

A JELZETT GÁTLÓK ALKALMAZÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI AZ ELEKTRONMIKROSKÓPOS CITOKÉMIÁBAN

SOMOGYI ENDRE az orvostudományok doktora és SÓTONYI PÉTER

Közlésre érkezett: 1975. VI. 17.

Az enzimhisztokémia egyik alapvető törekvése az enzim helyének szöveten és sejten belüli lokalizálása. Eredményeink helyességét azonban éppen e kérdésben nem tudjuk egyértelműen ellenőrizni. Olyan módszerek nem ismeretesek, melyek segítségével bizonyítani tudjuk, hogy a kapott citokémiai akció-csapadék az enzim tényleges helyének felel-e meg. A reakciótermék eldiffundálása, az enzim szolibilitásának kérdése alig tanulmányozható. Az enzim *in situ* kimutatására jelenleg két lehetőség adódik. Az egyik az enzim aktív centrum meghatározása jelzett gátló anyagok segítségével, a másik az enzim által katalizált reakció felhasználása pl: a fémkapcsolásos eljárásokkal. Dolgozatunkban a jelzett gátló módszerének kérdéseivel, alkalmazásának lehetőségeivel és a módszerrel kapott saját tapasztalatokkal foglalkozunk.

a) *Az enzimgátlás kérdései.*

Az enzimműködés olyan kémiai reagensekkel gátolható, amelyek az enzim fehérje vagy koenzim funkcionális csoportjait megkötik. Minden anyag, amely ezekkel az esszenciális csoportokkal reakcióba lép, az enzim működését gátolja. A gátlás több típusa ismeretes, ez egyben meghatározza morfológiai felhasználásuk lehetőségeit is.

A biokémiában ismereteinket elsősorban a reverzibilis gátlás tanulmányozása során kapott eredmények vitték előre. A jelzett gátlók esetében az irreverzibilis gátlás a preparatív behatásokkal szemben lényegesen ellenállóbb mint a reverzibilis gátlás. A két gátlási forma eltérő módszertani követelményeket kíván.

A különböző funkciókat végző enzimek fehérje természetűek, szabad gyököket tartalmaznak, melyek az enzim aktivitásához szükségesek. A nem specifikus gátlás során a vizsgált enzim mellett más enzimek inaktiválása is létrejön. Az enzim sajátos tulajdonságainak megismeréséhez így nem lehetséges, de a lokalizáláshoz más eredmények, — mint biokémiai, elektronmikroszkópos citokémiai — hirtokában értékelhető adatokat szolgáltatnak. A specifikus gátlók az enzim specificitásáért felelős csoportokkal lépnek csak reakcióba, így a fehérjéhez, koenzimhez, vagy esetleg aktiváló ionhoz kapcsolódnak. Ezek alkalmazása természetesen lényegesen kedvezőbb feltételeket teremt a lokalizáció vizs-

gálatához. Viszonylag kisszámú jelzett, az elektronmikroszkópos autoradiografiában felhasználható gátlóval rendelkezünk. A módszer alkalmazásának jelenlegi korlátait is jelenti ez a tény. A reverzibilis gátlás két formája, a kompetitív ill. nem kompetitív gátlás ismeretes. Az előbbi esetben a gátló és szubsztrát az enzim azonos csoportjaihoz kapcsolódik. A gátlás mértéke az inhibitor és a szubsztrát koncentrációjától is függ. A kompetíción alapuló folyamat a jelzett gátló, ill. jelzett szubsztrát módszerével vizsgálható.

A jelzett gátló módszer alkalmazásának célja a biokémiában kimutatott enzim aktív centrumának morfológiai tanulmányozása. Az egyes módszerek megválasztása a vizsgálandó kérdéstől, enzimetulajdonságoktól függ. Ezeket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

1. Intrinsic specificitás módszere. Lényege az enzim és a jelzett anyag kapcsolódás során létrejött komplex közvetlen vizsgálata. A kapcsolat lehet reverzibilis vagy irreverzibilis. A reverzibilis kapcsolat esetében az enzim-inhibitor komplex könnyű felbomlása miatt speciális preparációs módszert alkalmazunk, a „dry autoradiographia” eljárását. A módszer kizárja az enzim jelzett gátló kapcsolatának felbomlását.

2. A specifikus reaktiválás módszere. A szubsztrátot bontó enzim valamennyi helyét jelöletlen gátlóval blokkoljuk, majd az enzimre nézve specifikus reaktiválást alkalmazunk, pl: az acetyl-polieszteraz: piridin-2-aldoxinmetidin-nel. A reaktivált helyeket a jelölt blokkolóval hozzuk kapcsolatba. Az eljárást elsősorban akkor használjuk, amikor a szubsztrát az enzim számára nem specifikus.

