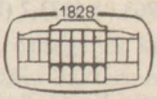
A bioszféra mikrobiológiája

I.

Szabó István Mihály

A bioszféra mikrobiológiája

I. kötet



Akadémiai Kiadó · Budapest 1988

507591

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

M. TUD. AKADÉMIA KÖNYVTÁRA
Könyvleltár 15605/1988. sz.

ISBN 963 05 4372 9 (Összkiadás)

ISBN 963 05 4373 7 (I. kötet)

© Akadémiai Kiadó, Budapest 1988

Printed in Hungary

Tartalomjegyzék

Előszó 7

1. fejezet. **A prokarioták és a bioszféra koevolúciója. A baktériumok anyagcseretípusai** 11
1.1. Az élet megjelenésének kozmikus előzményei 11
1.2. A Föld és a Világegyetem összehasonlítása 15
1.3. Szerves vegyületek az Univerzumban 19
1.4. Az őslégkör 22
1.5. Széles körű kutatómunka az élet és a bioszféra eredetének felderítésére 33
1.6. A biológiai, az ökológiai és az abiotikus fizikokémiai rendszerek koevolúciója a Földön 38
1.7. A szerves evolúció tendenciái a primitív Földön 3,8–2,3 milliárd évvel ezelőtt 45
1.8. A molekuláris önszerveződés és a precelluláris evolúció 50
1.9. A hidrofóbia jelenségének szerepe az élő anyag szerveződésében 69
1.10. A hiperciklus: a természetes önszerveződés feltételezett útja 73
1.11. A sejtes élet eredete 79
1.12. A sejt–sejt felismerési rendszer evolúciója 90
1.13. A recens prokariota sejttípus organizációja 94
1.14. Az anaerob anyagcsere 216
1.15. Az energiaszerzés és -konzerválás anyagcsereútjainak differenciálódása 249
1.16. ATP-igény és ATP-szintézis. Evolúciós funkciócsere 276
1.17. A szubsztrátszintű- és az elektrontranszport-foszforiláció változatai az anaeroboknál 306
1.18. A termodinamikai hatékonyság szabályozása az anaeroboknál 318

1.19. A metanogének mint ősi kemolitotróf autotrófok 322
1.20. A metanogének élettani differenciálódása és tevékenységük a modern bioszférában 334
1.21. A szulfátredukáló baktériumok ősiségének kérdése 348
1.22. A modern anaerob fotoszintetizáló baktériumok 350

1.23. A fényenergia befogása és konzerválása a fotoszintetizáló baktériumoknál.. 361
1.24. A fotofoszforiláció különleges megoldása az archaikus baktériumok egy csoportjában 387
1.25. A reduktív (fordított) citrátkör 398
1.26. A CO_2-fixáció ribulóz-difoszfát útja és ennek lehetséges evolúciója 406
1.27. A cianobaktériumok (kék–zöldalgák) 431
1.28. A sztromatolitok mikrobiológiája 454
1.29. Az oxidatív légkör kialakulásának problémaköre 468
1.30. Az aerob anyagcsereutak kiépülése 474
1.31. Az aerob anyagcsere 483
1.32. *Thermoplasma acidophilum* 513
1.33. Aerob kemolitotróf baktériumok 523
1.34. A baktériumgenom és működése 532
1.35. A genetikai információ változásainak, inter- és intraspecifikus átvitelének mechanizmusai a recens prokarioták világában. A bakteriális genom evolúciójának problémái 573
1.36. A prokarioták törzsfája 656
1.37. Az eukarioták eredete 671
1.38. Az eukariota sejtszerveződés néhány problémája 690

Előszó

A biológiai tudományoknak aligha van még egy szakterülete, melyen a kutatómunka annyira széles – az ipart, a mezőgazdaságot, a gyógyászatot, a természeti erőforrások kiaknázását, az űrkutatást stb. egyaránt felölelő – frontvonalon nyomulna előre, mint a mikrobiológia esetében. E tény hátterében a mikroorganizmusok anyagcseretípusainak, auto- és heterotrófoknak, foto- és kemolitotrófoknak, aerob, továbbá anaerob nitrát-, nitrit-, szulfát-, kén-, urán-, vas-, mangán- stb. légzőknek a sokasága és ezeknek az emberi környezet minden régióját átfogó, gyakran rendkívül specializált működése áll. Ma azt tartjuk, hogy a mikroorganizmusok a földtörténet során közel négy milliárd évet kitevő, kozmikus időtartamú korszakokon át differenciálódtak a ma élő anyagcsere típusaik légiójává. Energetikai hatékonyságukban egyre tökéletesedve a közösségi anyag- és energiaforgalom mind szorosabban koordinált kanalizációját valósították meg. Jelen biokémiai repertoárjuk összehasonlíthatatlanul gazdagabb, mint a magasabbrendű növényi és állati szervezeteké!

Már a XIX. század második felében, amikor az előtérben még a humán kórokozók elleni küzdelem állott, nyilvánvalóvá vált, hogy a kémiai elemek nagy földi biogeokémiai ciklusainak folytonosságát és ezáltal magának az életnek és evolúciójának a progresszióját is a mikroorganizmusok tartják fenn. Jelentőségüket már akkor is globális méretekben és földtörténeti távlatokban becsülték. A XX. században a mikrobiológia jelentős részt vállalt az ipari forradalmak előkészítése, a mezőgazdaság racionalizálása, a biodeterioráció-elhárítás és korrózióvédelem, a földkéregben végbemenő kémiai elemmigráció-kutatás stb. fejlesztése terén, míg a gyógyászatban a mikroba anyagcseretermék antibiotikumok bevezetésével a kórokozók in vivo leküzdésének korábban elképzelhetetlenül eredményes útjait nyitotta meg. Az 1960-as évekig a bioszféra anyagcseréjének mikrobiális negatív visszacsatoló rendszerekkel szabályozott útvonalait talaj- és vízmikrobiológusok adatai alapján rekonstruálták. Ebben a munkában a termőtalajok biokémiai dinamikájának vizsgálatával legalább három évtizeden át (1930 és 1950 között) kiemelkedő nemzetközi szerep jutott az egyik legnagyobb magyar mikrobiológus Fehér Dániel soproni erdészprofesszornak és iskolájának. Fehérnek az 1954-ben kiadott „Talajbiológiája" már 34 év óta az utolsó magyar nyelvű munka, mely az emberi környezetben végbemenő mikrobiológiai folyamatokról áttekintést nyújt.

Az 1960-as évek végén, még az ún. antibotikuméra virágkorában, a mikrobiológia két szakterületén jelentkezett forradalmi jellegű kibontakozás. A génsebészet, mely prokariota vektorokkal és rekombináns DNS-technológiával ipari fontosságú géntermékek tömegprodukcióját képes biztosítani, a biotechnológia fejlődésének ma még beláthatatlan távlatait nyitotta meg. Másrészt a már globális méreteket öltő kémiai környezetszennyezés kényszerítő erővel hatott a mikrobiológiai detoxifikációs mechanizmusok és általában a Föld ökológiai rendszere működésének megismerésére.

A biológiai tudományok hozzájárulása a termelés, a földi élet minőségének állandó fejlődéséhez az utóbbi másfél évszázadban egyre markánsabban rajzolódik ki. Nem túlzás az a megállapítás, hogy a biotechnológia kialakulása révén a biológia és ezen belül a mikrobiológia forradalmi méretű előretörésének vagyunk szemtanúi.

A klasszikus termelési rendszerekben elvileg új lehetőséget jelentett az ízeltlábúak bevonása a méhészet révén, melyet Vergilius a „Georgicon"-jában így foglal össze:

„Sic vos non vobis, mellificatis apes."

A mikroorganizmusok fokozott hasznosítása egy alacsonyabb rendű, de még hasznosabb biológiai energiaforrás, ill. eszköztár bevonását jelenti a világ termelésébe. Vergilius gondolatmenetét használva:

„Sic vos non vobis fermento actis microbae."

Az utóbbi évtizedben számos becslés jelent meg a bioiparok várható részesedéséről a világ össztermelésében. Nehéz megmondani, hogy ezek közül melyik reális, de egy biztos, hogy jelentőségük markáns és meghatározó lesz az emberiség sorsának alakulása szempontjából.

Az 1970 és 1988 között eltelt alig több mint másfél évtized kutatásai a Föld geobiokémiai evolúciója menetére vonatkozó elképzeléseinket is lényegesen megváltoztatták. Ősi típusú baktériumok sorát fedezték fel, melyek akár 100–110 °C között és pH 1 alatt is szaporodnak. Archaikus biológiai struktúrák létezését igazolták, mint pl. az izoprenoid lipidekből felépült egyrétegű ős-citoplazmamembránt. Egyedülálló anyagcsereutakat tártak fel, így a metanogének autotróf CO_2-fixációs rendszerét. A különböző korokból származtatott récens baktériumok energiagazdálkodásának eltéréseiből a Földfelszín évmilliárdos geokémiai változásaira következtettek, és meghatározták a reduktív-oxidatív légkörváltás idejét. 1980 körül, a létező legkonzervatívabb biológiai szerkezet a riboszomális 16 S RNS összehasonlító szekvenciaanalízisei alapján elsőnek vázolták fel az élővilág, geológiai időskálával egyeztetett, prekambriális evolúciós törzsfáját, melynek gyökerei a Föld kialakulását követő félmilliárd évig nyúlnak vissza. Mindezzel párhuzamosan fény derült napjaink új ipari szintézis termékeinek forgalomba hozatala és az ezek bontását katalizáló enzimekre kódoló új gének evolúciója közötti összefüggésekre, a komplex mikrobióták adaptációját elősegítő természetes interspecifikus génáram mechanizmusaira stb.

A „Bioszféra Mikrobiológiája" nagyvonalú áttekintését nyújtja a szárazulatok és tengerek anyagforgalmában kulcsfontosságú szerepet betöltő prokariotáknak. Bemutatja ezek közösségi szinten, különböző aspektusokban érvényre jutó mineralizációs, detoxifikációs vagy éppen környezetszennyező biokémiai reakcióhálózatait, és milliárdnyi évek távlatában idézi fel a nagy földi ökológiai rendszer evolúcióját. A szerző, Fehér Dániel tanítványa, e rendkívül célszerűen taglalt művével elsősorban is az 1975 és 1987 között közölt világirodalmi

adatokra és a maga és munkatársai elismert kutatási eredményeire támaszkodva régen nélkülözött, magas színvonalú, modern és a forrásmunka igényét kielégítő ismeretanyagot bocsát mindazok rendelkezésére, akik gyárakban, üzemekben, bányákban, kórházakban, állami és szövetkezeti gazdaságokban, kutatóintézetekben és még számtalan más területen valamilyen vonatkozásban a mikrobák tevékenységével foglalkoznak, vagy azt legalábbis megérteni törekednek. A Bioszféra Mikrobiológiájából, célszerű válogatással, egyetemeink, főiskoláink és más tanintézményeink oktatói hallgatóik számára szakosodásuk követelményeinek megfelelő tananyagot bármilyen kombinációban összeállíthatnak.

Meg vagyok győződve, hogy Szabó István Mihály könyve igen hasznos segítője lesz a hazai biológiai kutatómunkának.

TIGYI JÓZSEF
az MTA Biológiai Osztályának elnöke

A Föld bioszféraként megjelölt tartományában lezajló „tisztán" fizikai-kémiai vagy bármilyen szintű biológiai történéseknek – a magaslégkör kemizmusától az ember anyagcseréjén át a szilárd kéreg szerves kőzeteiben kibontakozó geokémiai szénülésig – aligha akad olyan mozzanata, melyet valamilyen módon, közvetve vagy közvetlenül, mikroorganizmusok ne befolyásolnának. Valójában ez a megállapítás még mindig csak szerény megfogalmazása annak a valóságos ténynek, hogy a bioszféra sajátos ökológiai rendszerét valamikor prokariota mikroorganizmusok (baktériumok) hozták létre, csaknem kétmilliárd éven át kizárólag ezek üzemeltették és hogy nélkülük a modern bioszféra anyag- és energiaforgalma is gyorsan összeomlana. Mindebből önként adódik, hogy a bioszféra mikrobiológiájának tárgyköre gyakorlatilag határterülete csaknem valamennyi tudományágnak a kőolajkutatástól az orvostudományig, a talajműveléstől a tenger- és műanyag-kémiáig, avagy a meteorológiától a műemlékvédelmen át az őslénytanig. Érthető tehát, hogy e munka célja – látszólag terjedelmével szöges ellentétben – e határterületek mikrobiológiai vonatkozású ismeretanyagának csupán vázlatos összefoglalása lehetett, vagyis mintegy vezérfonálul szolgálni mindazoknak az összefüggéseknek a megértéséhez és tanulmányozásához, melyeken a csaknem négymilliárd éven át tökéletesedett, mai, modern bioszféra globális anyagcseréje és energetikája nyugszik. Azt az alapvető megállapítást, hogy a bennünket körülvevő világegyetem állapotának és működésének megértéséhez csakis a múlt történetének, magának a teljes földi biogeokémiai metabolizmus evolúciójának ismeretén át vezet az út, igyekeztem nem szem elől téveszteni. Ugyanígy figyelembe vettem azt a tényt is, hogy a bioszférában a biológiai frakció minden, akár globális méretekben is felismerhető anyagcsere-folyamata a bonyolult közösségi struktúrák és sokszorosan integrált táplálkozási hálózatok egzisztenciája ellenére, végső soron az egyedi szervezetek metabolizmusában molekuláris síkon realizálódik. Mindennek ellenére „A bioszféra mikrobiológiája" nem azonos a baktériumok általános és részletes biokémiájával, minthogy ennek elsősorban csak azokat a részterületeit érinti, ahonnan kiindulva a celluláris, szubcelluláris és molekuláris folyamatokat valamilyen vonatkozásban a bioszféra egészének működésére és történetére, avagy az emberi tevékenység ezekkel összefüggő problémáira vetíthetjük ki. A súlypon-

tosan elsősorban is a prokarioták létrejöttére és mai tevékenységére összpontosuló anyag 177 alfejezetre tagolódik. Ezek – tekintet nélkül a terjedelmükben jelentkező különbségekre – egy-egy több-kevesebb részletességgel tanulmányozott vagy éppen csak nagyon kevéssé kutatott, de mindenképpen kiemelkedő fontosságúnak tűnő, önállóan kezelhető körét képviselik jelen ismereteinknek. A kézikönyvek hagyományaitól eltérően, számos helyen részletes utalásokat találhatunk az alkalmazott módszerekre vonatkozóan is. Ez a megoldás véleményem szerint sokkal mélyebb bepillantást enged az egyes területek kutatómunkájába, mint a végső konklúziók kizárólagos, háttér nélküli egybevetése.

E munka megírásánál mindvégig törekedtem a föld- és a biológiai tudományok elválaszthatatlan egységéből fakadó geobiológiai szemlélet érvényesítésére. Szükségesnek tartom ezt hangsúlyozni, mivel felsőfokú oktatásunkban az utóbbi évtizedekben e két tudományterületet, a környezetvédelmi képzés követelményeivel ellentétben, de a jövőben feltétlenül már tarthatatlanul, mind élesebben elkülönítették.

Köszönetet kell itt mindazoknak mondanom, akik e könyv megírásában és szakmai szintjének javításában segítségemre voltak. Így elsősorban is Szabó Gábor és Ferenczy Lajos akadémikusoknak, Koch Sándor, Simon Tibor és Szegi József professzoroknak, továbbá Szollár Zsuzsának, Klaniczay Júliának és Marton Andornak az Akadémiai Kiadó szerkesztőinek, valamint az ELTE Mikrobiológiai Tanszéke oktatóinak. Végül köszönet illeti Regéczy Lászlónét és Kandikó Magdolnát a kézirat nyomda alá rendezéséért, csakúgy mint Szabó Attilát a név- és tárgymutató összeállításáért.

Szabó István Mihály
az ELTE tanára

1. fejezet

A prokarioták és a bioszféra koevolúciója. A baktériumok anyagcseretípusai

1.1. Az élet megjelenésének kozmikus előzményei

Rendkívül nehéz, sőt bizonyosan megoldhatatlan feladat lenne az élet és az Univerzum korát években mérve összehasonlítani. Pontosan egyikét sem ismerjük. Az élet eredetét a Földön napjainktól visszafelé számítva, 4×10^9 és 3×10^9 évek közötti időre teszik. Egyáltalán nem állítható azonban, hogy az Univerzum egészét tekintve az élet először éppen a Földön jött volna létre, sőt ez aligha látszik valószínűnek. Az Univerzum korával tehát csakis a földi életnek, és nem az életnek mint olyannak a korát vethetnénk össze – már amennyiben az előbbit ismernénk. Súlyos nehézségeink vannak azonban az Univerzum korának becslését illetően is.

1.1.1. A kiterjedő, homogén és izotróp Univerzum

A több milliárd fényév sugarú környezetünkre, a világmindenségre, az Univerzumra vonatkozó vizsgálati adatok és az általános relativitáselmélet alapján, ma már széles körűen elfogadott, modern kozmológiai világmodell birtokában vagyunk. Ez a világmodell, mely a Világmindenségnek mint összefüggő egésznek jelenlegi állapotáról, létrejöttéről és változásáról, a galaxisok megfigyelt távolodási sebességéről szóló elmélet, lehetővé teszi, hogy a Világegyetem múltjában végbement történések kronológiai sorrendjét felvázolhassuk és a Világegyetem korára vonatkozóan nagyvonalú becslésekbe bocsátkozhassunk.

Az Univerzum jelenleg is észlelhető kiterjedése egyetlen hatalmas és szupersűrű állapotból kiinduló robbanással („Big Bang") kezdődött. Ez az Univerzum mai felfogásunk szerint homogén, izotróp és feltehetően „zárt". Homogenitását felismerni csupán a Naprendszer vagy akár saját galaxisunk viszonylatában is aligha lehetséges. Anyagtartalmának homogenitása azonban még ezeknél is hatalmasabb skálán egyrészt a látha-

tó galaxisok és radioforrások megoszlásának egyöntetűségében, másrészt az egyetemes röntgen-háttérsugárzás uniformitásában kétségtelenül megállapítható. Ez azt jelenti, hogy az Univerzum legszélesebb skálán érvényesülő tulajdonságai bármely galaxison élő megfigyelő számára bármiféle irányban is vizsgálódva azonosak lehetnek. Ami az Univerzum „zárt"-ságát illeti, ez azt feltételezi, hogy kiterjedése nem a végtelenbe tart (vagyis a Világegyetem nem „nyílt"), hanem a kiterjedés véges, amit egy idő után majd összeroskadás követ. Az is elfogadott álláspont, hogy a Világegyetem magva az ősrobbanást követően nem maradt elegendő ideig forró és sűrű ahhoz, hogy a nehezebb elemek, mint amilyen a szén és a vas is, az ősi protonokból és neutronokból felépülhettek volna. A nehéz elemek már jóval később a csillagok belsejében szintetizálódhattak. Ezzel szemben a hélium (kozmikus gyakoriságában a hidrogén után a második) univerzális és egyöntetű elterjedése arra utal, hogy ez nem a csillagok belsejében, hanem még az ősrobbanást követő magas hőmérsékleten alakult ki.

1.1.2. A földi élet megjelenésének időpontja az Univerzum történetének időskáláján

Az ősrobbanástól számítható kozmikus történések kronológiai sorrendjét BARROW és SILK után (1980) az *1. táblázat* mutatja be. E szerzők másokkal ellentétben* az ősi robbanás időpontját 20×10^9 évre datálják, amit szerintük rendkívül rövid időn belül az anyagvilág egymást váltó néhány alapvető korszaka drámai sebességgel követett. A „Big Bang"-től galaxisunkban a Naprendszer kiinduló anyagát képező protoszoláris felhő megjelenéséig $15{,}2 \times 10^9$ év telt el, ezt pedig 2×10^9 éven belül már a földi ősbaktériumok térhódítása követte. Vagyis a földi baktériumok az Univerzum 20 milliárd évéből 3, de sokak szerint csaknem 4 milliárd évet kitevő csillagászati időtartamú korszakon át léteztek, ami megközelítheti az Univerzum teljes élettartamának egyötödét. E biológiai korszak viszonylagos hossza még ennél is sokkal tartósabb lehetett, ha azoknak a kalkulációit vesszük figyelembe, akik az ősrobbanást csak

* A Világegyetem korának becsléséhez több módszer is rendelkezésünkre áll (VAN DEN BERGH, 1981). Az izotópok gyakoriságát alapul véve az Univerzum kora 10–15 milliárd évre tehető. A legrégebbi galaktikus csillagok evolúciójából 12–20 milliárd évvel számolnak. Végül a galaxisok haladási sebessége és a tőlünk számított távolsága közötti ún. HUBBLE-reláció alapján, mikor is a reverz HUBBLE-paraméter *(H)* az egyenletesen kiterjedő Univerzum korának mértékeként kezelhető, szintén lehetőségünk nyílik korbecslésekre. Sajnos úgy tűnik, hogy a Világegyetem kiterjedésében rendkívül nagyfokú lokális zavarok jelentkeznek, ami a VIRGO-szupercsoport gravitációs hatására vezethető vissza. Emiatt VAN DEN BERGH (1981) szerint, jelenleg mindössze annyit mondhatunk, hogy a Világegyetem kora hozzávetőlegesen 10–20 milliárd évre tehető.

1. táblázat

A Világegyetem történetének főbb korszakai. Az időadatok feltételezettek, minthogy a Világegyetem pontos kora ismeretlen. Emiatt helyesebb a történések idejét a „vöröseltolódás"* terminussal kifejezni, mely a kiterjedő Világegyetem sűrűségi fokának mértékét adja meg. A nagy robbanáshoz közel eső időkre jellemző ultranagy kiterjedési sebességeknél a vöröseltolódás $= (1+v/c)/(1-v^2/c^2)^{1/2}-1$, ahol v a sugárzásforrás sebessége, míg c a fénysebesség (3×10^8 m/sec). (BARROW és SILK, 1980)

Kozmikus idő	Korszak	Vöröseltolódás	Történések	Évvel ezelőtt
0	„Egyedüliség"	Végtelen	Nagy robbanás	20×10^9
10^{-43} sec	Planck idő	10^{32}	Részecskeképződés	20×10^9
10^{-6} sec	Hadron kor	10^{13}	A proton–antiproton párok annihilációja	20×10^9
1 sec	Lepton kor	10^{10}	Az elektron–pozitron párok annihilációja	20×10^9
1 min	Sugárzás kor	10^9	A hélium és a deutérium magszintézise	20×10^9
1 hét		10^7	A kort megelőző sugárzási termalizálás	20×10^9
10 000 év	Anyag kor	10^4	A Világegyetemben kibontakozik az anyag dominanciája	20×10^9
300 000 év	Differenciálódás kora	10^3	A Világegyetem átlátszóvá válik	$19\times9997\times10^9$
$1–2\times10^9$ év		10–30	Kialakulnak a galaxisok	$18–19\times10^9$
3×10^9 év		5	A galaxisok csoportosulni kezdenek	17×10^9
4×10^9 év			A mi protogalaxisunk összeroppan	16×10^9
$4{,}1\times10^9$ év			Létrejönnek az első csillagok	$15{,}9\times10^9$
5×10^9 év		3	Quazárok születnek; II-es csillagpopuláció létrejötte	15×10^9
10×10^9 év		1	I-es csillagpopuláció létrejötte	10×10^9
$15{,}2\times10^9$ év			Kialakul a protoszoláris csillagközi felhő	$4{,}8\times10^9$
$15{,}3\times10^9$ év			A protoszoláris por és gázfelhő összeroppan	$4{,}7\times10^9$
$15{,}4\times10^9$ év			Bolygóképződés; kőzetek merevedése	$4{,}6\times10^9$

1. táblázat folytatása

Kozmikus idő	Korszak	Vöröseltolódás	Történések	Évvel ezelőtt
$15{,}7 \times 10^9$ év			Erőteljes kráterképződés a bolygókon	$4{,}3 \times 10^9$
$16{,}1 \times 10^9$ év	Archeozoikum		Létrejönnek a legrégibb földi terresztrikus kőzetek	$3{,}9 \times 10^9$
17×10^9 év			Megjelennek az első baktériumok	3×10^9
18×10^9 év	Proterozoikum		Oxigéngazdag légkör fejlődik	2×10^9
19×10^9 év			Megjelennek a makroszkópos élő szervezetek	1×10^9
$19{,}4 \times 10^9$ év	Paleozoikum		Eukarióta kövületek	600×10^6
$19{,}55 \times 10^9$ év			Első halak	450×10^6
$19{,}6 \times 10^9$ év			A legkorábbi szárazföldi növények	400×10^6
$19{,}7 \times 10^9$ év			Koniferák	300×10^6
$19{,}8 \times 10^9$ év	Mezozoikum		Első emlősök	200×10^6
$19{,}85 \times 10^9$ év			Első madarak	150×10^6
$19{,}94 \times 10^9$ év	Coenozoikum		Első főemlősök	60×10^6
$19{,}95 \times 10^9$ év			Az emlősök előretörése	50×10^6
20×10^9 év			*Homo sapiens*	1×10^5

*Megjegyzés: A különböző galaxisok által kibocsátott fénysugárzás színképvonalainak jellegzetes megoszlása hasonló a Nap és galaktikánk más csillagai által kibocsátott fénysugárzáséhoz, azzal a különbséggel, hogy az előbbiek esetében a vonalak a színkép hosszú hullámú (vörös) vége felé tolódnak el. Ez a „vöröseltolódás" a galaxisok távolodásával magyarázható. A távolodással a fényhullámok megnyúlnak. A világegyetem jelenleg tágul.

10×10^9 év távlatába helyezik. Minthogy valójában a „Big Bang" időpontjára vonatkozóan nincsenek pontos adataink, arra irányuló igyekezetünk, hogy a földi élet korát a Világegyetemével összehasonlíthassuk, ma még csak kétes eredménnyel járhat. Azt a következtetést azonban már most joggal levonhatjuk, hogy a baktériumok ősi szervezetek és földi történetük is kozmikus távlatokra nyúlik vissza. Egykoron ezek a szervezetek „alapították" a bioszférát és legalább 2 milliárd éven át annak kizárólagos lakói voltak. Az Univerzum jelen térségeiben más bolygókon élők után kutatva feltétlenül nagyobb annak a valószínűsége, hogy mikroorganizmusokra, mintsem hogy értelmes lényekre bukkanjunk.

1.2. A Föld és a Világegyetem összehasonlítása

A Világegyetem a maga egészét tekintve 92,8% hidrogénből és 7,1% héliumból áll (DICKERSON, 1978). A fennmaradó 0,1%-ot kevés nitrogén, oxigén, neon és más elemek teszik ki. Az elemek gyakorisága általában fordítottan arányos a rendszámmal (ami azonos az atommagot alkotó protonok számával). Ezenkívül a páros rendszámú elemek, vagyis azok, melyek atommagja páros számú protont tartalmaz, sokkal gyakoribbak páratlan rendszámú szomszédjaiknál. Ennek az az oka, hogy a csillagok belsejében végbemenő magreakciók során a nehezebb elemek a könnyebbekből szintetizálódnak és hogy ez a szintézis, legalábbis a vas rendszámáig sorolható elemek esetében, két protont tartalmazó α-részecskék vagy héliummagvak felvételével jár együtt. A páros rendszámú elemek azért is sokkal gyakoribbak, mivel ezek a szintézis főáramában helyezkednek el. A páratlan rendszámúak viszont azért ritkábbak, mivel mellékreakciók során jönnek létre. Másrészt a berillium például ritkábban fordul elő mint a szén, minthogy, sajátos módon, három héliummag fúziója szénné inkább végbemegy, mint két héliummag fúziója berilliummá.

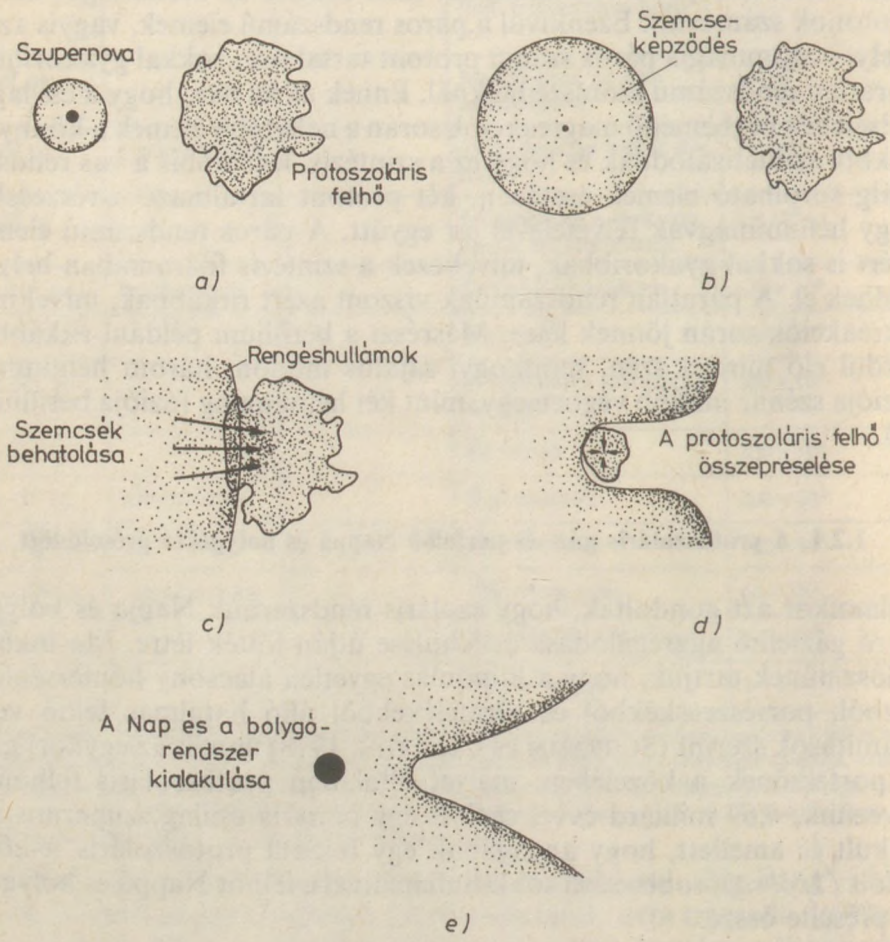
1.2.1. A protoszoláris gáz- és porfelhő Nappá és bolygóivá préselődött

Valamikor azt gondolták, hogy szoláris rendszerünk Napja és bolygói forró gázfelhő aggregálódása és lehűlése útján jöttek létre. Ma inkább valószínűnek tartjuk, hogy a kiindulás egyetlen alacsony hőmérsékletű gázból, porrészecskékből és törmelékekből álló hatalmas felhő volt. Számítások szerint (SCHRAMM és CLAYTON, 1978) annak az egykori gáz- és porfelhőnek a közelében, melyet általában protoszoláris felhőnek nevezünk, 4,69 milliárd évvel ezelőtt egy masszív csillag szupernovává alakult és amellett, hogy anyagának egy része a protoszoláris felhőbe hatolt *(1. ábra)*, robbanása sokk-hullámaival e felhőt Nappá és bolygóivá préselte össze.

