

N- ϵ -³H-TRIMETIL-L-LIZIN FELVÉTELÉNEK VIZSGÁLATA NK/Ly ASCITES TUMOROS EGEREK SZERVEIBEN

LAPIS KÁROLY, az MTA levelező tagja, JENEY ANDRÁS, az orvostudományok kandidátusa, TYIHÁK ERNŐ, KOPPER LÁSZLÓ, SZARVAS TIBOR, BURSICS LÁSZLÓ, ÚJHELYI ESZTER és SZENDE BÉLA, az orvostudományok kandidátusa

Közlésre érkezett: 1976. V. 27.

Az élő szervezetekben kötött és szabad formában egyaránt előforduló N-metilezett, bázikus aminosavak (N- ϵ -metilezett lizinek, N^C-metilezett argininek, imidazol-N-metilezett hisztidinek) biológiai funkciójáról még nagyon keveset tudunk (Paik és Kim 1971; Tyihák és mtsai 1976a). A legtöbb ismeretünk — az utóbbi évek biológiai vizsgálatai alapján — az N- ϵ -metilezett lizinek közé tartozó N- ϵ -trimetil-L-lizinről (L-lizin-betain; TML) van. Előző kísérleteinkben azt észleltük, hogy TML kezelés hatására a daganatos és nem daganatos sejtpopulációk ún. „nyugvó” állapotban levő sejtjeinek egy része a DNS-szintézis, majd a sejtosztódás fázisába kerül (Szende és mtsai 1970; Kopper és mtsai 1971; Stotz és mtsai 1974). Másik jelentős megállapítás az, hogy a biológiai fehérje-metilezés termékeként szabadon is előforduló TML-ből a zsírsav-anyagszerében különösen fontos szerepet játszó karnitin képződik (Tanphaichitr és Broquist 1973; Cox és Hoppel 1973; Villanueva és Lederer 1975).

A TML sejtproliferációt fokozó hatásában szerepet játszó tényezők közelebbi megismerése céljából tanulmányoztuk a ³H-TML beépülését, megoszlását és átalakulását az NK/Ly ascites tumoros sejtekben.

A ³H-TML-el végzett eddigi vizsgálatok kimutatták, hogy az egerek i.p. kezelését követő első két órában a beadott TML 70%-a kiürül és ezen belül a 80% pedig változatlan formában a vesén keresztül választódik ki. A TML clearance értéke az inulinhoz közel álló, mely arra utal, hogy az a tubulusokból nem reabszorbeálódik (Löwer és mtsai 1974).

Anyag és módszer

Metilezett lizinek előállítása: 1,82 g L-lizin-hidrokloridot 18 ml vízben oldotunk és 660 mg bázikus réz-karbonát hozzáadása után keverés közben félórát 100 °C-on tartottuk. A reakcióelegyet lehűtöttük és 0 °C—5 °C között egyszerre becepegettünk 12 ml 10%-os nátrium-hidroxid oldatot és 3,78 g dimetil-³H-szulfátot (fajlagos aktivitás 258,2 mCi/mmól) 45 perc alatt. Ezután

további 4 órát kevertettünk ezen a hőmérsékleten. A reakcióelegyet 3×30 ml éterrel extraháltuk. A vizes fázist vízsugárvákuumban való szívatással étermentesítettük, majd Dowex 50 gyantaoszlopon vezettük át. Ezután 1000 ml vízzel mostuk a gyantaoszlopot, majd 2,5%-os ammónium-hidroxid oldattal eluáltuk — a rézionok a gyantán megkötődve maradtak. Az eluátumot 40—50 °C közötti hőmérsékleten vízsugárszivattyún bepárooltuk. 2,58 g sárga színű, olajos anyag maradt vissza, amelyet 3 ml vízben oldottunk és 2,9 g fumársav 50 ml alkoholos oldatának hozzáadásával a TML-fumarátot — egy éjszakai hűtőszekrényben való állás után — kiszűrtük. A nyert termék súlya: 1,85 g. O.p.: 142—145 °C. Fajlagos aktivitás: 221,35 mCi/mmól.

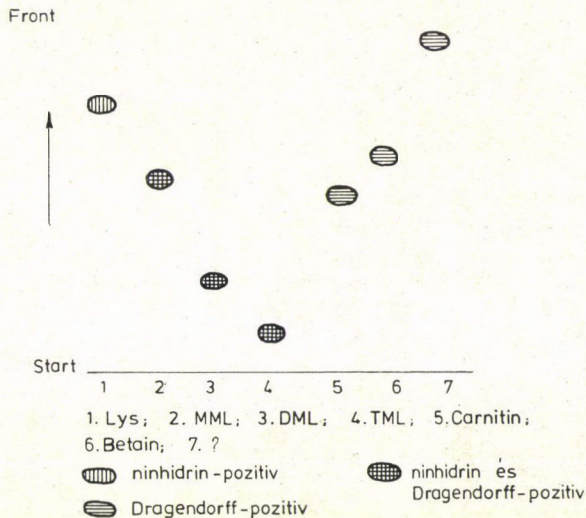
A nem radioaktív N- ϵ -metilezett lizineket [(N- ϵ -monometil-L-lizin HCl (MML), N- ϵ -dimetil-L-lizin HCl (DML), N- ϵ -trimetil-DL-lizin-2-HCl (TML)] szintézissel állítottuk elő (Puskás és Tyihák 1969; Benoiton 1964; Matsuoka 1972).

