

11. TANULMÁNYUTAK

MARÓTI PÉTER

(JATE, Biofizikai Tanszék)

**Urbana (USA) 1983. június–1985. június,
1986. június–augusztus**

1983–85 között kétéves, majd 1986-ban két és fél hónapos ösztöndíjas tanulmányúton vettem részt az egyesült államokbeli Urbanai Egyetem Biofizikai és Fiziológiai Intézetének meghívására. A Rhodobacter spheroides vad- és karotenoidmentes mutánsainak hidrogénkötésével foglalkoztam, az ezekből a baktériumokból preparálható reakciócentrumok különböző fiziko-kémiai állapotaiban. A protolitikus reakciók alakítják ki a fotoszintetikus membránban az elektromos és pH gradienst, amelyek képezik a sejt normális működésének bioenergetikai alapját. A zöld növényeknél két helyen (a két fotokémiai rendszer között, valamint a vízhasító enzimmél), míg a fotoszintetizáló baktériumokban egy helyen (a kinon akceptor komplexnél) kötődik, ill. válik le proton. Bennünket a reakciócentrumhoz közvetlenül kötődő vagy attól leváló H^+ szerepe és jelentősége érdekelt leginkább. Eddigi vizsgálataink meglepő eredményeket hoztak: a H^+ -kötés sebességi állandója két-három nagyságrenddel nagyobb, mint ami egy biomolekuláris, egyszerű kémiai reakció feltételezése alapján várható. Az alagútazás feltételének kísérleti és elméleti esélyeit még meg kell vizsgálni.

Na-boronhidrid-del történő redukálás irreverzibilisen megváltoztatja az RC pigmentösszetételét, de a primér elektron-transzportot nem befolyásolja.

Kutatómunkám során több olyan újkeletű felismerés született, amely lényegesen összetettebbé teszi a reakciócentrumok proton-kötésével kapcsolatos képet: a H^+ -ion bekötési sebesség nem lineáris függvénye a bulk-proton-koncentrációnak, hanem annak, 0,25 hatványával arányos. Ez a felismerés valószínűleg azt takarja, hogy a lokális pH nagyobb, mint a bulk, ill. a reakciócentrum-fehérje egyes részein proton-kutak vannak, amelyek a lokalizált proton-elmélet alkalmazására nyújthatnak lehetőséget.

A téma a nagyon élénk nemzetközi és hazai bioenergetikai kutatások szerves részét képezi. Kísérleti és elméleti adalékokkal járul hozzá azokhoz az alap kutatásokhoz, amelyek célul tűzik ki a fotoszintetikus energiatermelési folyamatok megértését és esetleges későbbi hasznosítási lehetőségét. Felismerve a témában rejlő nagy lehetőségeket, a világ számos laboratóriumában foglalkoznak a magasabb rendű növényekből preparált kloroplasztiszok protolitikus reakcióival (pl. Osnabrück, Ny.-Berlin, Puscsino stb.). A fotoszintetizáló baktériumok, ill. a belőlük izolált kromatofórák H^+ -kötésével már lényegesen kevesebb kutató kötött ismeretséget, míg a reakciócentrumok ilyen jellegű vizsgálata még fehér foltnak látszik. A téma magában hordozza a fehérjék proton transzport (pumpa) leírásának lehetőségét is. Ilyen szempontból a reakciócentrum fehérje vetekszik a már hosszú ideje, többek által tanulmányozott bakteriorodopszinnal.

Baltimore (USA), 1985. április–1986. április

Ösztöndíjas tanulmányúton egy évet töltöttem a Maryland Egyetem (Baltimore, USA) Biokémiai Tanszékén, dr. Joseph R. Lakowicz professzor laboratóriumában. Célunk a fehérjék dinamikájának megismerésére szolgáló kísérleti technika továbbfejlesztése oly módon, hogy kapcsolatot találjunk a fehérjék dinamikája és azok működése között. Korábbi közös munkánk alapján elsőként sikerült változtatható frekvenciájú fázis-fluorimetriás módszerrel szubnanoszekundumos időfeloldású fluoreszcencia anizotrópiai lecsengést mérnünk egyetlen triptofán reziduomot tartalmazó fehérjéken. Újabb fluoreszcencia lecsengési méréseinkből megállapítottuk, hogy a lecsengés szinte sohasem írható le egyetlen exponenciális taggal, sőt lehetséges, hogy a kinetika összetett, nem is exponenciális. Fluoreszcencia anizotrópia lecsengésből megmutattuk, hogy a frekvencia tartománybeli fázisfluorimetria alkalmas olyan gyors és komplex anizotrópia lecsengés felbontására, amelyre eddig nem volt mód. Pl. propilén-glikolban oldott NATA anizotrópia lecsengést két komponensűnek találtuk, a 0,3 ns-os gyors komponens az indolgyűrű lokális mozgását, a hosszabb, 3,4 ns-os időállandó a teljes NATA molekula forgását tükrözi. A becslések szerint a fehérjék helyi oszcillációi is ebben az időtartományban vannak, így várható, hogy módszerünk e folyamatok feloldására is alkalmas.

