

A nem specifikus enzim hatás in vitro vizsgálata
aromás-szteroidokban

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A József Attila Tudományegyetem Természettudományi
Karához benyújtja

S. Rajki Erzsébet

Készült a József Attila Tudományegyetem Biokémiai
Csoportjánál.

Szeged

1972.

Diss. B 819



A dolgozatban használt rövidítések:

Ö.: ösztрон

Öd.: ösztradiol /-17 β /

Öt.: ösztриol /-16 α , -17 β /

2-OHÖ.: 2 hidroxi ösztрон

2-OHöd.: 2 hidroxi ösztradiol

2,4-di-OHÖ.: 2,4 dihidroxi ösztрон

E/mol/.: moláris extinció's koeficiens

$\mathcal{L}$ -me.tyr.: $\mathcal{L}$ -metil-tirozin

3-J-tyr.: 3-jodo-tirozin

+

AO: aszkorbinsav oxidáz

FO: fenoloxidáz

XO: xantinoxidáz

LO: lipoxidáz

TH: tirozin hidroxiláz

K: kataláz

TH vagy HRP: tormaperoxidáz

MP: mieloperoxidáz

M_kP: mellékvese kéreg peroxidáz

LP: laktoperoxidáz

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

+

Az enzimeket Barman szerint /67/ osztályoztuk.

Tartalom Jegyzék

I.	Bevezetés	1
II.	Irodalmi áttekintés	1
	Az általunk vizsgált enzimek osztályozása . .	4
	Az enzimek jellemzése	5
III.	Anyagok és módszerek	19
	Standard anyagok előállítása	20
	Kísérleteinkben használt enzimek preparálása és aktivitás mérése	21
	Kvantitatív mérések	30
IV.	Kísérleti eredmények	32
	Enzim aktivitás mérések	32
	A keletkezett termékek azonosítása	36
	Kvantitatív mérések	39
V.	Kísérleti eredmények értékelése	41
VI.	Összefoglalás	49
VII.	Irodalom	51

I.

Bevezetés

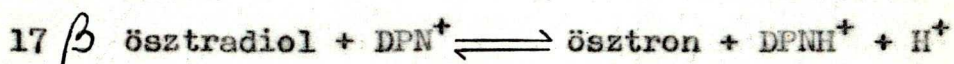
Régi tapasztalat és tapasztalatunk, hogy az aromás és alifás anyagok átalakításában a specifikus hidroxiláló enzimek mellett bizonyos nem specifikus hidroxilázok /az oxidázok és peroxidázok stb./ is részt vesznek /1/. Munkánkban a nem specifikus hidroxiláló enzimek egy csoportjának ilyen irányú szerepét igyekeztünk tisztázni aromás szteroid modell vegyületeken. Közelebbről olyan oxidázok, mint a fenoloxidáz, aszkorbinsavoxidáz, tirozin hidroxiláz, xantinoxidáz, lipoxidáz, valamint a peroxid bontó enzimek a kataláz és a peroxidázok nem specifikus szteroid hidroxiláló képességét tanulmányoztuk.

II.

Irodalmi áttekintés

Az élő szervezetben a szteroid hormonok egymásba való átalakulásának és a detoxikálásnak egyik legfontosabb utja a hidroxilálás. Már számos specifikus hidroxiláló enzimet izoláltak és tisztítottak meg a legkülönbözőbb élőlényekből. A hidroxilálás sokszor döntő-

en befolyásolja például a hormon hatásu vegyületek biológiai aktivitását. Sok esetben a hidroxil csoport beépítése új hormon keletkezéséhez vezet. Például a *Cephalothecium Roseum*-ból izolált Steroid 17β hidroxiláz a progeszteron hidroxilációját katalizálja 17-oxiprogesteronná, de ugyanez az enzim katalizálja a kortikoszteron $\longrightarrow$ kortizol átalakulást is. Az ösztrogéneknél ismert szteroid-dehidrogenáz a



átalakulást katalizálja. Neve: 17β Hydroxisteroid dehidrogenáz, amelyet humán placentából izoláltak és tisztítottak meg /2/. Indirekt módon játszik szerepet a hidroxil csoport kiépítésében. A szteroidok aromás gyűrűjében a hidroxil csoport beépítésében szerepet játszó aromás hidroxiláz, mint különálló enzim még nem ismert, bár a vizeletben kimutatható mennyiségben ürül a 2-hidroxi ösztron. A 2-hidroxi ösztron tipikus metabolit ösztrogén, aktivitása elenyésző az ösztronhoz és ösztradiolhoz viszonyítva.

Ezen hormonok aktivitáscsökkenését már az 1940-es években megfigyelték, ha az ösztrogéneket különböző homogenizátumokkal /3/ és szövetszeletekkel /4/ inkubálták. Zondek és Sklow /3/ májhomogenizátummal, burgonyalével és bizonyos baktériumokkal inkubálta az ösztradiolt, és 95 %-os aktivitás csökkenést észlelt. Westerfeld szerint

/5/ a gomba tirozináz inaktiválja az ösztrogéneket, ami ellentmond Zondekék adatainak, miszerint a máj, burgonya és baktérium homogenizátum inaktivál. Pincussék /6/ a laccázt tették felelőssé az inaktiválásban, viszont a laccáz majdnem minden növényben előfordul, mégsem sok növényi homogenizátum csökkenti ilyen nagy mértékben az ösztrogén hatást. Sokan egy specifikus enzim jelenlétét tételezik fel, amit "estrinase"-nak neveztek. Pincuss és Graubard /7/ fenoloxidáz hatására az ösztroinnak egy színes végtermékét mutatták ki, amit azonosítani nem tudtak.

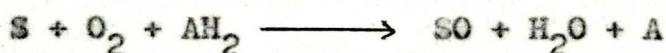
Pashkisék /8/ májhomogenizátummal inkubálva vizsgálták az ösztrogén inaktiváló enzim tulajdonságait. Nitrogén atmoszféra, cianid, azid gátolta az enzim működését, redukált NAD viszont megnövelte a homogenizátum aktivitását. Pincussék kimutatták, hogy az ösztrogén inaktiválódáshoz oxigén szükséges /7/, ebből oxidáló enzim jelenlétére következtethetünk.

Ezzel szemben Klebanoffék /9/ peroxidázos kezelés hatására mutatták ki az ösztrogén inaktiválódást, ami szemben állt a korábbi feltevésekkel, miszerint valamilyen oxidáló enzim lenne a specifikus ösztrogén inaktiváló ágens. Kimutatták, hogy míg a 17 β -hidroxil csoport acetilálása nem, a 3-as hidroxil csoporté gátolja az inaktiválódást. Így feltételezték, hogy az aromás gyűrűben lehet az inaktiválást okozó változás a 3-as szénatom közelében.

Ezen egymásnak ellentmondó eredményekből kiindulva próbáltunk kísérleteinkkel egy egységes képet kialakítani az ösztrogének aromás gyűrűjét hidroxiláló enzimről vagy enzimekről.

Az általunk vizsgált oxidázok fontos szerepet játszanak az aromás vegyületek méregtelenítésében és az $S + 1/2 O_2 \longrightarrow SO$ átalakulást katalizálják, tehát monooxygenázok. /S=szubsztrát/

A tiszta, koenzim mentes enzim preparátum működéséhez a szubsztráttal equivalens mennyiségben redukált kofaktor-nak kell jelen lenni, ami a másik oxigén atomot vízzé redukálja:



ahol "A"=kofaktor, "S"=szubsztrát.

A kofaktor lehet például az aszkorbinsav, a fenoloxidáznál, a dihidroxifumársav a peroxidáznál, de a legtöbb enzimnél a redukált NAD vagy NADP funkcionál H donorként.

A vizsgált enzimeket csoportosíthatjuk prosztetikus csoport szerint is. /ld. 1.sz. táblázat/

1.sz. táblázat

Az általunk vizsgált enzimek prosztetikus csoport szerinti felosztása.

Prosztetikus csoport	Enzim
hem	Peroxidáz Kataláz Lipoxidáz
réz	Fenoloxidáz Aszkorbinsavoxidáz
flavoprotein	Xantinoxidáz
pteridin	Tirozin hidroxiláz

A kísérleteink során megvizsgált enzimek jellemzése.

Xantinoxidáz /XO/ /E.I. 1.2.3.2./

Az emlős szövetekben lévő purinvázias vegyületeket oxidáló enzim jelenléte már kb. 60 éve ismert. Schardinger azt találta, hogy a tej valamilyen felépítője katalizálja a formaldehid és más aldehidek karboxi-csoporttá való oxidációját. Később ezen vizsgálatok feledésbe merültek, de

1935-től ismét a vizsgálatok középpontjába került. Az enzimet az általa katalizált reakciók miatt xantinoxidáznak nevezték /10/. Különböző szervezetségű élőlényekből, /11/ sőt már baktériumokból is izolálták.

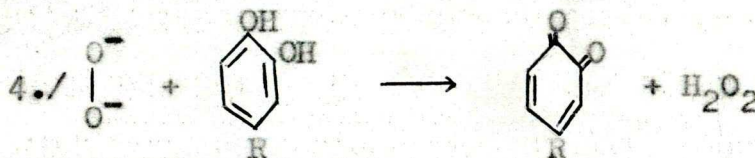
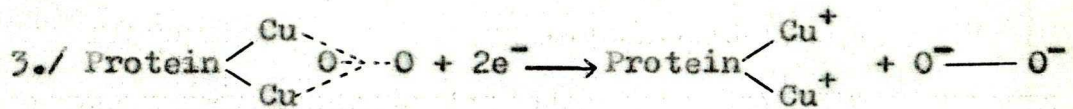
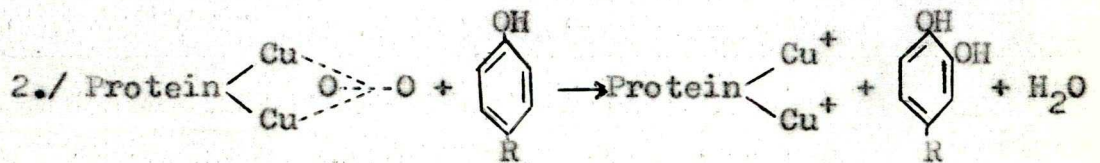
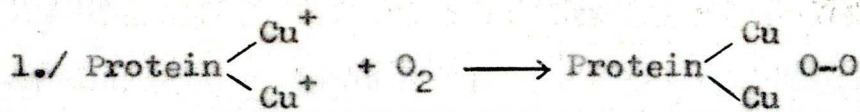
Molekuláris tulajdonságai: $M_s=290\ 000$, két molekula FAD-t tartalmaz enzim molekulánként /12,13/. Ph optimuma 8,3; izoelektromos pontja 0,2 ionerősségű acetát pufferben 5,3-5,4. /14/ Az enzim normális körülmények között egy atom Mo-t tartalmaz FAD molekulánként /15/, és a FAD:vas arány 1:4 /16, 17/. Az enzim különböző mértékben oxidálja a különböző purinokat, a metil- merkaptó- és halogén-származékokat is.

Legjobb elektron akceptora az oxigén /15/, de a metilénkék /12/, a 2,6 diklórfenol-indofenol /16/ és a ferricianid /18/ is helyettesítheti az oxigént. Legtöbb inhibitora kompetetive hat, amelyek vagy egyáltalán nem, vagy kis mértékben oxidálódnak az enzim által, mint például a különböző purinok és pteridinek. Az egyik legerősebb inhibitora a 2-aminó-4 hidroxí-6 formilpteridin /19/.