3. Specifikus protekció módszere. Az alacsony specificitású, de irreverzibilis inhibitor esetében használjuk. Az eljárás lényege az enzim, s szubsztrát-gátló közötti kompeticio.

4. Az irreverzibilis gátlás kiváltotta protekció módszere. A kontroll szövethöz viszonyított jelölés különbség értékelésén alapszik.

b) *A jelzett gátló módszerének irodalmi áttekintése.*

A jelzett gátlók eljárását Ostrowski és Barnard (1961) és Thursh és Benditt (1961) vezették be. Az acetyl kolineszteraze kimutatásához triciált-DFP (di-isopropil-fluorofoszfátot) használtak. Motoros véglemezben szelektív, jól lokalizálható autoradiogramokat kaptak. Ostrowski és Barnard (1961) H³-malonsavat alkalmaztak szukeinodehidrogenaze mitokondriumon belüli lokalizálásához.

Barnard és Ostrowski (1969), Ostrowski és mtsai (1963), Rogers és mtsai (1966), Salpeter (1967) további vizsgálatokat végzett motoros véglemezen az acetyl-kolineszteraze és a májsejt nem-specifikus eszteraze lokalizációjának tanulmányozásában. Ostrowski és mtsai (1963) a fénymikroszkópos hisztokémiai eljárást autoradiografia módszerével kombinálta. A két eljárás eredményei, egyidőben egymás mellett értékelhetők. Csillik és Knyihár (1968) hazai szerzők

közül elsőnek tanulmányozta B₆-vitamin dependens enzimek agyszöveten belüli lokalizálását, fénymikroszkópos szinten. Ostrowski (1972, 1975) összefoglaló munkáiban részletesen elemezte az eljárás lehetőségeit, módszertani nehézségeit. Somogyi és Sótonyi (1975 a, b) ismertette néhány hidrolitikus és oxidatív enzim jelzett gátlóval történő lokalizálásával szerzett tapasztalatait.

c) *Az eljárás módszertani kérdései.*

A helyes módszer megválasztásának alapkérdése, hogy a radioaktív anyag vízdékony, vagy sem. A vízdékony radioaktív anyagok esetében speciális módszer szükséges. Rutinszerűen használható eljárás jelenleg nem ismeretes. A metszet készítéséhez a „dry autoradiographia” módszerét alkalmazzuk. A preparációból adódó nehézségek részben az azonnal lefagyasztott, szárított ultravékony metszetek, szárított emulzióval történő lefedésével csökkenthetők. Az eljárással Nagata és mtsai (1969) vizsgálataira utalunk. A vízdékony anyagok speciális módszertani követelményeivel Appleton (1964), Bordier és mtsai (1970), Geyer (1973), Stirling és Kinter (1967) és Neumann (1975) foglalkoztak. A nem vízdékony radioaktív anyagoknál az autoradiográfiában jól bevált eljárások használhatók. Az inkubáláshoz általában friss, rögzítetlen szövetdarabkák megfelelőek. Az inkubálás után az anyagot pufferben mostuk rövid alkoholos dehidráció, propilén-oxidon keresztül araldit beágyazás történt. A fixálást elsősorban abból a megfontolásból kerültük, hogy a rögzítő az enzim aktív csoportjaival reakcióba léphet, ami még gondos mosás után is gátolhatja a jelzett anyag – enzim kapcsolat kialakulásának lehetőségeit. Az inkubálás után az anyag glutaraldehyd rögzítése elvégezhető. Az irreverzibilis inhibitor az enzim aktív centrumához kötődik, a fixáló tehát nem tudja leválasztani. A reverzibilis inhibitor esetében azonban ennek lehetőségével számolnunk kell.

