

A FEHÉRJESZINTÉZISSEL KAPCSOLATOS ÚJABB EREDMÉNYEK

STRAUB F. BRUNÓ. r. tag

Előadta a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Csoportjának

1956. évi nagygyűlésén, május 31-én

Biokémiai ismereteink haladása tükröződik abban, hogy az utóbbi időkben lehetővé vált a lebomlások tanulmányozása mellett az élő anyagainak felépítését is nyomon követni. Elsősorban a módszerek ugrásszerű fejlődése tette lehetővé, hogy a bioszintetikus folyamatok tényének megállapítása mellett napirendre került ezeknek a szintetikus folyamatoknak elemzése, mechanizmusuk vizsgálata is. Az e téren, a közelmúltban megismert tények, mint a zsírsavak és szteránvázas vegyületek szintézis-mechanizmusainak felderítése, vagy a fotoszintézis széndioxidfixálási mechanizmusának megismerése, egészen meglepő új eredményeket jelentenek.

Jelentős segítséget adott a bioszintetikus módszerek tanulmányozásához a radioaktív izotópok széleskörű felhasználása a biokémiában. Így előállt az a sajátságos helyzet, amiben a modern biokémia a klasszikus biokémiától lényegesen különbözik, hogy ma már olyan anyagok bioszintézise is tanulmányozható, melyek szerkezetéről még pontos képünk nincsen. Régebben az élő szervezetben előforduló egyszerűbb anyagok szerkezetének megismerése után vetődhetett csak fel keletkezésük problémája. Ezzel szemben a nukleinsavak és a fehérjék bioszintézisére vonatkozólag számos adat áll már rendelkezésünkre és remélhető, hogy a nukleinsavak és a fehérjék bonyolult felépítésének megismeréséhez éppen bioszintézisük tanulmányozása lényeges adatokat szolgáltat.

A fehérjék és a nukleinsavak keletkezésének vizsgálata azonban elsősorban azért áll az érdeklődés homlokterében, mert ezek az anyagok alkotják a lényegét a múlt században fehérjekomplex néven ismert élő anyagnak, melyre az élet jellemző tulajdonságai visszavezethetők. Mint látni fogjuk, a két probléma egymástól nem igen választható el. Azt hiszem felesleges hangsúlyozni, hogy a fehérjék és nukleinsavak bioszintézisének tanulmányozása a sejtek szaporodása, a mikrobiológia, vírusológia, onkológia, de a hormonok hatásmechanizmusának megértése szempontjából is milyen széles perspektívákat jelent. Ennek megfelelően a kérdés tanulmányozásának nehézségei is igen nagyok és számolni kell azzal, hogy sok csalódás, téves út és helytelen általánosítás vár azokra, akik erre a területre merészkednek.

I.

Mit tudunk ma a fehérjék bioszintéziséről?

Egész élő szervezetek, vagy ép sejtek, ha tápanyagaikhoz C^{14} izotóppal megjelölt aminosavakat adunk, ezeket a megjelölt aminosavakat beépítik szervezetükbe, s egy idő után fehérjékben — természetesen változó arányban — ezek a jelölt aminosavak megtalálhatók. Ezt a jelenséget tág értelemben „inkorporáció”-nak nevezzük. Megfelelő kontrollkísérletek szükségesek annak bizonyítására, hogy adott kísérleti körülmények között ennek az inkorporációnak mennyiben felel meg fehérjeszintézis. Sok esetben igazolható, hogy az inkorporáció ténylegesen fehérjeszintézist jelent és ilyen esetekben az inkorporáció sebességének mérésével a fehérjeszintézis sebessége mérhető. Így vizsgálni lehet azt is, hogy különböző behatások, az anyagszere megváltoztatása, gyógyszerek, antibiotikumok stb. hogyan befolyásolják a fehérjék szintézisét. Hangsúlyozni kell, hogy az inkorporáció egyes esetekben a fehérjék szintézisétől függetlenül is bekövetkezhetik.

Radioaktív aminosavak inkorporációjának mérésével gyakorlatilag eldönthető volt az az évek óta vitatott probléma, hogy a fehérjék egymásba át tudnak-e alakulni, más szóval, hogy polipeptidek, peptidek felhasználhatók-e egy új fehérjemolekula képződéshez, vagy a másik alternatíva igaz-e, hogy minden újonnan képződött fehérjemolekula szabad aminosavak felhasználásával, mint mondani szokás „de novo” képződik-e. A vizsgálatok a „de novo”-elméletet igazolták. Igen érdekesek erre vonatkozólag *Velick* és munkatársainak (1) vizsgálatai.

A „de novo” szintézis alapján újra felmerült az a kérdés, hogyan kell értelmezni *Schoenheimer* klasszikus kísérleteit. Még a radioaktív aminosavak alkalmazása előtt, a tömegspektrográffal meghatározható nehéz nitrogén alkalmazásával *Schoenheimer* és munkatársai arra az eredményre jutottak, hogy a szervezet fehérjéi nem állandóak, állandóan folyik új fehérje szintézise a szervezet minden részében. Kezdetben ezt az eredményt úgy értelmezték, hogy a fehérjék részlegesen is meg tudnak újulni. Ez a felfogás ellentétben áll a „de novo” szintézis elméletével. Ma még nem világos, hogy mi a fehérjék dinamikus állapotának helyes értelmezése. Meg kell azonban említeni egy érdekes adatot, amelyet a legújabb időben nyertek. *Monod* és munkatársai (2) Párisban hosszabb ideje foglalkoznak *E. coli* törzsekben észlelhető indukálható β -galaktózidáz képződéssel.