Fenoloxidáz /FO/ /E.I. 1.10.3.2./

Réztartalmu enzim, majdnem minden növényben előfordul. Két típusa van: a./ ortofenoloxidáz vagy tirozináz, amely sokkal gyakrabban fordul elő a növényvilágban is, mint a b./ laccáz, amely a paradifenolokat oxidálja. A ti-

rozínáz a monofenol $\longrightarrow$ orto-difenol átalakulást katalizálja, majd az ortodifenolt kinonná oxidálja. Az oxigén kötődését sematikusan úgy képzelik el, hogy az oxigén koordinatív kötésekkel kötődik a két rézatomhoz, így kovalens kötése is kialakulhat és megfelelő H-donorral reagálhat:

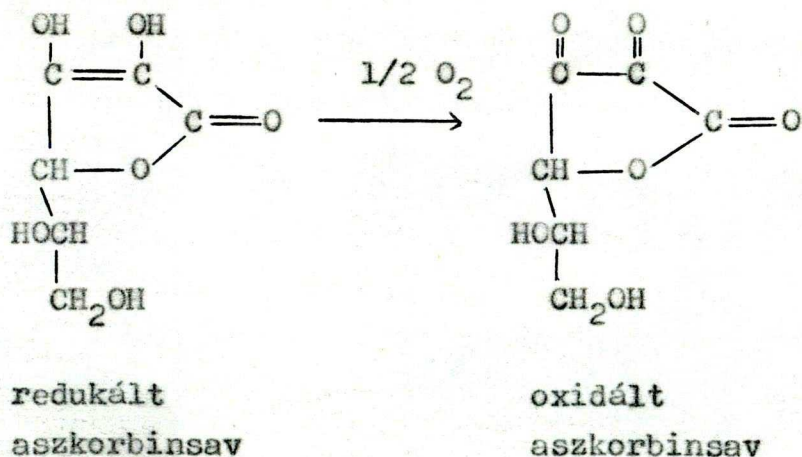


A tiszta enzim $M_s=34\ 500$, pH optimuma 7,06 /20/, alacsonyabb pH -n képes az aszkorbinsav oxidálására is. Az enzim aktivitását az AO-hoz hasonlóan az időegységre eső oxigén fogyasztással jellemezhetjük. A tiszta enzim abszorpciós maximuma 283 nm-nél van, réztartalma 0,2 % szárazanyag tartalomra vonatkoztatva /21/.

Aszkorbinsavoxidáz /AO/ /E.I. 1.10.3.3./

Az enzimet először Szent-Györgyi figyelte meg és hexuronsav oxidáznak nevezte. A végoxidázok csoportjába tartozó enzim, amely közvetlenül a levegő oxigénjével oxidál. Ma már kristályosan is előállították. Ph optimuma 5,3 /22/ a kémhatás változtatásával csökken az aktivitása /23/. Érzékeny a puffer minőségére is, állás közben gyorsan csökken az aktivitása, ami zselatin hozzáadásával kivédhető /22/. Az enzim 0,24 % rézet tartalmaz /szárazanyag %-ban/, CO nem gátolja az aktivitását, enzimaktivitása arányos a réztartalommal. Az aszkorbát oxidáció során a Cu^{++} redukálódik Cu^{+} -á, amely az oxigénnel visszaoxidálódik. /23/ Az oxigén terminális redukcióterméke ilyenkor H_2O_2 /24/.

Az AO által katalizált reakció:



Optimális szubsztrát koncentrációja: 0,002-0,01 M.

Oxidálja az L-aszkorbinsavat és analógjait, hat a zártgyűrűs éndiolokra /Katechol stb./. Ph=7,2-nél FO sajátsgot mutat.

Kataláz/E.I. 1.11.1.6./

A végoxidázok oxidációjakor keletkező H_2O_2 lebontásával fontos méregtelenítési funkciót lát el az élő szervezetben.

A $2 H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$ reakciót katalizálja. 1901-ben Loew /25/ nevezte el kataláznak az enzimet. 1930-ban Kzeile és mts.-nak sikerült koncentráltabb kataláz preparátumot előállítani májból, és kimutatták, hogy az enzim hemet tartalmaz /26/. 1936-ban Stern korrelációt talált az enzim kémiája és katalitikus aktivitása között. A kataláz hem csoportja Protohem IX, enzim molekulánként négy hem csoportot tartalmaz. Ms=240 000. Az enzim cianiddal, szulfiddal, fluoriddal való inhibíciója a többi hem tartalmu enzimhez hasonló. Az azonos fajokból izolált máj- és vérkataláz szerológiaiilag megegyezik /27/. A különböző katalázok különböző aktivitása a proteinek különböző mértékű denaturációjából származik.

Peroxidáz /PO/ /E.I. 1.11.1.7./

1898-ban Linossier preparált először oxidáz mentes peroxidázt leukocitákból /28/, amely csak a peroxiddal

reagált. 1931-ben Kuhn és mtsi. /29/ azt találták, hogy az enzim működés és a kémiai szerkezet között összefüggés van. Keilin és Mann, akik több tormaperoxidáz származék spektrumát leírták, kristályosították és azonosították preparátumukból a protohemint /30/. 1939-ben Theorellék tormából izolálták a kristályos enzimet. /31/ 1957-ben Dolin felfedezett egy fém-mentes peroxidázt a Streptococcus Faecalisban, amelyet flavoproteinként azonosított. /32/

K.G. Paul a peroxidázokat prosztetikus csoport szerint csoportosította /33/:

I. Vas tartalmu peroxidáz:

A. Protohem peroxidáz:

Növényi peroxidáz /pl. tormaperoxidáz/

Állati peroxidáz /pl. jodid peroxidáz pajzsmirigyben/

Microorganizmusokban lévő peroxidáz

B. Verdoperoxidáz:

Myeloperoxidáz

Lactoperoxidáz

Egyéb szöveti peroxidázok

II. Flavoprotein tartalmu peroxidáz:

Streptococcus peroxidáz

Glutation peroxidáz

I. Vas tartalmu peroxidázok jellemzése:

A./ Protohem peroxidázok: A prosztetikus csoport protohem

IX, amely lazán kötődik a proteinhez és acetonnal könnyen lehasítható. Az AH_2 típusu vegyületeket oxidálják, cianid és CO gátolja az enzim működését. Az idetartozó tormaperoxidáz /HRP/ a legrégebben ismert peroxidáz, ez volt a negyedik kristályosan előállított hemoprotein, jellegét, kémiai tulajdonságait csak a tiszta, kristályos enzim preparálása után ismerték meg. Ph optimuma 5,6; izoelektromos pontja $pH=7,2$ -nél van. $M_s=44\ 100$, a tiszta enzim 1,36 % hemet tartalmaz, tehát enzim molekulánként 1 molekula hemet /34/. ELFO-val két komponensre bontható, egy kisebbre /HRP I., paraperoxidáz/ és egy nagyobbra /HRP II./. A két komponens tulajdonságai:

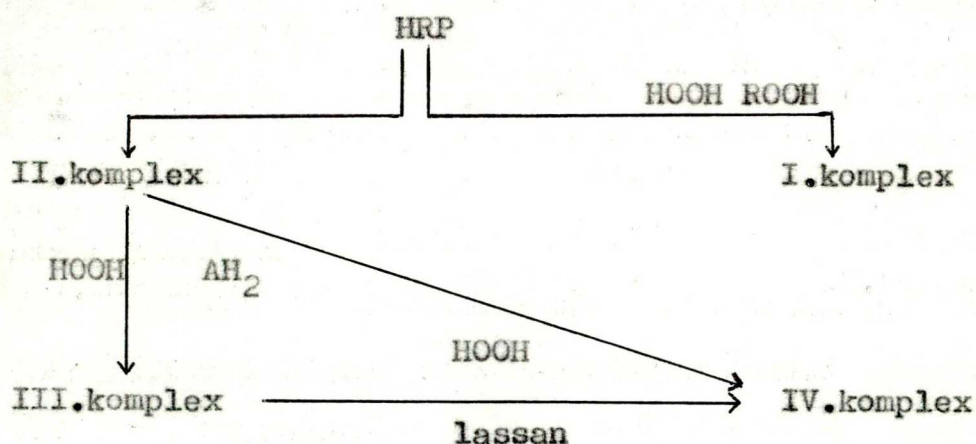
2.sz. táblázat

A HRP ELFO-val szétválasztható két komponensének tulajdonságait mutatja. PN: purpurogallin szám.

	Hem %	N %	M_s	PN
HRP II;	1,36	13,2	39 800	1 220
HRP I.	-	15,4	-	-

Ha a részlegesen tisztított HRP-hoz H_2O_2 -t adunk, barna színeződést kapunk, ami a HRP II. komplexe. Ha a H_2O_2 kon-

Centrációját növeljük, csillogó vörös szineződés jön létre, amely a III. komplex. Magas tisztaságu preparátumon először egy olajzöld szineződés jelentkezik, amely az I. komplex. Az enzim H_2O_2 -vel alkotott komplexei I-III-ig revercibilisek, oxidálható anyag hatására a szín visszaalakul, azonban enélkül 30 perc alatt kb. 50%-ban irrevercibilis károsodás éri az enzimet. Fény hatására egy smaragd zöld szineződés lép fel, a IV. komplex.

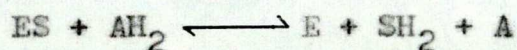
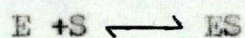


Az I. és II. komplex nemcsak peroxidok, hanem anionos oxidáló szerek hatására is kialakul.

A HRP a különböző peroxidokkal szemben nem egyformán affinis.

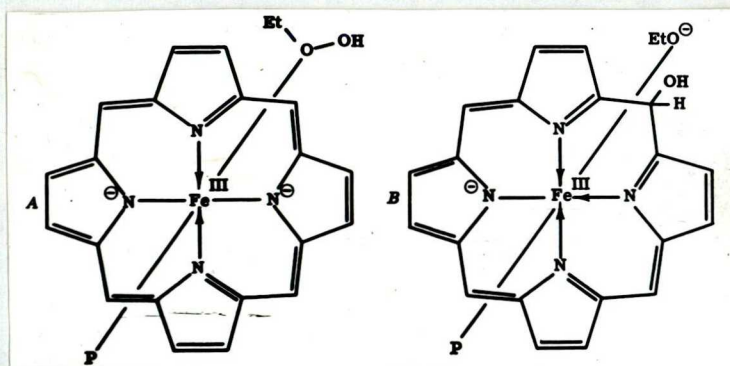
Peroxid	PN
dihidrogén	276
etil-hidrogén	49
dietil	0
perecetsav	8,5 /ph 6,6/
dihidroximetil	0
Diszukcinil	0

A peroxidáz-reakciók mechanizmusa:



ahol az ES komplex a ferri-peroxi komplex, amely reagálhat a donor /AH₂/ molekulával, miközben azt oxidálja.
/A-vá/

1.sz. ábra



A feltételezett hem-peroxid komplex,
ahol P=protein, A=aktiv komplex,
B=irrevertibilis inaktív komplex.

A hidroxil csoport kapcsolódik a hem vas atomjához, de ugyanezen kötés kialakításáért verseng a rendszerben esetlegesen jelenlévő anion /pl. a fluorid/ is. Savas közegben / $pK=5$ / a hidroxil csoport ledisszociál a hemről.

A természetben a HRP-nek több izozimje is előfordul.

B./ Verdoperoxidázok: a prosztetikus csoportjuk egy zöldes színű, ismeretlen felépítőjű hem, amely szorosan kapcsolódik a proteinhez, sem acetonnal, sem nehézfém sókkal nem szakítható le. Az ide tartozó enzimek az AH^- és A^{2-} jellegű szubsztrátokkal reagálnak, mint elektron transzportáló enzimek működnek. A cianid és fluorid igen, a CO nem gátolja a ferment működését.