Az elektronmikroszkópos autoradiográfia alapkövetelménye az optimális érzékenység, a megfelelő feloldás és a jó lokalizáció biztosítása. A kérdéssel kapcsolatban a vízben nem oldékony radioaktív anyag esetében több módszer ismeretes. A jelölt gátló technikában, tekintettel arra elsősorban az enzim lokalizációját vizsgáljuk, alapkövetelmény a monolayer készítésének helyes módszertani megválasztása, illetve olyan lokalizációt biztosító autoradiogramok nyérése, amely az egyes strukturák membránjain való elhelyezkedést biztosítja. Tapasztalataink szerint a „Dropping” eljárás legkevésbé használható, szemben a „Dipping” és „Loop” eljárások, melyek lényegesen kedvezőbb módszertani lehetőségeket biztosítanak. A többrétegű emulzió az érzékenység szempontjából feltétlenül előnyös, a feloldás, ill. a lokalizáció szempontjából azonban hátrányos. A monolayer készítéséhez különböző emulziókat mint Kodak NTE, Gevert NCU 307 és Ilford 4 stb. használnak. Saját tapasztalataink elsősorban Kodak NTE emulzióval vannak. A metszeteket szalagban, zsírtalanított celloidin-izoamilacetát oldattal fedett üveglemezekre húztuk. Esetenként Kushida és Fujita (1966) szerint kombinált uranil-ólom kontrasztot végez-

tünk. Szárítás után vákuumgőzöléssel 60–80 Å vastagságú szénréteget gőzöl-tünk, majd erre bemártással vagy a kacs módszerével 40 °C-os emulzióréteget helyeztünk. Az anyagot 18 °C-on foszforpentoxidot tartalmazó dobozban tárol-tuk. Az expozíciós idő a kísérlettelől függően 4–8 hét. Az üveglemezről a celloidi-nen levő anyagot vízben leúsztattuk és rostély ráfordítással kiemeltük. A meg-szárított rostély autoradiográfiás vizsgálatra alkalmas. A módszer egyik proble-matikája a nem mindig kielégítő határfok, a helytelen blokkfaragás, a nem meg-felelő orientálás. A blokk inkubált anyag esetében az izotóp eloszlásának egye-netlenségét, az egyes területek izotóp jelöletlenségét figyelhettük meg. Már félvékony metszeteken szükséges tehát annak eldöntése, hogy azokban érdek-leges reakció megfigyelhető-e? Aralditban történő beágyazás után az anyagot 16 órát polimerizáltuk, majd kb. a 200–300 Å vastagságú metszeteket emulzió-val fedtük le és 3–8 napos expozíció után előhívtuk, majd toluidinkékkel festettük. A megfelelő szemcsesűrűségű területeket kiválasztva, a blokkokat orientáltan faragtuk, majd további 14–20 órán keresztül polimerizáltuk. A félvékony metszetek autoradiográfiás módszertani kérdéseivel Bergeron és Droz (1968) és Kiss, J. (1969) vizsgálataira és eredményeire utalunk. Az elő-híváshoz Kodak D-19, Microdol-X és Phenidont használtunk, 20 °C-on 1–10 percig. A Phenidon előhívásnál kör alakú, a Kodak D-19 és Microdol-X előhívá-sánál kacs alakú szemcséket nyerhetünk. A két előhívási módszert célszerű egy-más mellett, ugyanazon anyagból kapott metszeteken, egyidőben elvégezni, ami a helyes lokalizálást elősegítheti. Azokban az esetekben, amikor a szemcsesűrűség nagy, az átfedés a kacs módszerrel tapasztalataink szerint zavaróbb, mint a kör alakú szemcséknél.

d) *Az eljárás nehézségei, alkalmazásának néhány kérdése.*

A jelölt gátlók módszerének egyik problémája, hogy a feloldás ugyanolyan jó, ill. rossz lehet, mint a fény- és elektronmikroszkópos autoradiográfiában. Valamennyi, a lokalizáció és az enzim elmozdulását érintő probléma itt sem hagyható figyelmen kívül. Az eljárás specificitásának alapkövetelménye, hogy a gátló és a reaktiváló az enzimre nézve specifikus legyen. Jelenleg viszonylag kisszámú, a fenti követelményeket kielégítő jelölt anyaggal rendelkezünk. Specifikus gátló, reaktiváló birtokában a lokalizáció vizsgálata lényegesen kedvezőbb feltételeket biztosíthat. A vízdékony radioaktív anyagoknál a módszertani nehézségek hatványozottan jelentkeznek. Az inhibitor és enzim aktív centrum stöchiometriájából az eredmény mennyiségileg is értékelhető. A szemcsék számából mennyiségi és minőségi következtetésekre is lehetőség van. A mennyiségi vizsgálatra azonban csak több metszet matematikai statisztikai értékelése alapján látszik alkalmasnak, ehhez speciális feltételek szükségesek. A metszetek vastagságának homogénnek és összehasonlíthatónak kell lenni. Az emulzió felvitele az expozíciós idő, valamint az előhívás, a sorozat minden autoradiogramjára nézve egyező legyen. Nem kevésbé fontos a sorozat minden