Sikerült kimutatnunk különböző mozgási szabadságú triptofán reziduumok lokális mozgását fehérjékben, staphylococcus nukleáznál, monellinben, mellitinben. Eredményeink igazolták, hogy módszerünkkel a fehérjékben végbemenő kis amplitudójú és gyors (néhányszor 10 ps) szegmentális mozgások is kvantitatív módon vizsgálhatók, ez pedig új lehetőséget nyit a fehérjék dinamikájának kutatásában.

A megnövelt hidrosztatikai nyomás fehérjékre és membránokra gyakorolt hatásának vizsgálatához 10 kbar-ig használható mérőcellát terveztem, és a kereskedelemben kapható nagynyomású részegységekből megterveztem a céljainkra optimális nagynyomású rendszert.

A fluoreszcencia kinetikai kutatások egyik alapvető fejlesztési célja a lehető legjobb időfeloldás elérése. A mérőberendezések kritikus eleme a fotodetektor. A kereskedelemben pár éve már kapható, de még kísérleti stádiumban lévő csatornalemezes fotomultipler tűnik legjobbnak, de a fázisfluorimetriában eddig nem alkalmazták, mert nem sikerült megoldani a heterodin detektálását. Külső, kétszeresen kiegyensúlyozott keverő felhasználásával elsőként oldottuk meg ezt a problémát, 2 GHz-es határfrekvenciát értünk el, amely az eddig használt leggyorsabb változtatható frekvenciájú fázisfluoriméterek sebességét kb. egy nagyságrenddel meghaladja. Készülékünk érzékenysége 1 foton/gerjesztő impulzusnál sokkal nagyobb, jóval felülmúlja az ebben az időtartományban használható másik fotodetektor, a lavina fotodióda érzékenységét. A készülék időfeloldása lehetővé teszi, hogy pl. a fehérjék lokális torziós mozgásait megjósoló molekuláris dinamikai számítások eredményeit kísérlettel ellenőrizzük, és megnyitja az utat ezen mozgások vizsgálata felé. A készülékkel oxytocin minta dinamikáját tanulmányoztuk. Eredményeink igazolták, hogy az utóbbi évek fejlesztőmunkájának köszönhetően a frekven-

cia tartománybeli fázisfluorimetria a fluoreszcencia kinetika kutatásában a közelmúltig szinte egyeduralgató impulzus fluorimetria komoly versenytársává fejlődött.

Tanulmányutam során tapasztalatokat gyűjtöttem a fluoreszcencia kinetikai spektroszkópia területén, és annak biológiai alkalmazásában. Ezt egyetemi oktatói és kutatói munkámban tudom hasznosítani. Itthoni kutatási terveinkben a fotoszintetizáló baktériumok reakciócentrum-preparátumaiban végbemenő reakciók abszorpció-változás és a fluoreszcencia kinetika mérésével való nyomonkövetése szerepel. E területen elsősorban a fluoreszcencia kinetika mérések metodikájában, valamint a számítógépes mérési adatgyűjtés, mérésvezérlés, és mérési adatfeldolgozás területén szerzett gyakorlatom jelent segítséget.

LAKATOS TIBOR

(POTE Biofizikai Intézet, Pécs)

London (Anglia), 1985/86.

A Wellcome Trust ösztöndíjának elnyerésével alkalmam nyílt arra, hogy 1985. novemberétől egy évet dolgozhassam Londonban a Londoni Egyetem KQC (King's and Queen's College) Élettani Intézetében, amely akkor Peter F. Baker professzor vezetésében állt. (P. F. Baker váratlanul, fiatalon elhunyt 1987 tavaszán.)

A tanulmányút munkatervére egyes tercier aminok hatásainak vizsgálatát tűzte ki célul. P. F. Baker javaslatára elvállaltam, hogy erre a célra (és az Intézet egyéb igényeinek kielégítésére) felépítsek egy „patch clamp” berendezést. Az Intézet a szükséges készülékeket haladéktalanul megvásárolta és minden lehetséges támogatást megadott. Mindemellett számos nehézséggel kellett szembenézni, például a járműforgalom okozta épületrengés kiküszöbölése csaknem lehetetlenné bizonyult; ez sokszor a késő éjszakai órákra korlátozta a kísérletezés idejét (a King's College épülete ugyanis London egyik igen forgalmas utcájában áll).