Myeloperoxidáz: /MP/ A hemoterápia fejlődésével párhuzamosan fejlődött az enzim kutatása. Elsőként Agner izolálta /35/ genny tartalmu kutya uterusból. Izoelektromos pontja 10,2. $M_s=149\ 000$. Vastartalma ismeretlen. Aktivitása kb. 1/10-1/20-a a növényi peroxidáznak.

Lactoperoxidáz: /LP/ Az enzim tisztítása nehéz, mert nagyon törékeny, és szorosan kapcsolódik egy vas gazdag vörös proteinhez. Elsőként Theorell és Akeson izolálta "tavaszi tejből" /36/. $M_s=82\ 000$. Enzim molekulánként egy hem csoportot tartalmaz.

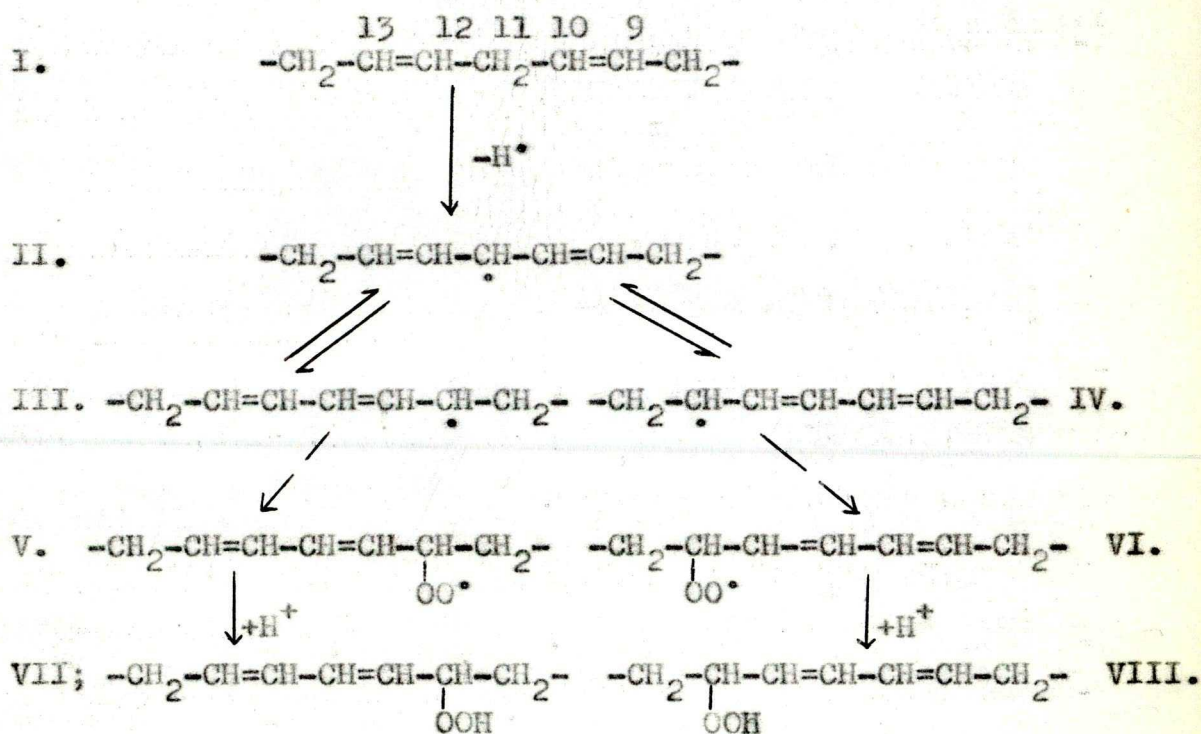
Mellékvesekéreg peroxidáz: / M_kP / pH optimuma 6,8. Molekuláris tulajdonságai még ismeretlenek, aktivitása a verdoperoxidázokéhoz hasonló.

II. Flavoprotein peroxidáz: Ph optimuma 5,4. Ide tartozik a Dolin által tanulmányozott Streptococcus peroxidáz. Prosztetikus csoportja FAD, 0,66%-ban tartalmazza. Azidra és cianidra érzéketlen.

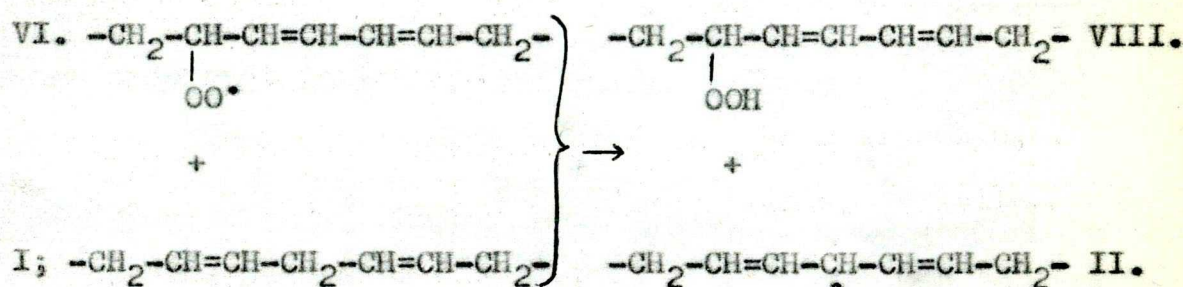
Lipoxidáz v. Lipoxigenáz: /LO/ /E.I. 1. 13.1.13./

A növény és állatvilágban egyaránt előforduló, telítetlen zsírsavak oxidációját katalizáló enzim. Specifikusan a cis,cis-1,4 diolefinekre hat: a linolsavra, linolén-savra, és az arachidonsavra. A molekuláris oxigén direkt addíciójakor keletkező termék egy cisz-transz 1-3 diolefin-peroxid.

1951-ben Holman és Bergstrom kristályosította szójababból /37/. A legtöbb LO ph optimuma 6,5 és 7,0 között van. A szójabab LO Km-je $1 \times 10^{-3} M$, linolsav szubsztrát esetén /37/. $M_s = 102\,400$, kb. három enzim molekulánként tartalmaz egy molekula vasat, az oxigén transzportban szerepet játszó nem-fém komponensről nem sokat tudnak, de aminosavai között egy ismeretlen felépítőt is találtak, aminek szerepe lehet az oxigén megkötésben. /38/ Az enzim működése antioxidációs folyamathoz hasonló, Bergström és Holman sz. /39/ a következő:



Az enzim a C_{11} -en lévő hidrogén atom eltávolításával egy láncreakciót iniciál és így a III. és IV. állapot között egy rezonáns hibrid jön létre. Ez egy láncvégi O_2 addíciót eredményez, amelyből a peroxi-végtermék jön létre. /VII.-VIII./. A közti termék /V. VI./ láncreakciót indít el, egy másik linolsav hidrogénjének elvonásával.



A láncreakció mechanizmusa következményeként várt négyzetes reakciósebesség növekedést Tappelék mutatták ki a szó-

jabab lipoxidáznál /40/.

Tirozin hidroxiláz /TH/ /E.I.1.14.3a./

Agyban, szimpatikus beidegzésű szövetekben és mellékvese velőben fordul elő nagyobb mennyiségben. $M_s=147\ 000$, szedimentációs állandója 9,2, pH optimuma 6,0. A tiszta enzim működéséhez redukált pteridint és Fe^{2+} iont nagymértékben igényel, míg az Fe^{3+} ion nagymértékben lecsökkenti az aktivitását. Elsőként Udenfriendék izolálták /41/ mellékvese velőből a $105\ 000\ "g"$ -s centrifugálással nyert felüluszóbból, mint "szolubilis enzimet". Később B. Petrack és mtsi. a $105\ 000\ "g"$ -ig ülepedő részecske frakciókból izolálta az un. "particulate enzimet", amelyet tripszines kezeléssel tártak fel /42/. Musacchióék kétségbevonták az enzim kétféle lokalizációját /43/, és szerintük a "particulate enzim" a kezelések során már csak egy részét tartalmazza a natív "szolubilis enzimnek", amit az alacsonyabb molsúly és szedimentációs állandó igazol.

A TH kofaktor igényében hasonló a fenilalanin hidroxilázhoz /FH/, azonban sok tulajdonságában eltér /44/.

A TH nagymértékben különbözik a tirozináztól is /45/. A tirozináz kevésbé specifikus enzim, amely a tirozin —
→ DOPA → melanin átalakulást katalizálja, de ezenkívül még nagyon sok más típusú aromás vegyület oxidációját is. A TH specifikusan csak az L-tirozinra és fenilalaninra hat,

nem katalizálja a D-tirozin $\longrightarrow$ DOPA átalakulást. Csak a para helyzetű tirozint hidroxilálja és nem gátolható a tirozináz inhibitoraival.

3.sz. táblázat

A TH és FH tulajdonságainak összehasonlítása.

Tulajdonság	TH	FH
ph optimum	6,0	7,4
gátlás α -me-tyr. / $1 \times 10^{-5} \text{M}$ /	72%	0%
3-J-tyr. / $1 \times 10^{-5} \text{M}$ /	85%	0%

III.

Anyagok és módszerek

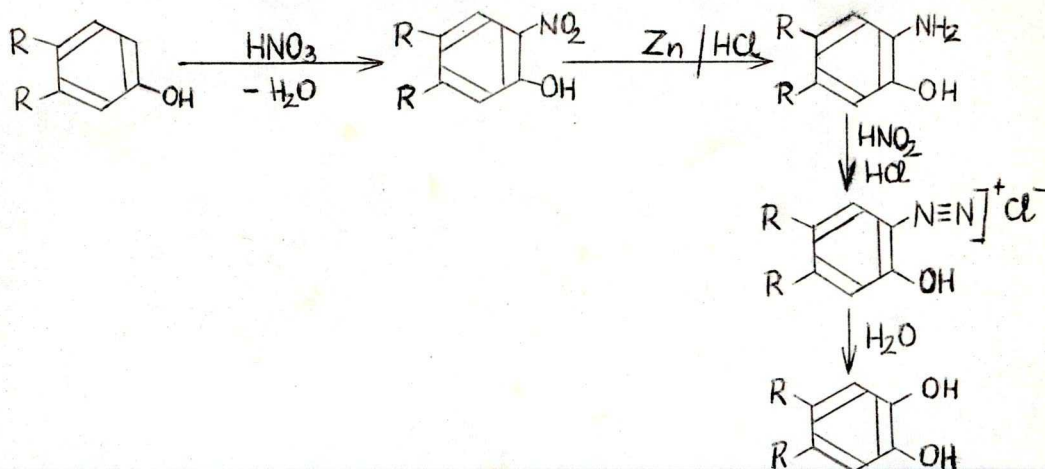
Kísérleteinkben in vitro modell rendszereket alkalmaztunk. Az inkubálást szobahőmérsékleten illetve 37 C°-on levegő jelenlétében rázatással végeztük. A rendszer tartalmazta az enzimet, szubsztrátumot, puffert, és kellően tisztított enzim preparátumok esetén még egyéb anyagokat is /hidrogén donort vagy H₂O₂-ot, vasat, -SH védőt stb./ Szubsztrátként aromás szteroid hormonokat adtunk az inkubációs elegyhez. /ösztront és ösztradiolt/

A kísérleteinkben felhasznált ösztron a Kőbányai Gyógyszerárugyár /Budapest/ ajándéka. Ebből készítettünk nátrium-borohidrides redukcióval Ösztradiolt /3-17 β -diol/. Az ösztriol /3,16 α - ,17 β -triol/ a SzOTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának ajándéka. A vízben rosszul oldódó szteroidok diszpergálására 3% propilénglikolt adtunk a rendszerhez, amely az ösztrogének finom szuszpenziójához vezetett, és így az enzimhatáshoz szükséges homogenitás biztosítva volt. A szubsztrátok /szteroidok/ magasabb koncentrációit használtuk, részben a könnyebb kimutatás, részben pedig az enzimhatás megkönnyítése érdekében. /5ml végtérfogatra 10⁻⁶M szubsztrátot használtunk/

Inkubálás után az elegyet azonos térfogatu kloroform-

mal háromszor kiráztuk. A szteroidokat a kloroformos fázis tartalmazta. A propilénlikolos szennyezést azonos térfogatu deszt. vizes mosással távolítottuk el. A kloroformos extraktumot vizmentes kalciumkloriddal szárítottuk és nitrogén atmoszférában bepároltuk, majd 0,5 ml kloroformban vettük fel a maradékot. A rétegekromatográfiát 0,25 mm rétegvastagságu, Kieselgél G. nach Stahl lapokon végeztük, amelyeket használat előtt 110 C°-on 2 órán át aktiváltunk. Futtató elegyként benzol:etanol 89:11 és ecetsav:ciclohexán:kloroform 1:2:2 rendszereket alkalmaztunk. A foltokat foszforsav:víz 1:1 arányu elegyével hívjuk elő, és a foltokat szárítás után UV fényben azonosítottuk. A keletkezett termékeket szintetikusán előállított hidroxiszteroid standardokkal azonosítottuk szín és Rf értékek alapján.