egyets metszete vizsgálatakor az azonos mikroszkóp, illetve fotonagyítás. Lehetőség szerint a kiértékelést azonos fototechnikai feltételek között végezzük. A fenti körülmények betartásával elérhető, hogy a radioaktív koncentráció reprodukálható mérése 20%-os hibahatár körül elvégezhető. Az értékeléssel kapcsolatos kérdéseket Williams (1969), Salpeter és Bachmann (1965) vizsgálatai taglalják. Olyan próbálkozások is történtek, hogy a kiértékelést metszetről beütésszámláló eljárással kapcsolták össze, ez összehasonlító méréseket tesz lehetővé az enzim szöveten belüli koncentrációjának tanulmányozására. A módszer azonban csak enzimre specifikus gátlók esetében alkalmazható, mint az Ostrowski (1975) vizsgálataiból ismeretes.

e) Gyakorlati tapasztalatok enzimek lokalizálásának vizsgálatában.

A kérdésekkel kapcsolatos fény- és elektronmikroszkópos hisztokémiai adatok ismertetésétől, azok összevetésétől eltekintünk. Elsősorban jelzett gátlók módszerével szerzett tapasztalatokkal foglalkozunk.

A kalium-natrium aktivált magnezium dependens ATP-az kimutatására használatos Wachstein és Meisel (1957) eljárás a kritikai vizsgálatokat nem állta ki. A módszer különböző módosításával sikerült részben az enzim lokalizációját, a reakció specifitását javítani, bár a kérdéssel kapcsolatos irodalmi adatok így is egymásnak ellentmondóak. Izolált vörösvértest membránokon Marchesi és Palade (1967) vizsgálataiban hisztokémiai reakció a membrán belső felszínén nem összefüggő, szakaszos formában granulárisan elhelyezkedő csapadékot talált. Az enzim specifikus gátlója a szív glikozida, quabain- H^3 használatával a szemcsék viszonylag kis számban a membrán felszínén jelennek meg. Nem tette lehetővé esetleges statisztikus kiértékelését a lokalizáció megkönnyítése céljából. A morfológiai módszerrel a szív glikozida kapcsolódását a sejtmembránhoz ki lehetett mutatni. A lokalizációt azonban a jelzett gátlóval sem lehetett eldönteni (1 ábra). A myelin hüvelyen elhelyezkedő ATP-az, a hisztokémiai reakciója, a kapott ólomcsapadék mennyisége alapján erős enzim aktivitásra utal. Az ATP-az kimutatásával kapcsolatos, elsősorban a műtermék képződést érintő adatok birtokában felmerül annak a lehetősége, hogy a reakció jelentős része nem artefaktum-e. Aláhúzza ezt az, hogy szubsztrát nélküli inkubálás során az ólomcsapadék hasonló helyen jelenik meg.

Jód-acetic-acid- $2H^3$ inkubálásnál a myelin hüvelyen megjelennek a szemcsék. Feltételezhetően ezek egy része az enzim centrumával lépett reakcióba. Az eljárás problémája a gátló nem specifikus, más vizsgált enzimekkel, vagy reaktív csoportokkal is kapcsolatba léphet. Minden esetre szembetűnő volt, az autoradiogramokban mutatkozó kevés szemcse. (2. ábra).

A szukcinodehidrogenaz elektronmikroszkópos citokémiai kimutatásához a korábban alkalmazott tetrazoliumsós eljárásokat a ferricianid-rézsulfátos eljárás váltotta fel. Úgy tűnik, hogy ezek specifikusnak tekinthetők. Az enzim

gátlásának egyik lehetősége a malonsavas kezelés, ami az inkubáló oldat pH-ját is megváltoztatja. A kérdéssel kapcsolatban nem zárható ki az a tény, hogy a gátlás egyik oka már a pH eltolódásában keresendő. Az inkubáló oldathoz tett malonsav-C14 kezelésével a szemcsék a mitokondriumok belső terében jelentek meg, ami arra utal, hogy a malonsav a mitokondrium membranon keresztül bejut. (3. ábra).

Az endonukleaze elektronmikroszkópos hisztokémiai kimutatásához a DN-az II. vizsgálatára a Zotikov és Bernhard (1970) eljárását használjuk. A reakcióval a perinuklearis kromatinban, a durva felszínű endoplazmatikus retikulumokban találunk reakciót. Optimális körülmények között a nukleolusban is előfordul, míg az interkromatikus tér negatív. Az eljárás az ólomsós módszer valamennyi módszertani problémáját magában foglalja. Az enzim aktinomycin-D-vel gátolható. Jelzett aktinomycin-D-C14 használatával a mag kromatin állományában, a nukleolusban és a durva felszínű endoplazmatikus retikulumokban figyelhető meg a szemcsék. (4. ábra).