*Monod*ék kísérletének a lényege az, hogy mielőtt a baktériumokat β -galaktózidáz szintézisére indukálták, izotópként, S^{35} -t tartalmazó táptalajba helyezték és gondoskodtak arról, hogy a táptalaj egyébként kéniszegény legyen, tehát a fehérjeszintézist a kén limitálta, másrészt az S^{35} közel teljesen beépült a baktérium fehérjéibe a kísérlet folyamán. Ezután izotópmentes közegben

β -galaktozidáz szintézist indukáltak, majd igen finom módszerekkel a baktériumokból előállították a tiszta β -galaktozidázt. Arra a jelentős eredményre jutottak, hogy a baktériumok egyik fehérjében levő kénizotóp a β -galaktozidázban nem volt megtalálható. Tehát ezekben a baktériumokban a meglévő fehérjék alkatrészei nem használódtak fel az indukció hatására keletkező fermentfehérje szintéziséhez, az új fehérje szabad aminosavakból képződött, nincs szó a fehérjék dinamikus állapotáról, nincs állandó fehérjemegújulás, hanem csak szövet vagy sejtmeújulás, vagy környezeti hatásra új fehérje képződése.

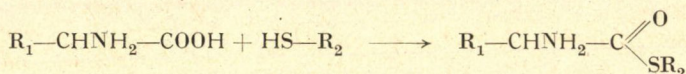
A fehérjeszintézisre vonatkozó tudásunknak egy harmadik részletkérdéséről kell még megemlékezni, a fehérjeszintézis és a nukleinsavak közötti összefüggésről. Ez a biokémiának spekulációkban leggazdagabb területe és számos nézet, amely tankönyvekben is szerepel, csupán a spekulációk szilárd talaján alapszik. Mindenesetre abban ma már a kísérletes adatok alapján egyöntetű a vélemény, hogy a dezoxiribonukleinsavak és a fehérjék szintézise között direkt összefüggés nincs. Ribonukleinsavak jelenlétére azonban úgylátzik feltétlenül szükség van, de kérdéses, hogy a ribonukleinsavak radioaktív izotópokkal vizsgálható megújulása és a fehérjék szintézise között van-e összefüggés.

Jelenlegi ismereteink alapján kialakultak elképzelések a fehérjeszintézis mechanizmusára vonatkozólag is. A „de novo” elmélet alapján fel kell tételezni, hogy a sejtben van egy specifikus felület, az ún. templát, amelyre az aminosavak olyan meghatározott sorrendben adszorbeálódnak, ahogy azt a fehérje polipeptidláncban elfoglalt helyük meghatározza, tehát a felület specifikus. Feltehetőleg az aminosavak valamely energiadús állapotban adszorbeálódnak, valószínűleg acilaktiválás után. Az ilyen aktivált aminosavak azután már minden energiabefektetés nélkül képezhetnek a specifikus felületen peptidkötéseket. Semmi elképzelésünk nincs arra vonatkozólag, hogy a templát felületén keletkezett polipeptidlánc hogyan válik le a felületről és hogyan alakul ki a polipeptidláncból a fehérjemolekula jellemző térszerkezete. Feltételezik általában, hogy ez a templát felület egy bizonyos nukleinsavat jelent, amelynek kémiai felépítése olyan, hogy pontosan egy bizonyos specifikus fehérje szintézisére alkalmas. Erre az azonosításra természetesen bizonyíték még nincs.

Mindezeket a gondolatokat egész szervezetekben vagy izolált ép sejtekben, esetleg szövetmetszetekben, radioaktív izotópok segítségével végzett vizsgálatok magyarázataként írták le. Az ilyen vizsgálatok nagy lehetősége, hogy a bonyolult reakciókat, melyek a sejt egészében gyorsan végbemennek, követni lehet, de hátránya, hogy éppen a teljes komplexitás miatt nem lehetséges a részletfolyamatok megfigyelése és ennek következtében a folyamat mechanizmusára vonatkozóan csak nagyon spekulatív, bizonytalan következtetéseket lehet levonni.

A biokémia haladása során mindig nagy eredményeket szolgáltatott az a módszer, hogy az egyes integrált folyamatok tanulmányozása céljából az élő anyag alkotórészeit egymástól elkülönítve izolált reakciók alakjában tanulmányozta. A részletfolyamatoknak ez az analízise tette csak lehetővé, hogy a fermentáció és az oxidáció teljességét és összefüggését ma már valahogy el tudjuk képzelni. Ennek az elvnek a fehérjék bioszintézisének tanulmányozására való alkalmazása annyit jelent, hogy a folyamat lényegének megértéséhez szükséges a komplex jelenséget az egyes részfolyamatokra felbontani és azokat külön-külön tanulmányozni.

A radioaktív izotópok alkalmazásával két olyan megfigyelés áll rendelkezésünkre, amely bizonyos mértékig a részletfolyamatok megértéséhez segíthet. *Siekevitz* és *Hessin* (3,4) kimutatták, hogy a szervezetbe adott radioaktív aminosav, ha az állatokat különböző idő eltelte után feldolgozzuk, legelőször a májsejtek ún. mikroszóma frakcióiban jelenik meg, amiből arra következtethetünk, hogy ez a ribonukleinsavakban különösen gazdag sejtorganelum lenne a plazmafehérjék szintézisének helye. A másik adat egészen friss: ez évben jelent meg *Hoagland* és munkatársainak közleménye, amelyben leírják, hogy a májszövetből elkülöníthető egy olyan fermentkeverék, amely a természetes aminosavak acilaktiválását, tehát energiadús állapotba vitelét képes katalizálni. Ez a reakció, mint fentebb említettük, a fehérjeszintézis bevezető lépése lenne.