A standard anyagok előállítása: A 2-hidroxi öszttront és a 2,4 dihidroxi öszttront Werbin módszerével preparáltuk, aki klasszikus fenol csoport kiépítési módszert ajánl /46/. Első lépésben orto-helyzetben nitráltunk, majd a nitrocsoportot cinksósavval aminná redukáltuk. Az amin csoportot NaNO_2 -vel diazotáltuk és az öszttron-diazóniumsó elbontásával a 2-es helyzetben hidroxil csoporthoz jutottunk.



A 2-OH öd-t és a 2,4 diOH öd-t az előző módszerhez hasonlóan preparáltuk az öd-ből Patton módszerével/47/. Az anyagok fizikai, kémiai sajátságai a leírtakkal azonosak voltak.

Az inkubáláshoz használt enzimeket a következőképpen preparáltuk:

Az aszkorbinsavoxidázt /AO/ H. Tauber módszerével izoláltuk káposztából /48/. Az enzimet 30%-os etanollal extraháltuk a homogenizátumból. Az extraktumból többszörös acetonos kicsapással tisztítottuk és izoláltuk, majd a keletkezett csapadékot vízben oldottuk. Az enzim aktivitás egységének az egy óra alatt fogyott aszkorbinsav mennyiségét tekintettük, amit az aszkorbát koncentráció 265 nm-nél való csökkenésével mértünk Spektromom 201-en. Az enzim aktivitása 60 egység/ml/h volt.

Ezzel az eljárással szintén csak részlegesen tisztított enzim preparátumot nyertünk.

Az ösztrogének inkubálásához használt reakcióelegy:

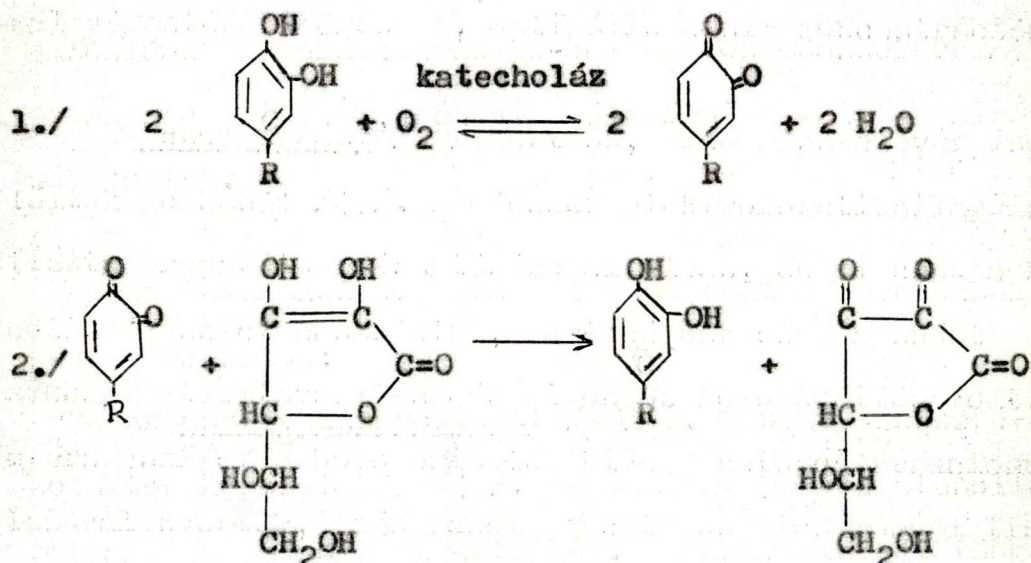
$10^{-3}M$	ösztrogén	1 ml
$5,2 \cdot 10^{-5}M$	EDTA	1 ml
$6,6 \cdot 10^{-2}M$	foszfát puffer ph=5,7	1 ml
2xhigitásu enzim		<u>1 ml</u>
deszt. vízzel kiegészítve		5 ml-re

Az inkubálást szobahőmérsékleten, levegőn való rázatással végeztük 12 órán át, optimális enzim koncentrációnál.

A fenoloxidázt /FO/ Kertész, Zito módszerével izoláltuk gombából /49/. A módszer elektroforetikailag is tiszta preparátum készítésére alkalmas, de mi csak a kezdeti lépéseket használtuk, mert célunk csak a saját szubsztrát eltávolítása és bizonyos fokú dúsítás volt. A nyers enzimet a homogenizátum hideg acetonos frakcionálásával nyertük, majd kalcium acetátos kicsapással tisztítottuk. Ezután ismét acetonnal kezeltük a felülusztót, és az így precipitálódott enzimet alkalmaztuk kísérleteinkben. Az enzimet ph=7,1-es 0,05 M-os foszfát pufferben oldottuk. A rendszer tartalmazta az enzim működéséhez szükséges redukált hidrogén donort / $NADH_2$ / és elhanyagolható mennyiségű saját szubsztrátot, mert a készítmény levegő érzékeny volt, elég gyorsan megbarnult, ami aktiv

enzimműködést jelzett. Az enzim katecholáz aktivitását mértük El-Bayomni, E.-Frieden módszerével /50/. Megfelelő hidrogén donor jelenlétében az enzim fenoláz aktivitása általában a katecholáz aktivitás kétszerese.

Az aktivitás mérésre használt módszer lényege, hogy az enzim által kinonná oxidált katecholokat aszkorbinsavval visszaredukálja, és a redukált aszkorbinsav tartalom csökkenést fotometriásan méri 265 nm-nél Spektromom 201-en.



A legtöbb szerző hidrogén donort /aszkorbinsav vagy NADH_2 / ajánl az inkubáláshoz, tapasztalatink szerint azonban ez nem volt szükséges, mert az enzim aktivitását nem növelte meg a hozzáadott aszkorbinsav, sőt nagyobb koncentrációban gátolta azt.

Az enzim fenoláz aktivitása 260 egység/ml enzim volt. Az ösztrogénekkel való inkubálást az AO-hoz hasonlóan végeztük, csak a ph=5,7-es foszfát puffer helyett ph=7,1-es puffert használtunk.

A xantinoxidázt /XO/ tejből izoláltuk, P. Plesner és H. M. Kalclar módszerével /51/. Az enzimet a tejszínből szeparált író ammóniumszulfátos frakcionálása után kalcium foszfát gélen tisztítottuk. A géles kezelés után ismét ammónium szulfáttal frakcionáltuk, majd foszfát pufferrel szemben dializáltuk sómentesséig. Ezzel az eljárással egy kellően tiszta enzim preparátumhoz jutottunk. Aktivitását a xantin $\longrightarrow$ hűgysav átalakulás regisztrálásával mértük fotometriásan. Az enzim aktivitás egységének a 290 nm-nél századokban mért percenkénti extinció csökkenést vettük. Preparátumunk aktivitása 54 egység/ml volt. Az aktivitás méréshez használt reakcióelegy:

100 γ /ml	xantin	0,15 ml
$6 \cdot 10^{-2} M$	foszfát puffer	1,5 ml
$10^{-6} M$	EDTA	0,3 ml
	enzim	0,66 ml
	deszt. viz	
leállitás:	perklórsavval	0,09 ml
	végtérfogat:	3,0 ml

Az inkubálást az előzőekhez hasonlóan végeztük $ph=7,5$ -es foszfát pufferben, optimális enzim koncentrációval, 2 órára át, szobahőmérsékleten levegőn rázatva az elegyet.

A tirozin hidroxilázt /TH/ marha mellékvese velőből preparáltuk B. Petrack és mtsi. módszerével /52/, a 78 ezer "g"-ig ülepedő részecske frakciókból. A partikulumokat tripszines kezeléssel tártuk fel, és ammónium szulfátos frakcionálással tisztítottuk. Az aktivitás mérésénél az enzimnek azt a tulajdonságát használtuk fel, hogy a D-tirozinon kívül a D-fenilalanint is képes hidroxilálni, de a fenilalanin $\rightarrow$ tirozin átalakulást optimális körülmények között 13,8x lassabban katalizálja, mint a tirozin $\rightarrow$ DOPA átalakulást. A méréshez ^{14}C egységesen jelzett fenilalanint használtunk szubsztrátként. Az enzim aktivitás a 15' alatt átalakított szubsztrát mennyiségével / μM / arányos. Az enzim aktivitását Udenfriendék módszerének kismértékű módosításával mértük /53,54/. A rádióaktív aminosav foltokat nem hívtuk elő ninhidrinnel, csak a kontroll csíkokat, és így vágtuk ki a mintákat. A "Bray" féle oldat /55/ helyett használt szcintillátor folyadék a következő volt:

4 g POP /2,5-difeniloxazol/

0,2 g POPOP /1,4 di-2-/5-difeniloxazolil benzol/
toluollal 1 l-re feltölteni.

Ebből a folyadékból 10-10 ml-t vittünk a küvettákba és így a kioltás nagymértékben kiküszöbölhető volt. A minták rádióaktivitását Beckman LS-200 B folyadék szcintillációs mérőműszerrel mérték. Az enzim aktivitása:

434,7 m μ M/mg enzim protein/ 15' volt.

Az inkubáláshoz használt reakcióelegy:

ösztrogén	1 μ M
acetát puffer ph=6	200 μ M
merkaptoetanol	100 μ M
Fe SO ₄	0,5 μ M
fólsav	1 μ M
enzim	10x higitásu
deszt. vízzel	1 ml-re feltölteni

Az inkubálást 37°C-on való rázatással végeztük két órán át.

A lipoxidázt /LO/ fehér gyöngybabból tisztítottuk RT Holman, S. Bergtrom módszerével /56/. Az enzimet a darált babból egy éjszakán át extraháltuk ph=7,0 acetát pufferrel. A nyers enzim kivonatot báriumacetát, aceton és bázikus ólomacetátos kicsapással tisztítottuk. Az így nyert felüluszót ammónium szulfáttal frakcionáltuk, és az enzimet ph=7,0 0,1 M-os foszfát pufferben oldottunk, és egy éjszakán át dializáltuk deszt. vízzel szemben.