Ostrowski és Barnard (1961) és Thursh és Benditt (1961) első észlelése óta eltelt időszakban viszonylag kisszámú munka számolt be ennek a módszernek kérdéseiről. Ennek oka elsősorban a metodika nehézségeiben, az eljárások során esetenként kialakított speciális körülményekben keresendő. Az eredmények azonban az enzim lokalizációjának tanulmányozásában új információkat és további olyan lehetőségeket adtak, melyeket az enzim-szubsztrát hasításán alapuló enzim hisztokémiai reakciók nem tesznek lehetővé. Az enzim lokalizációját vizsgáló eljárások közül éppen ezért jelenleg és a jövőben is rendkívül perspektivikus módszert jelentenek.

Összefoglalás

Szerzők a jelölt gátlók módszerével nyert elektronmikroszkópos hisztokémiai tapasztalataikról számolnak be. A kellő kritikával alkalmazott módszerek lehetővé teszik az enzim aktív centrumának autoradiográfiás eljárással történő tanulmányozását, az enzim lokalizálásának más irányú vizsgálatát. A referátum foglalkozik a módszertani kérdések részletes ismertetésével, az egyes eljárásokkal kapott eredményekkel.

IRODALOM

- Apleton, T. C.: *J. Roy. Micr. Soc.* **81**, 277 (1964).
 Barnard, E. A. és Ostrowski, K.: In *Techniques of Autoradiography* Ed. Adrew. A. W. Rogers. Elsevier, Publ. Co. Amsterdam—London—New York. (1969).
 Bergeron, M. és Dorz, B. I.: *J. Microsc.* **7**, 51 (1968).
 Bordier, A., Rogers, A. W. és Herz, L. C.: In: Rogers, A. W. *Techniques of Autoradiography* Elsevier Publ. Co. Amsterdam—London—New York. (1969).
 Csillik, B. és Knyihár, E.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **2**, 179 (1969).

- Geyer, G.: VEB Gustav Fischer Verlag. Jena (1973).
- Kiss, J.: MTA Biol. Oszt. Közl. **2**, 183 (1969).
- Kushida, H. és Fujita, K.: VI. Int. Congr. EM. Kyoto. **39**, (1966).
- Marchesi, V. T. és Palade, G. E.: J. Cell. Biol. **35**, 385 (1967).
- Nagata, T., Nawa, T. és Yokoto, S.: Histochem. **18**, 241 (1969).
- Neumann, D.: VIII. Arbeitstagung der Gesellschaft für Topochemie und Elektronmikroskopie der DDR. Kurzfassungen. Berlin. 1975.
- Ostrowski, K., és Branard, E. A.: Exp. Cell Res. **25**, 465 (1961).
- Ostrowski, E. A., Barnard, E. A., Stocka, Z. és Dorzynkiewitz, E.: Exp. Cell. Res, **31**, 89 (1963).
- Ostrowski, K.: Histochem. J. **4**, 467 (1972).
- Ostrowski, K.: VIII. Arbeitstagung der Gesellschaft für Topochemie und Elektronmikroskopie der DDR. Kurzfassungen. Berlin. 1975.
- Rogers, A. W., Darzynkiewicz, Z., Barnard, E. A. és Salpeter, M. M.: Nature **210**, 1003 (1966).
- Salpeter, M. M. és Bachmann, L.: Assessment og technical steps in electron microscope autoradiography. In: Leblond, L. P. The use of radioautography in investigating protein-synthesis. Acad. Press New York—London (1965).
- Salpeter, M. M.: J. Cell. Biol. **32**, 379 (1967).
- Somogyi, E. és Sótónyi, P.: Acta Histochem. (Jena) Közlés alatt (1975).
- Somogyi, E. és Sótónyi, P.: VIII. Arbeitstagung der Gesellschaft für Topochemie und Elektronmikroskopie der DDR. Kurzfassungen. Berlin. (1975).
- Stirling, Ch. E. és Kinter, W. B.: J. Cell. Biol. **35**, 585 (1967).
- Thursh, D. R. és Benditt, E. P.: J. Histochem. Cytochem. **9**, 616 (1961).
- Williams, M. A.: Adv.: Opt. Electron Microsc. **3**, 219 (1969).
- Wachstein, M. és Meisel, E.: Amer. J. Clin. Pathol. **27**, 13 (1959).
- Zotikov, L. és Bernhard, W.: J. Ultrastruct. Res. **30**, 642 (1970).