Az L-lizin HCl a REANAL Finomvegyszergyár (Budapest) és az L-carnitin HCl a PIERCE Chemical Co. terméke volt.

³H-TML vizsgálata sejtfrakciókban: NK/Ly ascites tumort 5×10^6 sejtszámmal i.p. transzplantáltunk CFLP nőtény egerekre, amelyeket préselt tápon (LATI) és csapvízen tartottunk. 8—10 nappal a transzplantáció után az állatokat 80 mg/kg ³H-TML-el, fumarattal i.p. kezeltük, amely 58,16 mCi/kg-nak felel meg. Kísérleteinkhez összesen 120 egeret használtunk, a vizsgált időpontokban csoportonként 4—7 egeret gáznarkózisban megöltünk. Az eltávolított szerveket (agy, máj, csontvelő) és a lecentrifugált tumorsejteket hideg, 0,9% NaCl oldattal mostuk és nedvessúlyukat meghatároztuk.

Minden szövetből 0,1 g/ml-es szuszpenziót készítettünk fiziológias NaCl-oldattal, illetve a cytoparticulumok előállításához 0,25 M szacharozval teflon fejes Potter-homogenizátorban. A tumorsejtekből Beckman L—2 ultracentrifugában differenciál-centrifugálással cytoparticulumokat állítottunk elő; további tisztítás nélküli magot 600xg-vel 10 percig, mitochondriumot 15 000xg-vel 20 percig, a mikroszómát 105.000xg-vel 60 percig ülepítettük. Kromatint és nukleoluszt *Bhorjee és Pederson* (1973) módszerével állítottunk elő. A homogenátumok és a cytoparticulumok feldolgozását *Scott* (1956) módszere szerint végeztük. A sorrendben hideg 0,5 N PCA-val (4 °C), alkohol-éter (3:1, v/v) elegyével, N NaOH—6 N HCl (5:1, v/v) elegyével, 0,5 N forró PCA-val (70 °C) és 0,1 N NaOH-val készített frakciók az alacsony molekulású anyagokat („poolt”), lipideket, RNS-t, DNS-t és fehérjéket tartalmazták. A radioaktivitását folyadék szcintillációs spektrométerrel (Beckman LS-100 C) mértük, toluol-2-etoxyetanol alapanyagú szcintillátor folyadékban, a dpm-re történő átszámítás a külső standard módszerrel történt (*Kopper és mtsai* 1976, *Higoshimura és mtsai* 1962). A fehérje-meghatározást *Lourey* (1951) módszerrel, míg a DNS-meghatározást *Burton* (1956) módszerével, az RNS-t pedig OD₂₆₀-on mértük.

Analitikai módszerek: A ³H-TML átalakulásának vizsgálatára az egyes szövet-frakciókat vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáltuk 0,25 mm vastag Kieselgel (G) rétegen, amelyen desztillált vizet futtató szernek használva a metilált lizinek elkülöníthetők egymástól (Tyihák és mtsai 1976). A 13 cm-es futás után megszáritott rétegről centiméterenként — a futás irányára merőlegesen — a



I. ábra: Metilált-lizinek elválasztása vékonyréteg-kromatográfián.

Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz. Lys: L-lizin-HCl, MML: N-ε-monometil-L-lizin, DML: N-ε-dimetil-L-lizin, TML: N-ε-trimetil-DL-lizin-HCl.

rétegsávokat lekapartuk és a rétegorok radioaktivitását szcintillációs spektrométerrel mértük. A rétegsávokat 2 ml vízben szuszpendáltuk és a szuszpenziós Aerosol MA tartalmú szcintillátoroldatba vittük, és a radioaktivitást szcintillációs spektrométerben mértük (Szarvas és mtsai 1971).

Más esetekben a radioaktivitást mutató metabolitok kémiai természetének jellemzésére a réteget ninhidrin-reagenssel (0,2 g ninhidrin 80 ml metanol és 20 ml 96%-os ecetsav elegyében +0,05 g CuSO₄ 5 H₂O; 100 °C-on melegítés 10 percig), vagy etilacetát tartalmú Dragendorff-reagenssel (Tyihák és Vág-ujfalvi 1970, Tyihák 1975) fújtuk be (1. ábra).

Eredmények

A ³H-TML aktivitásának eloszlása NK/Ly ascites tumoros egér különböző szerveinek frakcióiban

Az I. táblázat a radioaktivitás változását mutatja a ³H-TML kezelés utáni különböző időpontokban az NK/Ly ascites tumorsejtben és annak kémiai frakcióiban. Az egész sejt vizsgálatakor legnagyobb radioaktivitást a kezelés

utáni második órában észleltünk, ezzel szemben a DNS és a fehérje frakcióban a kezelés utáni 6. órában volt a maximális beépülés. A 48 órás megfigyelési idő alatt az egyes frakciók radioaktivitásának a csökkenése eltérő képet mutatott. A kezelés utáni 2. órától kezdve a hideg perklorásvval extrahálható ún. „pool” frakció állandóan csökkent, ugyanakkor a lipid frakcióban a 24. óra, a nuklein-

I. Táblázat

Radioaktivitás időbeli változása $^3\text{H-TML}$ -el kezelt NK/Ly tumoros sejtekben