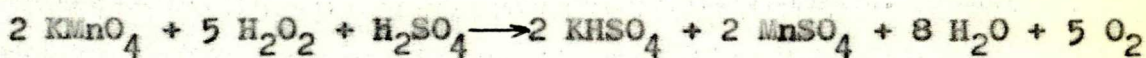
Az enzim aktivitását spektrofotometriásan mértük /56/ a linolsavon enzim hatására keletkező peroxi vegyületek megnövekedett abszorpciójának a mérésével, 232,5 nm

-nél Spektromom 201-en. A tiszta enzim preparátum aktivítási 60 egység /ml/ 1' volt.

Az inkubáláshoz használt reakcióelegy:

0,1 M	foszfát puffer ph=7,0	1 ml
10^{-3} M	ösztrogén	1 ml
10x higitásu	enzim	1 ml
	deszt. vízzel	4 ml-re

A katalázt /K/ H. Tauber E.L. Petit módszerével preparáltuk /57/ sertés májból. A darált májból vizes acetonnal extraháltuk az enzimet egy éjszakán át. Az extraktumot szűrtük, és a filtrátumból aceton hozzáadásával kicsaptuk az enzimet. Aktivitást az enzim által nem elbontott H_2O_2 permanganátos visszamérésével határoztuk meg.



A tömény enzim aktivitása 15 587 mg H_2O_2 /ml/ 1' volt.

Az inkubáláshoz használt reakcióelegy:

10^{-3} M	ösztrogén	1 ml
$5,2 \cdot 10^{-5}$ M	EDTA	1 ml
$2 \cdot 10^{-2}$ M	H_2O_2	1 ml
$6,7 \cdot 10^{-2}$ M	foszfát puffer ph=5,6	
10x higitásu	enzim	1 ml
	deszt.vízzel	5 ml-re

Az inkubáló elegyet két órán át rázattuk szobahőmérsékleten, zárt térben.

A peroxidázok közül a tormaperoxidázt /TP/ növényi, a többi peroxidázt pedig állati forrásokból izoláltuk. A TP-t K.G. Paul /68/ módszerével tisztítottuk torma gyökérből. A megtisztított és ledarált tormából vízzel extraháltuk az enzimet. Az extraktumot először 40 %-ig telítettük ammónium szulfáttal 4 C°-on. Azután a felüluszóhoz 85 % telítettségig adtunk ammónium szulfátot és az így keletkezett csapadék tartalmazta a feldusított enzimet. A csapadékot M/15 ph=7,0 foszfát pufferben oldottuk és deszt. vízzel szemben dializáltuk egy éjszakán át jégszekrényben. Az enzim aktivitása 117 mg J₂ /ml/ 1'.

A LP-t tejből izoláltuk /59/. A tisztítás első lépése a lefölözött tej kazeinmentesítése volt, ezt tejjel-tóval vagy ammónium szulfátos frakcionálással végeztük. A tejsavó proteinjét /amely sok szennyezés mellett a LP-t is tartalmazza/ ph=6,0-nál 2,8 M ammónium szulfát koncentrációnál kicsaptuk. A csapadékot vízben oldottuk 3 % protein koncentráció eléréséig. A nyers, hig enzim oldatot ammónium szulfát és Na-tetraborát hozzáadásával tisztítottuk az alkalikus foszfatázoktól. Az ammónium szulfát koncentráció emelésével /1,9 M-re/ kicsaptuk a XO szennyezéseket. A felüluszó ammónium szulfát koncentrációját 2,5 M-re emelve a LP precipitálódott. A precipitátumot 0,1 M bórax oldatban oldottuk, úgy, hogy az oldat 2 % protein koncentrációju legyen.

A hig enzimoldatot ismét ammónium szulfátos kezeléssel tisztítottuk és 2,3 M koncentráció elérésénél a tisztított LP kicsapódott. $\text{Ph}=7,0$ foszfát pufferben oldottuk és 20 térfogat deszt. vízzel szemben, állandó keverés mellett, 0°C -on dializáltuk két órán át. A baktériumos ferőzéstől néhány csepp toluol hozzáadásával védtük az enzim tartalmu oldatot. Aktivitása: $140 \text{ mg J}_2 / \text{ml} / 1 \text{ perc.}$

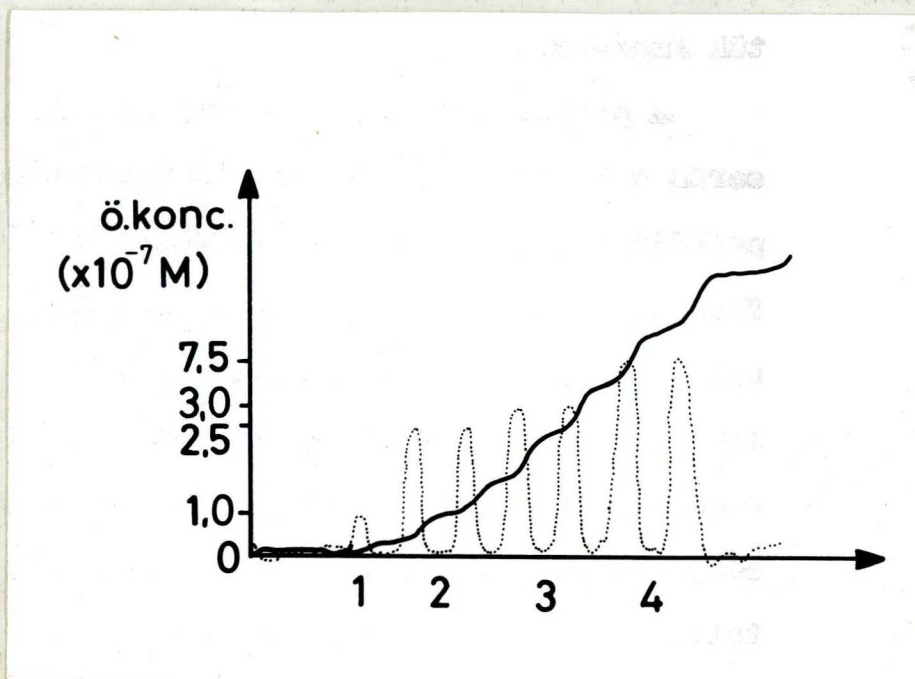
A MP-t gennyből tisztítottuk /60/. A gennyet 0,3M $\text{ph}=8,0$ foszfát pufferrel higitottuk, és ammónium szulfátos frakcionálással tisztítottuk. A 80 %-os ammónium szulfát telítettségénél keletkező csapadékot 0,3M $\text{ph}=8,0$ foszfát pufferben oldottuk és 0,1 M foszfát pufferrel szemben dializáltuk két órán át 4°C -on. Az így nyert enzim aktivitása $37,8 \text{ mg} / \text{J}_2 / \text{ml} / 1'$ volt.

A M_kP -t Huszák módszerével /61/ izoláltuk. A mellékvese kéreg homogenizátumot $1/50 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ -el mostuk hemoglobin mentességig. A hemoglobin mentes homogenizátumból 10 x térfogatu $1/15 \text{ M} - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ -el extraháltuk a M_kP -t. $1/10$ térfogatnyi 1 M acetát puffer hozzáadásával tisztítottuk a nyers enzimet. Az így keletkezett opaleszkáló oldatot 20°C -on $1/10$ -ére pároltuk, és 0°C -on deszt. vízzel szemben dializáltuk egy napig. A dialízis végén a tisztított enzim csapadék formájában kivált, lecentrifugáltuk és $1/15 \text{ M}$, $\text{ph}=6,8$ foszfát pufferben szuszpendáltuk. Az enzim aktivitása: $32,2 \text{ mg J}_2 / \text{ml} / 1'$ volt.

Minden peroxidáz aktivitását jodometriásan mértük /62/. Az enzim aktivitás egységének az egy perc alatti oxidálásra felhasznált H_2O_2 -vel egyenértékű J_2 súlyát tekintettük /mg/-ban.

A peroxidázos kísérleteinkben, ahol az inkubálások során a legnagyobb mértékű hidroxilálást észleltük, megpróbáltuk kvantitatíve mérni az anyag arányokat. A foszorsavval előhívott foltok alulexponált fotóit denzitometriásan mértük Carl Zeiss /Jena/ integrátoron. Először kalibrációs görbét készítettünk 10^{-7} - 10^{-6} M óztron koncentráció közötti tartományban. A nagyobb pontosság elérése céljából minden mérendő minta mellett két standardot futtattunk, úgy hogy a minták várható értéke a két standard folt mennyiségi értéke közé essen 10^{-6} M- 10^{-7} M/. A módszerrel 3 % hibahatáron belül lehet dolgozni, de az integrátor nagyon érzékeny a lapvastagságra /egyenletességre/ és a fotók minőségére, így a mennyiségi értékelés sokszor bizonyos korrekciókat igényel.

2. ábra



Kalibrációs görbe 10^{-7} - 10^{-6} M ösztрон koncentrációju tartományban. A mérés a már leírtak alapján történt, ahol I: 1×10^{-7} M; II: $2,5 \times 10^{-7}$ M; III. 5×10^{-7} M; IV: $7,5 \times 10^{-7}$ M ösztрон koncentrációnál felvett diagramm.

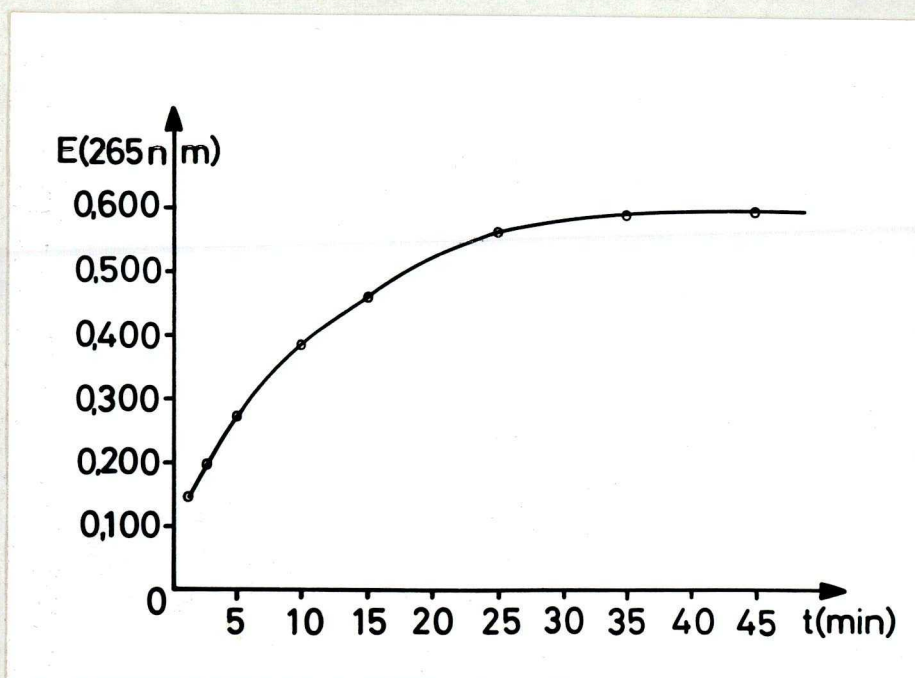
IV.

Kísérleti eredmények:

Mivel a kísérleteinkben felhasznált enzimek különböző tisztaságúak és aktivitásúak voltak, és az ösztrogénekkel inkubált rendszerben fontos volt az optimális enzim koncentráció beállítása, minden vizsgált enzimnél aktivitás mérést végeztünk.

A F.O. és A.O. aktivitását hasonló módszerrel mértük. Mindkét enzimnél az aktivitás egységének az időegység alatt megnövekedett oxidált aszkorbinsav mennyiségét vettük.