Ezeket az ismereteket legnagyobb mértékben szükségszerűen olyan körülmények között nyerték, amikor a fehérje mennyiség megszaporodását nem lehetett észlelni, hanem egyensúly állapota állott fenn és csupán a lebomlott élő anyag pótlására felépülő új fehérjemolekulák radioaktív aminosavtartalma szolgálhatta a mérés alapjául. Tekintettel arra, hogy az ilyen méréseknek számos ismert nehézsége van, célkitűzésünk először az volt, hogy olyan rendszert, olyan objektumot találjunk, amelyen sejtmentes közegben valamely fehérje netto szintézise is mérhető radioaktív aminosavak incorporációjának mérése mellett. A sejtmentes preparátumok előnye kettős: egyrészt megszűnnek a permeabilitási gátak által okozott nehézségek, tehát nagyobb molekulák hozzáadásával is lehet kísérletezni, másrészt pedig lehetővé válik az egyes komponens elválasztása.

Három irányban végeztünk kísérleteket a fenti célkitűzés megvalósítására. Az egyik vizsgált objektum mikrobiológiai volt, penicillinre érzékeny sejteken vizsgáltuk a penicillin hozzáadására meginduló penicillináz ferment képződését. A másik két objektum állati szövetből való: vizsgáltuk a patkány- és egérmájban a triptofán hatására meginduló triptofánperoxidáz ferment aktivitásnövekedését, másrészt pedig különböző állatfajoknál a pancreasban végbemenő amiláz szintézist.

II.

Először a penicillináz képződésére vonatkozó vizsgálatokkal foglalkozom. Bár ez az objektum nem váltotta be a fenti célkitűzésekben foglalt reményeket, a vizsgálat során olyan jelentős és érdekes adatokat nyertünk, amelyek a fehérjeszintézisre vonatkozó elképzeléseink kialakításában nagy segítséget adnak. A vizsgálatokat *Kramer Miklós* aspiránsmunkája során végezte, s ezekről értekezését a közelmúltban zárta le. Mivel ez teljes egészében nemsokára vitára kerül, csak két részletkérdést ragadok ki az eredményekből.

Pollock (5) vizsgálataiból ismeretes, hogy *cereus* baktériumok bizonyos törzsei, minimális mennyiségű penicillinnel történő kezelés után, megfelelő táptalajon tartva, rövid idő múlva intenzíven képeznek egy penicillinbontó fermentet, a penicillinázt. Megállapította, hogy a penicillin 1—2 perc alatt elbomlik (mesterségesen is eltávolíthatjuk néhány perces kontaktus után) s mégis, mintegy 20—30 perc latencia idő után megindul a penicillináz szintézise. Mi történik a fehérjeszintézis előtti latencia periódusban? *Kramer* vizsgálataiban megállapította, hogy ennek a periódusnak az időtartama, egyébként azonos körülmények között tartott baktériumok esetén, lényegében a nukleinsavszintézis sebességétől függ, tehát ez az idő arra szükséges, hogy a penicillinnel történt kontaktus hatására a baktériumsejtekben szintetizálódjék egy olyan specifikus új ribonukleinsav, amely azután előfeltétele a megfelelő specifikus fehérjeszintézisnek. Ennek a megállapításnak a következő két egyszerű bizonyítékát szeretném megemlíteni.

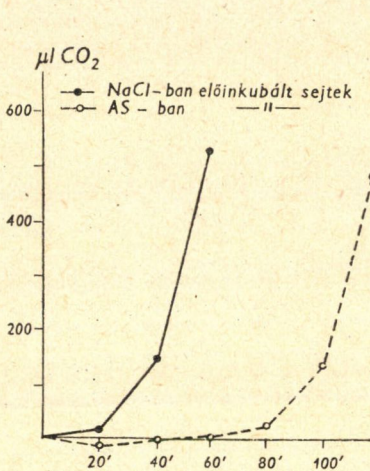
8 órás tenyészetből származó sejteket fiziológias konyhasóoldattal megmosunk, majd két részre osztjuk, egyik részét egy aminosavkeveréket tartalmazó elegyben inkubáljuk, másik részét egyszerűen konyhasóoldatban. Az előinkubálást csak annyi ideig végezzük, hogy a baktériumszám ne növekedjék. Ezután az eddigi szuszpendáló elegyet mosással eltávolítjuk, majd a mosott baktériumokat aminosavkeveréket tartalmazó táptalajban penicillinnel inkubáljuk. Azt látjuk, hogy a latenciaperódus lényegesen hosszabb azon baktériumok esetén, amelyek előzetesen aminosavkeverékben voltak.

A jelenség első pillanatra paradox, de az irodalomból ilyen jelenség már ismeretes: *Spiegelmann* kimutatta, hogy aminosavkeverékben inkubált (növekedő) mikroorganizmusokban a ribonukleinsav szintéziséhez szükséges anyagok (prekurzorok) elhasználódnak. Tehát a jelenség értelmezése az, hogy az aminosavval előinkubált sejtekben sokkal kevesebb a ribonukleinsav prekurzor abban a pillanatban, amikor a penicillin ingere arra készíti őket, hogy új fehérjéhez új ribonukleinsavakat szintetizáljanak.