Idő [órában]	0,5	2	6	12	24	48
Frakció						
Savban oldódó	4 893 000 ±1 731 360	14 311 960 ±1 731 360	2 214 580 ±727 500	738 320 ±96 500	392 760 ±61 750	158 360 ±24 726
Lipid	148 680 ±80 075	616 760 ±201 080	87 760 ±25 750	42 080 ±9 825	27 880 ±7 800	30 200 ±12 400
RNS	28 585 ±8 750	145 040 ±1 600	53 580 ±20 200	21 880 ±3 900	21 520 ±2 245	22 560 ±10 800
DNS	26 660 ±11 800	10 380 ±350	32 600 ±14 675	14 060 ±4 635	13 560 ±6 850	14 560 ±8 100
Fehérje	19 670 ±8 200	14 475 ±1 275	21 000 ±5 850	11 400 ±3 270	8 585 ±1 970	8 220 ±4 020
Összesen	5 116 595 ±1 930 000	15 098 615 ±1 927 505	2 409 520 ±240 750	827 740 ±96 500	464 305 ±54 000	238 900 ±46 200

Megjegyzés: 25–30 g súlyú CFLP nőstény egereket 5×10^6 NK/Ly ascites tumorról transzplantáltunk. 10 nappal később 80 mg/kg $^3\text{H-TML}$ -el i. p. kezeltük őket (részletesebben lásd Anyag és módszer fejezetben). Időpontként 4–6 állatból történt a radioaktivitás meghatározása. Eredményeket 1 g nedves súlyú tumorra vonatkoztatva dpm-ben fejeztük ki. ± = S. E.

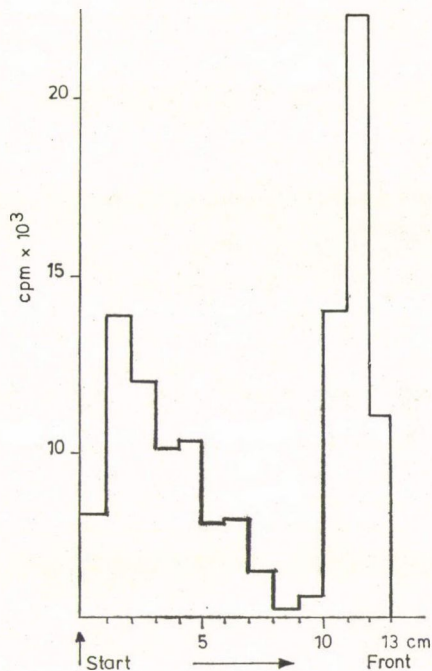
sav és fehérje frakciókban pedig 12. óra után már gyakorlatilag nem változott a radioaktivitás. A sejtekben levő radioaktivitás túlnyomó része a vizsgált időpontok mindegyikében a PCA-ban oldódó, ún. pool frakcióban található, tehát szabad formában, makromolekulához nem társult. A savban nem oldódó csapadékból az egymást követő kivonásokkal előállított lipidek, nukleinsavak és fehérjék a sejtben levő összes radioaktivitásnak egyre kisebb százalékát tartalmazzák. Ezért arra lehetne gondolni, hogy a TML a sejtekben kizárólag szabad formában van jelen és a makromolekulához csak adszorbeálódhatnak, így a TML-t csak szennyezésként tartalmazzák. A makromolekulákat tartalmazó frakciókban észlelt kis mennyiségű aktivitás azonban mégsem tekinthető kizárólag a savban oldódó frakció nem kielégítő eltávolítása miatti maradéknak, mivel a kezelési idő előrehaladtával a makromolekulához társult radioaktivitás viszonylagosan emelkedik, továbbá az egyes frakciók radiokromatográfiai vizsgálata eltérő szerkezethez tartozó radioaktivitásra utal (II. táblázat, 2, 3, 4, 5, 6. ábra).

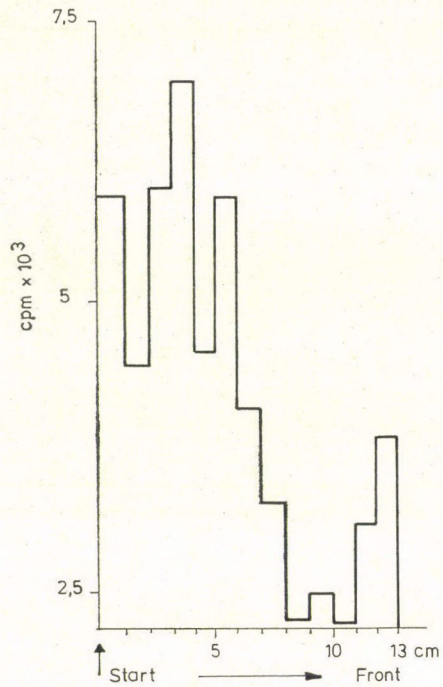
II. Táblázat

³H-TML százalékos megoszlása máj, agy, csontvelő és NK/Ly ascites tumor sejtfraekciói között