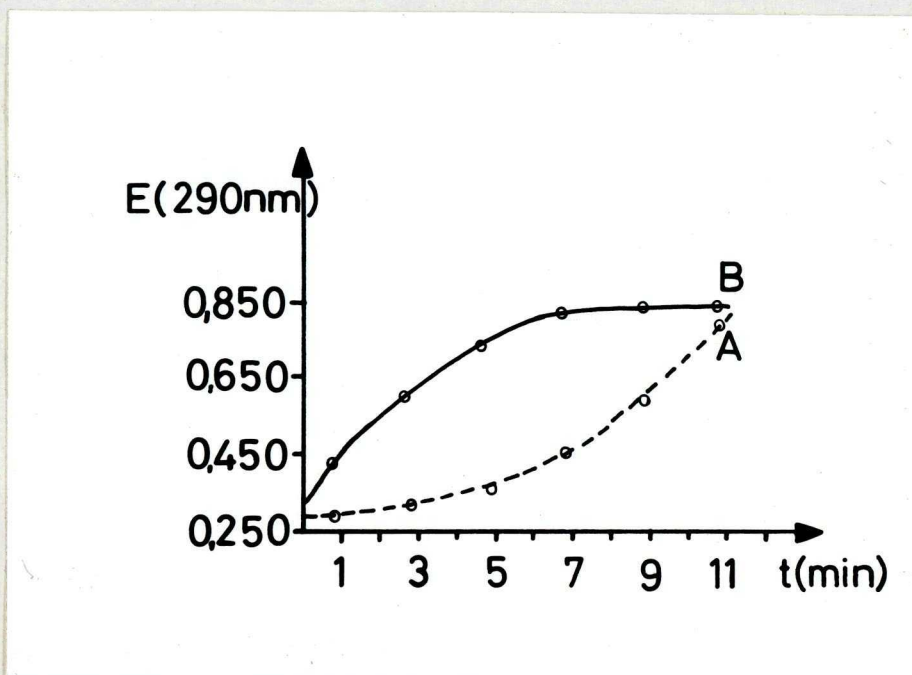
3. ábra



A FO aktivitás-görbéje. Az oxidált aszkorbinsav tartalom növekedést mértük 265 nm-nél Spektromom 201-en.

A XO aktivitásának egysége az az enzim mennyiség, amely a xantin $\longrightarrow$ hűgysav átalakulását olyan sebességgel katalizálja, hogy a reakcióelegy extinciója 1' alatt 0,01-al nő 290 nm-nél.

4. ábra



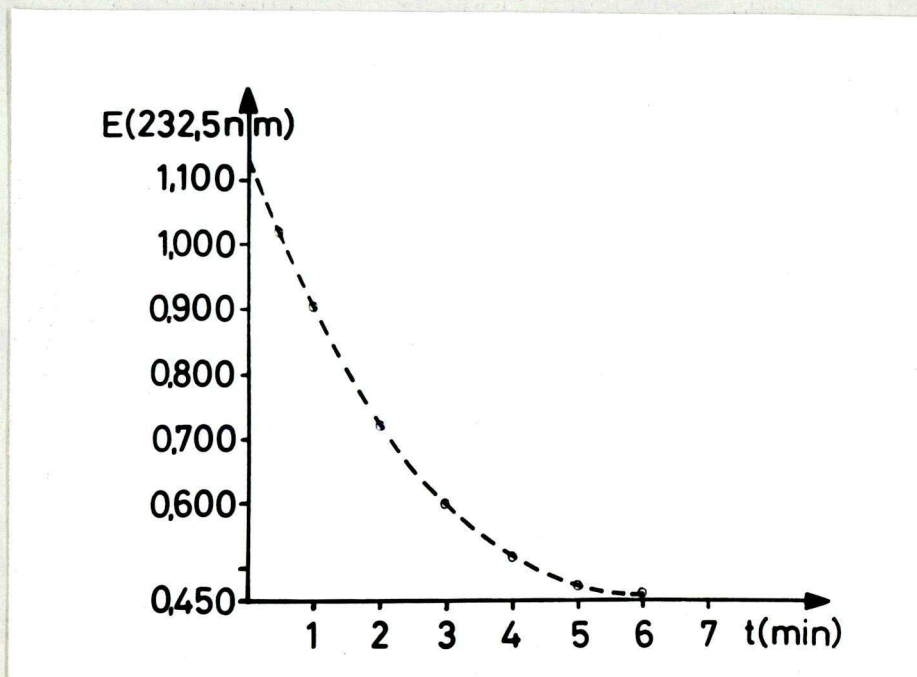
A XO aktivitás-görbéje

A: félig tisztított enzim preparátum

B: Ca-foszfát gélen tisztított preparátum

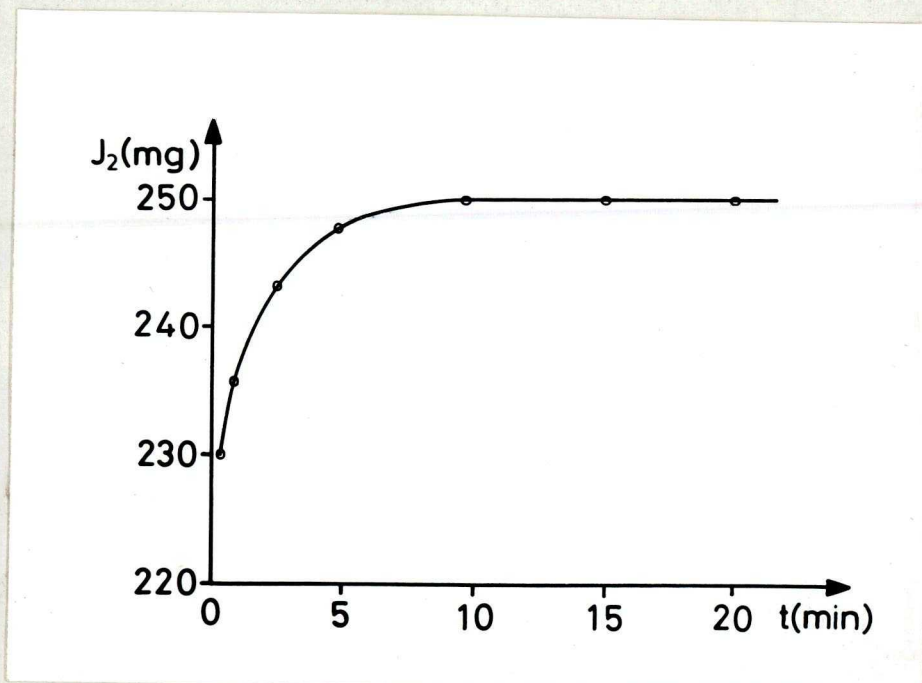
A LO aktivitását a linolsav-peroxi termékének 232,5 nm-nél megnövekedett abszorpció változásával mértük. /Emol.= $27,3 \cdot 10^3$ / 1 mol H_2O_2 .

5. ábra



A LO aktivitás-görbéje

6. ábra



A TP aktivitás-görbéje

A peroxidáz és kataláz aktivitását az enzim által időegység alatt elbontott H_2O_2 mennyiségével mértük. Mindkét esetben a maradék H_2O_2 mérésével a PO-nál jodometriás, a kataláznál permanganátos titrálással.

Az inkubált rendszerben elért eredményeket megfelelő vak próbák mellett értékeltük.

7. ábra

Ö.	20H Öd.	ES	20H Ö.	Öt.	S(Öd)
					
					
					
					

Az AO-al kezelt ösztron és származékai rétegkromatogramja. Futtatás: ecetsav:ciclohexan:kloroform /1:2:2/.

8. ábra

Ö.	2-OH Ö.	ES	Öt.	S(Ö)	24- OHÖ
					
					
					
					
					

A TP-al kezelt ösztroon származékainak kromatogramma.
Futtatás: benzol:etanol /98:11/.

A keletkezett hidroxí termékeket szín és R_f értékük alapján azonosítottuk.

Az ösztrogének szín és R_f értékei.

R_f"A":benzol: etanol /89:11/-ben, R_f"B":ecetsav:ciclohexan
:kloroform /1:2:2/-ben futtatva, Kieselgél-G lapon. Szín
"A": a foszforsav:víz /1:1/-el előhívott foltok színe a
látható-fényben. Szín "B": a foltok színe UV fényben.

/ld: 4.sz.táblázat/

4.sz. táblázat

	ö.	öd.	öt.	2-OH ö.	2,4 diOHö.	2-OH öd.
Rf"A"	0,727	0,557	0,188	0,385	0,350	0,200
Rf"B"	0,689	0,689	0,142	0,345	0,330	0,170
Szin"A"	narancssárga		barna		sötét barna	barna
Szin"B"	zöldessárga		barna		sötét barna	barna

A vizsgált enzimek közül az AO, FO, TP, LP, MP és M_kP bizonyult aktívnak az ösztrogének hidroxilálásában.

5.sz. táblázat

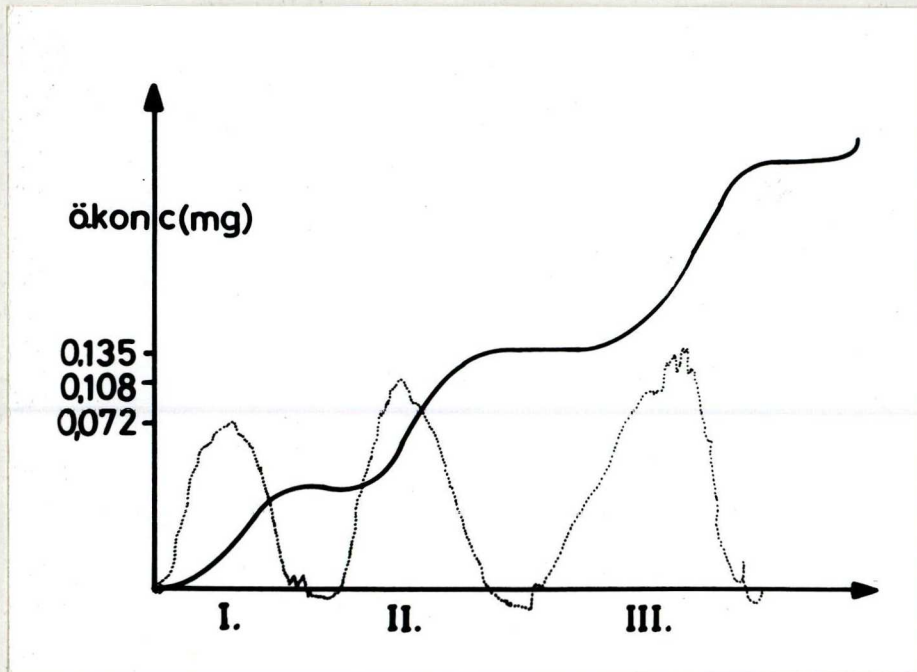
Enzim	FO	AO	TP	MP	LP	M_kP
Szubsztrát ö. Keletkezett termékek:	2-OHö.	2-OHö. 2-OHöd.	2-OHö. 2,4diOHö. öt. t"x"	2-OHö.	2-OHö.	2-OHö.
Szubsztrát öd. Keletkezett termékek:	2-OHöd.	2-OHöd.	2-OHöd. öt. t"x"	2-OHöd.	2-OHöd.	2-OHöd.

Az AO, FO, TP, MP, LP, M_kP -enzimekkel inkubált ösztrogénekből keletkezett hidroxil termékek. "x": egyéb, nem azonosított, alacsony Rf értékű barnán fluoreszkáló foltok.