1.2.2. A bolygók eltérő elemi összetételének okairól

Midőn a Nap már elkülönült, centrumától különböző távolságokban a felhő további lokális periferiális inhomogenitásai újabb kisebb, másodlagos aggregációs központokká váltak, melyekből azután a bolygók tömörültek ki. A nagy külső bolygók – Jupiter, Szaturnusz, Uránusz és a Neptun – a felhő eredeti összetételét feltehetően hívebben tükrözik vissza, minthogy elemi felépítésük nagyjából a Világegyetemével áll közel.

Ezek ugyanis főleg hidrogénből, héliumból, metánból, ammóniából és vízből állnak. A kisebb belső bolygók – Merkur, Vénusz, Föld és Mars – nehéz elemekben gazdagabbak, viszont szegényebbek olyan gázokban (hélium, neon), melyek e bolygók gyenge gravitációs vonzóköréből elszökhettek. Az alacsonyabb mérvű gravitáció és a magas hőmérséklet



1. ábra

Egy közeli szupernova robbanásának sokk-hullámai szolgáltatták azt a préselő erőt, mely több mint négy és fél milliárd évvel ezelőtt a diffúz protoszoláris por- és gázfelhőt a Naprendszer tagjaivá alakította át. *a)* A szupernovából kivetett anyagfelhő gáz halmazállapotú lehetett. *b)* Azonban feltételezhető, hogy e gázban már nagyon korán igen ellenálló ásványokból szemcsék kondenzálódtak. *c)* Midőn a kiterjedő szupernova-maradvány a protoszoláris ködöt elérte, *d)* részecskéinek egy hányada e ködbe srapnerszerűen fúródott be, és magával vitte azokat az izotóp-rendellenességeket, melyeket manapság e szupernovából származó meteoritokban figyelhetünk meg. A szupernovából eredő gáz legnagyobb része azonban a protoszoláris ködöt mintegy körülölelve *e)* azt úgy préselte össze, hogy annak sűrűsége a kritikus értéket már meghaladta, emiatt saját gravitációjának hatására összeomlott és belőle új csillag jött létre (SCHRAMM és CLAYTON, 1978)

2. táblázat

A legfontosabb elemek előfordulása (a periódusos rendszer első 30 elemének gyakorisága a Világegyetem, a Föld egésze, a Földkéreg, az óceánok vize és az emberi test viszonylatában atom/100 000 atomra kalkulálva; a – jel azt jelzi, hogy az illető elem gyakorisága kisebb ennél az értéknél) (*Dickerson*, 1978)

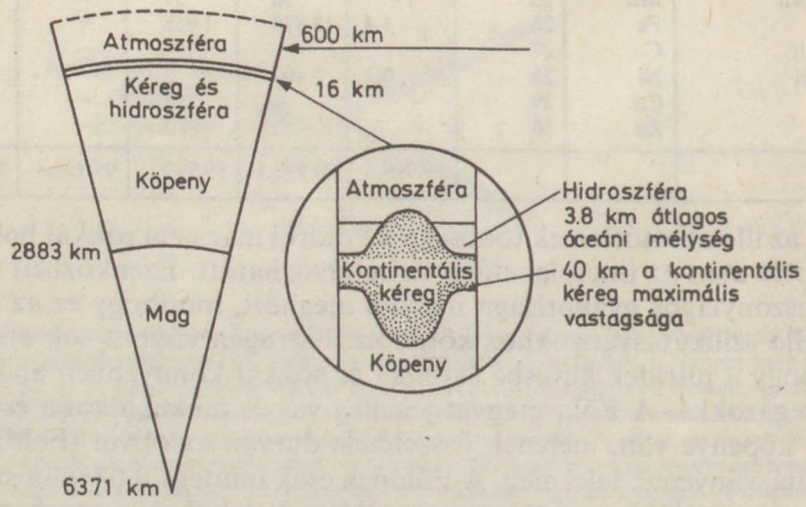
Elem	Vegyjel	Rendszám	Világ-egyetem	Föld	Földkéreg	Óceánvíz	Emberi test
Hidrogén	H	1	92 714	120	2 882	66 200	60 563
Hélium	He	2	7 185	–	–	–	–
Lítium	Li	3	–	–	9	–	–
Berillium	Be	4	–	–	–	–	–
Bór	B	5	–	–	–	–	–
Szén	C	6	8	99	55	14	10 680
Nitrogén	N	7	15	0,3	7	–	2 440
Oxigén	O	8	50	48 880	60 425	33 100	25 670
Fluor	F	9	–	3,8	77	–	–
Neon	Ne	10	20	–	–	–	–
Nátrium	Na	11	0,1	840	2 554	290	76
Magnézium	Mg	12	2,1	12 500	1 784	34	11
Alumínium	Al	13	0,2	1 300	6 251	–	–
Szilícium	Si	14	2,3	14 000	20 475	–	–
Foszfor	P	15	–	140	79	–	130
Kén	S	16	0,9	1 400	33	17	130
Klór	Cl	17	–	45	11	340	33
Argon	Ar	18	0,3	–	–	–	–
Kálium	K	19	–	58	1 374	8	37
Kálcium	Ca	20	0,1	460	1 878	6	230
Skandium	Sc	21	–	–	–	–	–
Titán	Ti	22	–	28	191	–	–
Vanádium	V	23	–	–	4	–	–
Króm	Cr	24	–	–	8	–	–
Mangán	Mn	25	–	56	37	–	–
Vas	Fe	26	1,4	18 870	1 858	–	–
Kobalt	Co	27	–	–	1	–	–
Nikkel	Ni	28	0,1	1 400	3	–	–
Réz	Cu	29	–	–	1	–	–
Cink	Zn	30	–	–	2	–	–
			99 999,5	99 998,1	99 999	99 994,4	99 999

miatt az illó alkotóelemek többsége a Földről már nem sokkal bolygónk létrejötte után az interplanetáris térbe távozhatott. Ezenközben az oxigén viszonylagos gyakorisága nagyon megnőtt, minthogy ez az elem a nem illó szilikátásványokhoz kötődött. Nitrogén viszont sok elveszett, minthogy a nitridek kevésbé stabilak és sokkal könnyebben alakulnak át illó gázokká. A Föld magvát jelenleg vas és nikkel alkotja és ennek olyan köpenye van, melynek összetétele durván az olivin ($FeMgSiO_4$) szilikátásványának felel meg. A Földnek csak mintegy 0,034%-a szén *(2. táblázat)*. A Föld – mint az a *2. táblázat*ból látható – csak nagyon kevéssé tükrözi vissza a Világegyetem egészének összetételét. Az emberi

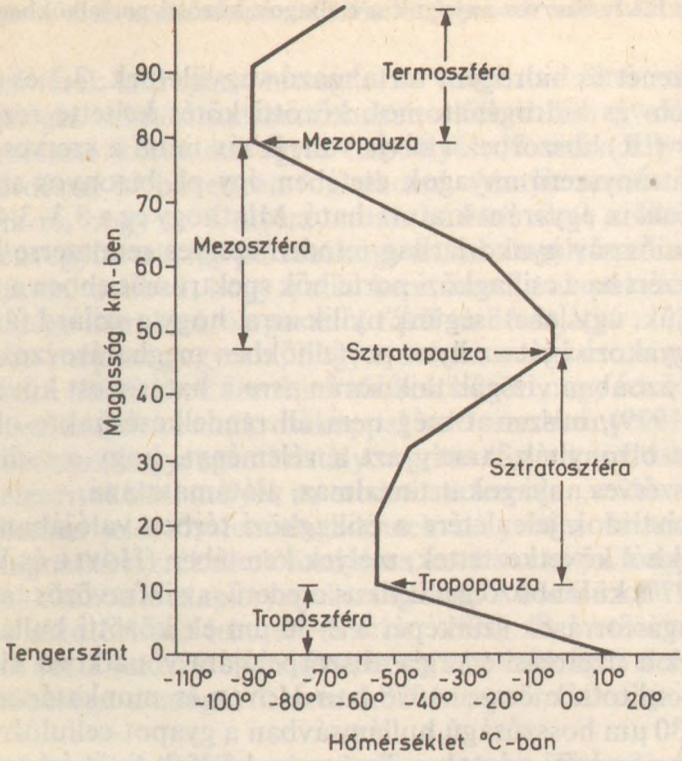
test összetétele megközelítően valamennyi élő szervezet összetételét reprezentálja. Az elemek közül huszonnégyet az életfolyamatok szempontjából esszenciálisnak tartanak, ezek: hidrogén, szén, nitrogén, oxigén, fluor, nátrium, magnézium, szilícium, foszfor, kén, klór, kálium, kalcium, vanádium, króm, mangán, vas, kobalt, réz, cink, szelén, molibdén, ón és a jód.

1.2.3. A Föld szerkezeti differenciálódása

A Föld, amint a porfelhőből folyamatosan gyarapodva felépült, a felszabaduló hő eredményeként magra, köpenyre és kéregre rétegeződött *(2. ábra)*. Eredeti felszíne túlságosan forró lehetett ahhoz, hogy azon a víz cseppfolyós állapotban megmaradjon, de mihelyt hőmérséklete a forráspont alá csökkent, a víz a belső terekből vulkáni gázkitörésekkel és kigőzölgésekkel a felszínre került, kondenzálódott és létrejöttek az ősóceánok. A kigőzölgések és gázkitörések a másodlagos atmoszféra forrásává váltak, melyben a vízgőz az ásványok hidratációs vizéből, a metán, a szén-dioxid és a szén-monoxid a fémkarbidok lebomlásából, az ammónia és a nitrogén nitridekből, végül a kén-hidrogén szulfidokból származott. Ebben a másodlagos atmoszférában, mely inkább redukáló, mintsem oxidáló jellegű volt, alakult ki az élet is.



2.a. ábra
A Föld felépítése és szerkezete



2.b. ábra

Az atmoszféra kéregfelszín-közeli régiói és azok átlaghőmérsékletét szemléltető görbe

1.3. Szerves vegyületek az Univerzumban

Minden jel arra utal, hogy bonyolult szénvegyületek, szerves anyagok szintézisének, sőt szénülésének feltételei nemcsak a Földön, de más égitesteken és az Univerzum csillagok közötti térségeiben is adottak lehetnek. A csillagászok (HOYLE és WICKRAMASINGHE, 1977; KNACKE, 1977; SMITH és ADAMS, 1978; HOYLE és munkatársai, 1978; DULEY és WILLIAMS, 1979, etc.) különösen nagy figyelmet szentelnek a csillagközi tér porfelhőiben lebegő részecskék kémiai összetételének, közöttük a feltételezett poliszacharid szemcsék, továbbá különböző szénvegyületek aggregátumai felépítése megismerésének. Jóllehet a csillagközi térben a szén, nitrogén, oxigén és hidrogén részvételével szintetizálódó anyagok genezisét, legalábbis elméleti alapon, minden nehézség nélkül magyarázhatjuk, ill. elképzelhetjük, mégis a jelenleg rendelkezésünkre álló adatok alapján aligha állíthatjuk, hogy az űrben a szerves anyagokból felépült részecskék jelentős mennyiségével számolhatnánk.

1.3.1. Szerves anyagok a csillagok közötti porfelhőkben

Minden szenet és hidrogént tartalmazó vegyületnek, 3,3 és 3,4 μm között, a szén- és hidrogénatomok közötti kötés keltette rezgés folytán infravörös (IR) abszorpciós sávja van. E sáv mind a szerves polimerek, mind a kátrányszerű anyagok esetében, így pl. bizonyos széntartalmú kondritoknál is, egyaránt kimutatható. Minthogy ez a 3,3–3,4 μm közötti abszorpciós sáv gyakorlatilag minden szerves rendszerre kifejezetten jellemző, ezért ha a csillagközi porfelhők spektrumát ebben a tartományban figyeljük, úgy lehetőségünk nyílik arra, hogy a szilárd fázisú szerves anyagok gyakoriságát az ilyen porfelhőkben meghatározzuk. DULEY és WILLIAMS azonban vizsgálataik során arra a határozott következtetésre jutottak (1979), miszerint még nem áll rendelkezésünkre olyan spektroszkópiás bizonyíték, amely azt a véleményt, hogy a csillagközi por zömében szerves anyagokat tartalmaz, alátámasztaná.

Poliszacharidok jelenlétére a csillagközi térben valójában azokból a vizsgálatokból következtettek, melyek keretében (HOYLE és WICKRAMASINGHE, 1977) különböző galaktikus eredetű, az infravörös tartományba tartozó sugárforrások színképét a 2–30 μm-ek közötti hullámsávban a cellulóznak a sugárzási energia abszorpciójára vonatkozó kísérleti adataival hasonlították össze. 1978-ban HOYLE és munkatársai közölték, hogy a 8–30 μm hosszúságú hullámsávban a gyapot-cellulózra vonatkozó abszorpciómérési adatok a Trapezum-ködfolt felől érkező emisszióval jó megegyezést mutatnak. Az összefüggések pontosítására törekedve, a galaktikus infravörös sugárforrások spektrumának interpretálására, átlag poliszacharid-transzmittanciagörbét szerkesztettek. Adataikból arra is következtettek, hogy a csillagközi térben a már kialakult poliszacharidok szénüléshez hasonló részleges degradációjánál vagy ellenkezőleg, a poliszacharidok szintézisének folyamatában mint köztitermékek, sajátos szerkezetű szénhidrogének is termelődhetnek.

Szemben DULEY és WILLIAMS véleményével a radioasztronómusok a csillagok közötti közegben napjainkra már több mint 35 különböző szerves molekulaféleséget mutattak ki (HAHN, 1982). Ezek nagyrészt két és három szénatomosak, de vannak sokkal komplexebbek is, mint pl. a ciano-tetraacetilén ($HC{\equiv}C{-}C{\equiv}C{-}C{\equiv}C{-}C{\equiv}C{-}C{\equiv}N$). Mind a viszonylag meleg (20–100 K) „giant" molekuláris felhők, mind a „sötét", kevéssé sűrű és viszonylag hideg ($T < 15K$) felhők a Naphoz hasonló csillagok evolúciójának színterei lehetnek, és ugyanakkor komplex szerves molekulák forrásai is. A csillagok közötti hideg porfelhők állapotait szimuláló laboratóriumi kísérletek szerint ezekben szerves polimerek jöhetnek létre, melyek a porrészecskék körül bevonatot képezhetnek. Egyes nézetek nem tartják azt sem kizártnak, hogy a hideg interstelláris porfelhőkben a szerves anyagok fontos alkotó komponensek is lehetnek.

1.3.2. A szén kemizmusán alapuló élet feltehető univerzalitása

A csillagközi terek hidrogén-, nitrogén- és oxigéntartalmú szénvegyületeinek lehetséges szintézismechanizmusai, előfordulási gyakorisága és kémiai természete körül ma egyre terebélyesedő viták folynak. Nem célunk e kérdéssel itt bővebben foglalkozni. Annyit azonban tényként fogadhatunk el, hogy az Univerzumban bárhol, ahol a feltételek erre adottak, szénvegyületek, így például nagy molekulasúlyú polimerek szintetizálódhatnak, továbbá, hogy a szén kemizmusán alapuló élet létrejöttének lehetősége nem kizárólagosan a földi miliő sajátja.

Érdemes itt még megjegyezni, hogy a széntartalmú és „kondrit"-ként ismert egyszerű meteoritok szenének többek között nagy feloldóképességű transzmissziós elektronmikroszkóppal való tanulmányozása fedte fel, hogy ez elsősorban is gyengén kristályos grafit (SMITH és BUSECK, 1981). Az ilyen meteoritokban, melyek az eredeti aszteroida „szülő alakulatokban" feltehetően jelentős felmelegedésnek még nem voltak kitéve, a grafit- és magnetitkeverékek előfordulása azt bizonyítja, hogy a grafit a Föld kialakulásához is alapanyagul szolgált és a korai szoláris felhőnek szignifikáns alkotóeleme lehetett (SMITH, 1981). E meteoritok szöveti felépítéséből azt is valószínűsíthetjük, hogy a bennük levő elemi állapotú vas nagy többsége a magnetit szén közvetítette redukciója révén jött létre.

Újabban jelentős kutatómunka összpontosul a Titán (a Szaturnusz egyik holdja) felületén végbemenő szervesanyag-szintézis lehetséges mechanizmusainak felderítésére. CAPONE és munkatársai (1980) feltételezik, hogy a Titán nitrogéntartalmú légkörében a kozmikus sugárzások bombázásának hatására egyszerű szerves nitrogénvegyületek, mint pl. a hidrogén-cianid nagy gyakorisággal keletkeznek. A Titánon ennek és a ciano-acetilénnek (HCCCN) a jelenlétét már sikerült is kimutatni. A Voyager–I bizonyította be, hogy a Titán légkörében a molekuláris nitrogén a fő komponens. CAPONE és munkatársai (1981) szerint itt, az alsó atmoszférában még bonyolultabb szerves nitrogénmolekulák is képződhetnek, így etil-cianid (CH_3CH_2CN) és vinil-cianid (CH_2CHCN) is. Különben ilyen molekulákat néhány, sötét csillagközi felhőben is észleltek már (KROTO és munkatársai 1978). A komplex szerves nitrogénvegyületek szintézisének lehetséges reakcióútjait – a Titán légkörének viszonylatában – CAPONE és munkatársai (1981) széles körű megfontolások tárgyává tették.

1.4. Az őslégkör

A földtörténeti evolúció során a légkör és az óceánok globális méretekben mindig is olyannyira egymással összekapcsolt és egységes környezeti tényezőt jelentettek, hogy emiatt könnyen megérthetjük azt az igyekezetet, amellyel napjainkban a légkör őstörténetét megismerni törekednek. A légkörben jelenleg fellelhető gázokat az alábbiak szerint csoportosíthatjuk: **1.** Fő-gázok (ezek keverékaránya felette van a 10^{-4} térfogatrésznek): nitrogén, oxigén, szén-dioxid és vízgőz; **2.** Nemesgázok: argon, neon, hélium, kripton, xenon és ezek izotópjai; **3.** Nyomokban előforduló gázok mint a metán, hidrogén, nitrogén-dioxid, szén-monoxid és még sok más egyéb, melyek keverékaránya alatta van a 10^{-6}-nak. Ez utóbbiak viszonylag gyors, nehezen követhető körforgalmi dinamikája alig ismert, de a légkör földtörténeti fejlődését mindenesetre kevésbé érintették. A nemesgázok jelentősége az őslégkörkutatás szempontjából kitűnik abból a tényből, hogy kémiai inertségük folytán a kozmo- és geokémiai folyamatok számára ideális nyomjelző elemeket adtak és adnak le.

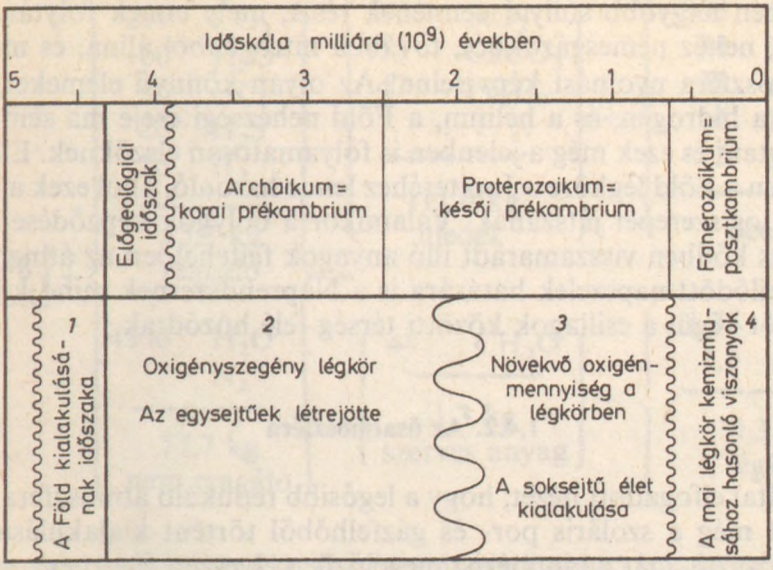
1.4.1. Föld kialakulásakor lejátszódott folyamatok

A földi légkör fejlődését csak a Földnek mint égitestnek és szilárd kérgének kialakulásával összefüggésben érthetjük meg. A Földön az üledékek, az óceánok és a légkör ma egyetlen geokémiai egységet alkotnak. Ez az egység azonban csak hosszú évmilliárdok során át jutott el jelen anyagforgalmi szintjére. Evolúciójában JUNGE (1981) négy alapvető periódust különböztet meg *(3. ábra)*.

Az első korszak magának a Földnek a kialakulása volt a szoláris gáz- és porfelhőből. Ez a jelenlegi elképzeléseink szerint néhány százmillió évnél nem tarthatott tovább és mintegy $4{,}6 \times 10^9$ évvel ezelőtt már be is fejeződött. Ez után nemsokára a földköpenyből megindult gázkiáramlások eredményeként létrejött az őslégkör, mely oxigénmentes volt.

Ez az ősatmoszféra a földtörténet első felén át folyamatosan fennmaradt. Mintegy 2×10^9 évvel ezelőtt a harmadik korszak kezdetén az oxigén mennyisége a légkörben emelkedni kezdett és a mai szintjét a korai fanerozoikumban (negyedik korszak kezdete) érte el. Ezt követően az oxigén szintje, bizonyos ingadozásoktól eltekintve, mind a mai napig megközelítően állandó maradt.

Amint a szoláris „ősköd" vagy pontosabban gáz- és porfelhő hűlni kezdett, a legmagasabb párolgáshőjű, vagyis a legkevésbé illó elemekből, ill. anyagkomponensekből kondenzációval kisméretű, diszkrét, szilárd anyagrészecskék különültek ki. A fokozatos lehűlés során, igaz cseké-



3. ábra

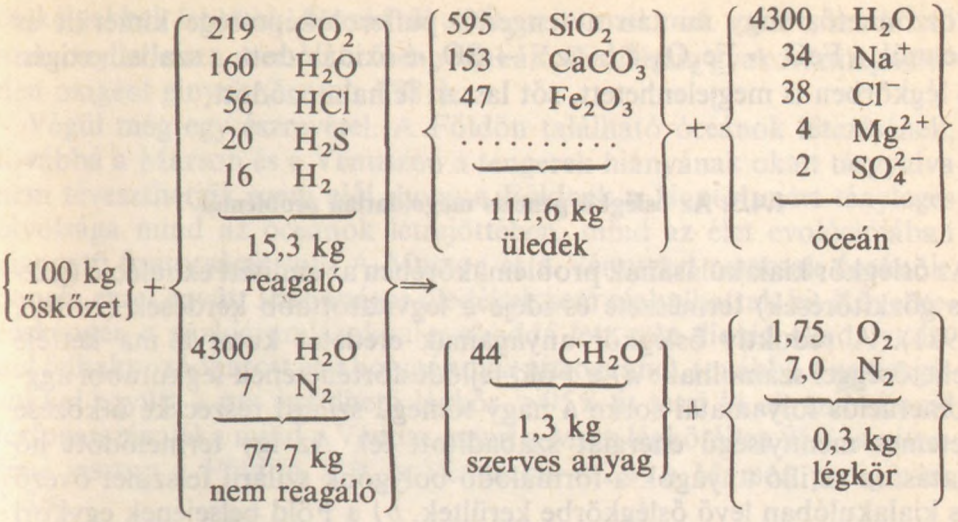
A földtörténet alapvető korszakai. Felül a geológiai időbeosztás látható. Az ún. előgeológiai periódus datálható üledékek hiányával, míg a fanerozoikum, mely a kambriummal kezdődik, makroszkópos fosszíliák megjelenésével jellemezhető. Ez a geológiai időszak a maga $0{,}6 \times 10^9$ évével az egész földtörténeti kornak mintegy 13%-át teszi ki. Az ábra ezenkívül még azokat az időszakokat is feltünteti, melyek a légkör és az élet evolúciója szempontjából döntőek lehettek (JUNGE, 1981)

lyebb tömegarányban, számos viszonylag illékonyabb anyag is kivált. A nemesgázok és az olyan erősen illó alkotóelemek, mint a hidrogén, nitrogén, és a szén bizonyos vegyületei (pl. a metán) még jórészt továbbra is a szoláris „felhő" térségében maradtak. E felhőből egyébként az egykoron nagy tömegben elkülönült ún. őskondenzátumok nem tűntek el teljesen. Ezek visszamaradt képviselőit mind a mai napig megtalálhatjuk és tanulmányozhatjuk az állandóan a Földre hulló kőmeteoritok egy bizonyos csoportjának, az ún. kondritoknak az alakjában, melyek nevüket onnan kapták, hogy bennük kicsiny golyócskaszerű *(chondren)* képletek mutathatók ki. A kondritok nagy vonalakban ugyanazt az összetételt mutatják, mint a Föld és valószínűleg a Mars és a Venus is a maguk totalitásában. Az utóbbi két bolygó egykori kialakulását ugyanilyen ősi meteoritok tömegeinek agglomerációjával magyarázhatjuk. Ezeknek a meteorittestecskéknek az analíziseredményei a szoláris felhőnek illó elemekben, mindenekelőtt a nemesgázokban egykor végbemehetett erőteljes elszegényedésére engednek következtetni. Ez az elszegényedés a hidrogén, a nitrogén és a szén vonatkozásában is hasonló mértékben jelentkezik. Amennyiben a Föld kialakulásánál ilyen veszteségek nem következtek volna be, akkor ezek az elemek ma a légkör

képzésében nagyobb súllyal vennének részt, mely ennek folytán főleg neonból, nehéz nemesgázokból, továbbá nitrogénből állna, és mintegy 10^6 atmoszféra nyomást képviselne! Az olyan könnyű elemeket, mint amilyen a hidrogén, és a hélium, a Föld nehézségi ereje ma sem tudja visszatartani és ezek még a jelenben is folyamatosan elszöknek. Ellenkező esetben a Föld légköre a Jupiteréhez lenne hasonló, ahol ezek a gázok igen fontos szerepet játszanak. Valamikor a bolygók képződése idején a szoláris ködben visszamaradt illó anyagok feltehetően az átmenetileg erőssé fejlődött napszelek hatására is a Naprendszernek mind külsőbb régiói, sőt végül a csillagok közötti térség felé húzódtak.

1.4.2. Az ősatmoszféra

Sokak által elfogadott nézet, hogy a legősibb redukáló atmoszféra, mely a Földet még a szoláris por- és gázfelhőből történt kialakulása után elsőnek övezte, már a biopoézist megelőzően elveszett és azt egy másodlagos, a Föld belsejéből származó gázkitörésekre visszavezethető, redukáló jellegű atmoszféra követte. A gázkitörések folyamata még ma sem szünetel, hanem vulkanikus aktivitások alakjában állandóan hat. A másodlagos atmoszféra tényleges összetétele még ma is vita tárgyát képezi. Sokak szerint ez a légkör teljesen redukáló jellegű volt, és főleg metánból, ammóniából, vízből és talán hidrogénből állt. Mások amellett törnek lándzsát, hogy neutrális volt és főleg szén-dioxidot, vizet és nitrogént tartalmazott. Vannak, akik szerint még további komponensként szénmonoxid is jelen volt. Nem egyszerű állást foglalni e vitában. Abban azonban a legtöbben megegyeznek, hogy molekuláris oxigén nem fordult elő. E kérdésekkel közelebbről foglalkozva mindenekelőtt meg kell állapítani, hogy a légkör–óceán–üledékköpeny létezése messzemenően azoknak a szekunder folyamatoknak köszönhető, melyek a Föld kialakulása után mentek végbe. Eközben a vízgőz óceánokká kondenzálódott, a szén-dioxid csaknem teljes egészében az üledékbe került, míg a kén és a halogének vagy a tengervízben feloldódtak, vagy sótelepeken halmozódtak fel. Így a légkörben gyakorlatilag csak a nitrogén és a nemesgázok kumulálódhattak. Minthogy az illó anyagok közül nagyon sok savat képez (pl. szénsav, sósav, kénsav) ezért a légkör–óceán–üledékek egykori rendszerének kialakulását kémiailag egy hatalmas acidi-alkalimetriás titrálási folyamatnak foghatjuk fel, mikor is az őskőzeteket a vízben oldott savak mállasztották és transzformálták. Li (1972) a jelenlegi viszonyokra is érvényes mennyiségi budgetszámításait, melyekben 44 mol szerves anyag (CH_2O) és a légkör szabad oxigénje is szerepel, az alábbiak szerint adja meg:



(Megjegyzés: az őskőzeteknek a földtörténet folyamán exhalált anyagok [második oszlop] segítségével végbement és a ma jelen levő üledékek, óceánok, szerves anyagok és a légkör létrejöttéhez vezetett kémiai mállására számított globális budget, molokban.)

A prekambriális őslégkör elemforgalma természetesen lényegesen eltérhetett a maitól. A körforgalomban részt vett elemek néhány kivételtől eltekintve magmatikus eredetűek lehettek (UREY, 1952; RANKAMA, 1955). Amennyiben a málló, tűzi eredetű kőzetek és az üledékes kőzetekben megjelenő mállási produktumok között fennálló, már jórészt felderített egykori geokémiai egyensúlyokból indulunk ki, úgy az ezek keretében „többlet"-ként jelentkező hidrogén, oxigén, nitrogén, kén, klór és más elemekről fel kell tételeznünk, hogy egykoron a Föld köpenyéből mint gázkiáramlások komponensei távozhattak és volatilizálódtak. Az egykor érvényes egyensúlyok vizsgálatánál néhány elemmel, mint pl. a kalciummal egyáltalán nem sikerült elszámolni, ami a geokémiai anyagforgalmi kalkulációkban mindaddig zavarokat okozott, mígnem az ún. „aláhordás" *(subduction)* folyamatát fel nem fedezték. Ma már tudjuk, hogy a Föld szilárd kérgének felépítésében hat vagy ennél több, a félig olvadt magmán úszó „lemez" is részt vesz (GARRELS és munkatársai, 1975; SIBLEY és VOGEL, 1976. stb.). A szegélyeken, az óceán alatt e lemezek a vulkanikus aktivitás révén szélesednek, terebélyesednek és a kontinensekhez közel a kontinentális lemezek alá csúsznak. Ha mármost valamely lemez szegélye a másik alá csúszik, úgy anyagainak, elemkészletének aláhordása következik be.