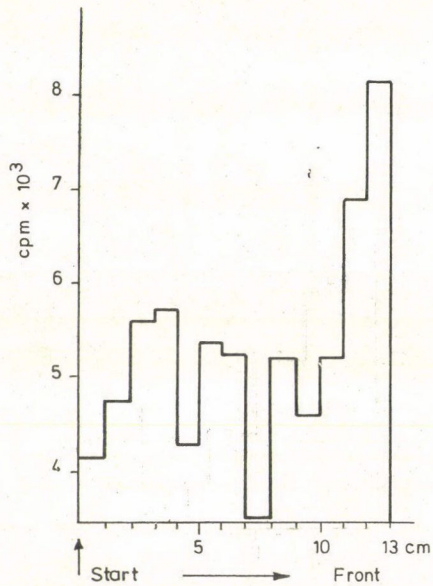
Szövet	Jelzési idő órában	Savban oldódó	Lipid	RNS	DNS	Fehérje	Összesen
Máj	0,5	96,13	3,10	0,43	0,08	0,20	100%
	2,0	95,50	3,15	1,10	0,10	0,10	100%
	6,0	93,64	4,88	0,59	0,23	0,60	100%
	24,0	91,26	6,32	0,88	0,24	1,21	100%
Agy	0,5	94,97	4,42	0,38	0,08	0,13	100%
	2,0	93,95	4,67	0,54	0,29	0,54	100%
	6,0	91,70	6,64	0,88	0,18	0,50	100%
	24,0	88,18	8,26	1,52	0,31	1,69	100%
Csontvelő	0,5	98,02	1,60	0,24	0,10	0,04	100%
	2,0	97,00	3,75	0,24	0,48	0,30	100%
	6,0	88,39	3,75	1,75	6,21	1,95	100%
	24,0	73,94	12,23	2,56	9,82	1,43	100%
NK/Ly tumor	0,5	95,66	2,89	0,55	0,52	0,38	100%
	2,0	94,78	4,11	0,96	0,06	0,09	100%
	6,0	92,00	3,53	2,22	1,33	0,92	100%
	24,0	84,55	6,00	4,65	2,93	1,87	100%

Megjegyzés: Kezelés és feldolgozás ugyanúgy, mint az I. táblázatban feltüntetett kísérletben

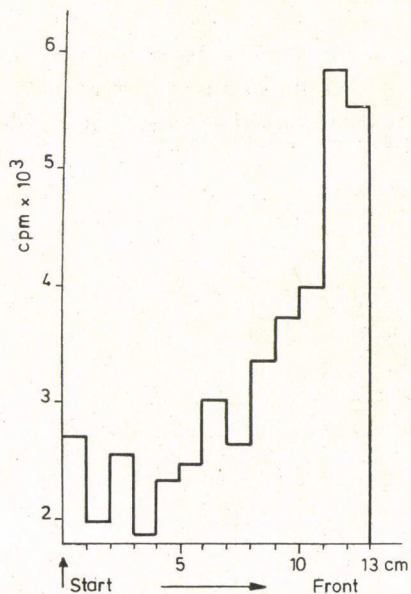
2. ábra: NK/Ly ascites tumorsejtek hideg Perklórsavas kivonatának rádiokromatogramja a ³H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kiesegel G. Futtatás: deszt. víz.



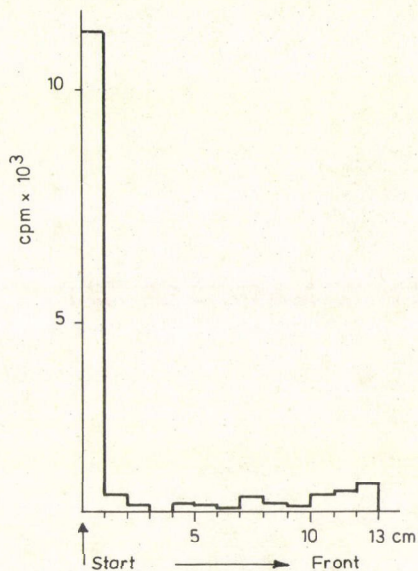
3. ábra: NK/Ly ascites tumorsejtek alkohol-éteres kivonatának rádiokromatogramja a ³H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.



4. ábra: NK/Ly ascites tumorsejtek RNS-t tartalmazó kivonatának rádiokromatogramja a ³H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.



5. ábra: NK/Ly ascites tumoros sejtek DNS-t tartalmazó kivonatának rádiokromatogramja a ³H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.



6. ábra: NK/Ly ascites tumoros sejtek fehérjét tartalmazó kivonatának rádiokromatogramja a ³H-TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.

A $^3\text{H-TML}$ közel azonos mértékben épült be a különböző szövetekbe. Jelentős eltérést csupán a vese és az agyszövet vizsgálatakor észleltünk, mivel az előbbiben nagyobb, az utóbbiban pedig kisebb volt a beépülés, mint a többi szövetben (máj, lép, tüdő). Az egyes szövetekből előállított frakciók közötti radioaktivitás-megoszlás tekintetében azonban a különböző szövetek eltérő képet mutattak, amely különösképpen két proliferáló (tumor, csontvelő) és két nem-proliferáló (máj, agy) összehasonlításakor szembetűnő.

III. Táblázat

*A radioaktivitás százalékos megoszlása a $^3\text{H-TML}$ -el *in vivo* kezelt NK/Ly ascites tumor cytoparticulumaiban*

Frakciók	Savban oldódó		Nukleinsav		Fehérje	
	1 óra	24 óra	1 óra	24 óra	1 óra	24 óra
Mag	0,99	3,2	4,2	25,8	16,8	35,5
Mitochondrium	5,30	3,6	35,0	33,9	16,7	30,7
Microsoma	0,77	1,9	30,5	27,7	21,9	19,1
Hyaloplasma	92,90	91,3	30,3	12,6	44,6	14,7
Összesen:	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Megjegyzés NK/Ly ascites tumoros egereket (CFLP 20—25 g nőstény) 10 nappal a transzplantáció után 80 mg/kg $^3\text{H-TML}$ i. p. kezeltük és a cytoparticulumokat az Anyag és módszer fejezetben leírtak szerint vizsgáltuk.