Elvégzett kísérleteink hátterében az az ismert effektus áll, hogy a prokain az idegi vezetést a Na^+ -permeabilitás növekedésének gátlása révén blokkolja és a calcium kompetitív ágense.

Kísérleteinkhez marhamellékveséből preparált kromaffin sejteket használtunk; a sejtek diszpergálásához a preparátumot különböző enzimatisz kezelésnek kell alávetni, ami egyben a sejtfelület tisztaságát is biztosítja. Az elektródpipetták kb. 2–3 μm átmérőjű végét hővel políroztuk. A sejtfelületre tapadt elektródák nyílásának peremén 10^{10} ohm nagyságrendű átmeneti ellenállás alakul ki („gigaseal”) és ezzel lehetővé válik egyedi ioncsatornák áramának mérése („patch clamp” elrendezésben) vagy a szivárgási áramtól mentesített egészséj membránáramok mérése. Ilyen egészséj áramok mérésével vizsgáltam, hogy prokain, lidokain, tetrakain és prokainamid milyen hatással van a feszültségérzékeny Na^+ és Ca^{++} -csatornák működésére. A vizsgálatok szerint a prokain, a lidokain és a tetrakain a koncentrációtól függően teljesen vagy részben blokkolja mind a Na^+ , mind a Ca^{++} áramot, míg a prokainamid csak csökkenti ezek nagyságát.

Résztehettem az intézet tudományos közéletében, a munkabeszámoló-

szerű intézeti szemináriumokon és a rendszeresen tartott „lunchtime” szemináriumokon, amelyekben olykor külső, felkért előadók szerepeltek, máskor az intézet tagjai tartottak előadást, ezt az alkalmat használták fel kongresszusokra készülve próbaelőadás tartására. Hazai munkámat ismertettem egy ilyen szemináriumon, szép sikert aratva.

Szeretném megemlíteni, hogy az intézet vezetőjétől és munkatársaitól minden kért segítséget megkaptam a külföldi életbe való beilleszkedésemhez; a Wellcome Trust ösztöndíja megközelítette az ott dolgozók fizetését és külön fedezte a belföldi kongresszusokon való részvétel költségét.

LEX LÁSZLÓ

(POTE, Biofizikai Intézet, Pécs)

Eugene (USA), 1986. június–1988. augusztus

A POTE Biofizikai Intézet Akadémiai Kutatócsoportjának tudományos munkatársaként az MTA engedélyével 1986. jún. 1-jétől 1988. aug. 31-ig hivatalos egyéni meghívásos ösztöndíjas tanulmányúton tartózkodtam az Oregoni Egyetem Kémiai Intézetében (Eugene, USA). Meghívóm J. F. W. Keana professzor laboratóriumában NMR-leképezéshez (magnetic resonance imaging) használható kontrasztnövelő anyagok szintézisével foglalkoztam. Az NMR-leképezés az NMR-spektroszkópia új felhasználási területe, amely szerint az emberi szervezet, a röntgennel ellentétben, káros mellékhatások nélkül leképezhető.

Tanulmányutam első felében stabilis nitroxid szabad gyököket tartalmazó liposzómák szintézisét oldottam meg. Az előállított lipidszerű anyagok, melyekből a liposzómák építhetők fel, a poláros fejrészben két, ill. három nitroxid szabad gyököt is tartalmaznak, melyek paramágnesesek lévén NMR-leképezésben kontrasztnövelő hatással rendelkeznek. Az előállított liposzómák óriási gömböknek tekinthetők, melyek mintegy nitroxid gyökökkel vannak beborítva.

Tanulmányutam második felében olyan kontrasztnövelő anyagok szintézisét oldottam meg, amelyek több paramágneses centrumot tartalmaznak és reaktív funkciós csoportjuk révén biomolekulákhoz kapcsolhatók. Szintetizáltunk kontrasztnövelő anyagokat 12 nitroxid csoporttal ill. amelyek 6 komplexbe kötött gadolinium (III)-iont, valamint a fiziológiás környezetben stabilis reakcióképes csoportot, izotiocianát-csoportot is tartalmaznak.