Minthogy az őskőzetek (korábban éppúgy mint ma is többnyire bazaltok) oxigénben nagyon telítetlenek, az ősatmoszféra szabad oxigént aligha tartalmazhatott. Csakis a víz fotolízisével társuló fotoszintézisnek

köszönhető, hogy miután a tengerek pufferolóképessége kimerült és bennük a FeO → Fe_2O_3-á és az S → SO_4-é oxidálódott, a szabad oxigén a légkörben is megjelenhetett, sőt lassan felhalmozódott.

1.4.3. Az őslégkörgenezis megoldatlan problémái

Az őslégkör kialakulásának problémakörében az említett exhaláció (gáz- és gőzkitörések) természete és ideje a legvitatottabb kérdések (JUNGE, 1981). A reduktív őslégkör anyagainak eredetét kutatva ma kétféle lehetőséggel számolnak: *a)* a Föld fejlődéstörténetének legkorábbi agglomerációs folyamatai során a nagy tömegű szilárd részecske ütközése tetemes mennyiségű energiát szabadított fel. Az így termelődött hő hatására az illó anyagok a formálódó bolygónk szilárd felszínét övező és kialakulóban levő őslégkörbe kerültek. *b)* a Föld belsejének egykori felmelegedéséért mind a rövid életidejű (pl. ^{26}Al), mind a hosszú élettartamú radioaktív elemek (^{40}K, ^{232}Th, ^{235}U és ^{238}U) bomlása is felelőssé tehető. A köpenyanyagok exhalációját ezek is gyorsították. Valószínűleg e két folyamat közel azonos arányban lehetett hatékony.

A Föld legrégebbi ($3{,}8 \times 10^9$ év), ún. Isua-üledékei kétségbevonhatatlanul igazolják, hogy az óceánok már a legkorábbi időkben kialakultak. Hasonlóan ősrégiek az üledék- és karbonátképződés folyamatai is. A Földön egykoron uralkodhatott hőmérsékleti viszonyoknak megfelelően először a víz kondenzálódott és gyűlt össze az óriási méretű mélyedésekben. Ezt követően a tengerek és óceánok vizében a szén-dioxid oldódott, majd nagyrészt karbonátok alakjában az üledékbe került. A légkör jelenlegi CO_2-koncentrációját alapjában véve a tengervíz kémiai összetétele (mindenekelőtt a kalciumionok koncentrációja és a pH) határozza meg. Utóbbi viszont már a kezdet kezdetén nagyon hasonló volt a maihoz. Következésképpen a légkör CO_2-szintje ugyancsak geológiai korszakokon át konstans maradt.

Az oxigénmentes őslégkör a „fő-gázok" mellett, még különböző, nyomokban előforduló egyéb gázokat is tartalmazhatott, melyek koncentrációja azonban az 1%-os határt semmiképpen sem léphette át. Közöttük viszont az olyan gázok jelenléte, mint pl. a metán, az ammónia, a hidrogén stb. az élet kialakulásában játszhattak fontos szerepet. Az oxigén ebben az őslégkörben teljesen azért mégsem hiányzott. Ennek lehetséges felső határértékét a bazaltos magmák gáztartalmának az oxigéntenziója hozzávetőleg 10^{-8}–10^{-7} nagyságrendre korlátozhatta. A víz és a szén-monoxid fotodisszociációja, továbbá a hidrogén szökése folytán elvárható O_2-szintek a H_2-gáz vulkanikus újratermelődése miatt még

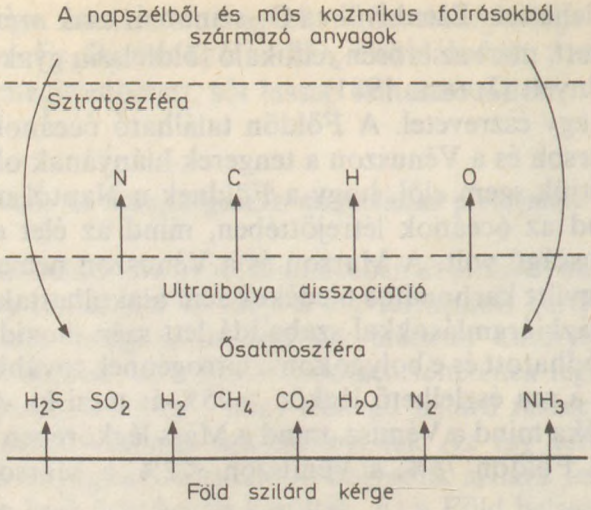
csekélyebbek lehettek. Ezenkívül az O_2-szint már csak azért is rendkívül alacsony lehetett, mert az erősen redukáló földfelszín gyakorlatilag minden oxigént elnyelt (JUNGE, 1981).

Végül még egy észrevétel. A Földön található óceánok létezésének, továbbá a Marson és a Vénuszon a tengerek hiányának okait tárgyalva nem téveszthetjük szem elől, hogy a Földnek a Naptól mért tényleges távolsága mind az óceánok létrejöttében, mind az élet evolúciójában alapvető fontosságú volt. A Marson és a Vénuszon nemcsak óceánok, hanem ezzel együtt karbonátos üledékek sem alakulhattak ki. Következésképpen a gázkiáramlásokkal szabaddá lett szén-dioxid akadálytalanul felhalmozódhatott és e bolygókon a nitrogénnel, továbbá a nemesgázokkal együtt a ma észlelhető légkör >95%-át teszi ki. A szén-dioxid térfogatszázaléka mind a Vénusz, mind a Mars légkörében 95%, a nitrogéné viszont a Földön 78%, a Vénuszon <2%, a Marson pedig csak 2–3%.

1.4.4. Az őslégkör nitrogénforgalma

A gázok előtörése a Föld köpenyéből a földtörténet kezdeteitől egészen napjainkig szakadatlanul, bár ma már erősen lecsökkent, de azért még mindig számottevő mértékben tart *(lásd 4. ábra)*. Ennek során víz, szén-dioxid, kén és ammónia, valamint különböző nitrogéntartalmú vegyületek, továbbá egyéb anyagok molekulái szabadulnak fel. Ma már alig van arra lehetőségünk, hogy az ősi atmoszféra térfogatára vonatkozóan becslésekbe bocsátkozhassunk, vagy hogy képet alkothassunk arról, hogy a prekambrium alatt a légkör miként töltődhetett fel. Feltételezhetően a különböző vegyületek folyamatosan léptek be a légkörbe, ugyanakkor egyesek a külső tér felé – az alkotóelemek atomos tömegének négyzetgyökével fordított arányban – meg is szöktek. Ezzel szemben szaporulat is keletkezhetett a nehezebb atomsúlyú elemekben a Napból az ún. napszél útján és más kozmikus forrásokból egyaránt. Feltételezhető, hogy a jövőben, amikor a napszél anyagi összetételéről és mennyiségi viszonyairól majd többet tudunk, úgy a földi geokémiai egyensúlyok változásaiban játszott szerepét is jobban figyelembe vehetjük.

Az oxigénről ma azt feltételezzük, hogy az a prekambriumban a légkörben biológiai folyamatok, mégpedig a víz fotolízisével járó fotoszintézis következményeként szaporodott fel. Mindazonáltal a fotoreakciók a sztratoszférában bizonyos mennyiségű oxigént már az őslégkörben is produkáltak. Ezzel szemben a molekuláris hidrogén, továbbá a víz, metán és az ammónia disszociációjából keletkezett hidrogén a világűr felé lassú ütemben, de folyamatosan távozhatott. Következésképpen a légkör redukáló jellege egyre csökkent. A legvalószínűbben ammónia-



4. ábra

Az ősatmoszféra a Föld kérgéből eltávozott gázokból, továbbá a világűr felől érkezett és volatilizálódott anyagokból jött létre. Erősen redukáló jellegű volt és benne oxigén legfeljebb csak nyomokban fordult elő. A víz és az ammónia disszociációjával felszabadult könnyű hidrogénatomok a Föld gravitációs teréből a világűr felé folyamatosan szökhettek el, ami így egy kevés oxigén, nitrogén és nitrogén-oxid létrejöttét tette lehetővé

ból, metánból és vízből álló őslégkör (DELWICHE, 1977) tehát lassan megváltozott és oxigén-, szén-dioxid- és nitrogéntartalmú légkörré alakult. Ezek a következtetések részben arra az alapelvre épülnek, hogy valamely légkör összetétele és fejlődésének gyorsasága az adott bolygó tömegétől is függ, továbbá, hogy a légkörünk múltjára és jövőjére vonatkozó minden interpretáció és előrejelzés bolygónk tömegének és gravitációs konstansának feltételezett állandóságára kell hogy támaszkodjék.

A szökés folytán bekövetkezett hidrogénveszteségek lehetővé tették, hogy a fotokémiai folyamatok során bizonyos mennyiségű molekuláris nitrogén jöjjön létre. A már meglévő óceánok viszont a redukáló körülményeknek megfelelően jelentős mennyiségű ammóniumiont tartalmazhattak. A talajokban és tengerekben a nitrátionok felhalmozódása mindaddig nem következhetett be, mígnem a fotoszintézis a légkörben az O_2-gáz mennyiségét meg nem növelte. Ez utóbbit megelőző időkben tehát a nitrogén-körforgalom igen egyszerű lehetett: szervetlen ammóniától szerves nitrogénig és vissza. Feltételezhetően a tengerek és édesvizek ammóniakészlete a reduktív légkör idején, legalábbis lokálisan, gyakorta kimerülhetett, mert a biológiai nitrogénfixáció képességének létrejötte egészen idáig nyúlik vissza. Az oxigén megjelenésével párhuzamosan a vizekben mind a biológiai, mind az abiotikus úton létrejött nitrátionok mennyisége egyaránt növekedett. Arra vonatkozóan, hogy az ősi anae-

rob fotoszintetizálók ammóniát elektrondonorként felhasználtak volna és ily módon N_2-gáz termelődhetett, nincsenek bizonyítékaink. Az azonban bizonyos, hogy a felszaporodott nitrátionok a biológiai denitrifikáció evolúcióját segítették elő, mely viszont a légkörben gyorsan növelte a molekuláris nitrogén részarányát.

1.4.5. Nitrogénfixáció az őslégkörben

Jelen körülmények között a modern bioszférában a nitrogén fixációja és (éppen a denitrifikáció révén) gáz alakjában a légkörbe való visszakerülése főleg biológiai reakciók során át valósul meg. Mint láthattuk, egyesek feltételezése szerint a molekuláris nitrogén az őslégkör evolúciójának már a kezdetén is fontos szerepet játszhatott. Ebben az esetben viszont megoldatlan kérdés, hogy a korai prebiotikus környezetben milyen folyamatok működhettek közre a nitrogén megkötésében. E kérdést YUNG és MCELROY (1979) a villámlás sajátos szerepével közelítették meg. Légkörünkben jelenleg a villámlás a nitrogén-monoxid előállításának (10^7–4×10^7 tonna N/év) egyik forrása. A reakcióegyenletek a következők:

$$O_2 \rightleftharpoons O + O$$

$$O + N_2 \rightleftharpoons NO + N$$

$$N + O_2 \rightleftharpoons NO + O$$

Ezek egyébként a villámkisülések közelében, az átmenetileg magas hőmérsékletű (30 000 K) levegőben mennek végbe. Az így létrejött nitrogén-monoxid a környező légkörben fotokémiailag nitrogén-dioxiddá, salétromos- és salétromsavvá alakul (M = katalizátor):

$$NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$$

$$NO + HO_2 \rightarrow NO_2 + OH$$

$$NO + OH + M \rightarrow HNO_2 + M$$

$$NO_2 + OH + M \rightarrow HNO_3 + M$$

Ezeket a reakciókat a termékek száraz és nedves depozíciója követi, ami végső soron a hidroszféra és a talaj fixált nitrogénkészleteit növeli. A korai prebiotikus légkörben azonban az oxigén gyakorisága igen csekély lehetett. Ilyen körülmények között a villámlások alkalmával a nitrogén-monoxid termelésében a vízhez kapcsolódó reakciók kerülhettek előtérbe.

$$H_2O \rightleftharpoons OH + H$$

$$OH + OH \rightleftharpoons H_2O + O$$

$$O + N_2 \rightleftharpoons NO + N$$

$$N + OH \rightleftharpoons NO + H$$

A létrejövő nitrogén-monoxid koncentrációja egyébként a sokk-hevítette légtömegek lehűlésekor csökkenni kezdett, minthogy ilyenkor az oxigénhiányos légkörben elsősorban is a

$$NO + H \rightarrow N + OH$$

$$NO + N \rightarrow N_2 + O$$

reakciók bontakozhattak ki. Ez a csökkenés magas O_2-tartalom esetén az alábbi reakciók szerint történhetett:

$$NO + O \rightarrow N + O_2$$

$$NO + N \rightarrow N_2 + O$$

A fixált nitrogén fontos elsődleges süllyesztőjét az alábbi egymást követő reakciók képviselik

$$NO + h\nu \rightarrow N + O$$

$$NO + N \rightarrow N_2 + O$$

A lecsapódó termékek (főleg a salétromos- és a salétromsav) végső hozama a környező légkör mindenkori részletes kemizmusától függ.

1.4.6. Modern őslégkörmodellek

Yung és McElroy (1979) három olyan légkörmodellt alkottak, melyek a Föld légkörét különböző fejlődési állapotokban mutatják be. Mindháromban a nitrogén a fő alkotóelem. Ezt gyakoriságában a víz és a szén-dioxid követi a jelenlegi rendszernek megfelelő koncentrációban.

Az első, az *A*-modellben zárt légkört tételeznek fel, melyben az anyagok exportja és importja elhanyagolható mértékű. Ebben a vízgőz a napfény hatására könnyen disszociál:

$$H_2O + h\nu \rightarrow H + OH$$

A víz képződése elsődlegesen az alábbi reakciók során történik:

$$OH + H_2 \rightarrow H_2O + H$$

$$OH + HO_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

A molekuláris oxigén és hidrogén pedig a következő reakciók révén keletkezik:

$$O + OH \rightarrow O_2 + H$$
$$H + HO_2 \rightarrow H_2 + O_2$$
$$H + H + M \rightarrow H_2 + M$$

E gázok pedig egyensúlyi állapotukban 5×10^{-8}, ill. 1×10^{-7} keverékarányt érnek el.

A második, a *B*-modell, az evolúció egy korábbi állapotát írja le. Ebben a H_2 gáz- és az O_2-gáz keverékarányát 1×10^{-3}, ill. 2×10^{-12}-re becsülték. Az exoszférából ekkor hidrogénatomok szöknek meg, mégpedig pontosan abban az arányban, mely azonos a földfelszíni bevétellel. Az elszökő hidrogénatomok főleg az alábbiak szerint jönnek létre:

$$N_2^+ + H_2 \rightarrow N_2H^+ + H$$
$$N_2H^+ + e \rightarrow N_2 + H$$

Az OH-csoport és a H_2O koncentrációja ez esetben nem számottevő. A *B*-modellben egyensúlyi állapotot feltételezve az O_2-koncentráció rendkívül alacsony. Magasabb O_2-szintek a H_2-gáz gyors vízzé alakulását eredményezhetnék. Ennek megfelelően a hidrogén szökési rátája arányosan csökkenhetne és az óceánban víz akkumulálódhatna mindaddig, míg az O_2-gáz keverékaránya a 2×10^{-12} egyensúlyi értékre nem állna be.

A harmadik, a *C*-modell a légköri evolúció egy feltehetően jóval későbbi fázisát írja le, midőn az O_2-gáz keverékaránya pl. a fotoszintézis hatására már 1×10^{-5}-re emelkedett. E modellben a H_2-gáz keverékaránya csupán 1×10^{-8}. A fotoszintézis és az ezzel társuló szervesanyag-szénülés viszonylag lassú O_2-koncentrációemelkedést okoz. A hidroxil-ion- és a vízkoncentrációk magasak.

Az *A*- és *C*-modellekben a villámlások révén megkötött nitrogén gyorsan átalakul salétromsavvá, és száraz vagy nedves depozíció révén a légkörből távozik, végső soron pedig az óceán nitrogéntartalékát gyarapítja. Az esővízben a fixált nitrogén összetételét mindaddig a salétromsav dominálja, amíg az O_2-gáz keverékaránya a 10^{-11}-et meghaladja. A *B*-modell esetében, ahol az O_2-gáz keverékaránya 2×10^{-12}-vel egyenlő, a villámlások során fixált nitrogénnek megközelítően csak 10%-a alakul át salétromsavvá. Még ilyen viszonylag extrém viszonyok esetén is, a nitrát szignifikáns végtermék lehet. Ilyen körülmények között tehát YUNG és MCELROY (1979) szerint nem tételezhető fel, hogy a fixált nitrogén a földi élet evolúciója számára komoly korlátozásokat jelenthetett volna.

Sajnos, az őslégkör nitrogénforgalmának kérdése a geokémiai anyagkörforgalmi egyensúly-rekonstrukciós kísérletek és az elméleti megközelítések nagy száma ellenére is ma még megoldatlan maradt. Valójában az őslégkör reduktív vagy neutrális jellege körül dúló vita sem dőlt még el. Elképzelhető, hogy nem volt neutrális, de erősen redukáló jellegű sem. Inkább gyengén redukáló lehetett. A jövőben elsősorban is tárgyi bizonyítékokat kell gyűjtenünk.

1.4.7. Az élet a légkörben keletkezett?

Egyesek feltételezik, hogy az élet legprimitívebb alakjai a légkörből származnak (WOESE, 1979, 1980). Eszerint kezdetben a Földön a légkör csak gyengén redukáló (CO_2, CO, H_2, H_2O, N_2 stb. alkothatták), a felszín száraz és forró volt, míg a folyadékfázis hiányzott. A légkör felső rétegének hőmérséklete alatta lehetett a víz forráspontjának. E légkört bevágódó meteoritok bombázhatták, abban nagy hőmérsékleti különbségeket előidézve, ami széles skálájú konvekciós áramlásokat kelthetett. A viharok a felszínről porfelhőket emelhettek magasba. A por a víz kondenzációjához fókuszként szolgálhatott. Következésképpen a felsőbb légkörben sós vízcseppek keletkeztek. Ezek lehettek az őssejtek kiinduló képletei, melyek tehát nem az óceáni biokemizmus, hanem a cseppfázisú biokemizmus termékei. Az egykoron a légkörben lejátszódott legfontosabb reakció ez lehetett:

$$4\,H_2 + CO_2 \rightleftharpoons CH_4 + 2\,H_2O$$

$$G = -131\ \text{kJ/mol}$$

Ez a reakció, mely a légkör felső rétegeiben mehetett végbe, energiát nyújthatott a WOESE szerint rendkívül ősi metanogén anyagcserének. Ugyanakkor ez az anyagcsere-aktivitás eredményezhette az ún. üvegházhatás gyengülését, ami a földfelszíni hőmérséklet süllyedését és az óceánok kialakulását tette lehetővé. Ezt követően az atmoszférikus élet az óceánokba helyeződött át. Érdemes megjegyezni, hogy gázzárványokat hordozó lebegő szervezetek létezését SAGAN és SALPETER (1976) a Jupiter légkörével kapcsolatban már korábban feltételeztek. WOESE elmélete SCHERER (1985) szerint semmiképpen sem tekinthető az OPARIN-elmélet ésszerű alternatívájaként.

1.5. Széles körű kutatómunka az élet és a bioszféra eredetének felderítésére

Az élet eredete utáni kutatás mindig is egyet jelentett az ősi, primitív protobaktériumok származásának kutatásával. Az első élőlények ilyen archaikus baktériumok lehettek és ezek közösségei terjedtek el a primitív Föld középső prekambriumi időszakában, hódították meg bolygónk felszínét és hozták létre a primitív bioszférát. A mikroorganizmusok eredetének felderítése tehát fényt vethet a bioszféra eredetére is, minthogy ezek egymástól elválaszthatatlanok még akkor is, ha a bioszférában napjainkban már a soksejtű eukariota szervezettípus, közöttük az ember a domináns elem. A mikrobák szerepét a modern Föld életében csakis evolúciójuk szem előtt tartásával érthetjük meg. A földi globális közösségi anyagcsere ismeretéhez az élet eredetének ismerete elválaszthatatlanul hozzátartozik.

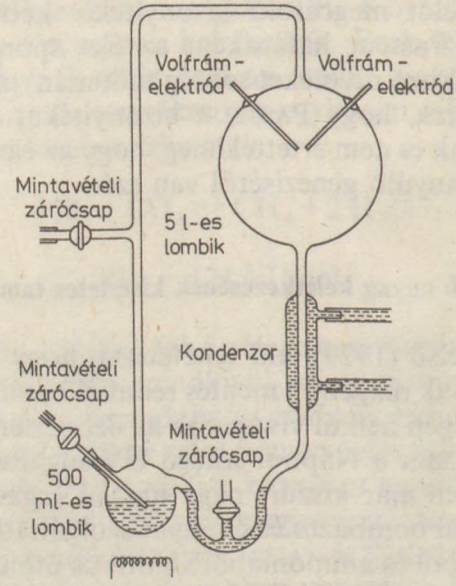
Az élet eredetének kísérletes, oknyomozó tanulmányozása csak igen későn, a huszadik század harmadik évtizedében indult el. A természettudomány más területeihez viszonyítva ez a késés jelentős mérvű volt, amiben furcsa módon PASTEUR munkásságának is része lehetett, akinek a spontán generációt megcáfoló bizonyítékai kétségtelenül figyelmet elterelőek voltak. Pasteur hatásaként az élet spontán keletkezésének lehetőségére vonatkozó nézeteket sokáig tudománytalannak tekintették. Nem gondoltak arra, hogy PASTEUR bizonyítékai a jelenre és nem a múltra vonatkoznak és nem értették meg, hogy az életnek még a primitív Föld korába visszanyúló geneziséről van szó.

1.5.1. Az élő anyag keletkezésének kísérletes tanulmányozása

HALDANE volt az első (1929), aki feltételezte, hogy élő anyag élettelen szerves anyagból csak oxigéntől mentes redukáló atmoszférában jöhetett létre. A légköri oxigén nélkül viszont az az ózonszféra sem alakulhatott volna ki, mely ma már a Napból érkező UV-sugarak többségét visszatartja. Ez a jelenben már kiszűrt nagy hatású sugárzás valaha a Föld felszínét közvetlenül bombázta és energiát szolgáltathatott ahhoz, hogy vízből, szén-dioxidból és ammóniából abiotikus úton jelentős mennyiségű szerves vegyület szintetizálódhasson. Az oxigén destruktív hatásának hiányában viszont e szerves vegyületek az ősi óceánok vizében felhalmozódhattak és azokat híg „táplevessé" (HALDANE-leves) alakíthatták. Másrészről a szovjet OPARIN, HALDANE előtt már öt évvel (1924) kidolgozta és közölte az élet spontán keletkezéséről szóló elméletét. Később, a chicagói egyetemen UREY és MILLER (UREY, 1952; MILLER, 1953;

MILLER és UREY, 1959), az OPARIN–HALDANE-elmélet laboratóriumi kísérletes bizonyításába kezdtek *(5. ábra)*. Arra a kérdésre kerestek választ, hogy vajon a primitív Föld energiaforrásai milyen mértékben és módon járulhattak hozzá a szerves anyagok szintéziséhez a primitív atmoszféra gázaiból? Kimutatták, hogy elektromos szikrakisülések hidrogén, metán, ammónia és víz keverékeiben aldehidek, karbon- és aminosavak szintézisét eredményezik. Más, szén-monoxid-, szén-dioxid- és nitrogéntartalmú gázkeverékekkel hasonló eredményeket kaptak feltéve, ha azokban szabad oxigén nem volt jelen. Adataik és a 60-as években a világűr meghódítására irányuló törekvések az élet eredetének és kozmikus jelenlétének kutatását már elengedhetetlenül szükségszerűvé tették.

OPARIN és HALDANE nézeteiben (OPARIN, 1953, 1968; HALDANE, 1933) az élet ősi állapotaira vonatkozóan már kezdettől fogva bizonyos eltérések jelentkeztek, melyek az élet eredetéről szóló teóriákban egészen napjainkig tovább éltek. Miről van szó? Az élő sejteknek két összetett központi funkciója van: az anyagcsere és a reprodukció. Rövid távon a sejt túlélése az általa táplálékként feldolgozott vegyületek atomjainak a saját fenntartásához szükséges molekulákká történő átrendezésével



5. ábra

MILLER és UREY a primitív Föld atmoszféráját az itt bemutatott készülékben szimulálták. Az őslégkör feltételezett különböző gázkeverékei a bal oldalon középen látható zárócsapon át jutottak a készülékbe. Ezután a gázokat az apparátus zárt rendszerén át 500 cm^3-es lombikba cirkuláltatták. A jobb oldali felső lombikban a gázok szikrakisülés hatása alá kerültek. Ilyen típusú energiaközlés feltehetően az őslégkörben is gyakori lehetett. A kisülések alkalmával létrejött különböző anyagok a készülék alján gyűltek össze

megy végbe. Hosszabb távon viszont túlélését önreprodukcióval biztosítja; biokémiailag hasonló képességű utódokat hoz létre. Kérdés, hogy e kettő közül melyik jött létre először? A működő anyagcsere, melyet a felhígulással és a környezet destrukciójával szemben bizonyos fajta kültakaró, ill. membrán védelmezett vagy egy óriásmolekula, melynek túlélése, az őt körülvevő anyagok rovására, önreprodukciójában rejlett. A kérdést másként megfogalmazva: melyik az idősebb, a „protobionta" vagy a „csupasz gén"? HALDANE az utóbbit részesítette előnyben. OPARINT inkább azok a kémiai reakciók érdekelték, melyek a környezetétől elkülönült cseppecskék, az ún. koacervátumok belsejében mennek végbe, továbbá az ilyen cseppecskék között a túlélésért folyó konkurrencia kérdése izgatta. OPARIN a reprodukciós mechanizmust és a DNS-t a biokémiai tökéletesedés végső pontjának tekintette, mely a fennmaradásért versengő protobiontákat az anyagcsere szintjén valódi sejtekké alakította.

Az anyagcsere vagy reprodukció (ill. protein vagy nukleinsav) vita végső soron éppen olyan sterillé válhat, mint ahogy a tyúk vagy tojás, ill. az öröklődés vagy a környezet viták váltak azzá a múltban. Ma nukleinsavak enzimek nélkül nem replikálódnak és enzimek sem jönnek létre nukleinsavak nélkül. Ezek párhuzamosan fejlődhettek. Azokat a reakciókat, melyek a primitív HALDANE-levesben a koacervátumok túlélését biztosították, katalizátorok serkenthették. Azt viszont, hogy e katalizátorok nem vesztek el, sőt minden leánykoacervátumba eljutottak még akkor is, midőn az ősóceán hullámzása vagy más mechanikai erők hatására, vagy pusztán a növekedés folytán a csepp felszakadt és diszpergálódott, azt a replikációs mechanizmus tehette lehetővé. Az enzimatikus katalízis és a DNS-replikáció az élő sejtekben ma már olyan szorosan összefonódnak, hogy nagyon nehéz elképzelni, hogy egyik vagy másik hiányában a legrégibb ősi protobionta rendszerek miként funkcionálhattak.

Az élő anyag megjelenéséig vezető út nagyon hosszú és bonyolult volt és ennek megismerése rendkívül sokoldalú kísérletes és elméleti megközelítést igényel. A 80-as évekre a biopoézis-kutatás soha nem látott méreteket öltött. A későbbiekben a kurrens témákba csupán rövid bepillantást nyújtunk.

1.5.2. Az élővé szerveződés őskörnyezeti feltételei

NISBET és PILLINGER (1981) az első szervezetek létrejöttét 3,8 és 4,2 milliárd évek közötti időszak távlatába helyezik. A lemeztektonika feltehetően már a korai archaikumban intenzíven működhetett (NISBET,

1985). Ennek folyományaként magnéziumban gazdag óceáni kéreg és kiterjedt medencékkel jellemezhető kontinentális talapzat létezhetett, ezek szegélyein aktív vulkánok sorozatával. A prekambrium kezdetén sekély vízi környezetek feltehetően sokkal ritkább előfordulásúak lehettek, mint később, amikor a kontinentális kéreg medencéit viszonylag nem nagy mélységű tengerek lephették el. Ezekben már 3,5 milliárd évvel ezelőtt fotoszintetizáló baktériumok tevékenykedhettek. Az óceáni talapzatot alkotó lemezek érintkezésénél felgyűrődött, víz alatti hegységekben élénk hidrotermális tevékenység folyhatott és az első kemoautotróf baktériumközösségek a tenger színe alatt feltört melegvízi források közelében már nagyon korán megjelenhettek (NISBET, 1985). Az első primitív élő szervezetek feltehetően a laza üledékek pórusait, a vulkanikus breccsiákat, a lávavezikulumokat stb. is elfoglalták.

Fontos és már dokumentált tény, hogy a biológiai struktúrák szerveződésében, különösen az evolúció kezdetén, a felszíngazdag agyagásványok döntő szerepet játszhattak (PAECHT-HOROWITZ és munkatársai, 1970; BERNAL, 1966). A polimerizációs folyamatok a víz–gáz fázishatárokon (FOLSOME és munkatársai, 1975; FOLSOME, 1975), továbbá – a fiatal bolygó fokozott gázexhalációi idején – a kőzetekkel kölcsönhatásba kerülve (NAGY és munkatársai, 1975) felgyorsulhattak.

Az élet keletkezésének vizsgálatához alapvető fontosságú volt a prekambrium geológiai történéseinek feltárása (HARGRAVES, 1976; LA BARBERA, 1978). A mikrofosszíliák kutatása és a prekambrium különböző időszakai palaeontológiai leleteinek értékelése (BARGHOORN és SCHOPF, 1966; OBERLIES és PRASHNOWSKY, 1968; PFLUG, 1967; SCHOPF és BARGHOORN, 1967; WELTE, 1967, PFLUG és munkatársai, 1979; BRIDGWATER és munkatársai, 1981; PFLUG, 1986 stb.) nagyban hozzájárult a sejtes evolúció történetének tisztázásához. Sokan (ABELSON és HARE, 1968; NAGY, 1970; SANYAL és munkatársai, 1971, NAGY és munkatársai, 1981 etc.) azonban azt is igazolták, hogy az üledékes kőzetek még az enyhe vagy mérsékelt metamorfózist követően is áteresztőek lehetnek és ennek következtében a perkoláló oldatok szerves anyagaival állandóan fertőződhetnek!