A II. táblázaton feltüntetett kísérleti adatok áttekintésekor látható, hogy a kezelési idő előrehaladtával a csontvelőben és az NK/Ly ascites tumorban jobban emelkedett a makromolekulákhoz (kötött) társult radioaktivitás relatív százaléka, mint a májban és az agyban. A máj- és agyszövet esetében a fehérje frakció, míg a csontvelőben és a tumorban a fehérje és a nukleinsavakat tartalmazó frakciók mutatták a legnagyobb mértékű relatív felhalmozódást. Különösképpen kiemelendő a csontvelő DNS-t tartalmazó frakciója, amelyben a radioaktivitás relatív tartalma 24 óra alatt közel százszorosára emelkedett.

A következő kísérletben megvizsgáltuk a szabad és kötött formában levő radioaktivitás megoszlását a differential centrifugálással előállított egyes cytoparticulumok között (III. táblázat). Az NK/Ly ascites tumor $^3\text{H-TML}$ kezelését követő 1. és 24. órában a savban oldódó frakció 91—93%-át a 105.000xg felülúszóban, tehát a hyaloplasmában találtuk. A fennmaradó 7—9% legnagyobb része a mitochondriumban volt, azonban ez nagyobb hányadot képviselt a kezelés utáni első órában, mint a 24. órában, mivel a mag és a microsoma savban nem oldódó radioaktivitása ezen megfigyelési idő alatt relatíve emelkedett. A forró perklórsavas frakció, amely az RNS-

és a DNS-t tartalmazza, az 1 órai kezelés után egyenlően oszlott meg a mitochondrium, mikroszoma és a hyaloplasma között és csak kis hányada (4,2%) volt a magban. Ez a megoszlás feltűnően megváltozott a kezelés utáni 24. órára, mivel a magban lényegesen emelkedett, a hyaloplasmában pedig csökkent a forró perklórsavval kivonható radioaktivitás relatív mennyisége. Hasonlóképpen a fehérjéhez társult radioaktivitás is eltérő megoszlást mutatott a ³H-TML kezelés utáni 1. és 24. órában; korai időpontban a hyaloplasma,

IV. Táblázat

Radioaktivitás időbeli változása ³H-TML-el kezelt NK/Ly ascites tumor nukleolus és chromatin nukleinsav frakcióiban

Idő	Nucleolus dpm/OD ₂₀₀	Chromatin dpm/OD ₂₀₀
30'	79,7 ± 23,9	138,0 ± 36,3
2 óra	136,5 ± 46,8	217,6 ± 38,7
6 óra	445,6 ± 60,8	329,6 ± 60,0
12 óra	396,2 ± 94,9	389,6 ± 33,0
24 óra	645,5 ± 84,7	100,0 ± 32,2

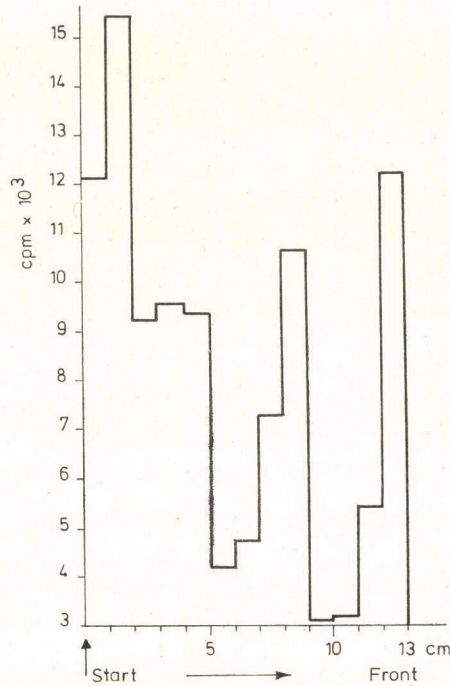
± = S. E.

a későbbiben pedig a mag tartalmazta a sejtben levő fehérjékhez társult radioaktivitás legnagyobb részét.

Mint hogy a sejtmag nukleinsav frakciója (forró PCA) mutatta a radioaktivitás legnagyobb mértékű relatív emelkedését (hatszoros), részletesebben tanulmányozni kívántuk a nukleolusz és a kromatin nukleinsav frakcióinak radioaktivitását különböző ideig tartó ³H-TML kezelés után (IV. táblázat). Megállapítottuk, hogy a kezelést követő 2. óráig a kromatin nukleinsav frakciójának specifikus aktivitása nagyobb, mint a nukleoluszé. A 6. órában azonban a nukleoluszban ugrásszerűen emelkedik a radioaktivitás és még a 24. órában is további emelkedés volt tapasztalható. Ezzel szemben a kromatin nukleinsav frakciója a 12. órában észlelt legmagasabb érték után a 24. órára már a 30 perces érték szintjére csökkent.