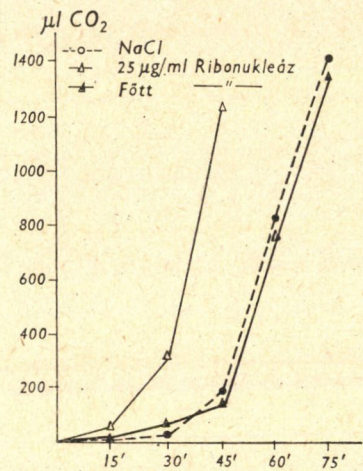
A fenti kísérlet alapján érthetővé válik a következő még furcsább jelenség. A sejteket kis mennyiségű kristályos ribonukleázzal előkezeljük s ezután, — eltávolítva a ribonukleázt, — adjuk hozzá a penicillint, aminosavakkal együtt: ilyenkor a latenciaperódus a kontrollhoz viszonyítva rendkívüli

mértékben lerövidül a ribonukleázzal kezelt sejteknél. (Meg kell említeni, hogy a ribonukleáz, — az itt alkalmazottnál kisebb mennyiségben is — teljesen legátolja a ferment képződését, ha a penicillinkezelés *után* adjuk a sejtekhez.) A ribonukleáz a sejt meglévő ribonukleinsavainak lebontásával, az előkezelés során a ribonukleinsav prekursorok koncentrációját növeli s így az új ribonukleinsav szintézis feltételei kedvezőbbek lesznek, ezért rövidül meg itt a latenciaperiódus.

Le lehet rövidíteni a latenciaperiódust prekursorokban elszegényedett sejtek esetén akkor is, ha a sejteket olyan elegyben szuszpendáljuk, amely a



1. ábra. Aminosavkeverékkel történő előinkubálás hatása a *B. cereus* sejtek penicillináz termelésére Ordináta: a penicillináz hatására keletkezett CO_2 mennyisége

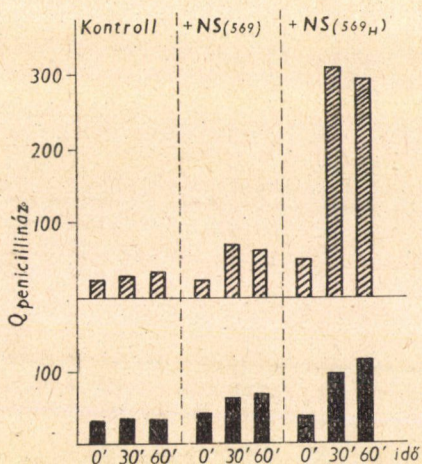


2. ábra. Ribonukleáz előkezelés hatása a *B. cereus* sejtek penicillináz termelésének megindulására

szokásos tápanyagokon kívül még purin és pirimidin bázisokat is tartalmaz. Hogy itt valóban ribonukleinsav szintézisről van szó, bizonyítja, hogy csak azok a bázisok hatékonyak, amelyek a ribonukleinsavakban szerepelnek, míg a dezoxiribonukleinsavakban előforduló timin hozzáadása teljesen hatástalan, inkább gátol.

Az előbbieken ismertetett eredmények biztatást adtak egy olyan kísérlet elvégzésére, amely eddig az irodalomban egészen ismeretlen. A sejteket ribonukleázzal kezeltük, majd a ribonukleáz kimosása után közvetlenül, — anélkül, hogy penicillinnel kezeltük volna őket, — olyan kivonatot adtunk a sejtekhez, amely különböző ribonukleinsavakat tartalmazott. A ribonukleáz kezelés felazítja a sejtek felületét és lehetővé teszi, hogy polimér ribonukleinsavak a sejtekbe bejuthassanak. Ribonukleinsavtartalmú kivonatokot lehet nyerni különböző sejtekből és szövetekből, ha azokat 1 M NaCl-al kezeljük. Ezeket a kivonatokot 20 perces főzésnek vetettük alá, ami a bennük levő fermenteket

(így a penicillinázt is) inaktíválta. Ilyen kivonatot készítettünk olyan *cereus* sejtekből, amelyeknek örökletes tulajdonsága, hogy minden penicillinkezelés nélkül állandóan tartalmaznak nagy mennyiségű penicillinázt (569 H törzs), másrészt olyan *cereus* sejtekből, amelyek az előbbivel teljesen azonos családba tartozó törzsből (569) származnak, amely azonban nem tartalmaz semmi penicillinázt. Kiderült, hogy a penicillinázt spontán képző sejtekből készített kivonat hozzáadására a RN-ázzal kezelt *cereus* sejtekben gyorsan megindul a penicillináz termelése, míg a teljesen hasonló, de penicillinázt nem képző *cereus* sejtek hasonló kivonata inaktív ugyanúgy, mint más ribonukleinsav-preparátumok.



3. ábra. Nukleinsavtartalmú kivonatok hatása *B. cereus* sejtek penicillináztermelésére, penicillinnel történő indukció nélkül

Ordináta: $Q_{\text{penicillináz}} = \text{CO}_2/\text{óra}/\text{mg}$ szárazanyag (penicillinbontásból eredő CO_2) — Felső sor: ribonukleázzal 1 M NaCl-ben előkezelt sejtek. — Alsó sor: 1 M NaCl-ban előkezelt sejtek. — Kontroll: 1 M NaCl adása. NS(569): indukálható, de penicillinázt nem tartalmazó *B. cereus* 569 sejtekből 1 M NaCl-al készült, felfőzött kivonattal. NS(569/H): penicillinázt konstitutíve termelő *B. cereus* 569/H sejtekből 1 M NaCl-al készült, felfőzött kivonattal

Könnyű valószínűsíteni, hogy a kivonatban ribonukleinsav a hatóanyag, mert kismennyiségű kristályos ribonukleázzal történő előkezelés után az aktív kivonat elveszti hatását.