A biológiai jelentőségű makromolekulák prebiotikus szintézisének lehetőségei változatlanul a kutatások előterében állnak. FOLSOME (1976) igazolta, hogy vízfelszín felett, CO-, CH_4- és N_2-gázok jelenlétében, szikrakisüléses reakciók szerves mikrostruktúrákat produkálhatnak. Bonyolult biológiai molekulák, így pl. polipeptidek (HARADA és FOX, 1965; MINARD és munkatársai, 1975; MATTHEWS, 1975) és polinukleotidok (ORÓ és STEPHEN-SHERWOOD, 1974) képződhetnek gyakori prekuzoraikból. Hasonlóan biológiailag aktív vegyületek képződését igazolták – primordiális gázokból és energiaforrásokból – PONNAMPERUMA és GABEL

(1968), továbbá CALVIN (1969). A primitív Föld szimulációs laboratóriumi vizsgálatai nemcsak aminosavakat, hanem nukleinsavakat is eredményeztek (ORÓ, 1960; ORÓ és KIMBALL, 1961; SANCHEZ és munkatársai, 1966). A makromolekuláknak azt a tendenciáját, hogy rendezett struktúrákká szerveződjenek, felhasználták a prebiotikus evolúció interpretálására (BEZRUKOV, 1979). A proteinek evolúciójának lehetséges útjai az ősi prokariota sejtekben sokak számára (HALL és munkatársai, 1974; WICKRAMASINGHE és VILLEE, 1975) csábító teoretikai témának bizonyultak. Hasonlóan az ősi anyagcsereutak lehetséges fejlődését is megkülönböztetett figyelemre méltatták (LIPMANN, 1965; HALL, 1971; BALTSCHEFFSKY, 1974; SMITH és munkatársai, 1981; FOLSOME és BRITTAIN, 1981 stb.).

1.5.3. A sejtek eredete

A sejtek eredetének kérdésével különösen FOX (1965, 1973) foglalkozott behatóan. Szerinte fázishatárolt proteinoid mikroszférák könnyen szintetizálódnak. Mikroszférákat kapott (FOX, 1969) termolítikus úton szintetizált aminosav-polikondenzátumokkal. FOX kísérleti megközelítése igen nagy jelentőségű, minthogy híven dokumentálja, miszerint nem biológiai polimerek önelrendeződéssel sejtszerű formákat alakítanak ki.

HEINZ és RIED (1980) borostyánkő színű, fluoreszkáló olajok (ezeket aminosavkeverékek termolízise útján állították elő) liofilizálásával sejtes szerkezetű anyagokhoz jutottak. Az ilyen sejtek átlagos átmérője 50 μm körül volt. Sejtes alakzatok kerogén (lásd 46. old.) anyagokban is kimutathatók. Ilyen kerogént FOLSOME és munkatársai (1975) gáz fázisban (H_2O, CH_4, CO_2 és N_2) MILLER–UREY-féle elektromos kisüléssel állítottak elő. Sejtes alakzatokhoz jutottak még SMITH és munkatársai (1969) vizes NH_4SCN oldatok UV besugárzásával, továbbá CALVIN (1975) természetesen előforduló makromolekulák ultrahangkezelésével. EVREINOVA és munkatársai (1974) koacervátumokat szkanning elektronmikroszkóppal vizsgáltak, megállapítva, hogy az élő sejtekre nagyon hasonlítanak.

Az élet önszerveződésének elméleti megalapozására széles körű kutatások folynak. E munka még BERTALANFFYtól indult ki és különösen BERNAL (1966), FOX (1965), EIGEN (1971), KUHN (1972), KUHN (1976), EIGEN és SCHUSTER (1978), KÜPPERS (1979), SMITH (1979),KAPLAN (1981) NISBET és PILLINGER (1981), RABINOWITZ és HAMPAI (1985), KOCH (1985), DRAGANIC és munkatársai (1985) és mások nyomán halad. Magyarországon az élet keletkezésének elméleti problémáival behatóan GÁNTI (1974, 1979) foglalkozik, aki a pusztán kémiai jellegű önszaporító körfolyamatoktól a tisztán biológiai rendszerekig folyamatos fejlődési vonal bizonyítását kísérelte meg.

1.5.4. Az élő anyag kialakulásának feltételezett folyamatai

Mindezek alapján ma úgy tűnik, hogy az élettelen anyagból az élő sejtekig tartó fejlődés folyamatát alapjában véve öt szakaszra tagolhatjuk:

1. Bolygónk és légkörének kialakulása: megszületik az élő anyag evolúciójának nyersanyagbázisa.
2. Biológiai monomerek (aminosavak, cukrok, szerves bázisok) abiotikus szintézise.
3. A monomerek abiotikus polimerizációja primitív proteinekké és nukleinsavláncokká, elsősorban is olyan vizes környezetben, mely termodinamikailag a depolimerizációnak kedvez.
4. A HALDANE-leves cseppjeinek szegregációja sajátos kemizmusú és fajtájú protobiontákká.
5. A reproduktív mechanizmus kifejlődése, mely lehetővé teszi, hogy a „leány protobionták" a szülő valamennyi kémiai sajátosságát és anyagcsere-képességét változatlanul megkaphassák.

Végső soron az élet keletkezése tehát a nyersanyagok felhalmozódásának, a monomerek szintézisének, a polimerek auto- és heterokatalízisének, az individuális szintű izolációnak és a reprodukciónak egymást követő folyamataiból áll.

A továbbiakban az ősbaktériumok megjelenéséig vezető biopoézis néhány kérdésével közelebbről is foglalkozunk. Mindezt tesszük azért is, mivel ez a problémakör egyúttal bevezetés a primitív bioszféra ősi anyagcseréjének születésétől a modern bioszféra kibontakozása felé irányuló evolúció tárgyalásába is.

1.6. A biológiai, az ökológiai és az abiotikus fizikokémiai rendszerek koevolúciója a Földön

A korai prekambriumban csak abiotikus, kezdetben anorganikus, később már szerves frakcióval is kiegészült lokális és globális földi anyagcsere-rendszerek léteztek. A Nap sugárzó energiájának hatására ezekben a különféle elemek körforgalma és az energiaáramlást biztosító anyagcsereutak bontakozhattak ki (HOROWITZ, 1974). Később, amikor a protobionták, majd az első baktériumok is megjelentek és velük a Földön az individualizált biológiai rendszerek is porondra léptek, a korábbi abiotikus fizikokémiai anyagcsere-rendszerek biológiai frakcióval bővültek és mint ökológiai rendszerek fejlődtek tovább napjainkig. Az élő és az élettelen világ anyagforgalmának evolúciója mind ez idáig elszakíthatatlan egységként haladt előre. Élő szervezetek élettelen környezetük

nélkül elképzelhetetlenek. Hatásuk és függésük kölcsönös. Így pl. az oxidatív légkört mintegy kétmilliárd éve mikrobák, mégpedig cianobaktériumok hozták létre. Az újonnan kialakult atmoszféra viszont a geokémiai átalakulások megszámlálhatatlan következményét vonta maga után, melyekhez ismét az élő szervezeteknek kellett alkalmazkodniok. Az egységes evolúciós szemlélet tehát mind a primitív Föld, mind a modern bioszféra kutatásának egyaránt alapját képezi. Az élő és az élettelen világ korai evolúciója egységes „kezelésmódjának" példájaként BERNAL (1960) nagy hatású biopoézis-elméletét mutatjuk be.

1.6.1. A ma létező egyetlen biokémiai „sablon" szelekciója

BERNAL, aki hosszú éveken keresztül foglalkozott az élet keletkezése problémájával, az életet meghatározott egységen, indivíduumon belül elkülönült önfenntartó kémiai folyamatok rendszerének minősítette. Szerinte a tulajdonképpeni biokémiai evolúció a „szervezetek evolúciójától" abban különbözik, hogy az első, az egyetlen, ma létező közös és kizárólagos biokémiai anyagcseresablonba bele nem illeszkedő különleges próbálkozásokat, változatokat és aberrációkat, folytonosan és könyörtelenül már eleve megsemmisítette. A Földi miliőben valaha kialakult és ma egyeduralkodó biokémiai sablonra extrém kémiai és strukturális konzervativizmus a jellemző. Az a tény, hogy ma kizárólag csak egyetlenegy ilyen biokémiai sablon van, az a bioszféra valamennyi szervezetét egyetlen hatalmas táplálkozási hálózatba tömöríti és ez a hálózat a földfelszín élettelen környezetének anyagcseréjével is összefüggő globális (biogeokémiai) anyagcserére vezethető vissza, mely minden ebbe bele nem illő sablont, anyagcseretípust eleve pusztulásra ítél.

1.6.2. Bernal biopoézisének hét korszaka

BERNAL szerint a „biopoézis", ahogyan ő az élővé válás folyamatát nevezte, hét fő szakaszra osztható *(lásd 3. táblázat)*. Ez a felosztás az aktivitásképes szubvitális, ill. vitális egységek organizációjának feltételezett fokozataira alapul. Az *első* szakaszban az individuális elkülönülés még nem ismerhető fel. Ekkor még az ősi óceáni vagy tavi miliőkben makromolekuláris previtális folyamatok zajlottak le. A *második* szakaszban – főleg agyagásványok hatására – sajátos komplex aggregátumok, ún. szubvitális egységek, lokális anyagcserekomplexek szerveződtek. A *harmadik* szakaszban az ásványi kötöttségtől felszabadult, különböző polimereket tartalmazó koacervátumcseppek (protosejtek, sejtalakú

3. táblázat

A BERNAL-féle

A fejlődés stádiumai		A Föld felszínén létrejött legfontosabb új képződmények, vegyületek, folyamatok stb.			Az elsődleges szabad energiaforrás	Szabadenergia elnyelés
		A litoszféra felszínén	A hidroszférában	Az atmoszférában		
1	Egyszerű molekulák létrejötte és koncentrálódása	SiO_2, homok. $AlSiO(OH)$, agyag. $Fe(OH)_2$ $CaCO_3$, mészkő	NH_4HCO_3, H_2S, NaCl, KCl, KH_2PO_4 alacsony koncentrációban	CO_2 (vagy CH_4) N_2 NH_3, H_2S, H_2O nagyon kevés	$8\,SH_2 \rightarrow S_8 + 8\,H_2$ stb.	$CO_2 + 4\,H = H_2CO + H_2O$ CO_2-fixáció
2	Dehidrogenáció és kondenzáció	Mint fentebb, és FeS	NH_4HCO_3, H_2S, KCl csökkenő koncentrációban, NaCl növekvő koncentrációban	CH_4, NH_3 és SH_2 eltűnnek, N_2 növekszik, CO_2 csökken	Rövid hullámhosszú napsugárzás	$CO_2 + 4\,H = H_2CO + H_2O$ CO_2-fixáció
3	Polimerizáció és koacervátum képződés. Eobionták	Szerves eredetű $FeO(OH)$ és $CaCO_3$	A K^+- és a PO_4^{3+}-ionok mennyisége csökken	Nagyon alacsony CO_2-koncentrációk	Látható napfény, fotoszintézis	Primitív fotoszintézis $2\,H_2S \rightarrow \rightarrow 4\,H + S_2$
4	Nukleoprotein szervecskék	Gyorsuló mállási folyamatok	Az összetétel a maihoz közeledik, de kevesebb a NaCl	Az O_2-koncentráció emelkedik	Aktivált porfirin. Fotoszintézis	$2\,H_2O \rightarrow \rightarrow 4\,H + O_2$. Fotoszintetikus O_2-felszabadítás
5	Lipid-membrán által határolt szervecskék	Mint fentebb	Az NaCl-tartalom növekedik	A légkör összetételében lassan a maihoz közeledik	Klorofill tartalmú lipidplasztidok	Lipidképződés
6	Membránba zárt sejtek. Protobaktériumok	A szárazföldön szerves talajok	Az NaCl-tartalom növekedik	A légkör összetételében lassan a maihoz közeledik	A S és Fe oxidációja molekuláris oxigénnel	Az ionkoncentrációk fenntartása
7	Elkülönült nukleuszt tartalmazó sejtek. (Eukarioták)	Az üledékekben szerves anyagok halmozódnak fel. Kőolajképződés	Az NaCl-tartalom növekedik	A légkör összetételében lassan a maihoz közeledik	A növényi és az állati táplálkozástípusok elkülönülése	–

„biopoézis" stádiumai

A bioszférában végbemenő fejlődés			Katalizátorok vagy enzimek	Összetartó, nagy állandósággal együttmaradó szerkezetek, anyagkomplexek stb.	Szaporodási mechanizmus
Az anyagcsere vezető típusai	Fontosabb metabolitok	Koenzimek			
CO_2 és NH_3 kondenzáció	NH_4^+ $CO_2(OH)^-$ CO_2NH_2 HS^-	$PO_2(OH)_2^-$ $\{PO(OH)_2\}n$ Polimetafoszforsav	SiO_2?	Nem zavart területek, tengeri iszap, homokzátonyok	Nincs
Dehidrogenáció	Aminosavak, triózok	$NH_2COPO_2(OH)$	Agyag, vashidroxidok	Adszorpció az agyagfelszíneken	A szubvitális történések folytonossága
Anaerob fermentáció	Peptidek, pirimidinek, purinok, pentózok	Protonukleotidok. Flavonok	Peptid, protoenzimek	Peptidmolekulák koacervátum cseppecskékké egyesülnek	Egyszerű osztódás. A fejlődés és a reprodukció még nem különültek el
Szénhidrátok előállítása és fermentálása	Proteinek, nukleinsavak, keményítő	ATP RNS	Protein enzimek	Proteinburkolatú szervecskék a koacervátumokban	A nukleoproteinek pontos lemásolása
Szénhidrátok oxidációja	Lipidek, szterinek	DNS	Protein enzimek	Lipidburkolatú vezikulumok	A nukleoproteinek pontos lemásolása
–	Cellulóz	DNS	Protein enzimek	Lipid alapú sejtmembrán	Nukleoproteinek replikációja és konjugációja
–	Rostos protein, miozin, kollagén	DNS	Protein enzimek	Magmembrán. Proteintartalmú sejtfal	Mitózis és ivaros szaporodás

mikrostruktúrák) jelentek meg, melyek már individuális szinten elkülönült osztódni és fuzionálni képes „eobionták" voltak. A *negyedik* feltételezett szakaszban a protobiontákba vírusokhoz hasonló, független anyagcserére képtelen nukleoprotein részecskék épültek be. Az *ötödik* és a későbbi fejlődési szakaszokat a lipoprotein-membránok megjelenése és az ezekből szerveződött belső membránok, mitokondriumok, plasztiszok stb. fellépése jellemezte. A *hatodik* stádium a jelenkori baktériumokra emlékeztető membránba zárt sejtek megjelenése volt. Végül a *hetedik* szakaszban már a kikülönült nukleusszal rendelkező valódi eukariota sejtek térfoglalása ment végbe. Amint az a *3. táblázatból* leolvasható, az élővé válás hét szakaszát a változó élettelen környezet ugyancsak hét különböző stádiumához lehet kapcsolni. Az elektrondonorok és -akceptorok változása és gyakorisága, a szerves és szervetlen (agyagásványok) adszorpciós komplexum előfordulása, a légkör reduktív vagy oxidatív volta, a rendelkezésre álló energiaforrások minősége, a Napból jövő sugárzás spektrumának módosulásai stb. mind, mind megannyi meghatározói és egyszersmind következményei is voltak az élet megjelenésének.

BERNAL „rendszere" közlésekor sok új elemet tartalmazott és alapgondolata még ma is érvényes. Lényegében ő ismerte fel az agyagásványok és az adszorpciós felületek jelentőségét az élő anyag szerveződése folyamatában. Egyes elképzelései azonban ma már több szempontból is módosításra szorulnak. Így például a légkörre ma jellemző O_2-koncentrációkhoz közel álló O_2-szintek csak jóval a protobaktériumok létrejötte után, már a fejlettebb cianobaktériumok hatására alakulhattak ki és ezek oxigéntermelő aktivitását is a tengerek ferrovastartalma még jó néhány 100 millió évig pufferolhatta, ami a légkör oxigéntartalmát sokáig igen alacsony szinten tarthatta. Igaz, a BERNAL-éhoz némileg közelítő és egyszer már elvetett néhány elképzelés újabban ismét a felszínre került. Az ősi típusú katalizátorokról is jóval többet tudunk ma már, és ezeknek számos alakját tartjuk nyilván. A legtöbb kutató szerint az anaerob fermentáció legalább egy korszakkal előzhette meg a primitív anaerob fotoszintézist, amit a víz fotolízisére alapított modern fotoszintézis feltétlenül egy további korszakkal még később követhetett stb. Mindezek ellenére BERNAL rendszere lényegesen hozzájárult a biopoézisről vallott mai modern felfogásunk kialakulásához, és az élő és az élettelen világ egységes evolúciójának gondolatát példamutatóan érvényesítette. Talán nem szükségtelen itt megjegyezni, hogy olyan nézetek, miszerint a fotoszintézis a fermentációval egyidős, hogy a fotopigmentek már a HALDANE-levesben abiotikus úton létrejöttek, továbbá hogy az oxidatív légkört nem a cianobaktériumok, hanem a vízmolekulák magaslégköri fotolízise alakította ki, ma is léteznek, és ezeket bizonyítani is igyekeznek. A kuta-

tások zöménél azonban mást bizonyító kísérletekre és megfigyelésekre alapítanak és más munkahipotézisek szem előtt tartásával dolgoznak.

1.6.3. Determinisztikus vonások a földi evolúció menetében

A változó környezet és a különböző típusú baktériumok prekambriális evolúciója között lehetséges összefüggéseket csodálatos logikával LEVY és munkatársai (1973) nyomán a *4. táblázat* tárja elénk.

A földfelszín biotikus és abiotikus történései mindig is oly módon kapcsolódtak össze, hogy bármely korszakban a bioszféra anyagforgalmában érvényre jutott és a fajok tíz- és százezrei által kanalizált elem- és energiaáramlási útvonalak irányát, sebességét, termodinamikai hatékonyságát, tömegviszonyait stb. mindig a megelőző földtörténeti korszakok folyamatainak minőségi és mennyiségi mutatói határozták meg.

Ugyanakkor az egyes korszakoknak a kutatások során feltárt geokémiai anyag- és energiamérlegéből és a mögötte rejlő és már ismert biokémiai, ásványgenetikai, szénkőzettani stb. folyamatok mechanizmusai fejlettségi szintjeiből csakúgy, mint a felderített klimatikus, hegyképző, sőt kozmikus történések adataiból nagy valószínűséggel lehet következtetni a soron következő korszak várható globális anyagforgalmára és az ezt majd megvalósító biogeokemizmusra.

A determinisztikus jellegű és különböző geológiai időszakokon át nyomon követhető ok-okozati összefüggéseknek számtalan példáját sorolhatjuk fel. Így pl. a Föld sekélytengereiben az első szulfáttelepeket még a reduktív légkör idején szulfidok oxidálásával anaerob fotoszintetizáló baktériumok hozták létre. Az oly nagy fontosságú és geológiai kihatású szulfátredukciós folyamatok csak ez után léphettek aktivitásba. A mai kénkörforgalom körvonalai tehát csak jóval a fotofoszforilációval szinkron működtetett és redukálóképesség meglétét igénylő CALVIN-ciklus megjelenése után bontakozhattak ki.

Ma a bioszférában működő meglehetősen bonyolult vaskörforgalmat ismerjük. Ennek keretében a Földön minden évben hatalmas ferrivas tömegek redukálódnak, terminális elektronakceptori minőségükben szerves anyagok légzés útján történő elégetését biztosítva. A vaskörforgalomnak ez az útja teljesen hiányozhatott akkor, amikor az oxigén a légkörben még nem játszott szerepet. A redukált kétértékű vasat (Fe^{2+}) ugyanis ez oxidálja vissza, ill. a mikrobák ezzel oxidálhatják az elektrontranszport-foszforilációval összekötött ATP-szintézist megvalósítva. A légköri oxigén megjelenésének viszont előfeltétele volt a kén-hidrogén és más redukált kénvegyületek megfogyatkozása a Föld vízi miliőiben, minthogy ez terelte az evolúció útját a redukálóképesség (NADH) előál-

4. táblázat

A baktériumok különböző csoportjainak feltételezhető evolúciós sorrendje. A változó környezeti viszonyok olyan újabb és újabb fajok szelekcióját eredményezték, melyek fokozatosan fejlettebb típusú energiaszerző képességekkel rendelkeztek

	Élettani csoportosítás	Szelekciót kiváltó tényezők	A szelekció során szerzett előnyök
ANAEROB	Anaerob heterotrófok (*Clostridium*-ok) ↓	Fermentálható szubsztrátok hiánya (ATP előállítására alkalmas anyagok hiánya)	Szubsztrát szintű foszforiláció
	Metántermelők (*Methanobacter*) ↓		Elektrontranszport $H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4$ – ATP-termelés elektrontranszport foszforiláció révén
	Szulfátredukálók (*Desulfovibrio*) ↓		– $SO_4^{2-} \longrightarrow H_2S$ – Citokróm-C_3
	Nitrátredukálók (*Pseudomonas*) ↓	CO_2, SO_4^{2-}- és NO_3^--ionok korlátolt mennyisége a környezetben ↓	– $NO_3^- \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow N_2$
	Fotoszintetizáló baktériumok →	*Rhodospirillaceae*	– Multicitokróm rendszer – Ciklikus fotofoszforiláció – Szerves szén fotoasszimilációja – Fotonok $\xrightarrow{\text{klorofill}}$ ATP
		Valódi fotoszintetizálók (*Chromatiaceae, Chlorobiaceae*) Kielégítő szerves szénellátás Korlátozott kénellátás	$CO_2 \xrightarrow{H_2S} CH_2O$, ill. átalakítás szerves szénforrásokká Ciklikus fotofoszforiláció
AEROB	Aerob fotoszintetizálók (kék-zöldalgák)		– Ciklikus fotofoszforiláció – CO_2-redukció vízzel – O_2-termelés vízből
	Aerob heterotrófok + Kemolitotróf autotrófok		– Képesség a molekuláris oxigénnek mint elektronakceptornak a hasznosítására – Képesség a rendelkezésre álló szerves szénforrások értékesítésére
			– Anorganikus szubsztrátok oxidációja ATP előállításához (pl. $H_2S \longrightarrow H_2SO_4$) ($NH_3 \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO_3^-$)

lításához közönségesebb és még kihasználatlan elektrondonorok (H_2O) hasznosítása felé. A kénkörforgalom teljessé válása tehát biológiai hatótényezők révén előfeltétele volt a vaskörforgalom kiteljesedésének. A ké-

né ezzel szemben elsősorban is a fotoautotróf anyagcseretípusok megjelenésétől függött, minthogy az ősi fermentatív heterotrófok a szulfidokat soha nem oxidálták volna szulfátokká. A modern uránkörforgalom felés leszálló ágainak evolúcióját kb. ugyanazok az előtörténések determinálták mint a vasét. A molekuláris oxigén légköri megjelenése volt ugyanis a legfontosabb mérföldkő az uránvegyületek oxidációs és ebből következő oldódási, ill. migrációs viszonyainak a maira jellemző alakulásában. A nitrogénkörforgalom tökéletesedése feltétlenül csak követte a kénét, de már az oxidatív légkör előtt magas szintre fejlődött. Nitrátok már a reduktív atmoszféra idején voltak és folyamatosan termelődtek, igaz, mai ismereteink szerint inkább fotokémiai, mintsem biológiai úton. Tény azonban, hogy ez az ősi nitrátkészlet tette lehetővé a biológiai elektrontranszport-foszforiláció (légzés) fejlődésének már csaknem az oxigénlégzés szintjére (nitrátlégzés) jutását, ami viszont a bioszférában az oxidatív állapotok beköszöntésének biológiai elfogadását (és az oxigéngáz tolerálását és hasznosítását) csaknem zökkenőmentessé tette.

A kőszéntelepek képződésének körülményeit kutatva nyilvánvalóvá vált, hogy ezek kiinduló nyers szervesanyag-tömegeit csak nagy bioszintetikus aktivitású fotoszintetizáló eukarioták állíthatták elő. Ugyanakkor ezen anyagok bomlatlan állapotban való felhalmozódásának előfeltétele volt az aerob és anaerob bakteriális szervesanyag-degradáció csekély általános aktivitásszintje. Ilyen nagy elfekvő szervesanyagtelepeket csak az oxidatív légkörben kifejlődött szemiterresztrikus növények produkálhattak. Ehhez a produkcióhoz viszont már a szén, a kén, a nitrogén és a vaskörforgalmának többé-kevésbé koordinált működésére is szükség volt. Áttételekkel tehát pl. a szulfátredukálók megjelenése a prekambrium első harmadában nélkülözhetetlen előfeltétele volt a karbonkori erdők évmilliárdokkal később érvényre jutott nagy biomassza-produkciójának, ami következményeiben az állatvilág típusainak meggyorsult differenciálódását vonta maga után. A végtelenségig lehetne ezeket az összefüggéseket még boncolgatni.

1.7. A szerves evolúció tendenciái a primitív Földön 3,8–2,3 milliárd évvel ezelőtt

Azok a gyakran nagyon bonyolult felépítésű szerves vegyületek, melyek mai földi környezetünkben találhatók, végső soron azokból az egyszerű szénvegyületekből származnak, melyek az egykori szoláris felhőben is, még mielőtt abból a Föld kikülönült volna, már jelen voltak. Feltehető, hogy a Föld kialakulása után az egykori, elsőnek szintetizálódott nem biológiai eredetű egyszerű szerves vegyületek már a primitív Földön is

állandóan változtak. Fokozatosan sokkal komplexebbé válhattak, kölcsönhatásaik során polimerizálódhattak. Ezek a folyamatok elsősorban is a víz–gáz határfelületeken (FOLSOME, 1975), továbbá kőzetekkel kölcsönhatásban (NAGY, 1976) mehettek végbe.

1.7.1. A több milliárd éves szerves fosszíliák analízise nagy körültekintést és óvatosságot igényel

A 70-es évek második felében az analitikai technikák haladása, a holdmintákon szerzett tapasztalatok, továbbá a széntartalmú meteoritok vizsgálati eredményei valamennyien hozzájárultak ahhoz, hogy a korai prekambrium szénkémiájába a korábbiaknál nagyobb mélységben bepillanthassunk. A korai prekambrium szervesanyag-forgalmának megismeréséhez az ezen időkből származó kőzetek szénvegyületeinek analitikai adatai szolgálhatnak felvilágosítással. Kockázatot jelentene azonban, ha következtetéseinkben kizárólag csak ezekre az adatokra támaszkodnánk, minthogy nincs pontos áttekintésünk arról, hogy a kérdéses szerves vegyületek az évmilliók során a geológiai folyamatok hatására miként változtak meg. Ezért tehát minden esetben döntő fontosságú, hogy mennyire ismerjük a tanulmányozott kőzetek metamorfózisának történetét. A szerves anyagokat és a mikrofosszíliákat ugyanis a hőmérséklet, a nyomás megváltoztathatja, vagy teljesen átalakíthatja. Ezenkívül azt is figyelembe kell még vennünk, hogy az üledékes kőzetek az enyhe vagy a közepes metamorfózist követően is még áteresztőek maradhatnak, aminek folytán ezekbe a perkolációs oldatok útján fiatalabb geológiai korokból származó szerves anyagok hatolhatnak. Mindezt szem előtt tartva biztonságosabb, ha a kőzetek oldhatatlan és kerogénnek megjelölt polimerszerű szerves anyagait, és nem oldószeres extraktumait analizáljuk, bár a kerogén maga is változik a kőzet metamorfózisa során. A kerogén a legtöbb üledékes kőzetben csupán néhány tizedszázalékban van jelen. E megállapításnak azonban nem mond ellent az a tény, hogy a kerogén a legközönségesebb szerves anyag a Földön. Az ilyen jellegű vizsgálatokhoz a megfelelő módon vett kőzetmintákat először teflon tömítésű golyósmalomban porítják. Ezután egymást követően benzollal, metanollal és vízzel ultrahangkezelés útján extrahálják. Ily módon a kőzetbe került esetleges szennyeződéseket távolítják el. A dekontaminált kerogént vagy hasonló oldhatatlan szerves anyagot ózonnal vagy pirolízissel oldható és könnyen analizálható termékké lehet alakítani. Ezeket a termékeket a gázkromatográfiás szeparáláshoz és az ezt követő tömegspektrometriás azonosításhoz volatizálják. A vizsgálatokhoz az összes üvegedényt és a golyósmalmot használat előtt forró cc.

H_2SO_4 (85%)–HNO_3 (15%) eleggyel tisztítják, az oldószereket pedig frissen desztillálják.

1.7.2. A szerves evolúció kutatásának klasszikus kőzetanyaga

Az utóbbi években a prekambriális szervesanyag-képződés dinamikájának megismerésére az alábbi fontosabb kőzeteket tanulmányozták:

1. Isua csillámos metakvarcit (Délnyugat-Grönland, $\sim 3{,}8 \times 10^9$ éves).
2. Onverwacht-csoport (Dél-Afrika, $\sim 3{,}4 \times 10^9$ éves).
3. Fig Tree-csoport (Dél-Afrika, $\sim 3 \times 10^9$ éves).
4. Bulawayan-sztromatolit (Rodézia, $\sim 2{,}8 \times 10^9$ éves).
5. Vaal-Reef-zátony (arany- és urántartalmú kerogén) (Dél-Afrika, $\sim 2{,}6 \times 10^9$ éves).
6. Transvaal-sztromatolit (Dél-Afrika, $\sim 2{,}3 \times 10^9$ éves).