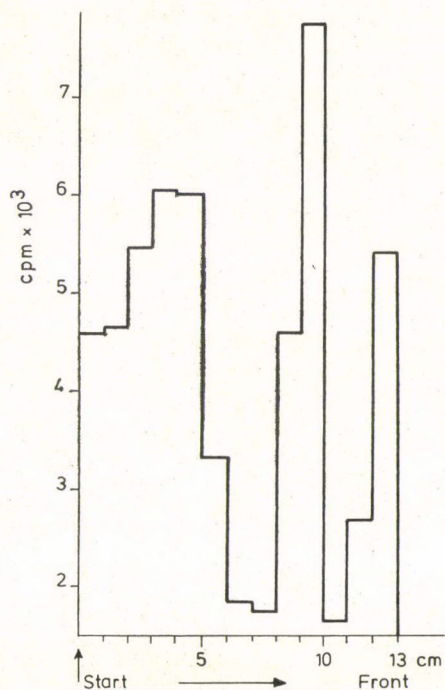
Továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a ³H-TML kezelés után az egyes sejtfrakciókban észlelt radioaktivitás a TML-ből vagy annak átalakulási termékéből származik. A TML és a vele rokon vegyületek kimutatására Kieselgel (G) réteget alkalmaztunk, amelyen desztillált vizes futtatással a lizin és a három N-ε-metilézett származéka jól elkülöníthető. Ebben a rendszerben a TML a start felett, a karnitin pedig 0,5 R_F értéknek megfelelő helyen jelentkezik. Egyébként az összes többi aminosav a rétegekromatográfiás rendszerben a rétegmegző felső harmadában helyezkedik el (1. ábra).

Megállapítottuk, hogy a savoldható frakcióban, mely a sejt összes aktivitásának 84—94%-át tartalmazza, ^3H -TML mellett nagy mennyiségben más vegyületek is kimutathatók, ezek közül feltűnőnek tartjuk azt, amelyik radioaktivitást 0,75—0,85 R_F értéktartományban mutat, továbbá Dragendorff pozitív és Ninhydrin negatív reakciót ad (2. ábra). A lipid, RNS és DNS

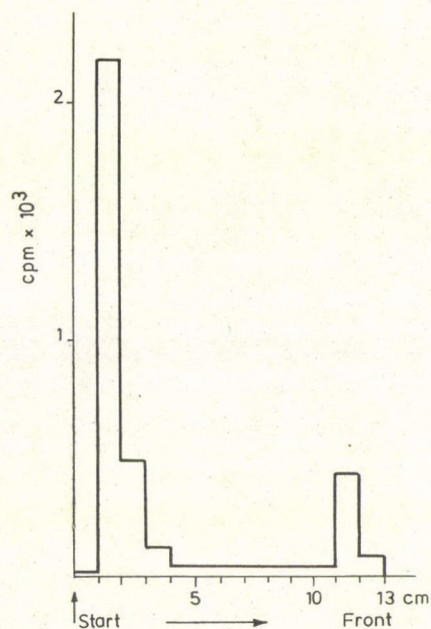


7. ábra: A sejtmentes ascites folyadék rádiokromatogramja a ^3H -TML kezelést követő 2. órában. Réteg: Kieselgel G. Futtatás: deszt. víz.

frakciók rétegekromatogramjai nagyon vátozatos képet mutattak, s a pontos azonosításokhoz további vizsgálatok szükségesek. A sejtek fehérje frakciójának lúgos vagy savas hidrolizátumában a radioaktivitás a TML-nek megfelelő helyen jelentkezett a radiokromatogramon (6. ábra). Az ascites folyadék, szérum és a vizelet vizsgálatakor a ^3H -TML változatlan formában kimutatható volt. Az ascites folyadékban és a szérumban a TML mellett egyéb radioaktivitást adó vegyületeket is találtunk, amelyek mennyisége meghaladta a TML-ét. Ezzel szemben a vizeletben a radioaktivitás elsősorban TML formájában található és a 0,18, ill. 0,85 R_F értékű átalakulási termékek csak kis hányadát képviselték a radioaktivitásnak (7., 8., 9. ábra). A vérszérum és a vizelet eltérő radiokromatogramja arra utal, hogy a TML metabolitjai sokkal jobban reabszorbeálódnak a vesékből, mint a TML.



8. ábra: Szérum rádiokromatogramja a ³H-TML kezelést követő 2. órában.
Réteg: Kieszelgel G. Futtatás: deszt. víz.



9. ábra: Víziet rádiokromatogramja a ³H-TML kezelést követő 2. órában.
Réteg: Kieszelgel G. Futtatás: deszt. víz.

Megbeszélés

Előző vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy TML kezelés utáni második órában az NK/Ly ascites tumorsejtek nukleolaris RNS szintézise fokozódik, a nukleoluszok megnagyobbodnak és számuk megnő. A DNS szintézis fokozódása a TML adagolás utáni 18., a mitózisok számának emelkedése pedig a 24. órában volt észlelhető (Szende és mtsai 1976).

A ^3H -TML-el végzett vizsgálatainkkal újabb adatokat kívántunk szerezni a sejtproliferációt stimuláló hatású TML hatásmódjára vonatkozóan.

A ^3H -TML átalakulásáról Löwer és mtsai számoltak be a közelmúltban (Löwer és mtsai 1972, 1974, 1975), akik azt találták, hogy emberekben az i.v. adott ^3H -TML jelentős része 2 óra alatt változatlan formában a vizelettel kiürül, ugyanakkor kutyában és egérben a MML és a DML nagyon jelentős katabolizmusát figyelték meg.