Összefoglalva tehát: a jelenség lényege az, hogy olyan sejtekben, amelyek penicillinnel való érintkezés után képesek penicillináz képzésére, sikerült ezt az enzimeképződést megindítani *penicillinkezelés nélkül* olyan ribonukleinsav-preparátummal, amely penicillinázt képző sejtekből származik. A jelenség látszatra hasonló az Avery és munkatársai által először leírt transzformáció jelenségéhez, amit azóta számos más objektumon észleltek, de lényegében attól különbözik. A transzformáció dezoxiribonukleinsavval egy tulajdonság maradandó átvitelét jelenti. A Kramer Miklós által felfedezett jelenség pedig nem egy örökletes faktor átvitelét jelenti, hanem azonos sejtpopuláción belül fermentáció megindítását, specifikus ribonukleinsavval.

A penicillinázképződés tanulmányozása során megkíséreltük a ferment-szintézist sejtmentes közegben is megvalósítani. Ezek a kísérletek, amelyek eredeti célkitűzéseinknek megfeleltek, csak részleges eredménnyel jártak. — Igaz, a sejtek elroncsolásával elő lehet állítani olyan sejtmentes anyagot, amely még a penicillináz szintézisére képes, feltéve, hogy a sejtek roncsolását a penicillinkezelés után végeztük. De a *cereus* és a rokon *megatherium* sejtekből előállított ilyen sejtmentes anyag a *Weibull* által leírt protoplasztokból áll, ezekben megy végbe a fehérje szintézise és ezek a protoplasztok még mindig eléggé komoly struktúrát jelentenek. Másrészt ezekben a roncsolt sejtekben a ferment szintézise rövid idő múlva megáll és azután a ferment el is tűnik, másszóval ebben a preparátumban olyan erős a proteolízis, hogy kísérleti céljainknak egyelőre nem felel meg.

III.

Állati szövetekben is lehet találni az előbb tárgyalt indukált ferment-szintézishez közelálló jelenséget. *Knox* és munkatársai kimutatták, hogy egér vagy patkány májában, i. p. adott triptofán hatására a triptofánperoxidáz aktivitása 10-szeresére is megnő. *Jefimocskina* megállapította, hogy májszeletek *in vitro* triptofán hozzáadására hasonlóképpen a triptofánperoxidáz aktivitás 5–10-szeres növekedésével reagálnak. Feltételezik, hogy itt valóban indukált enzimszintézisről van szó, új fehérje ferment képződéséről (7,8).

Intézetünkben *Balázs Róbert*, *Benei László* és *Kánitz Éva* foglalkozott ezzel a kérdéssel. Kísérleteik megerősítik az eddigi kísérleti adatokat, de az egész jelenség értelmezésével kapcsolatban annyi kételyt vetettek fel, hogy adataik alapján valószínű, hogy itt nem ferment fehérje szintéziséről van szó, hanem egy inaktív formában jelenlevő ferment aktiválódása következik be. Elég annyit megemlíteni, hogy a triptofánperoxidáz tartalmú májkivonat papírelektroforézise során a fermentaktivitás néha több, mint 20-szorosára növekszik. Érdekes megemlíteni e vizsgálatok egy részletét. Ha *in vivo* végzik a kísérletet, 1,5–2 mg *cortison* előzetes adása után normális patkányoknál 2–3-szorosára nő a triptofánperoxidáz aktiválódása, míg mellékveseírtott patkányoknál, melyeknél igen gyenge a triptofánperoxidáz keletkezés, ugyanez a kezelés 10-szeres aktiválódást jelent. *In vitro* a *cortison*nak nincs hatása a triptofánperoxidáz aktivitás növekedésére indukció után. Bár, mint említettem, az alapvető kérdés még nincsen tisztázva, úgy látszik, hogy hormonhatások vizsgálatára ez az objektum alkalmas lehet.

IV.

A harmadik objektum, amelyre kísérleteink irányultak, a *pancreas* amiláz keletkezésének vizsgálata. Ennek előnye, hogy gyorsan és nagy mennyiségben képződik *in vivo*. A szekretorikus enzimek közül azért választottuk az amilázt,

mert ennek mennyisége a legnagyobb és meghatározása a legpontosabban vihető keresztül. *Hokin* (9) még 1950-ben leírta, hogy galambpancreas metszetekben *in vitro*, ha a szuszpendáló folyadék a szükséges aminosavakat tartalmazza, az amiláz aktivitása óránként kb. 50%-kal nő és ez a növekedés valószínűleg a fermentfehérje szintézist jelenti.

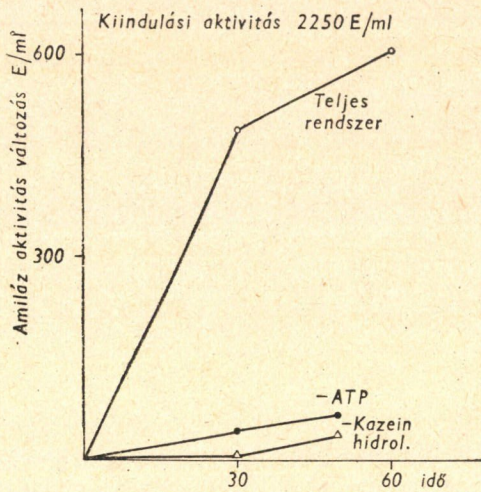
Ez a jelenség vizsgálataink szerint könnyen reprodukálható. Az amilázaktivitás növekedésének előfeltétele, hogy megfelelő aminosavkeverék jelenlétében ép sejtek legyenek jelen és szükséges az is, hogy a sejtek aerob anyagcseréje, energiatermelése zavartalan legyen. Így pl. 2,4-dinitrofenol, amely ismert módon az oxidatív foszforilálás megzavarásával lehetetlenné teszi az energia felhasználását, meggátolja az amilázaktivitás növekedését éppenúgy, mint az anaerobiozis. Egy komoly technikai nehézség van ezekkel az *in vitro* szövetmetszet kísérletekkel. Ismeretes, hogy a pancreasban a szekretorikus enzimek nincsenek szabad állapotban, hanem jelentős mennyiségük a zymogén granulomokba zárva, fermentatív inaktív formában található. A zymogén granulomok feltárása, amit pl. butilalkohollal el lehet érni, az amilázaktivitás növekedését idézi elő anélkül, hogy ehhez fermentszintézisre lenne szükség. Ilyen módon tehát nem könnyű eldönteni azt a kérdést, hogy az amilázaktivitás *in vitro* bekövetkező növekedése nem egy kioldódás eredménye-e.