Az *Isua csillámos metakvarcit* (1) nem tartalmazott felismerhető mikrofosszíliákat és metánon kívül szerves vegyületeket sem. Mindemellett ásványi mátrixában magnetit társaságában globuláris grafit mikrosktruktúrákat észleltek. NAGY szerint (1976) ez a grönlandi és egyébként a legidősebb általunk ismert üledékes kőzet a földi szerves kémiai evolúció „végső tagja". Ezen állítással szemben a 70-es évek végén meglepő közlemények láttak napvilágot. PFLUG (1978*a* és *b*), PFLUG és JAESCHKE-BOYER (1979), továbbá PFLUG és munkatársai (1979) az Isua-régió metakvarcitjaiból 3,8 milliárd évesnek tekintett mikrofosszíliákat írtak le. Így például az *Isuasphaera isua* PFLUG élesztőszerű szervezetnek tűnik, mely feltehetően a legelső fosszilizálódott élő szervezetek közé tartozik. BRIDGWATER és munkatársai (1981) azonban kimutatták, hogy e mikrostruktúrák valójában anorganikus képletek, melyeknek semmi közük sincs az egykori élőlényekhez. Különben is e kőzetek tektonikai múltja már eleve megsemmisítette volna ezeknek a szervezeteknek a maradványait. Azt az állítást is felülvizsgálták, miszerint ezek az Isua-kőzetek olyan szerves vegyületeket, közöttük szénhidrogéneket tartalmaznának, melyek az egykori őssejtek maradványaira lennének visszavezethetők. Az újabb analíziseket NAGY és munkatársai (1981) végezték el. Megállapításaik szerint az Isua-régió kőzetmintáiból ténylegesen ki lehet mutatni mind szénhidrogéneket, mind aminosavakat. Utóbbiak között nemcsak a biológiailag közönségesek, hanem geológiailag nem stabil, továbbá biológiailag ritka (pl. szarkozin) aminosavak is szerepeltek. Ezen aminosavak racemizációjának mértéke viszont határozottan igazolja, hogy alacsony élettartamú vegyületekről van szó, melyek néhány tízezer évnél

nem idősebbek. Összehasonlító gázkromatográfiás analízisek eredményei szerint ezek az aminosavak az Isua-kőzetek felszínén tenyésző *Pseudophebe minuscula* zuzmótól származnak és a kőzet finom repedései között az esővízzel, ill. a hólével szivárogtak a mélybe. Ami az izolált szénhidrogéneket illeti, ezek összetétele nagy hasonlóságot mutatott napjaink petróleumdesztillátumaival. A kőzetben feltehetően légszennyezés eredetűek. Sem a kimutatott aminosavak, sem a telített alifás szénhidrogének, közöttük példaként csak a prisztánt említve, az Isua-kőzetek ismert történeténél fogva nem lettek volna képesek a viszontagságokat átvészelni.

Az *Onverwacht-csoport*ban **(2)** az uralkodóan tűzi eredetű kőzetek között agyagos üledékekben viszonylag változatlan állapotú kovakövet *(chert)* és szideritet találtak. Korukat Rb-Sr-módszerrel 3375 ± 70 millió évre datálják. Ozonolízissel az *Onverwacht* és a fiatalabb *Fig Tree* (3000 millió éves) kerogénjeinek polimerszerű vegyületeiből rövid, alifás szénhidrogénláncokkal összekötött, aromás szénhidrogéneket, és kis számban hosszú láncú alifás szénhidrogéneket nyertek.

Pirolízis alapján a fiatalabb *Fig Tree-csoport* **(3)** kerogénje hosszúláncú *n*-alkánokban és aromás lebomlási termékekben bizonyult gazdagnak. A hosszúláncú *n*-alkánok sorozatát különben a fiatalabb korú üledékek esetében általában már biológiai eredetűnek tekintik.

A 2,8 milliárd évesnek datált és csupán diagenetikus változásokat mutató, ill. minimális metamorfózison átesett *Bulawayan (mészkő)-sztromatolitok* **(4)** kerogénjében a magas vákuum pirolízises ($\sim 10^{-6}$ torr), a gázkromatográfiás, és a tömegspektrométeres vizsgálatok szerint *n*-alkánok sorozata és számos aromás vegyület rejlett. Az ezekkel a módszerekkel kimutatott vegyületek között furaldehid és benzotril szerepelt, melyek már nyilvánvalóan szénhidrátok, ill. proteinek pirolízistermékei.

A 2,6 milliárd éves *Vaal Reef-kerogén* **(5)** analízise aromás szénhidrogéneket és aromás kénvegyületeket eredményezett, biogén pirolízistermékeket azonban még nyomokban sem sikerült kimutatni. Ez meglepő volt, mivel ezek a minták prokariota mikrofosszíliákat tartalmaznak, és ráadásul nagyfokú metamorfózison nem mentek keresztül. Feltételezik, hogy a szórványosan jelen levő uraninit (UO_2) ionizáló sugárzása lehetett az, ami a kerogén eredeti szerves anyagát megváltoztatta. Ez a sugárzás – mint ismeretes – képes például aminosavakat deaminálni stb.

A legrészletesebb vizsgálatoknak a 2,3 milliárd éves *Transvaal (mészkő)-sztromatolitok* **(6)** kerogénjét vetették alá. Ez erősen kötött ún. *„random polymer"*-t tartalmaz, melyben kondenzált, heteroatomos aromás szénhidrogén-komponensek vesznek részt, s ezeket telített szénhidrogén vagy nitrogénkötések tartják össze. Az alábbi, nagy valószínűség

szerint fontosabb biokemikáliákból származó termékeket mutatták ki: benzonitril, alifás nitrilek, pirrol, propil-furán, dimetil-furán, furán, 2-n-propil-3-metil-tetrahidro-furán és 2-n-propil-tetrahidro-pirán (NAGY, 1976).

1.7.3. A szerves evolúció menetének közvetlen kémiai bizonyítékai

A fentieket összefoglalva megállapítható, hogy a 80-as évekig elhúzódott viták ellenére a 3,8 milliárd éves Isua-kőzetek esetében életre utaló szerves kémiai bizonyítékokat nem sikerült gyűjteni. Fennáll azonban a lehetősége, hogy a Bulawayan-sztromatolitba beépülve 2,8 milliárd éves biokémiai vegyületek találhatók. A 2,3 milliárd éves Transvaal-sztromatolit viszont már kifejezetten előrehaladott prokariota biokemizmusra utal. Nagyon nehéz megítélni, hogy a 3,4–3,0 milliárd éves Onverwacht- és Fig Tree-üledékekben lerakódásuk idején biológiai anyag beépült-e vagy sem. Jelenleg úgy tűnik, hogy e kőzeteken végrehajtott mikropaleontológiai vizsgálatok eredményei párhuzamosak a szerves kémiai analízisekkel. Valódi mikrofosszíliák az Isua-metakvarcitokban ténylegesen hiányoznak, míg az Onverwacht- és a Fig Tree-csoport mikrostruktúrái e tekintetben nagyon problematikusak. A sztromatolitokat viszont az általánosan elfogadott vélemény szerint mikrobiológiai aktivitás eredményének tekintik. Ezekből nagyon kicsi méretű fosszilis baktériumok, ill. cianobaktériumok kerültek elő.

A terresztrikus szerves kémiai evolúció főbb folyamatait tehát a következőképpen körvonalazhatjuk:

1. A megközelítően 3,8 milliárd esztendővel ezelőtt Grönland délnyugati részén megkezdődött abiotikus szerves kemizmus viszonylag nagyon egyszerű lehetett.
2. Dél-Afrikában 3,4 milliárd évvel ezelőtt a molekuláris evolúció már viszonylag előrehaladott állapotba jutott és ekkorra már igen egyszerű élő szervezetek is kialakulhattak.
3. Azok a primitív szervezetek, melyek 2,8 milliárd évvel ezelőtt a Bulawayan-sztromatolitokat építették fel, már feltétlenül tartalmaztak biokemikáliákat, és végül
4. A 2,3 milliárd évvel ezelőtti prokariota biokemizmus már nagyon hasonló vagy éppen azonos lehetett azzal az enzimatikusan katalizált szerves reakciók sorozatából álló anyagcserével, mellyel a mai kékzöldalgákat (cianobaktériumok) jellemezhetjük.

1.8. A molekuláris önszerveződés és a precelluláris evolúció

A biológiai önszerveződés mind molekuláris, mind mikro- és makromorfológiai szinten új struktúrákat, szabadenergiában gazdagabb, ámde termodinamikailag egyre valószínűtlenebb rendszereket produkál, melyek fenntartása és működtetése csak állandó energiabefektetéssel és egyidejű entrópiatermeléssel valósítható meg. A prekambriális molekuláris önszerveződés hajtó és fenntartó erejeként az egykori primitív Föld energiaforrásai (a Nap sugárzó energiája, szikrakisülések stb.) szolgáltak. Az önszerveződés, a rendezett struktúrák kialakulása már önmagában is ellentmondónak tűnik a fizikai alapelvekkel, és számos megoldatlan kérdést vet fel. A mind nagyobb és bonyolultabb önszervező rendszerek kibontakozási folyamataiban olyan új törvényszerűségek is érvényesülnek, melyeket ma még nem ismerünk. HAKEN (1981) szerint lényegük megközelítésére az olyan fogalmak, mint amilyen az entrópia vagy az entrópiatermelés nem alkalmasak. Az, hogy HAKEN-nek mennyiben van igaza, vitatható, és hogy az általa az entrópia statisztikus alapelveivel szemben ajánlott új dinamikai alapelvek mennyiben lesznek használhatóak, ill. általánosíthatóak, „szinergetikája" megértésre talál-e, még nagyon is kérdéses, az azonban vitathatatlan, hogy bár az önszerveződés valószínű mechanizmusát egyre nagyobb mélységében tárjuk fel, lényege ma még alig megközelíthetőnek látszik. Már a ma élő legegyszerűbb egysejtű szervezetek rendkívüli összetettsége is határozottan arra utal, hogy az önálló életnek ezek a legkisebb egységei hosszú evolúciós folyamat végeredményeként alakultak ki, a molekuláris szerveződés és a strukturális organizáció milliónyi lépését tették már meg, melyek olyan rendkívül bonyolult anyagi elrendeződés rögzüléséhez vezettek, mely egyúttal a reproduktív funkciónak is a legjobban megfelel (EIGEN és WINKLER-OSWATITSCH, 1981). Az önszerveződés történetének teljes rekonstrukciója természetesen lehetetlen, azonban némi betekintést nyerhetünk az élet szerveződése folyamatába, ha a ma élő legprimitívebb mikrobák anyagcsere-folyamatait és a fosszíliák eredetét kutatjuk, a szénült szervesanyag-maradványokat elemezzük, vagy ha a molekuláris evolúció kezdetének ősi környezeti viszonyait szimuláljuk. Mindez azonban nem elégséges. Mire van még szükség? Idézzük EIGEN és WINKLER-OSWATITSCH (1981) sorait! „Az »evolúció« kifejezés nem csupán történeti folyamatokra, hanem a történések szabályosságára is utal." Vagyis a molekuláris önszabályozás alapvető törvényszerűségeit is fel kell tárnunk ahhoz, hogy a folyamatokat évmilliós távlatokban elemezhessük és megérthessük.

KUHN (1976), aki a biológiai evolúciót a kozmikus evolúcióhoz hasonlította, azt tartja, hogy az anyag önszerveződésének hajtóereje abban a

sajátos környezetben magában keresendő, mely a Föld felszínén korábban is uralkodott és ma is megtalálható. Ez a környezet, mely időben periodikusan és térben heterogén megoszlással változik, kezdeményezte és hajtja tovább az evolúciót az egyre növekvő mérvű komplexitás felé, mely párhuzamosan halad a rendelkezésre álló élettér folyamatos expanziójával. Adott környezeti körülmények között ez a folyamat szükségszerűség. Az egyes lépéseket véletlen történések kezdeményezik, azonban az evolúció általános folyamatát nem ezek, hanem a szelekciós mechanizmus szabja meg.

1.8.1. Az önszerveződés molekuláris nyersanyag- és energiabázisai

Az egykori molekuláris önszerveződés első alapvető kérdése, hogy vajon az élővé válás számára a primitív atmoszférában és óceánokban milyen hasznosítható prekurzor molekulák szintetizálódhattak? Feltehetően többek között a fehérjéket felépítő aminosavak (Fox és Dose, 1972), ezenkívül cukrok, foszfátok, nukleinsavak, membránlipidek és számos

5. táblázat

A kémiai szintézisek lehetséges egykori energiaforrásai*

Energiaforrás	A földfelszínre jutó energia mennyisége ($kJ/m^2/év$)
Teljes napsugárzás	11 900 000
Ultraibolya sugárzás (nanométer)	
300–250	119 000
250–200	22 000
200–150	1 650
kevesebb mint 150	71
Elektromos kisülések	
koronakisülés	126
villámlás	42
Természetes radioaktivitás 1 km mélységig	
4×10^9 évvel ezelőtt	117
Villámlás és meteoritok kiváltotta rezgés- és nyomáshullámok az atmoszférában	46
Napszél	8
Vulkáni hő	6
Kozmikus sugárzás	0,06

* Megjegyzés: a napsugárzással érkező energia több mint 98%-át olyan fotonok képviselik, melyek túl gyengék ahhoz, hogy kémiai kötéseket bontsanak vagy létrehozzanak. Csupán a 200 nanométernél rövidebb hullámhosszú ultraibolya fotonok (a teljes UV-sugárzás kevesebb mint 1,2%-a) lehettek eléggé hatékonyak kémiai reakciók kiváltásához. Az elektromos kisülések energiaértékét (totál 168 $kJ/m^2/év$) a jelenkori időjárási viszonyokra számították és ez az érték a primitív Földön nagyobb lehetett (Dickerson, 1978).

más speciális szerves vegyület, mint pl. flavinok stb. A legtöbb elképzelésünk a primitív atmoszféra gázaiból kiinduló és a biopolimerek felépítésében részt vevő monomerek szintéziseire vonatkozik. E reakciókat ugyanis laboratóriumban szimulálhatjuk és tanulmányozhatjuk. MILLER és UREY (1959) kísérleteikben mesterséges atmoszférával dolgoztak, melyben a hidrogénnek, továbbá a szénnek, nitrogénnek és oxigénnek teljesen redukált alakjai voltak jelen: metán, ammónia és víz. Az egykor lehetséges energiaforrásokra tekintettel *(5. táblázat)* először UV-sugárzást, később elektromos szikrakisüléseket alkalmaztak. A gázokat a szikra kiváltása után zárt térben egy hétig cirkuláltatták. A szintézis előrehaladását a folyamatosan vett minták analízisével követték. A szikrakisüléses kísérletek első termékei hidrogén-cianid és aldehidek voltak, majd egyre nagyobb atomszámú molekulák jelentek meg (urea, metil-urea, hangyasav, ecetsav, propionsav, glikolsav, glicin, szarkozin, alanin, β-alanin, tejsav, β-amino-vajsav, β-amino-izovajsav, N-metil-alanin, N-etil-glicin, α-hidroxi-vajsav, α-amino-vajsav, α-amino-izovajsav, γ-amino-vajsav, borostyánkősav, aszparaginsav, glutaminsav, valin, norvalin, izovalin, norleucin, imino-diecetsav, imino-ecet-propionsav, prolin és pipekolinsav stb.). A szintetizált anyagok között számos közönséges aminosav és más, az élő anyag felépítésében részt vevő molekula is szerepelt *(6. táblázat)*! E kísérleteket több változatban is megismételték, aminek során a metánt szén-monoxiddal vagy szén-dioxiddal, az ammóniát nitrogénnel helyettesítették. A mintákban leucint, izoleucint, szerint, treonint, aszparagint, lizint, fenil-alanint és tirozint találtak. Feltehető tehát, hogy aminosavak a primitiv atmoszférában könnyen szintetizálódhattak (FOX és DOSE, 1972). Jóllehet ezek a szimulálások az élő anyagban ma előforduló proteinek számos aminosavát produkálták, ugyanakkor azonban nagy számban állítottak elő olyan rokonmolekulákat is, melyek ma biológiai rendszerekben nem játszanak szerepet. Például a MILLER-típusú kísérletek a $C_3H_7NO_2$-képletű aminosav három izomer alakját eredményezték: alanint, β-alanint és szarkozint. Közülük élőkben csupán az alanin szerepel. A valin, izovalin és norvalin három izomeréből a mai proteinekben csupán a valin van meg. A szikrakisüléses kísérletekben a $C_4H_9NO_2$ képletű aminosav hét izomerje jött létre. Ezek közül azonban a földi élet egyetemes genetikai kódja egyetlenegyet sem tart nyilván. Úgy tűnik, hogy azt a 20 aminosavat, amit a genetikai kód ismer, nem a primitív Földön előfordult fehérje alkotóelem-jelöltek szűk listája diktálhatta. Jelenleg fogalmunk sincs róla, hogy a választás miért éppen az ismert 20 aminosavra és nem másokra esett. Voltak vajon hibás kiindulások is, melyek genetikai kódja az aminosavak más, a maitól eltérő készletét specifikálta? Ha igen, úgy ezek a fejlődés során nyom nélkül elpusztulhattak. Feltételezzük, hogy voltak.

Glicin nagyon gyakran keletkezik prebiotikus kemizmust szimuláló kísérletekben. Ez az aminosav kiindulását is képezheti további fontos szerves vegyületeknek. Radiolízisét, oxigénmentes vizes oldatában, ^{60}Co γ-sugárzás 20 Mrad-ig terjedő adszorbeált dózisainál vizsgálták (DRA-

6. táblázat

Hidrogén, metán, ammónia és víz alkotta rendszerben szikrakisülés hatására létrejött vegyületek*

Vegyület neve	Vegyület képlete	Vegyület mennyisége (μmol)
hangyasav	H–COOH	2330
glicin	$H_2N–CH_2–COOH$	630
glikolsav	$HO–CH_2–COOH$	560
alanin	$H_2N–CH(CH_3)–COOH$	340
tejsav	$HO–CH(CH_3)–COOH$	310
β-alanin	$H_2N–CH_2–CH_2–COOH$	150
ecetsav	$CH_3–COOH$	150
propionsav	$C_2H_5–COOH$	130
imino-diecetsav	$HOOC–CH_2–NH–CH_2–COOH$	55
szarkozin	$HN(CH_3)–CH_2–COOH$	50
α-amino-vajsav	$H_2N–CH(C_2H_5)–COOH$	50
α-hidroxi-vajsav	$HO–CH(C_2H_5)–COOH$	50
borostyánkősav	$HOOC–CH_2–CH_2–COOH$	40
urea	$H_2N–CO–NH_2$	20
N-metil-urea	$H_2N–CO–NH–CH_3$	15
imino-ecet-propionsav	$HOOC–CH_2–NH–C_2H_4–COOH$	15
N-metil-alanin	$HN(CH_3)–CH(CH_3)–COOH$	10
glutaminsav	$H_2N–CH(C_2H_4COOH)–COOH$	6
aszparaginsav	$H_2N–CH(CH_2COOH)–COOH$	4
α-amino-izovajsav	$H_2N–C(CH_3)_2COOH$	1

* Megjegyzés: A keverék eredetileg metángáz alakjában 710 mg, ill. 59 000 μmol szenet tartalmazott, melyből 15% alakult át az itt felsorolt vegyületekké. A szén lényegesen nagyobb százaléka analizálhatatlan állapotban ülepedett le. A kísérlet során a fehérjékben ma előforduló aminosavak közül mindössze négy jött létre.

GANIC és munkatársai, 1985). Legalább 20 vegyület képződött, közöttük aminosavak, egy oligoamin és nitrogénmentes polimerek (molekulasúly ≤28 000 dalton) is. Ha a glicinoldatban dicián-diamid volt jelen, úgy a glicin radiolitikus termékeinek társaságában nagyon különböző nitrogéntartalmú termékek, közöttük polimerek (molekulasúly 12 000 dalton) szintetizálódtak. Poliglicinek nem képződtek.

1.8.2. Az optikai izomerek szelekciójának problémái

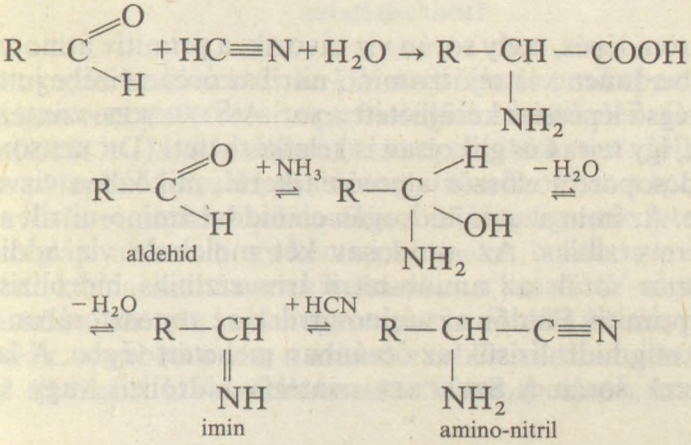
A prebiológiai reakciókat szimuláló kísérletek az optikailag aktív molekulák D- és L-konfigurációit egyenlő számban állították elő. A prokariotáktól eltekintve (pl. a baktériumok sejtfala) napjainkban az összes élő szervezet csupán L-aminosavakat épít be. Miért? A kísérletek alapján DICKERSON szerint (1978) az látszik valószínűnek, hogy az L-izomerek primitív szelekciója a D-izomerekkel szemben a véletlen műve lehetett. Az enzimek, melyek a szubsztrátmolekulákat felületükön kötik meg, hatékonyabbak, ha már eleve vagy az egyik, vagy a másik izomerre specializálódnak. Valamikor az élet kialakulásának kezdetén a prekurzorok felépítésében D- és L-aminosavak egyaránt részt vehettek és az esély 50–50% lehetett arra, hogy egyik vagy másik kerül majd előtérbe. Mindenesetre az tény, hogy az élő szervezetek csaknem kizárólag L-aminosavakat tartalmaznak, míg a tápanyagok nagy része a D-glükózra alapul. Ez PASTEUR óta már sokaknak felkeltette a figyelmét. Különböző hipotézisekkel szolgáltak annak magyarázatára, hogy az élet keletkezése során az L-aminosavak miért részesültek előnyben a D-konfigurációkkal szemben. A poláros napfényt mindenesetre nem vehetjük számításba, minthogy az L-, ill. a D-jelölés nem a forgatás irányát, hanem a D-glicerinaldehidre vonatkoztatott relatív konfigurációt jelöli. Az is valószínűtlen, hogy éppen az ionizáló sugárzások lennének azok, melyek a D- és L-enantiomereket megkülönböztetnék egymástól. Azt viszont már régen tudjuk, és az enantiosztereomerek keverékeinek kémiai, ill. biológiai szétválasztása is azon alapul, hogy az L- és D-vegyületek, jóllehet skaláris tulajdonságaikban azonosak, királis molekulákkal kovalens vagy komplex kötésben diasztereomereket képeznek, melyek fizikailag és kémiailag megkülönböztethetők. A korai prekambrium „HALDANE-leves"-ében feltételezhetően D-, L-racemát keveréke jöhetett létre. Az élővé válás folyamatában jelentkezett L-konfigurációs szelekció természetére nézve újabban érdekes szempontokhoz jutottunk. Az a megállapítás már korábban is felvetődött, hogy a felületgazdag, anorganikus agyagásványok az evolúció során sajátos szerepet játszhattak (BERNAL, 1966). Ezek a szerves anyagokat adszorptíve koncentrálták, egymással reagáltatták és a makromolekulákhoz vezető polikondenzációkban működtek közre. Felmerült azonban a kérdés, hogy vajon ez az adszorpció a királis anorganikus kristályfelületeken nem járulhatott e hozzá a sztereomerek gazdagodásához. Ma úgy tűnik, hogy a probléma megoldásának kulcsa éppen itt rejlik. BONDY és HARRINGTON (1979) az aszparaginsav, leucin és glükóz D- és L-izomerjeinek kötődési viszonyait bentoniton (alumínium-szilikát ásvány) tanulmányozták. Az ilyen agyagok a poláros szerves molekulák jelenlétében is ioncserélő tulajdonságokkal rendelkeznek. Azt

találták, hogy ezenkívül még messzemenően sztereoszelektívek is. Így a finommegoszlású steril bentonit az L-leucint és az L-aszparginsavat reverzíbilisen, D-izomerjeikkel szemben hétszer erősebben, a D-glükózt – az L-glükózzal szemben – 11-szer erősebben kötötte meg. Az antipódák a kötőhelyekért folytatott versengésben gyakorlatilag nem jöttek számításba. Az így előnyben részesülő „biológiai molekulák" híg oldataikból a kolloidális agyagfelszínen energiabefektetés nélkül, nagyfokú sztereoszelektivitással – miként az az ősóceánok partjain is végbemehetett – racem-egyensúlyuktól elkülönülhettek és koncentrálódhattak. A visszamaradó ki nem nyert antipodák azután folyamatosan utánracemizálódhattak és sok ezer év leforgása alatt az eredetileg „nem biológiai" izomerek is elhasználódhattak. Ezek adszorbeálódtak, koncentrálódtak, miközben reaktivált molekuláik egymással és egymás között egyre komplexebb rendszerekké kapcsolódtak és szerveződtek.

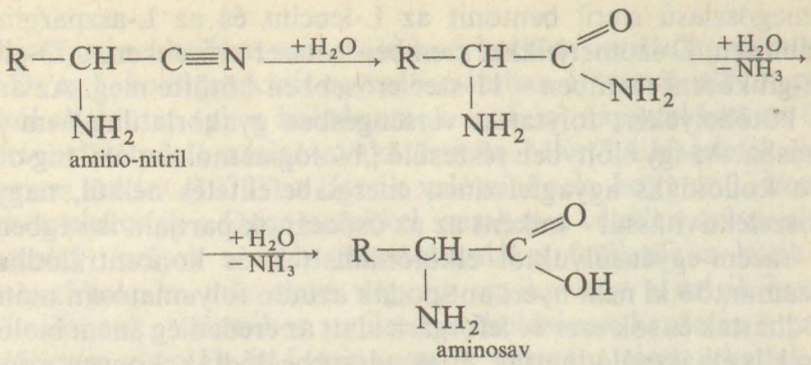
1.8.3. Az aminosavak abiotikus szintézisének lehetőségei

Az aminosavak szintézisére visszatérve kérdéses, hogy ez a szikrakisülések vagy az ultraibolya sugárzás hatására hogyan mehetett végbe. MILLER és UREY egyhetes kísérleteik során az intermedierek megjelenését és eltűnését is megfigyelték. Az ammónia koncentrációja állandóan csökkent és nitrogénatomjai először a hidrogén-cianid (HCN) és a cianogén (C_2N_2) molekuláiban jelentek meg. Ezek az aldehidekkel együtt az első lépésben képződött anyagok voltak. Az aminosavak maguk sokkal lassabban hidrogén-cianidból és aldehidekből szintetizálódtak. Ez a sorrend arra utal, hogy az aminosavak aldehidekből, a szerves kémiában jól ismert STRECKER-szintézis révén jöttek létre:

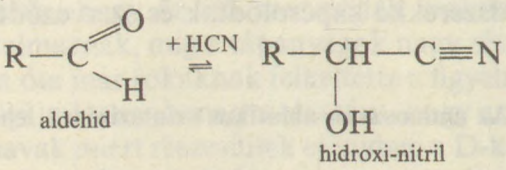
1. A légkörben:



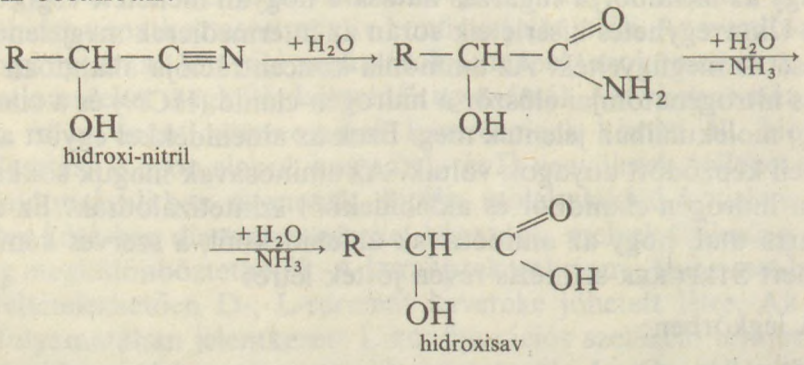
2. Az óceánban:



3. A légkörben:



4. Az óceánban:

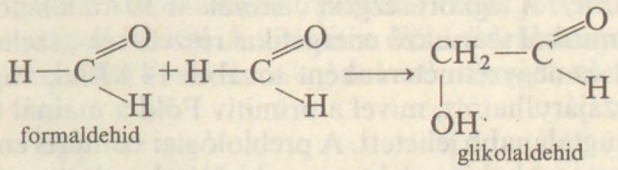


Az első három lépés, mely során víz távozik, a primitív atmoszférában mehetett végbe. Innen a létrejött amino-nitril az óceán vizébe jutott, ahol a hidrolízis végső lépéseire kerülhetett a sor. A STRECKER-szintézis során hidroxisavak, így tejsav és glikolsav is keletkezhetett (DICKERSON, 1978).

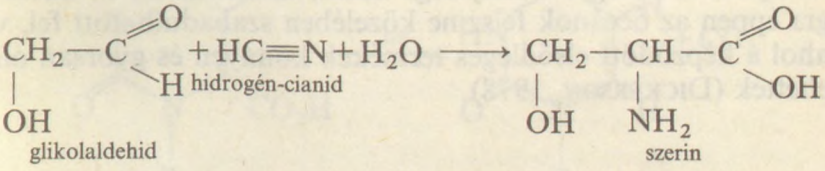
Az aldehidcsoportra először ammónia kerül, miközben vízvesztéssel imin jön létre. Az imin azután hidrogén-cianiddal amino-nitrilt alkot. Ez a két lépés reverzíbilis. Az aminosav két molekula víz addíciója és ammóniavesztés során az amino-nitril irreverzíbilis hidrolízise révén képződik. A primitív Földön az aminonitrilek az atmoszférában szintetizálódhattak, míg hidrolízisük az óceánban mehetett végbe. A laboratóriumi kísérletek során a STRECKER-szintézis–hidrolízis vagy savanyú,

vagy bázikus oldatokban megy végbe, minthogy neutrális oldatokban a hidrolízis sebessége csekély. A primitív Földön azonban a hidrolízis minden zavar nélkül akár tízezer évig is eltarthatott, mivel az aminonitrileket degradáló szabad oxigén nem volt jelen. A STRECKER-szintézis hidroxisavakat is eredményez. A formaldehid (CH_2O) glikolsavvá ($C_2H_4O_3$) és glicinné ($C_2H_5NO_2$), az acetaldehid (C_2H_4O) tejsavvá és alaninná konvertálódik. A hosszabb szénláncú aminosavak kiinduló anyagként még komplexebb aldehideket igényelnek. Másrészről, a hidroxilcsoportot tartalmazó szerin két molekula formaldehid kondenzációját követő STRECKER-szintézissel jöhetett létre az alábbi reakciók során:

1.



2.



Úgy tűnik, hogy ma már a legtöbb természetben előforduló aminosav abiotikus szintézisének lehetséges útját megfejtették.