Jelen vizsgálataink, amelyeket a metil csoportban jelzett TML-el végeztünk, rámutatnak a TML gyors átalakulására és a radioaktivitás megoszlásának időbeli változására az egyes sejtfrakciókban.

A TML-ből származó radioaktivitás legnagyobb része (80—90%) a sejt hyaloplasmájában és szabad formában található. A TML fő átalakulási terméke Dragendorff pozitív és Ninhydrin negatív reakcióval jellemezhető, továbbá a metilezett lizinektől és a carnitintől eltérő R_F értéket mutat. Így feltételezhető, hogy a TML átalakulásában meghatározó szerepet játszó tényezők (enzim?) az $-\text{NH}_2$ csoport oldalán, előbb dezaminálással, majd az ún. β -oxidációval hasítják a molekulát, a kvaterner csoportot hordozó molekularész pedig érintetlenül marad. Több szerző hasonló megfigyelésről számolt be mikrobákon, állati és emberi szöveteken végzett vizsgálatok alapján (Tanphaichitr és Broquist 1973; Cox és Hoppel 1973; Villanueva és Lederer 1975; Löwer és mtsai 1975). Ezen átalakulási termékek valószínűleg igen reaktív jelleggel rendelkeznek s elképzelhető kötődésük a makromolekulákhoz vagy részvételük a biológiai metilezésben. Erre utal egyébként az, hogy míg a 48 órás vizsgálati periódusban a szabad formában levő radioaktivitás (savban oldódó frakció) a maximális értékről 1%-ra csökken, addig a makromolekulát tartalmazó frakciókban ez a csökkenés lényegesen kisebb mértékű (lipid = 5%-ra, RNS = 15%-ra, DNS = 45%-ra, fehérje = 39%-ra). Ez a különbség nem magyarázható kizárólag az egyes frakciók eltérő retineáló képességével vagy lebomlásával, mivel a DNS és a fehérje frakcióban a maximális beépülés később következett be, mint a savban oldódó frakció esetében. A sejtmag kromatin és nukleolusz nukleinsav-frakciójának a vizsgálata a metil csoportok kötődésének abszolút emelkedésére szolgáltatott bizonyítékot. Ezen adatok alapján arra lehet gondolni, hogy a hyaloplasmában szabad formában levő „TML-metabolitok” a kezelési idő előrehaladtával, bár elsősorban az extracellularis térbe jutnak, egy részük reakcióba lép a sejt különböző makromole-

kulával. Ennek következtében a makromolekuláris frakciók (lipid, nukleinsav, fehérje) az egész sejtben levő raktárak nagyobb hányadát képviselik a TML kezelés későbbi időpontjaiban, mint a korábbiakban. A cytopartikulumok vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a felhalmozódás, amely a hyaloplazma terhére történik, a sejtmag és mitochondrium fehérje frakciójában, de legkifejezettebben a sejtmag nukleinsav frakciójában érvényesül. Az egyes sejtfrakciókban észlelt radioaktivitás eltérő kromatográfiás viselkedése különböző TML metabolitokra, illetve különböző molekulákhoz való kötődésre utal. A lipid frakcióban a carnitin jelenlétét valószínűsíti a radiokromatográfiás kísérletben végzett megfigyelésünk.

Löwer és mtsai (1974) arra a következtetésre jutottak, hogy a TML a fehérjékbe nem épül be, illetve annak mértéke 1% alatt volt. Rövid idejű ³H-TML kezeléskor mi is igen alacsony radioaktivitást mértünk a makromolekulákat tartalmazó frakciókban. A kezelési idő előrehaladtával azonban már lényegesen megnőtt a sejtben levő ³H-TML-ből származó radioaktivitás kötött, tehát makromolekulákhoz társuló formában levő hányada.

Feltűnőnek tartjuk, hogy amikor a savban oldódó ún. „pool” frakcióban ³H-TML-t változatlan formában csak kis mennyiségben tudunk kimutatni, a fehérje frakciók savas vagy lúgos hidrolizátumának kromatogramja TML jelenlétére mutatott rá. Ennek okát pontosan nem ismerjük, a megfigyelés elemzésénél két lehetőséget kívánunk figyelembe venni: a) A sejtbe jutott TML kis hányadát a fehérjeszintetizáló-rendszer gyorsan hasznosítja, azaz a polypeptid láncba beépül, míg a TML molekulák nagy része metabolizálódik vagy változatlan formában kiürül. b) A TML kezelés után a TML metabolitok metilezik a már szintetizálódott fehérjék —NH₂ csoportjait. Mindkét lehetőségnél figyelembe veendő az, hogy a rétegekromatográfiás vizsgálatokat a 2. órában vett szövetminták kivonataival végeztük, s akkor a fehérje frakciókban csak TML-t találtunk. Lehetséges, hogy a fehérje frakcióknál tapasztalt elhúzódó beépülés viszont TML-metabolitok metilezésével állhat összefüggésben.