A legerősebben hidroxiláló rendszereknél, a LP-al és MPal inkubált ösztronnál a keletkezett hidroxil termékeket kvantitativ mérjük az enzimmentes vak minta mellett. Mivel ezen enzimek hatására az ösztronból csak 2-OH ösztron keletkezett, egyéb melléktermék nem, az inkubálás után megmaradó ösztron mennyiségéből pontosan következtethetünk a 2-OH ösztron mennyiségére. Így tehát elegendő volt az ösztron maradék visszamérése, denzitometrián. A mérés pontosságához szükség volt az optimális enzim koncentráció használata, mert már 5-10 X koncentráció eltérés is nagy mértékben lecsökkentette az enzim hidroxiláló képességét.

Például a LP-nál az ideális enzim koncentrációt a 100x-os higitással értük el, itt az enzim a kiindulási ösztron 47 %-át alakította át 2-on ösztronná, míg a 10x enzim higitásánál már csak az ösztron 20 %-ának az átalakítására volt képes.

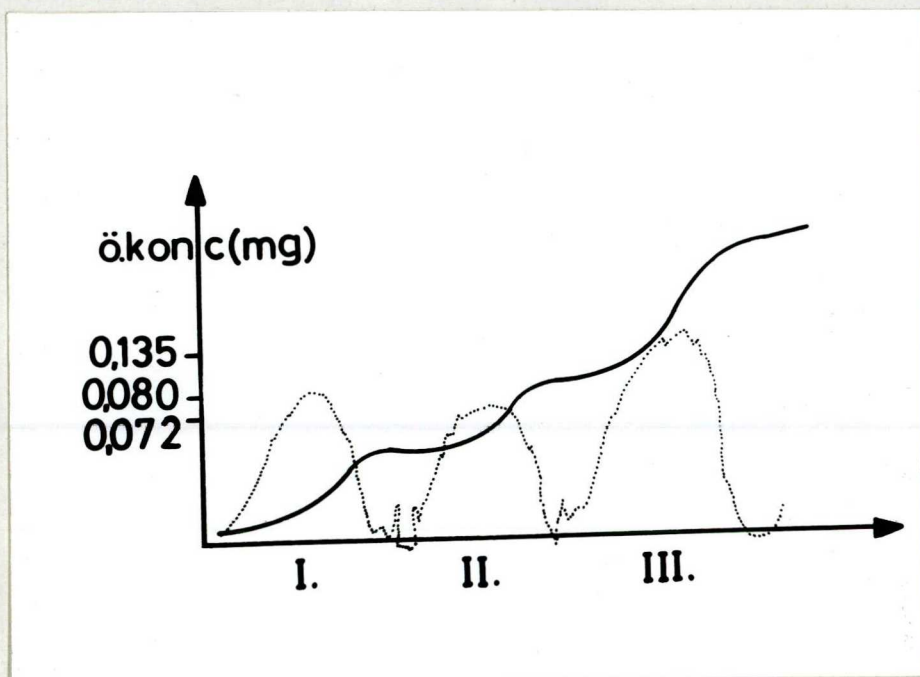
9. ábra



A LP-al inkubált rendszerben az inkubálás után megmaradó öszttron mennyiségének denzitometriás visszamérése. Ahol III. enzim nélkül II:a 10x higitásu LP-vel, I: a 100x higitásu LP-vel inkubált öszttron.

A MP-al inkubált rendszerben a 2x higitásu enzim koncentráció bizonyult optimálisnak. Ennél az enzim koncentrációnál az öszttron 47 %-a alakult át 2-OH öszttronná, míg a tömény enzimmel inkubálva csak 40,8 %-os volt az átalakulás.

10. ábra



A MP-al inkubált rendszerben az inkubálás után visszamért ösztrom mennyisége. Ahol III: enzim nélkül, II: 2x hígításu MP-vel, I: tömény MP-vel inkubált ösztrom.

4.sz. táblázat

Enzim	Kiindulási ösztrom koncentráció /mg/-ban	Inkubálás után megmaradó ösztrom/mg/-ban	Keletkezett 2-OHö.-ban /100%=kiindulási ö.koncentráció
MP tömény	0,135	0,08	40,8
MP 2xhígításu	0,135	0,072	47
LP 10x hígításu	0,135	0,108	20
LP 100x hígításu	0,135	0,072	47

A MP-al és LP-al inkubált rendszerben a keletkező 2-OH ö. mennyisége a kiindulási ösztrom koncentráció %-ában.

V.

Eredmények értékelése:

Kísérleteinkben több olyan enzimet vizsgáltunk, amellyel már korábban is foglalkoztak, mint feltételezett ösztrogén inaktiváló enzimmal, és több olyan enzimet is megvizsgáltunk, amelyről erre vonatkozó adatok még nem ismertek.

Már az 1940-es években Westerfeld és mtsi. /5/ és Pincus és mtsi. /6/ megfigyelték, hogy a tirozinázzal és laccázzal inkubált rendszerben az ösztradiol inaktiválódik. Ilyen hatást észlelt Zondek és Sklow /3/, amikor különböző szövet homogenizátumokkal inkubálta a rendszert.

5.sz. táblázat

A különböző szerzők különböző enzimeket tettek felelőssé az ösztradiol inaktiválásáért.

Enzim, eredete	Szerzők
tirozináz /gomba/	Westerfeld /5/
laccáz /kül. forrásokból/	Pincus és mtsi. /6/
máj, burgonya és biz. baktérium homogenizátum	Zondek, Sklow /3/
peroxidáz /torma/	Klebanoff és mtsi. /9/

Westerfeld szerint a tirozináz, Pincus szerint a laccáz inaktiválta az ösztrogéneket. -Sokan egy specifikus enzim jelenlétét tételezték fel, amit "estrinase"-nak neveztek. Az enzim előfordulására és tulajdonságaira vonatkozóan azonban nem sikerült egységes véleményt kialakítaniuk. Klebanoff /9/ tormaperoxidázzal végzett kísérletében kimutatta, hogy az inaktiválás az aromás gyűrűben történik a hármasszénatom közelében. Ezen az úton próbáltunk elindulni, amikor az ösztrogén inaktiváló enzimek keresésével emellett az inaktiválás mechanizmusára is megpróbáltunk fényt deríteni. Mivel az eddig vizsgált enzimek a hidroxilázok csoportjába tartoznak, a peroxidázok kivételével, de a peroxidázokról is ismert bizonyos esetekben, hogy az inaktiváláskor hidroxitermék keletkezik az aromás gyűrűben a hármasszénatom közelében. Mivel a vizetben az aromás gyűrűben helyettesített hidroxiszármazékok közül a 2-OH₅ az, ami nagy mennyiségben ürül, és az aktivitása nagyon kismértékű az ösztradiolhoz és ösztronhoz viszonyítva, mi is feltételeztük, hogy ez az anyag lenne az, amely a különböző enzimekkel inkubált rendszerben keletkezik és az átalakulás során az ösztrogén aktivitása nagymértékben lecsökken. Ezt a feltételezést támasztotta alá Pincus és Graubard /7/ kísérlete, akik a FO-al inkubált rendszerben az ösztronnak egy színes végtermékét mutatták ki, amit azonosítani nem tudtak.

Kísérleteinkben vizsgált enzimek az aromás vagy alifás szénláncra ható oxidázok, legtöbbje aromás vegyületek méregtelenítésében vesz részt, és így ezen enzimeknél feltételezhető egy nem specifikus ösztrogén hidroxiláló hatás is.

Kísérleteinkkel igazolódott, hogy a feltevésünk helyes, miszerint a vizsgált tíz enzim közül hat enzimmel inkubálva észleltünk kisebb, nagyobb mértékű hidroxilálást a kettes szénatomon.

6.sz. táblázat

A FO, AO, TP, MP, M_kP-al inkubált ösztrogénekből keletkezett hidroxi termékek. S: szubsztrát, "X": egyéb, nem azonosított alacsony R_f értékű barnán fluoreszkáló foltok.

Enzim	FO	AO	TP	LP	MP	M _k P
S: ö. keletkezett termékek:	2-OHö.	2-OHö. 2-OHöd	öt. 2-OHö. 2,4-diOHö "X"	2-OHö.	2-OHö.	2-OHö.
S: öd. keletke- zett termé- kek:	2-OHöd.	2-OHöd.	öt. 2-OHöd. "X"	2-OHöd.	2-OHöd.	2-OHöd.

Ezen eredmények azt mutatják, hogy ezek az enzimek a szervezetben potenciálisan "estrínase" hatásúak és kísérleteink alapján cáfolhatjuk, helyesebben kiegészíthetjük azt az elképzelést, miszerint csak egy specifikus enzim az

ösztrogén inaktivátor.

Tekintettel arra, hogy a TP-nál egyéb, nem azonosított termékek is keletkeztek a 2-OH δ . mellett, ugyanakkor az állati szövetekből nyert peroxidázok kiharólag kettes helyzetű hidroxilálással hatnak, ezért valószínűnek látszik az utóbbiak fontos szerepe az ösztrogének katabolizmusában. Az AO és FO szintén előfordul az emlős szervezetben és mivel a saját szubsztrátjukon kívül még sok aromás illetve alifás szénláncu vegyületet hidroxilálnak, így ezen hatásuk várható volt. Szintén specifikusan a kettes helyzetben hidroxilálnak, de az AO-nál még észleltünk δ . $\longrightarrow$ 2-OH δ . átalakulást is, ahol tehát a kettes helyzetű hidroxilálás mellett az enzim a 17-es helyzetben is hidroxilál. A LP és MP a két legintenzívebben ható enzim. Hatásukra optimális inkubálási körülmények mellett, optimális enzim koncentrációnál a kiindulási ösztro-
tron 47 %-a alakult át 2-OH δ -á.

Mivel a MP hatékonyan résztvesz a neutrofil leukociták mikrobaölő tevékenységében, elképzelhető, hogy az ösztrogén hidroxiláló hatása is ezen részvételen keresztül magyarázható. Klebanoff szerint a neutrofil leukocitákban lokalizálódó antimikrobiális rendszer mieloperoxidázból és H₂O₂-ből épül fel /63/. A H₂O₂-t vagy a bekebelezett mikroorganizmus fejleszti, vagy a rendszerben jelenlévő oxidálható kofaktorok eloxidálásból származik. Leg-

hatásosabb kofaktor a jodid és klorid ion, de jó hatásokkal működik a rendszer tiocianát vagy fenol csoport jelenlétében is. Ennek alapján feltételezhető, hogy jelen esetben az ösztrogének aromás gyűrűje funkcionál oxidálható kofaktorként, és így magyarázható az intenzív hidroxil csoport beépítőképeség. Ez az út azonban nem látszik nagy jelentőségűnek az ösztrogének katabolizmusában.

A LP- esetén specifikusabb hatást vártunk. Valószínű, hogy az enzim aktiv működése és a laktáció alatti ösztrogén szint csökkenés szorosan összefügg. Ugyanis a LP minden tejben megtalálható és nagymértékű hidroxiláló képessége megnöveli az ösztrogén $\rightarrow$ 2-OH ösztrogén átalakulást. Így az ösztrogének aktivitása nagymértékben lecsökken és ezen termékek nagyrésze kiürül. Feltételezésünket alátámasztani látszik a LP a többi általunk vizsgált enzimmél intenzívebb ösztrogén hidroxiláló képessége is.

Egy másik elképzelés szerint a LP és MP-hoz hasonlóan funkcionálhat az antimikrobális rendszer enzimjeként, ahol az ösztron vagy ösztradiol a rendszer oxidálható kofaktoraként funkcionál és oxidációjából származna az antimikrobiális rendszer működéséhez nélkülözhetetlen H_2O_2 . Mivel a szervezetben az ösztrogén szint sohasem olyan magas, hogy ilyen extenzív folyamatokban hidrogén donorként szerepelhessen, ez az ösztrogén funkció, ha létezik is,

nem látszik jelentősnek.