1.8.4. Milyen energiaforrások hasznosultak leginkább a prebiotikus szintézisekhez?

Az elektromos kisülések és az UV-sugárzás semmiképpen sem lehettek kizárólagos energiaforrásai a prebiológiai szintézisnek. E téren sok más energiaforrás is *(lásd 5. táblázat)* szerepet játszhatott. Jóllehet a legtöbb energia a Napból érkezett, ennek nagy része azonban a spektrum látható és infravörös régiójára korlátozódott. Márpedig ezek fotonjainak nincs elég energiája ahhoz, hogy kémiai kötéseket bontsanak és létesítsenek. Ezenkívül kémiai szintézisek kiváltásához a beeső UV-sugárzás többsége is hatástalan lehetett, minthogy a metán és más kicsiny szénhidrogénmolekulák, továbbá a víz, a szén-dioxid és a szén-monoxid csak a 200 nm-nél rövidebb UV-hullámhosszon abszorbeálnak, melynek aránya

viszont a rendelkezésre álló összes UV-sugárzás 1,2%-a alatt maradhatott (mintegy 1720 kJ az évente a földfelszín négyzetméterére jutó totál 143 000 kJ-ból). A primitív atmoszférában feltételezhetően jelen volt gázokból csupán az ammónia és a kén-hidrogén abszorbeáltak hosszabb hullámhosszon: az ammónia 220 nm-ig, a kén-hidrogén 240 nm-ig. Ennélfogva e két gáz mint napenergiagyűjtő a primitív atmoszférában igen fontos lehetett.

Amennyiben a primitív Föld időjárási viszonyai nem voltak annyira viszontagságosak, mint a jelenben, úgy a villámlások és a légköri elektromosság koronakisülései évente négyzetméterenként 170 kJ-t tehettek ki. A természetes radioaktivitásból származó energia mennyisége, a földtörténet korai éveire visszafelé extrapolálva, mintegy 117 kJ/év lehetett *(lásd 5. táblázat)*. A légköri rezgéshullámok 46 kJ-ra tehetők. A Napból és a vulkanizmusból származó energetikai részecskék „szele" az összképhez évenként és négyzetméterenként további 14 kJ-lal, vagy talán még többel is hozzájárulhatott, mivel a primitív Föld a mainál tektonikailag feltétlenül nyugtalanabb lehetett. A prebiológiai szintézis energiaforrásai közül a legfontosabbak az elektromos kisülések voltak, mégpedig nemcsak a fejlődött energia mennyisége miatt, hanem azért is, mivel ez az energia éppen az óceánok felszíne közelében szabadulhatott fel, vagyis ott, ahol a képződött elsődleges termékek könnyen és gyorsan oldatba is mehettek (DICKERSON, 1978).

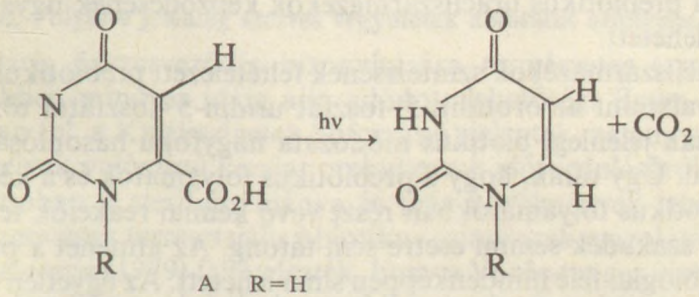
1.8.5. A nukleinsavak építőelemeinek abiotikus szintézise

A mai proteinek 20-féle aminosavból épülnek fel. A nukleinsav-szintézishez kétféle cukor (az RNS-hez ribóz, a DNS-hez dezoxiribóz), foszfát, továbbá purin- és pirimidinbázisok szükségesek. A cukrok mint a formaldehid kondenzációs termékei a „formózreakció" néven ismert szintézissel épülnek fel (*lásd* 411. old.). Bár ennek mechanizmusa több lépést igényel, a reakció maga igen egyszerű: a formaldehid öt molekulája együttesen egy molekula ribózt alkot. A „formózreakció"-val kapcsolatban bizonyos problémák merültek fel (az előállított ribóz pl. vizes oldatban nem stabil és az alkalmazott kísérleti feltételek is erősen kifogásolható módon szimulálták a primitív Föld viszonyait), mégis úgy tűnik, csakis ilyesféle reakciók állíthatták elő a szintézishez a szükséges ribózt (DICKERSON, 1978).

A szerves bázisok közül a purinbázis adenin az, amely a legkönnyebben szintetizálódhat (SANCHEZ és munkatársai, 1967; FERRIS és munkatársai, 1977 stb.). Ez egyszerűen öt HCN-molekula pentamerje ($C_5H_5N_5$). Valószínű, hogy először négy HCN-molekula kapcsolódik

össze tetramerré (diamino-maleo-nitrillé). Utóbbi a bázisszintézishez vezető reakciók fontos köztiterméke. Fény jelenlétében molekulái önelrendeződéssel egy-egy HCN-molekulát vesznek fel, miközben adenin jön létre. Ilyen szintézis mehetett a primitív Föld körülményei között is végbe. A guanin, a nukleinsavak szintéziséhez szükséges másik purinbázis diamino-maleo-nitrilből cianogén részvételével hidrolízisek révén nyerhető [FERRIS és munkatársai (1977)]. A szintézisek lehetséges útjait a pirimidinbázisok (timin, uracil, citozin) relációjában is megkísérelték már kidolgozni.

A pirimidinbázisok szintézisében fontos szerepet játszik az orotsav, mely HCN-oligomerek hidrolízisével jön létre. Az egykori biológiai rendszerekben az RNS építőegységeinek az uridin 5′-foszfátnak és a citidin 5′-foszfátnak a szintézisénél, prekurzorként jöhetett számításba (TAX és munkatársai 1976). A primitív Föld körülményei között az orotsav és származékai fotokémiailag dekarboxileződhettek (FERRIS és JOSHI, 1978).



A R=H
B R=1′-ribozil
C R=1′-ribozil 5′-foszfát

Az orotsav (1A) az orotidin (1B) és az orotidin 5′-foszfát (1C) besugárzása 254 nm-nél uracilszármazékok képződéséhez vezet, mégpedig nagy hatékonysággal *(7. táblázat)*.

7. táblázat

Az orotsav és származékainak fotokémiai dekarboxilezése* (FERRIS és JOSHI, 1978)

Vegyület	Koncentráció (M)	Besugárzási idő (h)	Termék	Hozam (%)
Orotsav (1A)	$6{,}4 \times 10^{-4}$	48	Uracil (2A)	4,9
Orotsav (1A)	$6{,}5 \times 10^{-5}$	6	Uracil (2A)	12,7
Orotidin (1B)	$6{,}4 \times 10^{-4}$	3	Uridin (2B)	45
Orotidin 5′-foszfát (1C)	$6{,}4 \times 10^{-4}$	4	Uridin 5′-foszfát (2C)	23

* Megjegyzés: A fotolízist pH 8,5-re adjusztált vizes oldatban valósították meg.

Az orotsav dekarboxilezését a Fe(III) és a Cu (II) jelenléte elősegítette. 7–8%-os uracilhozamot értek el, amennyiben $6{,}4 \times 10^{-4}$ M orotsavat 6 órán át e fémionok valamelyikének ekvimoláris mennyisége jelenlétében besugározták. E fémionok jelenléte nélkül az uracilhozam csak 1%-os volt. E fémek különben fontos szerepet játszhattak az egykori precelluláris evolúcióban (MILLER és ORGEL, 1974).

Az uracil fotokémiai képződésének kimutatása orotsavból megerősíti azt a feltételezést, mely szerint a pirimidinek hidrogén-cianidból szintetizálódhattak. Csupán ultraibolya sugárzásra volt szükség ahhoz, hogy az anyagcsereút teljessé váljon, ami viszont a primitív Föld egyik legközönségesebb energiaforrása volt. Ezenkívül az ilyen fotolitikus reakciók hatékonysága akkor sem csökkent, ha a kiinduló anyagok koncentrációja nagyon alacsony volt. Ebben az esetben ugyanis a hatékonyság oly mértékben növekedik, amilyen mértékben az orotsav koncentrációja csökken, ugyanis az egymással versengő biomolekuláris fotofolyamatok aránya kisebb lesz. Az orotsav fémionokkal meggyorsított fotodekarboxilezése a prebiotikus uracilszármazékok képződésének ugyancsak fontos útja lehetett.

Az uracilszármazékok szintézisének feltételezett prebiotikus útja orotsavból, valamint az orotidin-5′-foszfát uridin-5′-foszfáttá történő konverziójának jelenlegi biotikus módozata nagyfokú hasonlóságot mutat egymással. Úgy tűnik, hogy a prebiotikus folyamatok és a később kifejlődött biotikus folyamatokban részt vevő kémiai reakciók tekintetében nagyobb szakadék semmi esetre sem tátong. Az átmenet a prebiológiai úttól a biológiai felé mindenképpen sima lehetett. Az egyetlen különleges követelmény a prebiológiai kémiai folyamatokat meggyorsítani képes enzimek evolúciója iránt jelentkezett (HOROWITZ, 1945; FERRIS és JOSHI, 1978). Ezek ugyanis már nélkülözhetetlennek bizonyultak akkor, amikor az orotátszármazékokat olyan biológiai rendszerek asszimilálták, melyek az UV-sugaraktól leárnyékolt helyen éltek, vagy amikor a primitív légkörben már elegendő mennyiségű O_2-gáz fejlődött ahhoz, hogy az ozonoszféra kialakulhatott és ez hatékonyan kiszűrte azokat a Napból jövő UV-sugarakat, melyek a fotodekarboxilezéshez feltétlenül szükségesek.

Adeninből és egy molekula ribózból adenozint, vagyis egy molekula nukleozidot származtathatunk. Egy molekula trifoszfát egyszerű addíciójával ebből ATP lesz. Említésre méltó tény, hogy az a nukleozid, mely az evolúció során az élő szervezetekben olyannyira fontos energiahordozó szerepének betöltésére, a három foszfát hordozására szelektálódott, az pontosan az adenozin és nem a guanozin vagy a citidin, illetve az uridin volt. Ez a választás nem egykönnyen okolható meg. Kérdés, hogy miért jobb energia tárolására az ATP, mint a GTP, CTP vagy akár az

UTP? Lehetséges, hogy a primitív HALDANE-levesben az adenin szintézisének viszonylagos egyszerűsége következtében már eleve nagyobb koncentrációban lehetett jelen, mint más bázisok (DICKERSON, 1978).

A nukleinsavak bázisainak és cukrainak szintézise a primitív Föld körülményei között nem ütközhetett nehézségekbe. Kevésbé felderíthetőnek látszik azonban az, hogy ezek miként kapcsolódhattak össze nukleozidokká. A ribóznak például négy olyan hidroxilcsoportja van, amelyek összekapcsolhatják az adeninnel. Ráadásul a hidroxilcsoportok közül három aszimmetrikus szénatomhoz kötődik, ennek folytán az adenin ezek mindegyikéhez (az 1′, 2′ és a 3′ szénatomokhoz) strukturálisan vagy α-, vagy β-konfigurációban két különböző módon is kapcsolódhat. Eddig még senkinek sem sikerült olyan eljárást javasolnia, mely az adenin és a ribóz között kielégítő mennyiségben éppen azt a β–1′ kapcsolódási típust állítaná elő, mely a természetes DNS-ben és RNS-ben univerzálisan megtalálható.

1.8.6. Folyik-e jelenleg szerves vegyületek abiotikus szintézise?

A molekuláris önszerveződés bizonyítására természetes terresztriális környezetekben mind ez idáig alig adódott lehetőség. Egyes miliőkre vonatkozóan (pl. a Kuril-szigetek hőforrásai) jelentek meg ugyan közlemények, melyek valószínű kémiai prekurzorok előfordulásáról számolnak be, azonban a sterilitás hiánya és más körülmények lehetetlenné tették a természetes terresztriális abiotikus szintézisek igazolását. DOWLER és INGMANSON (1979) feltételezték, hogy a Vörös-tenger vize, mégpedig a tenger fenekén a „globális lemezek" terjeszkedése aktív tengelyének repedés okozta völgyében, alkalmas hely lehet az élet prekurzorai abiotikus szintézisének tanulmányozására. Figyelmük itt különösen az „Atlantis II Deep brine" (21°22′ É, 38°05′ K)-re irányult, minthogy a vizsgálatok szerint ez steril, metánban 10^3-szor gazdagabb, mint a normál tengervíz, nem tartalmaz szabad oxigént, szokatlanul meleg (63 °C) és „redukáló környezetnek" minősíthető. Ez a kb. 200 m vastagságú vízréteg 2000 m mélységben helyezkedik el. A vízmintákat steril körülmények között, a fenék felett 14–225 m között vették. A vízminták eredendő sterilitása kimutatható volt. A tiocianátot papírkromatográfiás analízissel és spektrofotométerrel detektálták, megállapítva, hogy koncentrációja az „Atlantis II Deep brine"-ben $2{,}4 \times 10^{-5}$ M. A Vörös-tenger vizének kontroll-mintáiban tiocianátot nem találtak. Ez a koncentráció szignifikánsnak tekinthető a prebiotikus kemizmus szempontjából. Valószínűleg e különleges miliőben valamennyi cianid tiocianáttá alakulhat, minthogy azok az üledékek, melyeken ez a víz folyik keresztül, gazdagok elemi kénben és szulfidokban (pirit, kalkopirit, szfalerit és markazit).

Most már csak az a kérdés, hogy az „Atlantis II Deep brine" tiocianátja honnan származhat? Nincs olyan tengeri szervezet, mely cianidot vagy tiocanátot választana ki környezetébe. Ezzel szemben geotermális forrásokból mind cianidot, mind tiocianátot kimutattak. A hidrogén-cianid a törésrendszerben abiotikus úton keletkezhetett és csak azután vált szabaddá, miután már kénnel vagy szulfidokkal reagálva tiocianát jött létre. A hidrogén-cianid és az ezzel rokon kémiai vegyületek – mint láthattuk – jelentős szerepet játszhattak a purinok, pirimidinek és aminosavak prebiotikus szintézisében. DOWLER és INGMANSON (1979) felfedezése arra utal, hogy az élet eredete és a földkéreg evolúciója között feltétlenül kapcsolat lehetett. Minthogy a tiocianát jelenléte steril tengervízben még nem egyértelműen bizonyítja annak a cianidnak az abiotikus eredetét, melyből a tiocianát származhatott, további vizsgálatokra van tehát szükség, elsősorban is a rendszerben szereplő szerves molekulák kimutatására. Az eddigi adatok arra utalnak, hogy e tengervízben jelentős mennyiségű metán, etán és alacsony molekulasúlyú paraffin is jelen van. Ugyanitt aminosavak abiotikus szintézise is feltételezhető.

1.8.7. Szerves polimerek szintézisének feltételezett abiotikus útjai

Természetesen a biológiai rendszerekben szereplő polimerek legfontosabb monomerjei szintézisének néhai abiotikus anyagcsereútjait illetően sok részletkérdést kell még tisztázni. Ami a monomereknek a primitív Földön végbement polimerizációját illeti, itt a legalapvetőbb kérdés, hogy az ősóceán vizében az energiabevitel és a vízelvonás során milyen reakciók játszódhattak le. A polimerlánc meghosszabbodásakor minden új alegység csatlakozása vízelvonással jár. Mivel az ilyen reakciók reverzíbilisek, ezért az óceán színterében a víz túlsúlya a folyamatokat inkább a hidrolízis, mintsem a polimerizáció irányába tolja el. Ezenkívül, amíg a reagensek és termékek egyidejű és megfelelő koncentrációja jelenlétében a hidrolízis irányában végbemenő reakció szabadenergiát ad le és spontán jellegű, addig a polimerizáció energiabefektetést igényel. A polimerizáció irányába két módon tolhatók el a folyamatok: **1.** A reagensek koncentrálása. **2.** E folyamat összekapcsolása a polimerizációt elősegítő energiafelszabadító reakciókkal. Mindkét lehetőséget megvizsgálták.

A ma élő szervezetekben a polimerizációt szolgáló energiát az ATP biztosítja. Az energiát igénylő és nyújtó reakciók összekapcsolása enzimekkel történik. A prebiológiai Földön, még a specifikus enzimek megjelenése előtt, e téren bizonyos szabadenergiában gazdag és a reagáló molekulákhoz kapcsolódni is képes vegyületek játszhattak szerepet. A szerves kémia több ilyen összekötő reagenst is ismer. Ezek egy jellegze-

tes csoportját a karbodiimidek alkotják. Bennük egy szénatom kettős kötéssel két nitrogénatomhoz kapcsolódik (N = C = N). Ha a karbodiimid egymást követően két olyan monomerrel vagy polimerrel – nevezzük ezeket *A*-nak és *B*-nek – kapcsolódik, melyek egyike terminális hidroxilcsoportot, a másika terminális hidrogénatomot visel, akkor a két monomert vagy polimert végeiken egyidejű vízelvonással összeköti. A karbodiimid vízfelvétele elegendő energiát szabadít fel ahhoz, hogy e reakció végbemehessen. A karbodiimidek azonban csak egy példa a sok közül. Potenciálisan összekötő ágenseket a prebiológiai szintézisek szimulálásakor többet is előállítottak: cianogént (N≡C—C≡N), cián-amidot (N≡C—NH_2), ciano-acetilént (N≡C—C≡C—H), és diamino-maleonitrilt. Valamennyi szén- és nitrogénatomot összekötő nagy energiájú hármas kötést tartalmaz. A ciano-acetilén hidrogén-cianidból elektromos kisülés hatására keletkezik. A cianogén hidrogén-cianidból mind elektromos kisüléssel, mind ultraibolya sugárzással egyaránt előállítható. Az elektromos szikra vagy a fotonok energiája a termék molekuláinak hármas kötésében mint szabad kémiai energia raktározódik, majd később az összekötő reakciónál szabaddá válik. Ily módon a prebiológiai polimerizációk energiaforrásaiként közvetve az ultraibolya sugárzás és a villámlás jöhettek szóba éppen úgy, mint ahogy a ma élő szervezetek anyagcseréje szoláris energiával üzemel (DICKERSON, 1978).

A prebiológiai kapcsolódási mechanizmusok megértésénél jelentős gondot okoz, hogy az összekötő ágens miért nem reagált közvetlenül a mindenütt jelen levő vízzel, ami egyúttal a kívánt polimerizációs reakciók kizárását is jelentette volna. Laboratóriumi viszonyok között a karbodiimid kapcsolódási reakciókat nem vizes oldószerekben hajtják végre. Ilyen modell azonban nem szimulálhatja a primitív Föld viszonyait. Ha a kapcsoló ágens cianogén lenne, úgy a víz a polimerizációt a kétlépéses reakció mindegyikében felfüggesztheti. Egyesek elképzelése szerint a prebiológiai kapcsolódási reakciók vizes közegben is végbemehettek, amennyiben a polimerizálandó molekulák előzetesen negatív töltésű ionokhoz, így például foszfátinokhoz (HPO_4^{2-}) kapcsolódtak. A szerves foszfátok a vízzel a kapcsoló reagensek nagy energiájú kötéseiért már előnnyel vehetik fel a versenyt. Foszfátkondenzációkat már sikeresen alkalmaztak aminosavakból dipeptidek, továbbá adenozinból és foszfátból AMP előállítására, ezenkívül a nukleinsavak ribóz-foszfát gerincének összekötésére és foszfátionokból polifoszfátok felépítésére.

A polifoszfátok, a hosszú láncú foszfátpolimerek abiotikus szintézise az élet evolúciója szempontjából nagy jelentőségű folyamat lehetett. Az élő sejtekben maga az ATP is éppen nagy energiájú foszfátkötései miatt lett az energiaraktározás és -szállítás hatékony eszköze. Feltételezik, hogy az a nagy mennyiségű energia, mely a polifoszfátok foszfátokká

történő hidrolízise során szabadulhat fel, ezeknél az ősi szintéziseknél hasznosítódhatott. Az ATP-t is egyszerűen csak mint parányi adenin-„jelzésű" polifoszfátot kezelhetjük, melynél a jelzés már a modern katalizátoroknak, az enzimeknek teszi a felismerést lehetővé. A ma élő baktériumok közül energiát a citoplazmában lokalizált polifoszfáttestecskékben többen is tárolnak. Lehet, hogy egykor a kondenzáló ágensek révén létrehozott polifoszfátok az első élő szervezetek, ill. közvetlen prekurzoraik legfontosabb energiaforrásait képezhették (DICKERSON, 1978). Mindenesetre a recens baktériumok, ma jóllehet polifoszfátokat szintetizálnak, de ezek energiáját aligha hasznosítják (lásd 200. old.).

A glikolízis és az ehhez kapcsolódó anaerob fermentáció feltehetően az élő szervezetek legrégebbi energiaszerző anyagcsereútjai közé tartozik. Ennek során a glükóz vagy az ehhez hasonló vegyületek molekulái lebomlanak, energiájuk pedig adenozinnal „jelzett" polifoszfátban, ATP-ben raktározódik. DICKERSON szerint a glikolízis az ősi miliők polifoszfáttartalékainak kimerülése miatt jött létre, minthogy az első primitív szervezetek energiaigénye már meghaladta a polifoszfátok kondenzációval végbemenő természetes abiotikus produkciójának sebességét. Ha feltételezzük, hogy az összekötő reagensek az UV-sugárzás vagy az elektromos kisülések energiájának felhasználásával jönnek létre, továbbá, hogy a polifoszfátok felépüléséért is ilyen összekapcsoló reagensek voltak felelősek és hogy a polifoszfátok hidrolízise az ősi szervezetek számára valóban energiaforrásul szolgált, úgy ezek a villámlások és az UV-sugárzás energiájából csak „harmadkézből" részesültek.

A polimerizációhoz vezető reakciókat a vízmolekulák jelenléte gátolja, vagy lelassítja. Elképzelhető, hogy az egykori HALDANE-leves kicsiny mennyiségeit a Napsugárzás okozta párolgás (szoláris evaporáció) a sekélyvízű tengeröblök partjain levő bemélyedésekben, elszigetelt vájatokban erősen koncentrálhatta, ami a polimerizációnak feltétlenül kedvezhezett. Édesvízi tavacskák e szempontból még több előnyt nyújthattak, mivel azokból a víz beszáradásakor sók nem kristályosodtak ki. Az evaporációra vonatkozó elképzelésekkel szemben felvethető, hogy a „biológiai molekulák" számtalan fontos prekurzora, így például a hidrogén-cianid, a cianogén, a formaldehid, az acetaldehid és az ammónia maguk illékonyak. Az „archaikus pocsolyák" evaporációja a monomerek koncentrálásával elősegíthette a polimerizációs folyamatokat, míg a monomerek szintézisében alig lehetett jelentősége. A prebiológiai molekulák koncentrálódásának más lehetőségei is voltak, így például ha ezek különböző ásványok felületén adszorbeálódtak (PAECHT-HOROWITZ és munkatársai, 1970; BERNAL, 1966; BONDY és HARRINGTON, 1979 stb.). Csillámok és agyagásványok pozitív ionokkal összetartott szilikátrácsában a lapok között vízmolekulák alkotnak rétegeket. E vízrétegek a

szilikátlapokat az agyagba diffundáló molekulák számára mindkét oldalukon hozzáférhetővé teszik és így a molekuláris adszorbcióra alkalmas felület rendkívüli mértékben megnövekedik. A kaolinit típusú agyagásványokban a szilikátlapokat csupán 0,71 nm távolság választja el egymástól, ami azt jelenti, hogy egy 1 cm élhosszú kaolinitkocka mintegy 2800 m^2 felületet képvisel. Ezenkívül a szilikátlapok maguk negatív töltésűek és az alumíniumionok ezekhez hármas pozitív töltéssel kapcsolódnak. A negatív és pozitív töltések nagy száma nem csupán azért fontos, mert a töltéssel rendelkező és a rendszerbe került molekulákat ezek kötik a rétegrácshoz, hanem e töltésgazdagság az ősi katalitikus reakciók centrumaként is funkcionálhatott. A montmorillonit típusú agyagásványok különösen hatékonyan segítik elő a protein típusú polipeptidláncok polimerizációját aminosav-adenilátokból (AMP-ből és aminosavakból létrejött észterekből). Minthogy ez utóbbiak szabadenergiában gazdagok és foszfátiont is tartalmaznak, emiatt hatékony polimerizációjuk vizes oldatokban is végbemegy. Ha az aminosav-adenilátok agyagfelszíneken adszorbeálódhatnak, úgy ott polimerizációjuk 50 vagy még több egységükből is közel 100%-os hatékonysággal mehet végbe. A proteinszintézis prekurzorai valamennyi élő szervezetben aminosav-adenilátok és feltételezhető, hogy ezek néhai agyagfelületi polimerizációi fontos kezdeti lépések lehettek a biológiai proteinszintézis evolúciójában. Ha az ősi miliőkben a polimerek már egyszer létrejöttek, úgy újra oldatba menve és lassan felhalmozódva további, a fejlődést szolgáló reakciók részeseivé válhattak.

Az agyagásványok lehetséges szerepét mérlegelve nem hagyhatjuk figyelmen kívül a tényt, miszerint szerves katalizátorok, enzimek, felületükön adszorbeálódva, specifikus aktivitásukat még megtarthatják. Az ureáz enzim pl. hexadeciltrimetil-ammónium-bentoniton hidrofób kötéssel adszorbeálódhat. Ez a kötődés nem függ a pH-tól és az enzimaktivitás olyan szinten marad mint homogén oldatban (Boyd és Mortland, 1985). Ilyen állapotban azonban az enzim hőstabilitása és a proteolízissel szembeni rezisztenciája nagyon lecsökken.

A prebiotikus úton létrejött vegyületek koncentrálódásának és polimerizációjának még két további módját is feltételezik: a fagyást, továbbá a felmelegedés előidézte kiszáradást. Ismeretes, hogy oldatokat koncentrálhatunk, ha azokból a vizet, jégkristályok alakjában kifagyasztjuk. A prebiológiai Földön kifagyással mínusz 21 °C-on a hidrogén-cianid híg oldataiból 75%-os koncentrátumok jöhettek létre. Másrészt Fox (Fox, 1969, 1973, 1976) szerint tiszta aminosavak száraz keveréke 130 °C-os hőmérsékleten már néhány óra alatt spontán polimerizálódik ún. „termál proteinoidok"-ká. Ha polifoszfátok is jelen vannak, úgy e proteinoidok szintéziséhez egy napig tartó 60 °C is már elegendő, feltéve, hogy

az aminosavkeverék tagjai uralkodóan vagy savanyú, vagy bázikus jellegűek és elektromosan töltött oldalláncokkal rendelkeznek. Fox elképzelései szerint ily módon 200 vagy több aminosavegységet tartalmazó polimerek is felépülhetnek. Jóllehet a legtöbb így kialakuló peptidkötés normál típusú, mégis az oldalláncok bevonásával egy kevés „nem megfelelő" kapcsolódás is létrejöhet. Ez egyáltalán nem meglepő. A prebiológiai polimerektől a teljességnek azt a fokát, amit az élőkéi mutatnak, semmiképpen sem várhatjuk el. Az ősi óceánok vizében létrejött aminosavak különösen a vulkanikus területeken száraz állapotig evaporálódhattak és így hőpolimerizáció részesei is lehettek. A kialakult proteinoidok visszamosódva a tengerbe további prebiológiai történésekbe kapcsolódhattak be.

Rabinowitz és Hampai (1985) a kémiai evolúciókutatás szempontjából jelentősnek tartják azt a megfigyelést, miszerint ha valamely aminosav 0,1 M vizes oldatának és 0,1 M trimetafoszfátnak az elegyét imidazol vagy 1,2,4-triazol jelenlétében pH 8,0 és 10,5 közötti értéken, szobahőmérsékleten állni hagyták, úgy már néhány nap alatt megfelelő peptidek keletkeztek. Jobb hozamot értek el, ha a pH-t koncentrált nátrium- vagy kálium-hidroxiddal és nem ammóniával állították be. A glicin néhány esetben már 10–15 nap alatt kvantitatíve peptidekké, többnyire di- és tripeptidekké transzformálódott.

Jelenleg már sok megfigyelés igazolja, hogy szerves vegyületek abiotikus polimerizációját különböző ásványok jelentősen gyorsíthatják. Az elsődleges ásványok, mint pl. az olivinek, amfibolok, piroxének, csillámok, földpátok és kvarc, nagyon különböznek abban a tekintetben, hogy jelenlétükkel mennyiben képesek meggyorsítani pl. a hidrokinon abiotikus polimeriációját (Shindo és Huang, 1985). A legerősebb katalitikus hatás e tekintetben a teforit részéről jelentkezett, mely Mn-t hordozó szilikát. Ezt sorrendben az aktinolit, a hornblende, a fayalit, az augit, a biotit, a muszkovit, ill. az albit, ortoklasz, mikroklin, továbbá a kvarc követte. Ezeknek az ásványoknak, különösen a Mn-hordozó szilikátoknak komoly jelentősége lehetett és lehet ma is a talajokban a bonyolult szerves vegyületek abiotikus szintézisénél.

1.8.8. A nukleinsavak abiotikus szintézisének kérdése

A nukleinsavak egykori szintézisének problémája már sokkal bonyolultabb, mint a fehérjéké. Minden ribózmolekulának négy hidroxilcsoportja van, melyek bármelyike részt vehet a purin- vagy a pirimidinbázisok megkötésében és a foszfáthidakkal kivitelezett polimerizációban. Tegyük fel, hogy találunk olyan hatékony, nem enzimatikus módszert, mely a nukleotidokat (1 bázis + 1 ribóz + 1 foszfát) a mainak megfelelő

korrekt elrendeződésben építi fel. Akkor is még mindig hátra van a nukleotidok megfelelő összekötése nukleinsavpolimerekké. Jóllehet abiotikus úton enyhe hőkezeléssel (kb. 55 °C), polifoszfátok jelenlétében a nukleotidokat polimerizálni lehet, mégis ilyenkor a legkönnyebben létrejövő kapcsolódás az egyik cukormolekula 5′ és a másik 2′ (és nem 3′) hidroxilcsoportja között észlelhető, mely pedig napjaink DNS-ére és RNS-ére nem jellemző. Az 5′,3′ kapcsolódásnak az 5′,2′-ével szemben szignifikáns előnyei lehettek, mivel annak ellenére, hogy kémiailag kevéssé előnyös, mégis a genetikai információtárolás modern megoldásához ez bizonyult a legalkalmasabbnak.