Bár vizsgálataink célját képezi, munkánk jelenlegi szakaszában nem tudjuk megállapítani, hogy a TML biológiai hatása az eredeti molekulának vagy átalakulási termékének tulajdonítható, továbbá hogy ez a hatás melyik sejtanyagcsere-út befolyásolásán keresztül jön létre. A TML proliferációt serkentő biológiai hatásával összefüggésben állhat az, hogy a gyorsan proliferáló esontvelő és tumorsejtek makromolekulái jobban visszatartják, illetve idővel többet építenek be a TML-ből, ill. annak metabolitjaiból, mint a nem-proliferáló máj- és agyszövet sejtjei. Ezen megfigyelés kapcsolatban állhat azzal, hogy a gyorsan proliferáló daganatos sejtek DNS-ében a metilált bázisok előfordulásgyakorisága igen magas (Désai és mtsai 1971). A metilációkban részt vevő makromolekulák (DNS, fehérjék) közelebbi megismerése és azok metileződésének a sejt proliferációjában betöltött jelentőségének a részletes tanulmányozása jelenleg folyó kutatásaink tárgyát képezik.

Összefoglalás

Előző vizsgálatainkban azt észleltük, hogy a N- ϵ -Trimethyl-L-lysin (TML) a sejt proliferációját daganatos és normál sejtpopulációkban fokozni képes. Jelen tanulmányunkban megvizsgáltuk, hogy a ^3H -TML milyen mértékben épül be az NK/Ly ascites tumoros állatok egyes szerveibe, és hogyan oszlik meg a különböző makromolekulákat tartalmazó sejtfrakciók, valamint a differenciál-centrifugálással nyert cytoparticulumok között. A ^3H -TML átalakulását vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel követtük. Megállapítottuk, hogy a radioaktivitás legnagyobb része a hyaloplasmában, mégpedig a makromolekulákat nem tartalmazó frakcióban található. A TML igen jelentős része a sejtekben gyorsan metabolizálódik és főként ninhydrin negatív és Dragendorff-pozitív természetű anyag képződik. Emellett azonban mindegyik makromolekulás frakcióban radioaktivitás volt észlelhető, amelyek közül jelentősnek tartható az, hogy a fehérjék hidrolizátumában radioaktívan jelzett trimethyllysin is kimutatható volt. A kezelési idő előrehaladtával a sejtben maradt radioaktivitás egyre nagyobb hányada volt található a makromolekulákhoz kötött állapotban, különösen figyelemre méltó a sejtmag nukleoluszában az emelkedés.

Kísérleteinkkel első bizonyítékát szolgáltatottuk a methylezett lysinek makromolekulákhoz való kapcsolódásának és gyors sejtben belüli átalakulásának.

IRODALOM

- Benoiton, L.: Can. J. Chem. **42**, 2043 (1964).
 Burton, K.: Biochem. J. **62**, 315–323. (1956).
 Bhorjee, J. S. és Pederson, T.: Biochemistry **12**, 2767. (1973).
 Cox, R. A. és Hoppel, C. L.: Biochem. J. **136**, 1083. (1973).
 Desai, L. S., Wulff, U. C. és Foley, G. E.: Exptl. Cell. Res. **65**, 260–263. (1971).
 Higashimura, T., Yamada, O., Nohara, N., Shidei, T.: Intern. J. Appl. Radiation Isotopes **13**, 308. (1962).
 Kopper, L., Szende, B., Lapis, K. és Tyihák, E.: Neoplasma **18**, (1971).
 Kopper, L., Jeney, A., Ferencz, G., Lapis, K. és Szende, B.: Z. Krebsforschung **85**, 117–124. (1976).
 Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, L., Randall, R. J.: J. Biol. Chem. **193**, 265. (1951).
 Löwer, R., Lange, H. W. és Hempel, K.: Clin. Chim. Acta **58**, 155. (1975).
 Löwer, R., Lange, H. W. és Hempel, K.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 1545. (1972).
 Löwer, R., Lange, H. W. és Hempel, K.: Pflügers Arch. **347**, 159. (1974).
 Matsuoka, Y.: Seikagaku **44**, 353. (1972).
 Paik, W. K. és Kim, S.: Science **174**, 114. (1971).
 Puskás, J. és Tyihák, E.: Periodica Polytechnica, chem. Ingenieurwes. **13**, 261. (1969).
 Scott, J. P., Frascastoro, A. P. és Taft, E. B.: J. Histochem. Cytochem. **4**, 1. (1956).
 Stotz, Gy., Szende, B., Lapis, K. és Tyihák, E.: Exp. Pathologie **9**, 317–322. (1974).
 Szarvas, T., Ömböly, Cs., Végh, G.: Radioisotopy **12** (5) 779. (1971).
 Szende, B., Tyihák, E., Kopper, L. és Lapis, K.: Neoplasma **17**, 433. (1970).
 Szende, B., Benedeczky, I., Jeney, A., Lapis, K.: Proc. Sixth Internat. Symp. on the Biol. Characterisation of Human Tumours. Excerpta Med. Suppl. (1976) II.
 Tanphaichitr, V. és Broquist, H. P.: J. Biol. Chem. **248**, 2176. (1973).
 Tyihák, E., Szende, B. és Lapis, K.: Life Sciences. Közlés alatt. (1976. a)
 Tyihák, E.: Fehérjevizsgálati módszerek (Szerk.: Kerese I.) Műszaki Könyvkiadó, Budapest (1975).
 Tyihák, E., Patthy, A., Ferenczi, S., Eckhardt, S., Kralovánszki, J., Lapis, K. és Szende, B.: Kísér. Orvostud. (in press) (1976. b).
 Tyihák, E. és Vágújfalvi, D.: J. Chromatogr. **49**, 343. (1970).
 Villanueva, V. R. és Lederer, E.: Neurospora Newsletter N° **22**, 7. (1975).