Igaz, hogy a *Hokin* kísérleteiben észlelt és általunk is megerősített energia- és aminosavszükséglet a szintézis ténye mellett szól, a bizonyítás azonban így még nem százszázalékos. Ugyanezzel a nehézséggel küzdöttünk akkor is, amikor első ízben sikerült sejtmentes homogenizátumban az amilázaktivitás növekedését megvalósítanunk. *Ullmann Ágnessel* végzett kísérleteinkben, melyekről az elmúlt két év alatt kétszer is beszámoltunk, kimutattuk, hogy a galambpancreas homogenizátumban, valamint az ebből differenciálcentrifugálással elkülönített ún. „mitochondrium”-frakcióban bekövetkezik az amilázaktivitás növekedése, ha nagyobb koncentrációjú adenzintrifoszorsav (ATP) hozzáadásával gondoskodunk a megfelelő mennyiségű felhasználható energiáról, valamint aminosavkeverék hozzáadásával gondoskodunk megfelelő aminosavkoncentrációról. Kísérleteink azt mutatták, hogy ez a granulomfrakcióban észlelhető amilázaktivitás-növekedés már független az anyagcserétől, nem gátolható anaerobiozissal vagy dinitrofenollal, másrészt azonban gátolható kis koncentrációjú *chloramphenicol* vagy diaminoakridinnel.

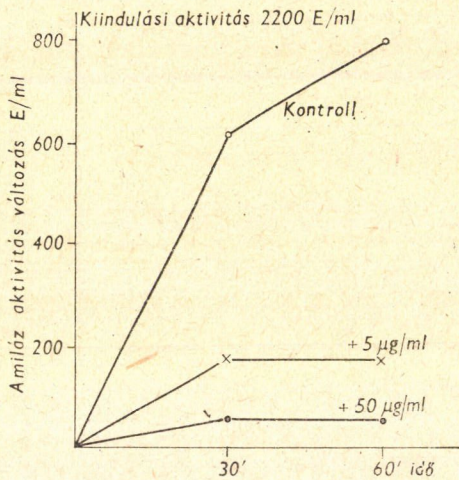
Ezek elég komoly bizonyítékok arra vonatkozóan, hogy lényegében fermentszintézis és nem szekréciós granulomok szétesése megy végbe. Azért mondom, hogy lényegében, mert tapasztalataim szerint sok esetben a gátlószerek nem adnak 100%-os gátlást, s ez a maradék aktivitás-emelkedés kioldódásnak, fermentaktiválódásnak tulajdonítható.

Intézetünkben *Szabó Mária* és *Perl Katalin* végeztek vizsgálatokat arra vonatkozóan, hogy a galambmájhomogenizátum kevés szekréciós granulát is tartalmazó mitochondrium frakciójában mik a feltételei az amiláz szintézis-

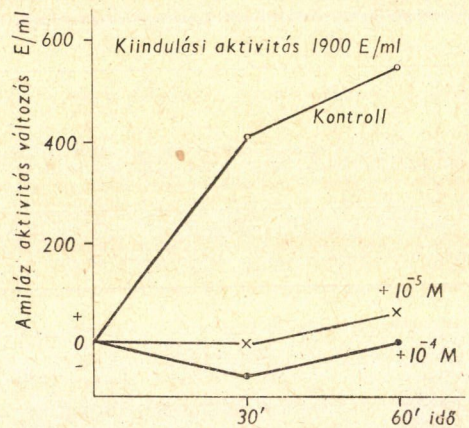
től független aktiválódásnak. Úgy látszik, hogy elsősorban a pH lúgos irányban való eltolódása okozhat ilyen aktiválódást. A fentebb említett feltételek



4. ábra. Amilázaktivitás növekedés galambpancreasból izolált „mitochondrium” frakcióban. Teljes rendszer: „mitochondrium” frakció + ATP 8 mg/ml + kazeinhidrolízátum 4 mg/ml + Krebs-Ringer sóoldat



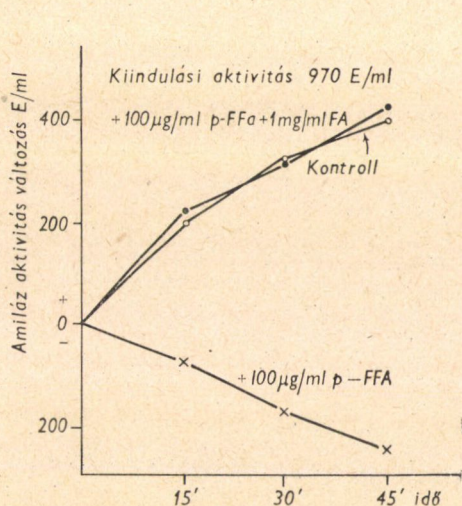
5. ábra. 3,6-diaminoakridin hatása az amilázaktivitás növekedésére galambpancreas „mitochondrium” frakció jelenlétében. — Kontroll: mint 4. ábra esetén. Diaminoakridinkoncentráció a görbén feltüntetett