Molekulamodellekkel végzett tanulmányok szerint kettősfonalú DNS hélix-et bázispárokkal 5′,2′ kapcsolódással is elő lehet állítani, az ilyen hélix azonban az 5′,3′-struktúrájúval szemben kevéssé stabilis. Az 5′,2′-hélixben a genetikai információ tárolása nem olyan biztonságos, mint 5′,3′-hélixben. Az 5′,2′-hélix létrejötte megakadályozásának egyik lehetősége a 2′ hidroxilcsoport eltávolítása. A valóságban pontosan ez különbözteti meg a DNS-t az RNS-től. Érdemes megjegyezni, hogy a polinukleotidokat a ferrihidroxid, ez a feltehetően fontos prebiotikus anyag, erősen adszorbeálja. SCHWARTZ és ORGEL (1985) kimutatták, hogy a ferrihidroxidon és más ásványokon végbement adszorpció a guanilsavnak policitidilsavon végbemenő templát irányított oligomerizációját nem befolyásolta. Ezenkívül ezek az ásványok a hosszabb, 3′-5′-kapcsolódású guanilsav-oligomerek nagyon hatékony, régióspecifikus templátirányítású szintézisét sem zavarták.

A két információt őrző polimer közül DICKERSON szerint (1978) a DNS lehet az ősibb és az RNS csupán azt követően jelent meg, miután a 2′ hidroxilcsoporthoz való kapcsolást elkerülni képes enzimek már kifejlődtek. KÜPPERS (1979) viszont úgy gondolja, hogy a molekuláris evolúció korai időszakában az RNS (mely egyben katalitikus aktivitású is) fontosabb lehetett, mint a DNS. A genotípus és a fenotípus anyagi szeparálódása, mely a ma élő sejtek esetén jelentkezik, csupán az után vált lehetővé, hogy a genetikai kód létrejött. A molekuláris evolúció nagyon korai állapotában azonban, amikor transzlációs mechanizmus még egyáltalán nem létezett, a genetikai információ egyúttal magának a genetikai anyagnak a fenotípusos tulajdonságaiként is megnyilvánult. Következésképpen a környezeti szelekció közvetlenül magára a genetikai anyagra hatott és nem a géntermékekre (KÜPPERS, 1979). Az RNS szabad 2′ hidroxilcsoportja következtében magas szinten rendezett harmadlagos struktúrák kiépítésére és így sajátos fenotípusos bélyegek hordozására képes. Természetesen a szelekció során a nukleinsavmolekula elsődleges struktúrájának csak olyan variációi realizálódtak, melyek maguk is mint a környezet által felismerhető fenotípusos differenci-

ák nyilvánultak meg. Itt viszont felmerül a kérdés, hogy vajon valamely nem transzlatálódó, de replikálódó nukleinsavmolekula egyáltalán mennyi megkülönböztethető fenotípusos bélyeget képes környezete felé képviselni?

EIGEN és WINKLER-OSWATITSCH (1981 a és b) a tRNS-t a transzlációs mechanizmus legősibb komponensének tekintik. A tRNS-ek a ma élő sejtek transzlációs mechanizmusában kulcsszerepet töltenek be. Az élet eredetét kutatva az aminosavak kódjaikhoz való adaptálását rendkívül fontos lépésnek lehet tekinteni, mely nélkül az enzimatikus működés sohasem vált volna az evolúció tárgyává. Feltehető tehát a kérdés, hogy vajon a modern tRNS-ek ősi prekurzorai milyen módon épülhettek be a transzláció korai mechanizmusaiba? Az itt említett szerzők szerint a mai tRNS-ek nagyon ősi molekuláris szerkezeteket képviselnek, leszármazottai egy egykori molekulacsaládnak, melynek tagjai már az élet keletkezésének hajnalán a legprimitívebb transzlációs mechanizmusokban is szerepeltek. A filogenetikai evolúció szempontjából nézve – mely sokak szerint mint a megkettőződő géneken át kifejlő szukcesszív (folyamatosan kibontakozó) diverzifikáció jelölhető meg – a ma létező tRNS-család tagjai a legvalószínűbb módon szelektíven neutrális mutációk sorozatából indulhattak ki, amit azután a specifikus tRNS-ek egymással párhuzamos, folyamatos elkülönülése követhetett. Az események történetét tekintve mindez egy olyan időszak létezését tételezi fel, amikor a fejlődő replikációs és transzlációs mechanizmust képviselő genetikai információ a mai sejtekben lévő genomhoz hasonló replikálódó egységbe még nem integrálódott.

A genetikai kód evolúciójára vonatkozóan javasolt modelleket ma két csoportba sorolhatjuk (PORSHKE, 1985):

a) Determinisztikus modellek, melyek az ún. „sztereokémiai hipotézisre" támaszkodnak. Eszerint a kódonok létrejöttének evolúciós útját az aminosavak és mai kódonjaik közötti, legkedvezőbbnek bizonyult és szelekciót eredményezett kölcsönhatások egyengették.

b) Sztochasztikus modellek, melyek feltételezik, hogy az evolúció egy korábbi szakaszában az aminosavak kódolása véletlenszerűen ment végbe (az aminosav és mai kódonja találomra jöttek össze), amit az evolúció későbbi szakaszában rögzülés, stabilizálódás követett.

DOSE (1984) szerint úgy tűnik, hogy a biológiai információ, vagyis a DNS-ben kódolt információk eredete még sokáig megoldatlan marad. Valószínűbbnek tartja, hogy a prebiotikus proteinoidok információja szolgálhatott forrásul az első nukleotid-gének felépítéséhez. Szerinte mind az egyszerű nukleotidok, mind a replikációképes polinukleotidok spontán prebiotikus képződését nagyon valószínűtlennek kell tartanunk.

Érdemes talán még megjegyezni, hogy – amint az kísérletesen is igazol-

ható (KÜPPERS, 1979) – biológiai információt bizonyos mértékig protein is szolgáltathat. Ennek ellenére megállapítható, hogy a természetben nem létezik olyan rendszerré szerveződött folyamat, amelynek során proteinről „reverz transzláció" (fehérje által meghatározott nukleinsavszintézis) menne végbe. Minthogy az ősi szerves kemizmus nukleinsavakat és proteineket egymástól függetlenül hozott létre, az élet eredete kutatásának egyik legkomolyabb problémája nem a nukleinsavak és fehérjék közötti időleges kölcsönhatások tanulmányozása, hanem annak a funkcionális kapcsolódásnak a felderítése, mely az integrált genetikai rendszer kialakulásához vezetett.

1.9. A hidrofóbia jelenségének szerepe az élő anyag szerveződésében

Az abiotikus úton létrejött szerves anyag élő anyaggá szerveződésének folyamatát teoretikusan igen különböző szempontok szerint közelíthetjük meg. Az eltérő szempontok az élővé válás evolúciójának megértésében mindenképpen értékes segítséget nyújthatnak még akkor is, ha a valóságban bonyolult, komplex és kísérletesen talán soha meg nem ismételhető történésekről van is szó.

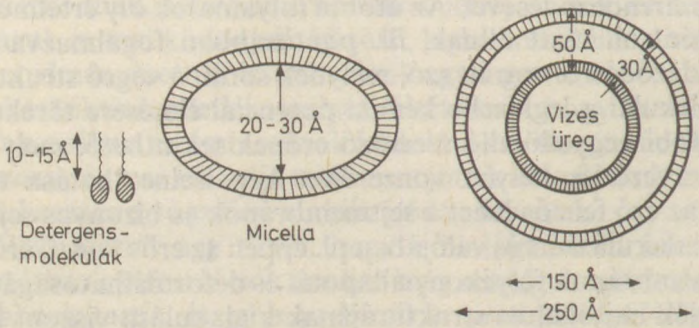
1.9.1. Taszító hatáson alapuló „szervező erő" az önelrendeződésben

TANFORD (1978) az élő anyag szerveződésének kérdését a hidrofóbia jelenségének szemszögéből vizsgálta. Alapgondolata szerint a biológiai organizáció két fő stádiummal jellemezhető: az alkotóelemek szintézisével és azok elrendeződésével. Az utóbbi folyamatok oly értelmű termodinamikai kontroll alatt állnak, ill. pontosabban fogalmazva olyan el- vagy átrendeződésről van itt szó, melynek során a végső struktúra egyes alkotó molekulái a legkisebb kémiai potenciál elérésére törekednek.

A hidrofóbia egyedülálló szervező erőnek tekinthető, mely ahelyett, hogy a szerveződés helyén vonzerőket képviselne, hatása taszításon alapul. Ez az erő felelős lehet a sejtmembránok és bizonyos sejten belüli egységek kialakulásáért és valójában pl. éppen az erős vonzó erők hiánya az, ami a membránok folyékony állapotát és deformálhatóságát biztosítja. A fehérjék hajtogatott struktúrájának kialakulása viszont közvetlen poláros kötéseket is igényel, ami már sokkal merevebb szerkezetek létrejöttéhez vezet. Az intercelluláris organizáció már feltehetően a sejtfelszíni proteinek közötti poláros kötésekre alapul.

1.9.2. A molekulák „kooperációja" a micellaképzés önelrendeződési folyamatában

A hidrofób erők nem merev, hanem ellenkezőleg, rendkívül flexibilis struktúrák kialakulását biztosítják, ami viszont alapvető fontosságú lehetett az élő anyag szerveződésénél, ahol a deformálhatóság eleve szükségszerűnek bizonyulhatott. A hidrofób hatás szervező ereje máris megnyilvánul, mihelyt valamely vizes közegben amfipatikus molekuláknak vagy ionoknak, melyek egyik végükön egy viszonylag hosszú szénhidrogénhez kapcsolódó poláris vagy töltéssel rendelkező csoportot tartalmaznak, elegendően nagy koncentrációja van jelen. Az ilyen molekulák végeinek ellentétes termodinamikai preferenciája egyszerűen már oly módon is kielégülhet, hogy önelrendeződéssel olyan aggregátumokat hoznak létre, melyek belsejében szénhidrogénláncok helyezkednek el, érintkezésüket így a vízzel minimálisra csökkentve, míg hidrofil poláros csoportjaik a felszínen tömörülnek. Az ilyen részecskéket micelláknak nevezzük és típusos esetekben 100–100 molekulát tartalmaznak. A micellaképződés, mely az alkotóelemek rendkívül nagy mértékben kooperatív folyamata, a monomerek koncentrációjától is függ. Egy bizonyos koncentráció alatt micellák nem észlelhetők, felette viszont valamennyi amfipatikus molekula micelláris állapotba rendeződik. A micellák méretét és alakját geometriai és termodinamikai tényezők kombinációja határozza meg (TANFORD, 1974). Az egyik ilyen geometriai faktor a felszín/térfogat arány: ahogy a micella szénhidrogénmagjában nő a beépült alkilláncok száma, úgy csökken a felszíni kiterjedés/láncok száma. Ugyancsak geometriai tényezőként értékelhető a micellamag növekedésének korlátozottsága: átmérője nem lehet nagyobb, mint annak a két



6. ábra

(Bal oldalon): Detergensmolekulák önelrendeződéssel micellát hoznak létre. Ez korongszerű, folyékony és alakját feltehetően állandóan változtatja. (Jobb oldalon): A foszfolipid-vezikulum sematikus vázlata. Az ábrán feltüntetett dimenziók hasonlóak az ultrahangkezeléssel előállított kísérleti tojássárga-lecitin vezikulumok méreteihez

alkilláncnak az együttes hossza, melyek az ellentétes oldalak felől egymással átellenesen érintkeznek. Termodinamikailag a legkedvezőbb állapotot a korong alakú micella-struktúrák képviselhetik. A mesterségesen előállított kicsiny micellák hidrodinamikai tulajdonságaik mérése alkalmával, valóban korong alakúnak bizonyulnak. A micellaképződés termodinamikájával foglalkozva azt is kimutatták, hogy az optimális stabilitást a korong alakon kívül leginkább az olyan felszín biztosítja, melyen 60–65 $Å^2$-enként egy poláros „fejrész" található. Az ilyen parányi, de stabil micellákat olyan amfifil molekulák hozzák létre, melyeknek csupán egyetlen, a micellamagban lehorganyzott szénhidrogénlánca van. A biológiai membránok foszfolipidmolekulái ezzel szemben fejcsoportonként 2–2 szénhidrogénlánccal rendelkeznek. Ez esetben a stabilitáshoz szükséges optimális méretű felület kialakítása azáltal valósulhat meg, hogy ún. zárt vezikulumok jönnek létre *(6. ábra)*. Ezeknek vízzel töltött belső ürege van.

1.9.3. A vezikulumképzés mint az élővé szerveződés fontos állomása

A biológiai organizáció első legfontosabb lépése az ilyen vezikulumok kialakulása lehetett. Ha egyszer már a megfelelő alkotó molekulák, a foszfolipidek létrejöttek, úgy ezekből spontán szerveződhettek a vezikulumok, mégpedig egyszerűen a termodinamikai egyensúly felé irányuló hajtóerő következtében. Igaz, a termodinamika szempontjából paradoxon, hogy a vezikulumok 30 Å vastagságú folyékony szénhidrogénfala az ionok, hidrofil metabolitok stb. áthaladása számára hatékony gátat jelent, és ennek folytán a vezikulum külső és belső tere között megszakad a kapcsolat, vagyis a kiegyensúlyozódás többé már nem mehet végbe. Eszerint a lipidmolekulák, midőn saját termodinamikai egyensúlyuk elérésére törekednek, olyan struktúrákat hoznak létre, melyek a vízoldékony anyagok közötti egyensúly kialakulását kifejezetten megakadályozzák. Amíg a vezikulum fala ép marad, addig a belső tér reakciói ténylegesen eltérőek lesznek a külsőétől.

A belső tér és a külső környezet közötti anyagcsere lebonyolítására az evolúció folyamán a fejlődő membránokban további struktúraelemek, specifikus fehérjék jelentek meg. Utóbbiak elhelyezkedése a membránban ugyancsak termodinamikai szabályozásnak lehetett kitéve és a hidrofób effektus ennek során is döntő szerepet játszhatott.

Ismeretes, hogy megfelelő körülmények között a gyűretlen lineáris polipeptidláncok *in vitro* spontán módon ugyanarra a konfigurációra gyűrődhetnek, mint az élő sejtekben (LEVITT és WARSHEL, 1975). A fehérjék végső struktúrájának kialakítása nagymérvű termodinamikai sza-

bályozás alatt áll. Az ilyen szerkezetképző folyamat először is csupán a polipeptidlánc egy meghatározott részének saját, termodinamikailag stabil állapota eléréséhez vezető gyűrődésével kezdődik. A hidrofób erők még a protein (végleges) struktúrájának kialakításában is fontos szerepet játszanak. Számos vízoldékony protein pl. olyan globuláris alakzatot vesz fel, melynek belsejében hidrofób csoportok vannak. A membránkötődésű proteinek felületükön, ott, ahol a membránba merülnek, hidrofób csoportokat viselnek. Ezek felületén a hidrofil csoportokat a membránon kívüli külső vagy a belső térbe nyúló részeken találhatjuk. E proteineket a biológiai membránokból extrahálva utólag ismét funkcióképes állapotba egyesíthetjük, ami arra utal, hogy maga a modern biológiai membránszerkezet is közvetlen termodinamikai szabályozás hatása alatt épül ki. Ma a biológiai membránok szerkezetét úgy tekinthetjük, mint termodinamikailag nagymértékben kedvező strukturális állapotot. Nem véletlen, hogy az élőkben a határfelületeken éppen ezek a struktúrák találhatók. Deformálhatóságuk és ezekbe a megfelelő elemek könnyű beépíthetősége oly módon, hogy ott valamennyi molekula pozícióját tekintve a legkisebb kémiai potenciált képviselje, alapvető jellemvonásaik közé tartozik. Feltehetően hasonló erők, ha kisebb mértékben is, szerepet játszanak a sejtek alakváltozásainál, az intercelluláris kontaktus kialakításánál és más biológiai szerveződési aspektusokban is. A poláros kötések domináns szerepe ott érvényesül, ahol merev struktúrák kialakítására van szükség, mint pl. a proteinek végső rendezett szerkezetének stabilizálásánál a hidrogénkötések merev hálózata.

1.9.4. Mesterséges liposzómák a biológiai kutatások szolgálatában

A meghatározott méretben (általában 25–600 μm tartományban) és szintetikus, izolált bakteriális stb. lipidekből előállított mesterséges liposzómák ma már a mikrobiológiai, gyógyszerészeti stb. kutatásoknak lényeges elemei. Ipari készítményeik is forgalomba kerülnek. Felhasználhatók pl. az immunreakciók kutatására, mikor is a liposzómákba sejtalkotóelemeket, enzimeket, vírusokat stb. építenek be és ekkor mint antigének szállítói szerepelnek. Hasonlóan genetikai anyagot is szállíthatnak, megkönnyítve annak sejtbe lépését és idegen genomba épülését. Baktériumgéneket a recipiensek tenyészeteibe liposzómaközvetítőkkel juttathatnak.

Előállításuknál meghatározott belső térfogattal, külső felülettel és részecskeátmérővel rendelkező, unilamelláris felépítésű, homogén liposzómakészítmények forgalomba hozatalára törekednek. Speciális igé-

nyek kielégítésére rendkívül kis méretű (néhány μm átmérőjű) liposzómapreparátumokat is előállítanak. A készítmények lipidkoncentrációja általában 2–80 mg/ml-ig terjed (ANONYMOUS, 1984).

1.10. A hiperciklus: a természetes önszerveződés feltételezett útja

Az élet keletkezésének problémáival foglalkozva különös nehézségekkel állunk szemben akkor, ha arra a kérdésre szándékozunk választ adni, miként haladhatott az evolúció útja, az egyesek szerint az információtárolás szolgálatában elsőnek szerepelt ősi RNS-ek vagy hasonló molekulák specifikus proteinek nélküli replikációjától mindaddig, amikor e folyamatban a ma már elengedhetetlen szerepet játszó polimerázok és más proteinek is (melyeket egyébként szintén nukleinsavak kódolnak) megjelentek. A specifikus enzimek nélküli replikáció pontossága nagyon alacsony szintű lehet, és emiatt az így mégis megfelelően replikálódó nukleinsav-molekulák nagysága is igen kicsi. A modern bioszféra körülményei között a pontos replikációhoz nélkülözhetetlenül szükséges anyagcsere-komponensek (enzimek stb.) szintéziséhez szükséges információk különben maguk is tetemes hosszúságú nukleotidszekvenciákat igényelnek. Így SMITH szerint (1979) még akkor is, ha kiindulásul a kodonoknak csak nagyon korlátozott készletével számolunk, a pontos replikáció maga 2000 vagy még ennél is több bázispárból álló és ugyancsak pontosan replikálódó pl. RNS nélkül ma, a múltra vonatkoztatva, aligha képzelhető el. Ezt a problémát kísérelték meg EIGEN és SCHUSTER (1977, 1978) áthidalni a „hiperciklus"-t mint az evolúció egy fejlődési szakaszán átmenetileg érvényre jutott sajátos replikációs mechanizmust javasolva. Valójában e szerzők a sejten belüli funkcionális organizáció egy speciális ősi és mégis magas szinten koordinált típusát vélték feltárni és kísérelték meg annak érvényességét az élet eredetének és evolúciójának viszonylatában igazolni. Szerintük az olyan (egykoron) önreplikálódó makromolekulák, mint amilyenek az RNS és a DNS is, megfelelő környezetben „darwini" módon viselkedtek, amit legjobban a „quasispecies" (kvázi speciesz) fogalommal magyarázhatunk meg. A „quasispecies"-t mestermásolatokkal (*„master copies"*) dominált, nagyon szorosan rokon szekvenciákat hordozó makromolekuláris elemek populációjának adott megoszlásaként definiálhatjuk. Alapvető fontosságú, hogy külső, környezeti kényszerhatásokra közöttük fokozódik a legjobban adaptált megoszlásra (vad típus) irányuló szelekció. A „darwini viselkedés" másik döntő jellemvonása, hogy a kvázi-speciesznek van változó mérvű belső stabilitása, aminek fennmaradása meghatározott

feltételektől függ. Utóbbiakat drasztikusan megsértve a mestermásolatok nukleotidszekvenciájában tárolt információ irreverzíbilisen károsodhat és a hibák esetleg a kvázi-speciesz dezintegrálódásához vezethetnek. Mindezt figyelembe véve az egyes RNS- vagy DNS-molekulák képviselte információmennyiség szelekció révén érvényre jutó evolúciója előtt nagyon korlátozott az út szemben azokkal a fejlődési lehetőségekkel, melyek a replikálódó elemek populációi előtt nyílnak meg.

1.10.1. Nukleinsav-molekulák kölcsönös együttműködése egymás replikációjának elősegítésére?

Az RNS-nek és a DNS-nek különböző organizációs szinteknél végbemenő replikációjára vonatkozó kísérleti adatok analízise EIGEN és SCHUSTER szerint (1977–78) arra enged következtetni, hogy a mai transzlációs mechanizmus megvalósításához szükséges információ már a különböző replikatív elemek rendszert kialakító funkcionális integrációja útján is létrejöhetett. Az elemek egyfajta stabil együttműködési integrációja magát az egész rendszert is az organizáció magasabb szintjére emelheti, miáltal annak információs kapacitása is jelentősen kiszélesedik, és információtartalma gazdagodik. Ahhoz, hogy információtároló egységek (nukleinsav-molekulák) ilyen perspektivikus együttműködése megvalósuljon és együttesen integrált replikációs ciklust alakíthassanak ki, bizonyos feltételeknek kell érvényesülniök. Ezek: *a)* Az egymástól különböző nukleotidszekvenciák mint gének példányai együttesen a környezettől (pl. membránnal) elhatárolt diszkrét rendszerbe (sejtbe, koacervátumba stb.) kerüljenek; *b)* Ez a rendszer, ill. „leszármazottai" folyamatosan őrizzék meg mindazokat a géneket, melyek működését biztosítják; *c)* A gének, ill. ezek együttesének információtartalma ne csökkenjen, ne károsodjon, a „génazonos" nukleotidszekvenciák különböző mértékben hibás kópiái között pozitív szelekció érvényesüljön; *d)* A gének között valamennyit magába foglaló és replikációjukat is biztosító együttműködési integráció (ciklus, hiperciklus) alakuljon ki; *e)* Az így létrejött magas szinten organizált rendszer (koacervátum, sejt) mint individuum a térért, anyagokért és energiáért éles harcban álljon más hasonló individuumokkal, melyek természetesen csak saját integrált működésüket törekednek biztosítani.

Az ilyen integrált működésű, individuális szintű, anyagcseréjükben hiperciklust megvalósító rendszerek fejlődése vezethezett el többek között a mai modern replikációs mechanizmus kialakulásához is. EIGEN és SCHUSTER (1977, 1978) a genetikai kód és a transzlációs mechanizmus eredetét értelmező hiperciklusmodelljüket röviden így jellemzik:

1. A feltételezett hiperciklusnak elégségesen egyszerű a működési rendszere ahhoz, hogy a genetikai kód kialakulását prebiotikus körülmények között véges valószínűséggel lehetővé tegye.

2. A genetikai kód létrejöttét folyamatos kibontakozással magyarázza, mégpedig szorosan rokon, tRNS-szerű prekurzorokból kiindulva, melyek eredetileg egy stabil RNS-kvázi-speciesz nagyobb gyakorisági szintre bővült tagjai lehettek.

3. A hiperciklus ősi funkcionális organizációja és ennek egyes működési elemei a prokariota sejt, továbbá bizonyos bakteriális vírusok genetikai kódjában és transzlációs apparátusában még ma is felismerhetők.

A hiperciklus elméletét többek között SMITH (1979) bírálta, aki szerint EIGEN és SCHUSTER (1977, 1978) munkái több problémát vetnek fel, mint amennyit megoldanak. Érdemük, hogy a nukleinsavak replikációs mechanizmusa kialakulásának evolúciós hátterét csodálatos logikával igyekeztek feltárni és hogy a hiperciklussal egy olyan utat, módot javasoltak, amelyen az anyagcsere magas szintű koordinációja révén viszonylag komplex nukleotidszekvenciák egyre tökéletesebb replikációja valósulhat meg.

1.10.2. Miként valósulhatott meg egykoron a hiperciklus?

Közelítsük most a hiperciklus problémakörét kevésbé elvonatkoztatva. Hogyan is működhetett ez a valóságban EIGEN és SCHUSTER elképzelése szerint? Az ősi protobionták léte feltehetően különböző funkciójú molekulák kooperációjával jött létre. Ezek között a molekulák között nukleinsavak is voltak, melyek vagy az egykori enzimek génjeiként szerepeltek, vagy talán az enzimmentes protobiontában a reakciókat maguk katalizálták, és feltehetően mind nukleotidszekvenciájukat, mind méretüket tekintve nagyon különbözőek lehettek. Az utóbbi eltérések következményeként replikációjuk sebessége is jelentősen különbözhetett, ami a protosejten belül a gyorsan és lassan replikálódó gének közötti ún. genobiotikus versengéshez vezethetett. E verseny a sejtosztódások alkalmával a lassúak számát feltétlenül csökkenthette. Így elképzelhetően a fontos, de „lassú gének" elvesztése folytán az életképtelen utódsejtek száma egyre több és több lett, ami viszont a protocelluláris törzs pusztulását idézte volna elő. A szerzők e végzetes folyamat feltételezése helyett az össejten belül végbement génreplikációknak a reakciók hiperciklusos kapcsolódásával megvalósult szinkronizációját tartják valószínűbbnek. Ez akkor és úgy történhet meg, hogyha az egyes gének olyan proteineket determinálnak, melyeknek nem csupán egy, hanem két katalitikus aktivitása is van. Az ilyen proteinek, ill. géntermékek egyik funkciója kiter-

jed a sejt egy bizonyos másik géntípusának replikációjára. Így valamely, mondjuk az első gén révén kódolt protein, specifikusan egy második gént replikál, melynek terméke a harmadik gént replikálja stb., míg végül az utolsó gén terméke az első gén replikációját valósítja meg. Ily módon bontakozik ki a ciklus valamennyi génje replikációjának szinkronizációja (hiperciklus). Ahhoz, hogy a hiperciklusos rendszerek a darwini mechanizmus szerint elképzelteknek megfelelően fejlődhessenek, fel kell még tételeznünk, hogy a szinkronizáció protosejtekbe elkülönülten mehetett végbe, ami egymással versenyezni képes egyedek létrejöttéhez vezetett. Amennyiben ez az individuális szintű elkülönülés nem valósult volna meg, úgy a gének evolúciós tökéletesedése sem következett volna be, minthogy a gének és molekulák egyetlen, határok nélküli diszperz rendszerében a mutált gének, melyek termékei nagyobb katalitikus vagy pl. korrektebb replikációt kivitelező aktivitással rendelkeznek, nem részesülnek a nem mutáltakkal szemben előnyben, következésképpen az előnyösen mutált géntípusok dúsulása a nem vagy nem úgy mutáltakéhoz képest nem következne be. Jóllehet a hiperciklusos rend az első pillanatban úgy tűnik, a sejtrendszer határtalan stabilitását eredményezheti, mégis a hiperciklus értelmezésénél nem kis nehézségek is jelentkeznek, minthogy a valóságban a hiperciklusos protobionták sokkal kisebb valószínűséggel jöhettek létre, mint az egyszerűek. Gondoljuk csak meg, olyan génekre volt szükség, melyek egyszerre két funkciót is kódoltak és ráadásul az egyiknek meglehetősen specifikusnak kellett lennie! Ezzel szemben az egyszerű, az „aciklusos" protobionták génjei csupán egyetlen funkciót hordozó fehérjére kódolhattak és a gének közül mindössze egyetlen kódolt replikázt, mely azután nem specifikusan valamennyi génre hathatott.

1.10.3. Aciklusos és hiperciklusos protobionták. Melyikben valósulhat meg előbb a replikációs szinkron?

Kaplan (1981) okoskodásában abból a tényből indult ki, hogy az élet leglényegesebb vonásai, az önreprodukció, a mutáció és az individualizáció, minden esetben replikálódó nukleinsav-molekulák működéséhez kapcsolódnak. A „génes" élet evolúciója (genobiózis) egyedi szintű anyagcsere-rendszerek elkülönülése nélkül csak nagyon korlátozott lehet. Az evolúció azonban határtalanná válhat, amennyiben a nukleinsavak proteinmolekulákkal együtt, körülhatárolt sejtbe zárulnak és mindkét polimer szintézise egymással kölcsönösen kapcsolódik („Vollleben"; „Holobiozis"). Szerinte fel kell tételeznünk, hogy az ősi holobiotikus anyagcsere-rendszer prototípusa, vagyis egy protobionta, nuklein-

savak és proteinek kicsiny aggregátuma lehetett, mely olyan működő molekulák sorozatát tartalmazta, melyek között minden egyes előforduló enzimtípusnak és a szintéziséhez szükséges génnek legalább egyetlen molekulája jelen volt. Amennyiben az abiogén polimerek véletlenszerű aggregációjából származó protobionták létrejötte nem különleges és ritka történés volt, hanem a primitív Föld körülményei között rendszeresen előfordult, akkor az ilyenekben a funkciót viselő molekulák készlete csekély lehetett. A protobionták létrejötte statisztikai valószínűségének durva becslése is arra utal, hogy egyszerűbb típusok korábban és nagyobb számban jelenhettek meg. Amennyiben viszont feltételezzük, hogy a protosejt különböző génjeinek aszinkron replikációjából eredő instabilitás hátrányos következményeit valamiféle hiperciklusos organizáció győzhette le, úgy nem vitatható, hogy az ilyen hiperciklusos sejtek megjelenése rendkívül ritka esemény lehetett, minthogy a kettős funkciójú enzimekre kódolt, abiogén eredetű gének is nagyon ritkák lehettek.

Sokkal valószínűbb, hogy az összehasonlíthatatlanul nagyobb gyakoriságú aciklusos protobionták mutációk és szelekciós folyamatok érvényesülése útján már korai evolúciójuk során olyan egyszerű, de hatékony szinkron replikációt fejlesztettek ki, amely a legtöbb lassan replikálódó gén duplikációját is meggyorsította pl. azáltal, hogy redukálta azok szekvenciáinak hosszát. Durva becslések arra utalnak, hogy mintegy $10^4 - 10^2$ nagyságrendű protocelluláris generáció már elegendően nagy klónt alakíthat ki ahhoz, hogy abban egy gyorsulást kiváltó mutáció nagy valószínűséggel jelentkezzen. Az az idő, mely az ilyen típusú szinkronizáció evolúciójához szükséges lehet, semmiképpen sem hosszú ahhoz az időtartamhoz viszonyítva, mely a prekambriumban a szén-dioxidot asszimiláló sejtek kialakulásáig rendelkezésre állott.