A MP, LP és M_kP hatására az öszttronból tisztán egyéb melléktermékektől mentesen keletkezett a 2-OHö. Ez egy specifikus, élő szervezetben is lejátszódó hidroxilálás lehetőségét támasztja alá. A M_kP sokkal kisebb mértékben hidroxilál, mint az előbbi két enzim, így elképzelhetően ennek az enzimnek sincs jelentős szerepe az élő szervezetben az ösztrogének oxidatív lebomlásában.

A LP és MP ösztrogén anyagcserében betöltött szerepéről csak úgy nyerhetnénk végleges elképzelést, ha enez kísérleteinket még in vivó vizsgálatokkal is kiegészítenénk, összehasonlítva sz ösztrogén anyagcserét a megnövekedett LP és MP szintű egyedek és a normális enzimszintű egyedek viszonylatában. Legegyszerűbbek az izotópos kísérletek lennének, ahol például a beadagolt C^{14} -ösztradiol oxidatív bomlástermékeinek kiürülését figyelnénk gyulladásos megbetegedéseknél a tünetmentes kontrollok mellett. A LP működését legegyszerűbben a laktáció és tejtermelés mentes időszak ösztrogén anyagcseréjének összehasonlításával kontrollálhatnánk.

Az a tény, hogy az uterusban erős peroxidáz aktivitást mutattak ki /64/, kísérleti eredményeinket alátámasztja. Az ovariectomizált állatok uterus peroxidáz aktivitása lecsökken, de ösztradiol adagolással ismét megnövelhető az enzimaktivitás /64/. Valószínű, hogy ez a

tény is az itt lokalizálódó peroxidáz ösztrogén anyagcserére gyakorolt hatását bizonyítja.

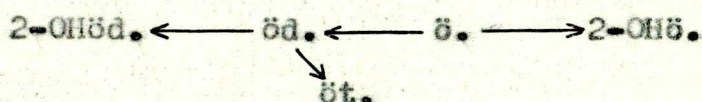
Amikor az ovariectomizált állatoknál lecsökken az ösztradiol szint, a peroxidáz aktivitás is lecsökken, valószínűleg, azért, mert nincs szükség az ösztradiol aktivitás további csökkentésére, hidroxilálással. Gyorsan követi az enzimaktivitás növekedés az ösztradiol adagolást, valószínűen így szabályozza a megfelelő ösztrogén szint kialakulást.

Hollander és Stephens /65/ ösztrogén függő NADH_2 oxidáz mutatott ki az uterusból. Tulajdonságaiban nagyon hasonló az uterus peroxidázhoz /LLP/, a két enzim hidroxiláló képessége is hasonló mértékű. Mindkét enzim működéséhez fenol csoportra, Mn^{2+} , NADH_2 és O_2 -re van szükség. Kis mennyiségű H_2O_2 megnöveli aktivitásukat. A két enzim között csupán azid érzékenységbeli és alacsony hőmérsékleten való viselkedésben van különbség. Lehetséges, hogy ilyen csekély eltérés ellenére is szeparáltan létezik oxidáz és peroxidáz az uterusban, de amíg a két enzimet egymástól izoláltan nem sikerül ki preparálni, nem tudjuk bizonyítani a két enzim különálló létét. Amennyiben a peroxidáz és uterus oxidáz két különálló enzim, akkor az általunk vizsgált hidroxiláló enzimek katalógusát még ki kell egészíteni az uterus oxidázzal.

Összefoglalás

Kísérleteinkben az ösztrogén inaktiválás egyik fontos útjának, az aromás gyűrű 2-es helyzetében történő hidroxilálásnak az útját próbáltuk felderíteni. Eredményeink azt mutatják, hogy a specifikus hidroxiláló enzimeken kívül több különböző enzim is képes betölteni ugyanazt a funkciót. A kísérleteinkben vizsgált oxidázok /AO, FO, peroxidázok/ fontos szerepet játszanak a szervezet mérgeztelenítésében az aromás vegyületek detoxikálásában, és ez a tény is megerősíti azt a feltételezést, hogy az ösztrogén hormonok aktivitás csökkentésében fontos szerepük van a nem specifikus /hidroxiláz/enzim hatásoknak is. Vizsgálatainkkal ezen munkaelképzelésünk alátámasztást nyert, miszerint a vizsgált enzimek hatására jól kimutatható mennyiségben keletkezett a 2-OHö. A metabolitok egy része a vizelettel kiürül, a másik része a szervezetben tovább alakul sokszor alkotórészeire esik szét, az aromás gyűrű 2-es és 3-as szénatomja közötti hasadásával.

A vizsgált enzimek által katalizált reakciók:



Ezúton szeretném megköszönni Dr. Matkovics Béla
docens urnak, témavezetőmnek, hasznos utmutatásait és
sokoldalú szakmai segítségét, amelyet a disszertációm
megírásához nyújtott.

Irodalom

1. B.C. Saunders A.G. Holmes-Siedle B.P. Stark: Peroxidase London, Butterworths /1964/ p.192.
2. L.J. Langer L.L. Engel J. Biol. Chem. 233. /1958/ 583.
3. B. Zondek J. Sklow Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 49.
/1942/ 629.
4. Heller C.G. Endocrinol 26. /1940/ 619.
5. H Westerfeld Biochem. J. 34. /1940/ 51.
6. M. Graubard, G. Pincus Proc. Nat. Acad. Sci. /US./ 27.
/1941/ 149.
7. M. Graubard, G. Pincus Endocrinol. 30. /1942/ 265.
8. R.H. De Meio, A.E. Rakoff A. Cantarow, K.E. Paschkis
Endocrinol. 43. /1948/97.
9. S.J. Klebanoff S.J. Segal J. Biol. Chem. 235.No.1.
/1960/97.
10. E. Knobloch Z. Vitamin-Hormon-u. Ferment- forsch 1.
/1947/ 358.
11. E.C. de Renzo Advances in Enzymol. 17. /1956/ 293.
12. H.S. Corran J.G. Dewan A.H. Gordon D.E. Green Biochem
J. 33. /1939/ 1694.
13. E.G. Ball J. Biol. Chem. 128. /1939/ 51.
14. P.G. Avis F. Bergel R.C. Bray D.W.F. James K.V. Shooter
J. Chem. Soc. 1956. 1212.
15. R.C. Bray R. Petterson A. Ehrenberg Biochem. J. 81.

/1961/ 178.

16. P.G. Avis F. Bergel R.C. Bray J. Chem. Soc. 1956. 1219.
17. P.A. Richert W.W. Westerfeld J. Biol. Chem. 209. /1954/
179.
18. J. Fridovich P. Handler J. Biol. Chem. 233. /1958/ 1581.
19. O.H. Lowry O.A. Bessey E. J. Crawford J. Biol. Chem 180.
1949 /399/.
20. H.S. Mason J. Am. Chem. Soc. 77. /1955/ 2914.
21. D. Kertész R. Zito Biochem. Biophys. Acta 34. /1959/
/248/.
22. W.H. Powers J. General Physiol. 27. /1943/ 167.
23. H. Tauber I.S. Kleiner J. Biol. Chem. 110. /1955/ 211.
24. H.G. Steinmann J. Am. Chem. Soc. 64. /1942/ 1212.
25. Loew U.S. Dept. Agr. Repts. No. 68. /1901/ 47.
26. K. Zeile H. Hellström Z. Physiol. Chem. 192. /1930/ 171.
27. R.K. Bonnichesen Acta Biochem. Biophys. 12. /1947/ 83.
28. M.G. Linossier Compt. Rend. Soc. Biol. 50. /1898/ 373.
29. R. Kuhn D. Hand M. Florkin Z. Physiol Chem. 201. /1931/
30. D. Keilin T. Mann Proc. Roy. Soc. 122. B. /1937/ 199.
31. H. Theorell Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. 16. A. No 2.
/1942/
32. M.I. Dolin J. Biol. Chem. 225. /1957/ 557.
33. K.G. Paul The Enzymes 8. /1963/ 227. Acad. Press New
York Ed. Boyer, Lardy, Myrback.
34. H. Theorell The Enzymes 2. Part I. /1951/ 397. Acad.
Press New York Ed. J.B. Sumner K. Myrback.

35. K. Agner Acta Chem. Scand. 12. /1958/ 89.
36. H. Theorell A. Akeson Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. 17.
B. No 7. /1943/.
37. Holman R.T.S. Bergström The Enzymes 2. Part. 1. /1951/
565. Acad. Press New York Ed. J.B. Sumner K. Myrbäck
38. R.T. Holman F. Panzer B.S. Schweigert S.R. Ames Arch.
Biochem. Biophys. 26. /1950/ 199.
39. S. Bergström R.T. Holman Advances in Enzymol. 19. /
/1957/ 79.
40. S. Bergström R.T. Holman Advances in Enzymol. 8. /1948/
425.
41. T. Nagatsu T. Levitt S. Udenfriend J. Biol. Chem. 239.
No9. /1964/ 2910.
42. B. Petrack F. Sheppy V. Fetzer J. Biol. Chem. 243. No4.
/1968/ 743.
43. R.J. Wurzbarger I.M. Musacchio J. Pharmacol. and Exp.
Therapeutics 177. No.1. /1971/ 155.
44. M. Ikeda H. Levitt S. Udenfriend Arch. Biochem. Biophys
120. /1967/ 420.
45. T. Nagatsu M. Levitt S. Udenfriend Biochem. Biophys.
Res. Comm. 14. /1964/ 543.
46. H. Werbin C. Holoway J. Biol. Chem. 223. /1956/ 651.
47. T.L. Patton J. Organ. Chem. 24. /1959/ 1795.
48. Szalai I. Növényélettan Praktikum /1962/ 564.
49. D. Kertész R. Zito Nature 179. /1957/ 1017.

50. El-Bayomni E. Frieden J. Am. Chem. Soc. 79. /1957/
4854.
51. P.Plesner H.M. Kalclar Methods of Biochem. Anal. 3.
/1956/ 97. Interscience Publishers New York,
London Ed. D. Glicsk.
52. B.Petrack F. Sheppy V. Fetzer J. Biol. Chem. 243.
/1968/ 743.
53. M. Ikeda H. Levitt S. Udenfriend Arch. Biochem. Biophys. 120. /1967/ 420.
54. M. Ikeda H. Levitt S. Udenfriend Biochem. Biophys.
Res. Comm. 18. No.4. /1965/ 483.
55. G.A. Bray anal. Biochem. 1. /1960/ 279.
56. R.T. Holman S. Bergström The Enzymes 2. Part I. /1951/
559. Acad. Press New York Ed. B.Sumner.
57. H. Tauber E.L. Petit J. Biol. Chem. 195. /1952/ 703.
58. K.G. Paul Acta Chem. Scand. 12. /1958/ 1312.
59. B.D. Polis H.W. Shumkler J. Biol. Chem. 201. /1953/
475.
60. K. Agner Biochem. Biophys. Acta 96. /1965/ 463.
61. I. Huszák Biochemische Z. 312. /1942/330.
62. Matkovics B. Kovács E. Kisérlet. Orvostud. X. /1958/ 92.
63. S.J.Klebanoff: Biochemistry of the Phagocytic Process
Ed. J. Schultz North-Holland /1970/ 89.
64. Lucas F.V. Neufeld H.A. Utterback I.G. Martin A.P.
Stotz E. J. Biol. Chem. 214. /1955/ 775.

65. Hollander V.P. Stephens M.L. J. Biol. Chem. 234.
/1959/ 1901.
66. J. Fishman H. Guzik, L. Hellman Biochemistry 9. No.7.
/1970/ 1593.
67. T.E. Barman: Enzyme Handbook Springer Verlag 1969.