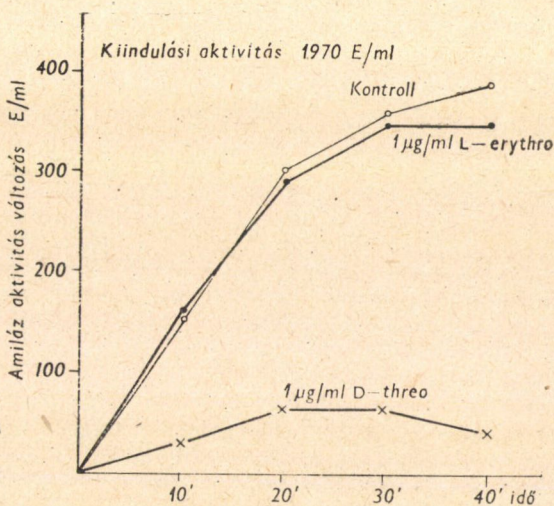
6. ábra. Chloramphenicol hatása a galambpancreas „mitochondrium” frakció amilázaktivitásnövekedésére. — Kontroll: mint 4. ábra teljes rendszere. Chloramphenicol a görbéken feltüntetett koncentrációban

között részben az ATP erős pufferhatása, részben az ATP bomlása következtében fellépő enyhe savanyodás miatt ez a lehetőség nem áll fenn. Másrészt a szekrécións granulák szétesése chloramphenicolal nem gátolható.

Mindenesetre a felmerülő problémák miatt célszerűnek látszott egy lépéssel továbbmenni és az amilázszintézis vizsgálatára olyan módon feltárni a pancreast, hogy ezek a subcellularis granuláris struktúrák se legyenek jelen. Sikerült ezt a célt azáltal elérni, hogy a friss pancreaszövetet -10°C acetonnal gyorsan megszárítjuk és ennek a száraz pornak 5 térfogat vízzel készült vizes kivonatát használjuk. A kivonás után a keveréket 10'-ig 0° -on 14 000 g-vel centrifugáljuk. A felülúszó folyadék ATP és aminosavkeverék jelenlétében az amilázaktivitás növekedését mutatja, de nem tartalmaz már kötött



7. ábra. p-Fluorfenilalanin hatása disznópancreasból készült oldható rendszerben. — Kontroll: mint 4. ábra esetén, de mitochondrium helyett acetonpor kivonata. Adalékok a görbén feltüntetve: FFA = D, L-fenilalanin, p-FA = D, L-p-fluorfenilalanin



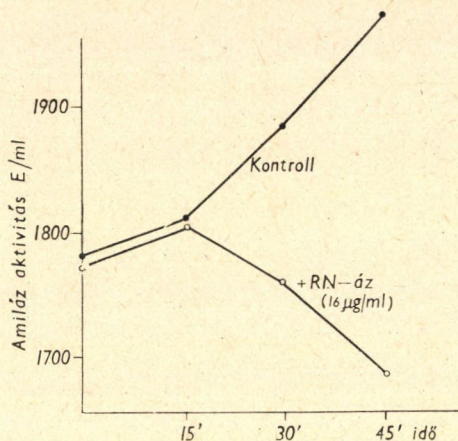
8. ábra. Oldható rendszerben (disznópancreas acetonpor vizes kivonata) a chloramphenicol-gátlás stereospecifitása. — Kontroll: teljes rendszer, mint a 4. ábránál. L-erythro: l-erythro-chloramphenicol, D-threo: D-threo-chloramphenicol

amilázt, amit bizonyít, hogy sem lúgosítással, sem butilalkoholos kezeléssel az amilázaktivitás már nem növekszik. Éppen ezért ebben a rendszerben a gátlószerek már teljes gátlást idéznek elő, sőt a proteolitikus fermentek kiszabadulása miatt, ha specifikusan gátoljuk az amilázaktivitás növekedését, akkor sok esetben az inkubáció során az amilázaktivitás csökkenését lehet megfigyelni.

A 7. és 8. ábra mutatja, hogy p-fluorfenilalanin és chloramphenicol gátolják ebben a rendszerben az amilázaktivitás növekedését. Ami érdekes, de várható is volt, az az, hogy az antibiotikumok ebben a struktúramentes rendszerben sokkal kisebb koncentrációban hatékonyak, mint a homogenizátumból nyert mitochondriumrendszer esetében. Ez arra mutat, hogy itt már valóban nincsenek permeabilitási nehézségek. Érdemes megemlíteni, hogy ebben a vízdoldékony rendszerben az idegen fajú állatból készített kristályos ribonuk-

leáz hozzáadására a fermentszintézis gátlása következik be, ami arra mutat, hogy itt is polimér ribonukleinsav jelenlétére van szükség a fehérjemolekula szintéziséhez.