A fenti vegyületek kontrasztnövelő hatásának vizsgálatát a Kaliforniai Egyetemen, az R. C. Brasch professzor vezette kutatócsoportban végezték ill. végzik el. Megállapították pl. hogy a Gd-komplex vegyület vörös vértestekhez kötve jelentős relaxációs időt csökkentő, vagyis kontrasztnövelő hatást eredményezett.

Az elvégzett munkáról eddig egy konferencián (Seventh Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1988. aug. 22–26.) ill. két megjelenés alatt álló közleményben számoltunk be.

Jól felszerelt, kiemelkedően műszerezett laboratóriumban dolgoztam, ahol egyidőben különböző témákon kb. 15–20 kutató dolgozott. Az állandó eszmecserék, kötetlen tudományos megbeszélések sok segítséget, ötletet nyújtottak

munkámhoz. Keana professzorral, a Kémiai Intézet munkatársaival és szűkebb csoportunk kollégáival kiváló kapcsolatot sikerült kialakítanom.

Tanulmányutam hasznos volt, mert új szintetikus szerves kémiai területtel ismerkedtem meg, valamint olyan kutatást kezdhettem el, amely napjaink egyik forradalmian új orvosi diagnosztikai módszerének – az NMR-leképezésnek – a továbbfejlesztéséhez kapcsolódik. Folytatva az elkezdett munkát, tapasztalataimat itthoni kutatómunkámban is hasznosítani szeretném.

LASKAY GÁBOR

(JATE Biofizikai Tanszék)

**Manchester (Anglia), 1986. november–1987. november és
1988. április, május**

A Paterson Institute és a Cancer Research Campaign ösztöndíjasaként tanulmányutat tettem a Paterson Institute for Cancer Research Biofizikai Intézetében. Munkám alapvetető célkitűzése állati sejtek plazmamembránja dinamikai sajátságainak vizsgálata volt.

A sejtmembrán fizikai állapotának tanulmányozása napjainkban egyre nagyobb szerepet játszik a rákkutatásban. Az iránta kibontakozó érdeklődés elsősorban abból a felismerésből táplálkozik, hogy a sejtosztódást szabályozó specifikus hatóanyagok („growth factor”-ok) a plazmamembránban elhelyezkedő receptorokkal kölcsönhatásba kerülve fejtik ki hatásukat. Különösen nagy hangsúlyt kapnak ezek a vizsgálatok azon új és jelentős felfedezések fényében, melyek szerint a rákos állapot kialakulása során megváltozik a sejtosztódást szabályozó hatóanyagok által finoman hangolt regulációs rendszer, így napjainkban e hatóanyagok hatásmechanizmusának tisztázását tekintik a rákkutatás egyik legfontosabb területének.

E hatóanyagok receptorhoz történő kötődését követően jel-átvezetés („szignál transzdukció”) történik a plazmamembránon keresztül, amelynek végeredményeként a sejtosztódást indukáló külső jel lefordítódik a sejt fiziológiai „nyelvére”. A szignál transzdukció során jelentős változások mennek végbe a plazmamembránban, specifikus foszfolipázok és protein kinázok aktiválódása révén.

Munkám elsődleges célja volt annak tanulmányozása, hogy a plazmamembrán fizikai állapota milyen mértékben befolyásolja ezt a folyamatot. Megvizsgáltam néhány hemopoietikus hatóanyagok a membránfluiditásra gyakorolt hatását. Vizsgálati módszerem a hidrofób difenil-hexatrién (DPH) fluoreszcencia anizotrópiája volt. Elvégeztük a fluoreszcencia intenzitásának és anizotrópiájának nanoszekundumos időfelbontását is. Eredményeim azt mutatják, hogy az egyik hatóanyag, az Interleukin-3, specifikusan növeli a DPH fluoreszcencia anizotrópiáját. Nem tapasztaltunk eltérést a fluoreszcencia élettartamában, így arra következtettünk, hogy a megfigyelt változás a próba membránon belüli mikro környezetének megváltozásával kapcsolatos. A vizsgálatokat kiterjesztettük olyan sejt vonalakra is, melyekben rákos állapot alakul ki és ezzel összefüggésben osztódásukhoz nem igényelnek mitogén hatóanyagokat. Minden esetben szignifikáns különbséget tapasztaltunk a normális, Interleukin-3-t igénylő és a rákos sejt vonalakban a plazmamembrán fizikai sajátságaiban, így úgy véljük, hogy az alkalmazott módszer diagnosztikai célokra is felhasználható. Kimutattuk továbbá, hogy a megfigyelt memb-

ránfluiditás-változás igen gyorsan (2 perc alatt) kialakul, így arra következtünk, hogy egy olyan, a plazmamembránnal kapcsolatos eseményt figyelünk meg, amely közvetlen kapcsolatban lehet a membránon keresztüli szignál-transzdukcióval.

EMBER ISTVÁN

(DOTE Közegészségtani Intézet, Debrecen)

Nápoly (Olaszország), 1987–1989.

1987–89-ben másfél évet töltöttem Nápolyban a II. sz. Orvosegyetem Általános Patológiai Intézetének virológiai és molekuláris biológiai laboratóriumaiban. Tekintettel arra, hogy előzőleg kémiai karcinogenezis in vivo módszereivel dolgoztam, az első periódusban nem lehetett más célom, mint a módszerek elsajátítása. Az első tíz hónapban igyekeztem elsajátítani alapvető molekuláris biológiai módszereket, melyeket az ott folyó munkában alkalmaztak s talán itthon is lehet alkalmazni. A munkacsoport (Prof. Fusco és Prof. Vecchio munkacsoportja) pajzsmirigy daganatokban (vírusindukálta illetve humán pappilláris cc) vizsgálta onkogének jelenlétét és azok aktivációját és/vagy expresszióját. Sikerült egy PCR nevű, kb. 40 kb. nagyságú új onkogént izolálniuk, melynek a szekvenálása most van folyamatban. E munkacsoportban sajátítottam el olyan módszereket, mint a transzfekció, klónozás bakteriofágokban, DNS/RNS hibridizációs technikák (Southern-Notern blotting/Western-blotting).

Az első kísérletsorozathoz csatlakozva a PCR onkogén egy kb. 4 kb. nagyságú részének (Alu-free) vizsgáltuk az expresszióját különféle epitheliális eredetű szövetekben és ilyen eredetű daganatokban. E génszakasz klónozási munkálataiban is részt vettem amikor EMBL 4, illetve lambda 10 és 11 bakteriofágokban történt vizsgálatok után sor került az expressziós vizsgálatokra is. A DNS-szakaszokat nick transzlációval, illetve random priminggel jeleztük a hibridizációhoz. Különféle könyvtárakat teszteltünk (ezek konstrukciójában is részt vettem a korábbiakban. E munkálatokról egy közös közleményben számoltunk be, mely megjelenés alatt van (PNAS).

Másik kísérletsorozatban TK-6, Ki-MuSv által in vivo indukált F344 patkánypajzsmirigy tumorsejtekre való hatását vizsgáltam a retinol származékoknak. A távolabbi cél az, hogy megállapítsuk, hogy e sejtvonalra milyen hatása van a RA-nak (vizsgálható részben a differenciálódás, részben a transzformáció), illetve milyen hatással van onkogén expresszióra, illetve aktivációra. Kiderült, hogy kis sejtszámmal indulva, jelentős gátlás észlelhető, azonban lényeges differenciálódási eltérés nélkül. A kérdés második felének tanulmányozása még hiányzik.

LAKATOS TIBOR

(POTE Biofizikai Intézet, Pécs)

Kijev (Szovjetunió) 1988. november

1988. novemberében csaknem három hetet töltöttem Kijevben, az Ukrán Akadémia Fiziológiai Kutató Intézetében. A tapasztalatcsere-jellegű látogatás

az egészségügyi minisztériumok közti csereegyezmény keretében jöhetett létre. A Kostyuk akadémikus vezetése alatt álló intézet nagyon jól felszerelt, széles nemzetközi kapcsolatokkal rendelkező kutatóhely, munkatársainak java beszél angolul. Az intézet munkája a modern elektrofiziológia témáihoz és módszereihez kapcsolódik, a tehetséges fiatal kutatógárda otthonosan mozog nemcsak a fiziológia, de az elektronika területén, és az „on line” használt számítógépek kezelésében is (nem értenek viszont egy xeroxgéphez, mert a hatalmas intézmény egyetlen másológépét csak kivételezettek használhatják, külön engedéllyel).

Különböző ganglion- és simaizom-sejtek preparálását ismertem meg és érdekes módszereket tanulmányozhattam az ún. „concentration clamp” és a pillanatszerű ($t \approx 10$ ms) koncentráció-változtatások megvalósítására; ezek a módszerek lehetővé teszik egyes ágensekkel szemben membránreakciók kinetikájának vizsgálatát is.

A tanulmányút költségeit az Ukrán Eü. Minisztérium térítette, a szállást is ők biztosították a minisztérium vendégházában, amely kényelmes, szállodaszerű elhelyezést és étkezési lehetőséget is nyújtott.