Valóban végső bizonyítékát annak, hogy itt a fehérje aminosavból történő szintézise megy végbe, radioaktív aminosavak inkorporációjával lehetne megadni. Néhány tájékoztató kísérletet már végeztünk ebben az irányban (*Garzó és Perl*) és megállapítottuk, hogy az olyan kísérletben, amelyben az



9. ábra. Ribonukleáz hatása az amilázaktivitás növekedésére. Kontroll: teljes rendszer, disz pancreas acetonepor kivonattal. RN-áz: proteolitikus aktivitástól mentesített kristánó ribonukleáz hozzáadásával

amilázaktivitás növekszik, több radioaktív izotóp aminosav épül be a fehérjébe, mint olyanban, amelyben specifikus gátlószerszerrel, *chloramphenicol*l gátoltuk az amilázaktivitás növekedését. Sajnos rendszerünk egyelőre rendkívül labilis és így csupán 30–45 percig terjedő kísérleteket tudunk végezni, holott fehérjeszintézis vizsgálatára általában több órás inkubációs időket szokás alkalmazni. Eredményeinket mutatja az alábbi táblázat. Megjegyzendő, hogyha ki-

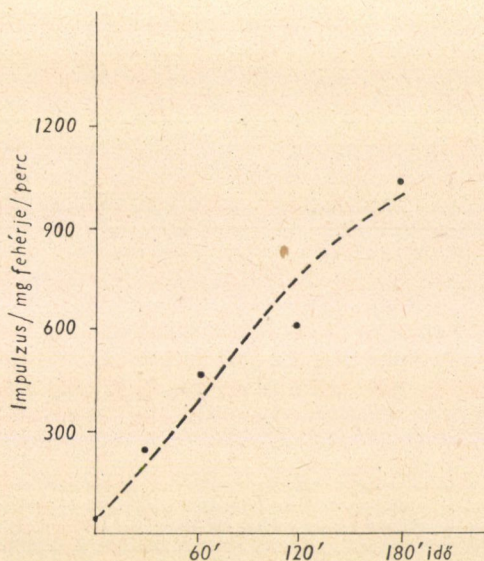
Táblázat

C^{14} aminosav inkorporáció kivonatban, 30' inkubálás után

Kísérlet	C^{14} aminosav	Imp/perc/mg fehérje	
1	tirozin	Kontroll +chloramphenicol	114 0
2	glikokoll	Kontroll +chloramphenicol	208 2
3	tirozin	Kontroll – ATP	66 21
4	tirozin	Kontroll +chloramphenicol	20 0

számítjuk, mennyi amilázfehérje képződött (az aktivitásnövekedés alapján) és kiszámítjuk, hogy mennyi izotóp glicin, ill. tirozin épül be, akkor azt találjuk, hogy a beépüléssel mért adat kb. $\frac{1}{10} - \frac{1}{4}$ része annak, amit a fermentaktivitás méréséből nyerünk.

Az eltérés szignifikáns, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy nemcsak az amiláz fehérjéje, hanem a jelenlévő többi fehérje is részesedik az észlelt inkorporációban. A kísérletekből tehát azt a következtetést kell levonni, hogy az adott kísérleti körülmények között nem az amiláz fehérje *de novo* szintézisé-



10. ábra. Izotóp-aminosav (tirozin- C^{14}) beépülése a galambpancreas metszet fehérjéibe

ről van szó. Felmerülhet természetesen az a gondolat, hogy a szintézis helyén adszorbeált aminosavak a rövid kísérleti periódus alatt nem tudnak egyensúlyba jutni a hozzátett megjelölt aminosavval. Ezt a gondolatot azonban megcáfolja az a tény, amit Garzó és Perl észlelt az utóbbi időben végzett kísérleteiben, hogy ti. galambpancreas metszetekben, — ahol a permeabilitási viszonyok kétségtelenül kedvezőtlenebbek, — a C^{14} tirozin hozzáadása után a fehérjébe történő inkorporáció nagy sebességgel és lineáris időgörbével következik be.

Ezek alapján tehát világos, hogy a mitochondrium preparátumban és a pancreas acetón-száraz-por kivonatában nem *de novo* szintézis folyik. Ezzel szemben a p-fluorfenilalaninnal és *chloramphenicol*al észlelt specifikus gátlás mutatja, hogy *peptidszintézis* szükséges az amilázaktivitás növekedéséhez — az akridin-gátlás egyfelől, a ribonukleáz-gátlás másfelől világosan bizonyítja, hogy *ribonukleinsav* felületén végbemenő folyamatról van szó. Így a kísérletek abba az irányba mutatnak, hogy az amilázszintézisnek ebben a végső fázisában

valamilyen prekursor fehérje átrendezése, vagy annak néhány aminosav hozzákapcsolódásával történő befejező szintézise megy végbe.

Az eddig elért eredmények alapján összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált esetekben jó kísérletes bizonyítékot sikerült szereznünk arra nézve, hogy a fermentek szintéziséhez specifikus ribonukleinsavra van szükség. Másrészt vizsgálataink során annyira jutottunk, hogy kísérletileg hozzáférhető objektumok vannak kezünkben, amelyekkel nemcsak a fehérjeszintézis részletfolyamatait tanulmányozhatjuk vízdékony rendszerben, hanem megvalósítható ezek elválasztása, megkísérelhető a specifikus nukleinsav elválasztása a ribonukleinsavak keverékéből.

IRODALOM

1. *Simpson M. V., Velick S. F.* : J. Biol. Chem. 208, 61 (1954).
2. *Hogness D. S., Cohn M., Monod J.* : Biochim. et Biophys. Acta 16, 99 (1955).
3. *Siekevitz P.* : J. Biol. Chem. 195, 549 (1952).
4. *Heszín R. B.* : Biochimija 19, 407 (1954).
5. *Pollock M. R.* : Brit. J. exp. Path. 31, 739 (1950).
6. *Spiegelmann S., Halvorson H. O., Ishai R. Ben.* : Amino Acid Metabolism, 129 (1955).
7. *Knox W. E.* : Brit. J. Exp. Path. 32, 462 (1951).
8. *Jefimocskina E. F.* : Biochimija 19, 68 (1954).
9. *Hokin L. E.* : Bioch. J. 48, 320 (1951), 50, 216 (1951).