KAPLAN (1981) végső következtetése az, hogy nagyon is lehetségesnek látszik, miszerint az aciklusos protobionták azért, mivel sokkal gyakoribbak lehettek, mint a hiperciklusosak, a szükséges replikációs szinkront a lassan replikálódó génekben végbement gyorsító mutációk révén viszonylag „rövid" földtörténeti időszak alatt maguk is elérhették. Az aciklusosak, egybevetve a hiperciklusosakkal, létrejöttükhöz az abiogén polimerek sokkal kisebb kritikus mennyiségeit igényelhették. Ennek folytán a kémiai evolúció útján már sokkal korábban meg is jelenhettek.

1.10.4. A prokariota genom evolúciójának egyéb feltételezett kezdeti lépései

HOROWITZ (cit. HOROWITZ, 1965) feltételezte, hogy az anyagcsere-rendszerek „hátrafelé" fejlődhettek (lásd 408. old.). A fotoszintézis pl. akkor jöhetett létre, amikor a szervezetek számára az abiotikus úton létrejött

hexózok külső forrásból többé már nem, vagy csak alig álltak rendelkezésre és emiatt nem fermentálhattak. A glikolízis, ill. a fermentáció anyagcsereútjai, mint az ATP-ellátás alternatív útjai viszont csak az után jelentek meg, miután már a külső nukleotid- és polifoszfát-energiaforrások teljesen kimerültek. Ezért a glükóz fotoszintézise (1), az ATP-előállítás glikolízissel (2), és végül magának az ATP-nek mint energiaforrásnak a hasznosítása (3) a hátulról előrefelé haladó evolúció eredményei lehettek. Még korábban, midőn az ősi miliőben az aktivált monomerek és a kondenzáló reagensek még kielégítő mennyiségben voltak jelen, az ezeket előállító enzimek szükségessége sem jelentkezett. Az enzimek azonban nem csupán katalizátorok, hanem irányító és összekötő funkciójuk is van, melyek lehetővé teszik, hogy az egyik reakció alkalmával felszabaduló kémiai szabadenergia ugyanakkor egy másik reakció végbemenetelét is biztosíthassa és ne vesszen el felhasználhatatlan hő alakjában. Amint a folyamatos szabadenergia-ellátás és a reakciók kanalizálásának szükségessége is felmerült, az enzimek és az általuk irányított komplex anyagcsereutak szelekciója is megindult. Az első protoenzimek spontán létrejött polimerláncok lehettek. Polimerizációk autokatalízissel is végbemennek: egy bizonyos polimer jelenléte elősegítheti több ugyanilyen polimer létrejöttét. A DNS-hélix kettős fonala kiváló példa az autokatalizációs polimerizációra és az élő szervezetekben már emiatt is a legtermészetesebb jelölt lehetett a központi szerep betöltésére. Mihelyt egy reakció szigorú autokatalitikussága megszűnik, vagyis ha a reakció katalizátora többé már nem azonos a reakciótermékkel, úgy a megfelelő katalizátor, annak utánpótlása és e katalizátorral az utód protobionták ellátása iránti igény szükségszerűen felmerül.

Az első stabilizálódott protobionták aktivált monomerek környezeti jelenlététől és inkább összekötő reagensektől, mintsem polimerizáló enzimektől függő, nukleinsavakból álló autokatalitikus koacervátumok lehettek. Az ezek felépítésében részt vevő nukleinsavak egyúttal templátként is szolgálhattak akármilyen véletlenszerű szekvenciájú proteinláncok polimerizációjához, melyek viszont pl. a koacervátum védő kültakaróját erősíthették. Ily módon már kezdettől fogva a nukleinsav és a protein között szoros kooperatív kölcsönhatás érvényesülhetett, melynek keretében a nukleinsav az autokatalitikus és templát szerepet, a protein pedig a strukturális és a védő szerepet játszotta. Ha a polipeptidlánc mentén a negatív és pozitív töltések meghatározott sajátos megoszlása akár a nukleinsavak, akár a polipeptidek polimerizációjára kedvezően hatott, úgy ezzel máris megtörtént az első lépés a protein típusú katalizátorok, ill. enzimek szelekciós bázisának megteremtéséhez. Maga a szelekciós nyomás ezután olyan nukleinsav-szekvenciákat válogathatott ki, melyek elősegítették az ugyanolyan és egyúttal enzimatikusan előnyös sablon

szerint felépített, a pozitív és negatív töltésű aminosav-oldalláncokat hatékony sorrendben tartalmazó polipeptidek folyamatos előállítását. Ily módon a nukleinsavnál a templát szerinti replikáció, míg a polipeptidnél az enzimatikus katalízis tandem fejlődhettek, és a valóságban sohasem lehetett sem „DNS nélküli élet" sem „csupasz gének" korszaka (DICKERSON, 1978).

1.11. A sejtes élet eredete

Az élő szervezeteknek, melyek más élőlényekkel benépesített környezetekben élnek, egzisztenciális szuverenitásuk és anyagcsere-individualitásuk megőrzését a környezetüktől őket elválasztó testfelszíni határfelületek biztosítják. Környezetüktől elkülönülő, sejtméretű, individualizált élettelen mikrostruktúrák, koacervátumok kialakulását és működését már sokan megfigyelték és tanulmányozták. Úgy tűnik, hogy a makromolekulák felépülésében a rendezett struktúrákká szerveződés tendenciája már eleve benne rejlik (BEZRUKOV, 1979). OPARIN (1936, 1953) a koacervátumokat természetes biopolimerekből hozta létre, míg FOX (1969) termolitikus úton szintetizált aminosav-polikondenzátumokból. BAHADUR a sajátos mikrostruktúrákat, az ún. *„jeewanu"*-kat állította elő (1966). Ezek sejt nagyságú, 1–3 μm átmérőjű ásványi–szerves komplexek, melyek nagy mennyiségben keletkeznek, ha formaldehid, továbbá ammónium-molibdát, ammónium-foszfát és más ásványok oldatait a látható fény intenzív hatásának teszik ki. Sejtes struktúrákat kerogénekben is találtak és ilyenek létrejönnek a MILLER–UREY-féle elektromos szikrakisülések alkalmával (FOLSOME és BRITTAIN, 1981), természetes makromolekulák ultrahangkezelésénél (CALVIN, 1975) és vizes ammónium-rodamid oldatok UV-sugárzásánál is (SMITH és munkatársai 1969). HEINZ és RIED (1980) három aminosav hőkezelésnek alávetett keverékből celluláris struktúrákhoz jutottak. Ezek intenzíven fluoreszkáltak és ezért *„lumiszférák"*-nak nevezték őket. Néhány fluoreszkáló kromofort is sikerült belőlük elkülöníteni. Ezeket azután a pteridinek és a flavinok (izoalloxazinok) képviselőiként lehetett identifikálni. A lumiszférák sarjadzással szaporodnak, olyan anyagokat tartalmaznak, melyek autokatalitikus és fotoszintetikus képességgel rendelkeznek. Sejtmembránstabilizációra képesek. Minthogy a lumiszférák kialakulásához csupán három kémiai komponens szükséges, ezért feltételezhető, hogy ilyenek az ősi prekambriális környezetben könnyen létrejöhettek.

1.11.1. Proteinoid mikroszférák (fehérjeszerű parányteste k)

Különösen figyelemre méltóak Fox (1973) kísérletei, aki a sejtek eredetének kérdésével éveken át foglalkozott. Fázishatárral (membránnal) elkülönült proteinoid mikroszférákat kapott, ha aminosavakat szárítással, hővel vagy polifoszfátok nagy koncentrációjában kopolimerizált. Ha az első lépésben így létrejött proteinoidokat vízzel lehűtik, úgy sajátos morfológiájú mikroszférák jönnek létre. Rajtuk még sarjadzás is megfigyelhető. A termálproteinoidok előállításához száraz aminosavak nagy koncentrációja szükséges, melyek között a dikarboxil-aminosavak jelentős aránya elengedhetetlen követelmény. A készítményeket általában hevíteni, majd vízzel hűteni kell. Valamikor ilyen folyamatok mehettek végbe pl. kis árapály tavakban vagy lávafolyások közelében. Kérdéses azonban, hogy abban az időben az aminosavak nagy koncentrációkban előfordultak-e? Még akkor is, ha az óceánvíz evaporációja a híg „levest" erősen koncentrálhatta, az oldott sók bepárlása feltétlenül korlátozhatta a hatékony polimerizációt. Ezenkívül a pirokondenzált polipeptidek csupán β-peptidkötéseket tartalmaznak, míg a mai proteinekre az α-peptid kapcsolódások a jellemzőek.

1.11.2. Mesterséges protosejtek

Még 1975-ben megfigyelték (Park és munkatársai, 1975; Folsome és munkatársai, 1975), hogy a szikrakisüléses kísérletek során, amikor a kisülés CO-, CH_4- és N_2-gázokon át a víz felszínére történik, a víz maga nagyon gyorsan zavarossá válik. A mikroszkópos vizsgálatok (Folsome, 1976) számos szerves mikrostruktúra jelenlétéről tanúskodtak. Morfológiájuk komplexnek tűnt, és ilyen alapon klasszifikációjukra is vállalkozhattak. A nagy szférikus formák mérete 20–40 μm között, míg az átmeneti megnyúlt alakoké 10–15 μm között ingadozott. 5×10^5/ml, ill. 3×10^6/ml koncentrációban fordultak elő. A baktériumszerű gömbök és pálcikák száma igen nagy volt (8×10^7/ml), míg méretük 1–2 μm körül ingadozott. Voltak csöves alakok is 4–8 μm × 70 μm hosszúak (5×10^5/ml mennyiségben) és megfigyelték mindezeknek masszív, komplex aggregátumait is. ^{14}CO-dal dolgozva észlelhették, hogy az összes bevitt szén legnagyobb része (néha több mint 60%) ezekbe a leülepedő struktúrákba épült be. Ha a mosott mikrostruktúrák híg szuszpenzióit formvarral borított rostélyra cseppentették, szárították és festetlenül transzmissziós elektronmikroszkópban vizsgálták, úgy alacsony elektrondenzitásúaknak tűntek és valamiféle membránszerű anyagfátyolra emlékeztető hálózat alakjában jelentek meg, melybe beépülve 280 Å átmérőjű részecské-

ket figyeltek meg. Ezek a mikrostruktúrák vizes szuszpenziójukból centrifugálással elkülöníthetők, miközben a kicsik megtartják alakjukat, a nagyobb komplexek viszont fragmentálódnak. A szferoidális alakok dehidratáció következtében összeesnek, de rehidratálva visszanyerik alakjukat. Ez arra utal, hogy stabilak és feltehetően membránszerűen határoltak. Infravörös adszorpciós spektrumuk 2,9 μm-nél, 3,4 μm-nél és 5,8–6,3 μm-nél maximumot mutat, továbbá 8,5–10,1 μm-nél egy széles sávjuk is jelentkezik. Emiatt úgy tűnik, hogy extenzíven keresztbekapcsolt polipeptidszerű struktúrájuk lehet, amit megerősít az a tény, hogy róluk 6 N sósavban, vagy 2 N nátrium-hidroxidban végrehajtott ismételt hidrolízis után is csak mérsékelt mennyiségű aminosav válik szabaddá. E protosejtekből szénhidrogének, zsírsavak és UV-kromofórok ugyancsak felszabadíthatók. E mikrostruktúrák produkciója hasonlóan a mikrobiális növekedési görbéhez elsőrendű kinetikát követ. Ha az energiabevitelt (szikrakisülést) leállítják, úgy a mikrostruktúra képződése is leáll, de ismételten megindult, mégpedig ugyancsak elsőrendű rátával, ha a kisülés megismétlődik. Így tehát a mikrostruktúrák szintézise energiadependens autokatalitikus folyamat. A mosott és tízszeresen koncentrált mikrostruktúrákat ATP-áz aktivitásra (ortofoszfát-felszabadítás) és H_2O_2-lebontási aktivitásra tesztelték. A kísérletek során inaktívnak bizonyultak (FOLSOME, 1976). FOLSOME szerint e mikrostruktúrák tulajdonságai hasonlóak lehetnek a nagyon ősi protobiontákéhoz. Általában nagy mennyiségben és nagyon különböző morfológiával állíthatók elő.

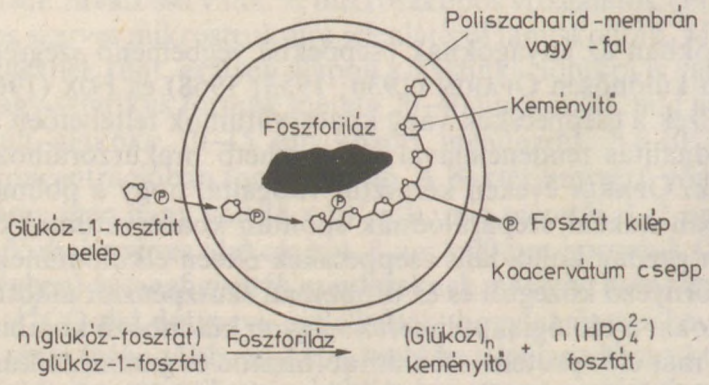
1.11.3. Koacervátum (cseppecske)-típusok

Az oldatokban az anyagoknak cseppekbe végbemenő szegregációjával korábban különösen OPARIN (1936; 1953; 1968) és FOX (1969) foglalkoztak. Ezek a cseppecskék vagy koacervátumok feltehetően az életnek az individualitás tendenciájával jellemezhető prekurzoraihoz lehetnek hasonlóak. OPARIN éveken keresztül vizsgálta, hogy a polimerek vizes oldataikban miként szeparálódnak spontán koacervátumokká: a polimerekben gazdag kolloidális cseppecskék élesen elkülönülnek a vízben gazdag környező közegtől és ez utóbbiban szuszpenziót alkotnak. Koacervátumokat a biológiai polimerek nagyon különböző kombinációiban állítottak már elő: protein–szénhidrát (hiszton és gumiarabikum), protein–protein (hiszton és albumin) és protein–nukleinsav (hiszton vagy klupein DNS-sel, ill. RNS-sel). Az ilyen koacervátumok természetesen az élő sejtek „őseinek" semmiképpen sem tekinthetők már csak azért sem, mivel ezeket egyáltalán nem primitív polimerek alkotják. Inkább a komplex kémiai működés, ill. „viselkedés" egyfajta analógjai, melyek

a különböző környezeti tényezők együttes hatására jönnek létre. A koacervátumok átmérője általában 1–500 μm között ingadozhat. Sok közülük a környező közegtől a polimercsepp külső oldalán létrejött és felületi anyagsűrűsödésre visszavezethető bizonyos fajta membránnal határolódik el. Egyes koacervátum-rendszerek stabilitása rendkívül csekély: perceken belül leülepednek a szuszpendáló folyadék aljára és ott attól elkülönülő egyetlen réteggé folynak össze. OPARIN és munkatársai órákig vagy akár hetekig is stabil koacervátumszuszpenziók előállítására törekedtek. Érdekes módon azt tapasztalták, hogy e cseppecskék stabilizálásának egyik hatékony módja, ha azokat valamilyen primitív anyagcsere-képességgel ruházzák fel.

1.11.4. Anyagcsere-képességgel felruházott koacervátumok

A koacervátumszuszpenzióknak mint minden kétfázisú rendszernek fontos tulajdonsága, hogy bennük a különböző oldékonyságú anyagok vagy teljesen vagy főleg a két fázis egyikében, ill. a másikában koncentrálódnak. Ha például foszforiláz enzimet hiszton- és gumiarabikum-tartalmú oldathoz adtak, úgy az enzim a különülő koacervátumok belsejében koncentrálódott. Ezután a szuszpendáló közegbe, a vízbe, glükóz-1-foszfátot juttatva, ez a koacervátumokba hatolt és ott az enzim hatására keményítővé polimerizálódott *(7. ábra)*. Minthogy a gumiarabikum maga is cukorpolimer, az előállított keményítő fokozatosan növelte a koacervátum méretét. A polimerizációhoz szükséges energia a glükóz-1-



7. ábra

Ha a fehérjéből és poliszacharidból felépült koacervátumba foszforiláz enzimet építenek be, és kívülről, a közegből glükóz-1-foszfáttal „etetik", úgy a belsejében végbemenő polimerizáció következtében „kültakarója" megvastagodik és térfogata megnő. A glükóz-1-foszfát a környező médiumból a cseppecskébe diffundál. Ott viszont a polimerizált keményítő fogva marad, a „falhoz" vándorol, felhalmozódik és növeli a koacervátum méretét (DICKERSON, 1978)

foszfát molekulák foszfátkötéseiből származott *(lásd 7. ábra)*. A szabaddá vált anorganikus foszfát mint salakanyag diffúzióval a környező oldatba távozott. Midőn a koacervátumcseppek túl nagyok lettek, spontán estek szét leánycseppekre. Azok, amelyekbe foszforiláz enzim is jutott, növekedésüket tovább folytatták ugyan, azonban már igen alacsony szinten, minthogy az eredeti enzimkészlet a leánycseppekben felhígult. Ha ezek a koacervátumok valamilyen módon (de hogyan?) foszforilázmolekulákat tudnának előállítani, úgy a magukat egylépéses energiacserével fenntartó protoorganizmusok példái lehetnének. Ezek „táplálékul" pusztán glükóz-1-foszfátra szorítkozva már túlélésre, növekedésre és szaporodásra is képesek lennének. Amennyiben a preparátumhoz foszforilázt és amilázt is adnak, úgy a koacervátumokban mindkét enzim akkumulálódik és ennek folytán kétlépéses reakciót is megvalósíthatnak. Először a bediffundáló glükóz-1-foszfát foszforiláz hatására keményítővé polimerizál. Ezt az amiláz azután maltózra hasítja. A maltóz végül az anorganikus foszfáttal együtt kidiffundál a koacervátumot környező oldatba. Így végső soron a glükóz-foszfát kötésenergiájával a koacervátumokban a glükóz-1-foszfátmolekulák maltózzá dimerizálódnak. Ezenkívül még más, növekedésre képes rendszereket is előállítottak. Készítettek pl. koacervátumot hisztonból és RNS-ből is. E cseppecskékbe RNS-polimeráz enzimet juttattak, majd „táplálékként" a környező közeghez ADP-t adtak. Az ADP behatol a cseppecskékbe, ahol az RNS-polimeráz poliadenilsavvá polimerizálja. A polimerizációhoz szükséges energiát maga az ADP tartalmazza. Az újonnan szintetizált poliadenilsav a koacervátum totál RNS-ét gyarapítja. Így a cseppecske növekedik, majd leánycseppecskékre hasad. Az ilyen rendszerek lejárnak, mint a felhúzott óra, minthogy bennük az ADP polimerizálásához szükséges enzimmolekulák a koacervátumok tömegének gyarapodásával egyre gyérülnek. Fentebb láthattuk, hogy a nukleinsavak nem enzimatikus úton kis, energiagazdag kapcsolóágens-molekulák (pl. cianogén) segítségével is polimerizálódhatnak. Következésképpen olyan proteinből, RNS-ből és megfelelő kapcsoló reagensből felépített és ADP-vel „etetett" koacervátumokat is elő lehetne állítani, melyek feltehetően mindaddig, amíg „táplálékutánpótlásuk" folyamatosan biztosított, növekednének és szaporodnának is.

Elektrontranszportot utánzó koacervátumot is előállítottak már. Ebbe bakteriális NADH-dehidrogenáz került beépítésre. A közeghez NADH-t és metilvörös festéket adtak, melyek a koacervátumokba diffundáltak. Az enzim a NADH-t oxidálta és egyidejűleg a festéket redukálta. Az utóbbi és az oxidált NAD^+ ezután a cseppecskékből kidiffundált. Más pigmentredukáló rendszereket is előállítottak. Az egyik ilyen rendszerben pl. a fotoszintézist szimulálták. A cseppekbe klorofillt épí-

tettek be; a környező közeghez metilvöröst és aszkorbinsavat adtak. Az aszkorbinsav maga a metilvörös redukciójához nem eléggé hatásos redukáló ágens. Amikor az ilyen cseppeket látható fénnyel megvilágítják, akkor a klorofillról jövő gerjesztett elektronok a metilvörösre kerülnek és azt redukálják. A klorofill viszont elvesztett elektronjait az aszkorbinsavról jövő elektronokkal pótolja. Ily módon az aszkorbinsav, a fotonok energiájának közreműködésével a metilénkéket közvetve redukálja egy, a zöld növények fotoszintézisével analóg folyamat keretében, ahol viszont a fotonok energiájának közreműködésével a $NADP^+$-t NADPH-vá, ugyancsak közvetve, vízmolekulák redukálják.

A már említett termálproteinoidok figyelemre méltó tulajdonságokkal rendelkeznek: ha ezeket koncentrált vizes oldataikban 130–180 °C-ra melegítik, úgy spontán 1–2 μm átmérőjű mikrogömbökké aggregálódnak. Jóllehet ezekben lipidek nincsenek jelen, mégis sok ilyen *„microsphere"* maga körül olyan külső határréteget hoz létre, mely a sejthártyák lipid-kettősrétegéhez hasonló. Megfelelő körülmények között a mikroszférák az oldatban maradt proteinoidok bekebelezésével nemcsak növekednek, hanem mint a baktériumok sarjadzanak, lefűződnek és szaporodnak is.

1.11.5. Koacervátumok spontán katalitikus aktivitása

Amíg Oparin a koacervátumokba beépített katalizátorokkal mesterséges anyagcsere-rendszereket hozott létre, addig Fox (1969, 1976, 1977) magukban a mikroszférákban rejlő katalitikus aktivitás után kutatott. Így pl. azt találta, hogy a mikroszférát szimuláló készítmények glükózlebontást katalizálhatnak, és hogy észteráz-, továbbá peroxidáz-aktivitásuk is van. Valójában meglepő is lenne, ha egy, az oldalláncain pozitív és negatív töltéseket viselő polipeptidláncnak nem lenne bizonyos fajta generalizált, sav–bázis katalitikus aktivitása. Elképzelhető, hogy az ilyen, a monomerekből véletlenszerűen felépített polimerekből az elektronadó és -vevő oldalláncok fokozatosan javuló pozicionálásával, térbeli átrendeződésével, olyan specifikus enzimek, ill. ezek aktív helyei fejlődhettek, melyek a már célszerűbben orientált felületi, elektromos töltésmintázatukkal bizonyos reakciókat másokkal szemben kifejezetten előnyben részesítettek.

1.11.6. A legprimitívebb energiaszerző rendszer

KOCH (1985.*b*.) elgondolása szerint az első, darwini evolúcióra képes lény abiotikus úton, foszfolipid molekulákból létrejött liposzóma-vezikulum lehetett, mely egy kevés genetikai anyagot és néhány lipidben oldódó abiotikus eredetű szerves molekulát hordozott, melyek segítségével nagy energiájú foszfátkötések szintéziséhez membránon át történő protonkoncentrációs gradienst állított elő. A genetikai anyag a primitív sejt növekedéséhez és osztódásához szükséges foszfolipidszerű anyagok, továbbá az energia transzdukcióját biztosító karrierek szintézisét segítette elő. A legprimitívebb energiaforrás alapját az a folyamat képezhette, melynek során a protosejt külső felszínén a hidrogénmolekula két elektronja a membránon át a szennyeződésként jelen lévő fémek segítségével szerves anyagok sejtbelső süllyesztőjébe került, miközben a kívül rekedt protonok túlsúlya a membrán két oldalán protonkoncentrációs gradienst alakított ki, ami egyrészt az aktív foszfát transzportjához, másrészt nagy energiájú foszfátkötések szintéziséhez volt felhasználható. Ez a modell feltételezi, hogy a zárt membránrendszerrel társuló protontranszlokáció megelőzhette a fotokémiai és az elektrontranszport-rendszereket, és hogy a fejlődés során az anyagcsere számára gyorsan szállítható kémiai energia (ATP) iránti igény már sokkal hamarabb felléphetett, mintem azt korábban feltételeztük. KOCH szerint a legprimitívebb energiaelőállítás mechanizmusa hátterében valamely oxidánsnak és egy reduktánsnak a katalizátor sejtbelső elhelyezkedésének következményeként létrejött sejtmembránon át való aszimmetrikus megoszlása állhatott. Ezen ősi protosejtek osztódási mechanizmusa olyan spontán folyamatok keretében fejlődhetett ki, melyek elválaszthatatlanok voltak a belső foszfolipidek evolúciójától. Néhány ma élő anaerob baktériumban a membrán külső oldalán elhelyezkedő hidrogenáz a sejt belsejében keletkezett és onnan kidiffundált hidrogént 2 hidrogénionra és két elektronra bontja. Az elektronok ezt követően a sejt belső elektronsüllyesztőjébe akadálytalanul jutnak vissza. A protonok viszont a sejtbe csak az ATP-áz közvetítésével juthatnak, ami nagy energiájú foszfátkötések szintézisét teszi lehetővé.

1.11.7. Kémiai szelekció – biológiai szelekció

A fentebb bemutatott kísérletek és rendszerek bepillantást nyújtanak az élőszerű viselkedés fizikokémiájába és ugyanakkor megismertetik velünk a „túlélést" biztosító kémiai szelekció fogalmát is. A természetes szelekciónak és az evolúciónak ez lehetett a legfőbb, sőt egyetlen mozgatórugó-

ja abban az időben, amikor még az információraktározó molekulák és a genetikai szelekció nem létezett.
A polimerek oldatai már eleve hajlamosak arra, hogy koacervátumszuszpenziókra differenciálódjanak és az ilyen koacervátum-mikrorendszerek nagyon különbözőek, nem egyformán stabilak. Túlélésük valószínűségét fokozza, ha egyszerű reakciók kivitelezésével ellenállóképességüket növelhetik és individuális integritásukat folyamatosan biztosíthatják.

1.11.8. Protosejtek fotoszintézise

Jelenleg szintetikus, sejtméretű mikrostruktúrákkal kiterjedt kutatómunka folyik. Az ún. *„protocell"*-t mint szerves, sejtméretű, membránnal határolt struktúrát definiálják, mely abiológiai eredetű szerves prekurzorokból keletkezik. Feltételezik, hogy az első élő sejtek valószínű ősei is organikus összetételű, membránnal határolt struktúrák lehettek, és hogy ilyen protosejtek a Földön legalább 500–1000 millió éven át létezhettek (Folsome, 1979). Számos szerző modellezett már protosejtekkel (Fox, 1973; Yanigawa és Egami, 1978; Folsome, 1976 stb.). E modellek tulajdonságai közé minden esetben hozzátartozott, hogy méreteikben a jelenkori sejtekre emlékeztettek, és hogy fázishatáraik voltak. Az utóbbi szükségszerűen vonja maga után, hogy a protosejt belseje és környezete között mind kémiai összetételben, mind az energiaszintben, egyaránt különbségek vannak. Amennyiben az anyagcserét úgy tekintjük, mint vegyületeknek fázishatárokon át végbemenő koncentrációs és reaktivitási ráta változásait, úgy a sejtanyagcsere kezdete feltétlenül egybeeshetett az őssejt kialakulásával.

Folsome és Brittain (1981) modellrendszerük segítségével formaldehid és más szerves termékek fotoszintézisét demonstrálták. A szerves modellsejtek vizes szuszpenzióját karbonát jelenlétében, nitrogén/hidrogén légkörben, hosszúhullámú ultraibolya fénnyel sugározták be. A fázishatárolt szerves mikrostruktúrák előállításához desztillált víz felszínén nitrogén, metán és szén-dioxid gázkeveréken át szikrakisülést hoztak létre. A kapott összetett morfológiájú mikrostruktúrák (protosejtek, koacervátumok) ozmotikusan szenzitívek voltak, méretük pedig 1–20 μm között ingadozott. Számuk és méretük a szintézis alatt autokatalitikusan növekedett, ami arra utal, hogy az új struktúrák önelrendeződése a már meglévő struktúrák felszínén mehetett végbe. Az így nyert mikrostruktúrákat desztillált vízben centrifugálással mosták, fagyasztva tárolták, vagy közvetlenül használták fel. A karbonátredukciós kísérletekhez 2 ml mikrostruktúra-szuszpenziót (kb. 7 mg szárazanyag) használtak, mely felett zárt kvarccsőben N_2- és H_2-gáz 14:1 arányú elegye volt. A szusz-

penzió állandó keveréséről is gondoskodtak. A reakciókeveréket ^{14}C-Na-bikarbonát (specifikus aktivitás 50 Ci M^{-1}) jelenlétében RAYONET fotokémiai reaktorban 27 °C-on sugározták be. A leadott UV 254 nm-es sugárdózis a kvarc reakcióedény exponált felületén $49{,}9 \times 10^3$ erg s^{-1} volt. 24 órás expozíció után 1,5 ml 11 M sósavval savanyítottak, N_2-gázzal öblítettek, majd vákuum alatt 30 percig a nem reagált karbonát eltávolítására gáztalanítottak. Ezután a mintát az oldott és a részecskefázis elkülönítésére 12 000 g-nél, 5 percig centrifugálták. Mindkettőt ^{14}C aktivitásra tesztelték. A két frakció aktivitásának összegét a jelzett karbonátból termelt összes szerves szénként kezelték. Ennek mintegy 30%-a partikuláris frakcióban volt. A kapott eredményeiket a *8. táblázat*on mutatjuk be.

8. táblázat

Modell protosejtek UV-fotokémiai karbonátredukciója*

Kísérlet száma	Összes ^{14}C-jelzésbevitel (mCi)	Összes visszanyert szerves ^{14}C (mCi × 10^{-6})	Szerves-C a termékben (mM × 10^{-9})	A redukált szénatomok száma (erg^{-1}cm^{-2} × 10^3)	φapp: látszólagos kvantumhozam
1	0,5	0,36	7,2	12	$0{,}09 \times 10^{-6}$
2	0,5	0,045	0,9	–	–
3	0,4	92,66	1853,2	3096	$24{,}2 \times 10^{-6}$
4	0,125	3,36	67,2	112	$0{,}88 \times 10^{-6}$
5	0,5	20,35	407,0	680	$5{,}32 \times 10^{-6}$

* Megjegyzés: **1:** Szerves mikrostruktúrákat nem adtak. **2:**UV-sugárzás nélkül. **3:** Minden reaktáns jelen volt (mikrostruktúrák deszt. vízben; $^{14}CO_3^{2-}$; N_2/H_2 a légfázisban). **4:** Valamennyi reaktáns jelen volt, a mikrostruktúrákat azonban ismételt fagyasztással és felolvasztással tönkretették. **5:** Minden reaktáns jelen volt, azonban a deszt. vizet pH 8,1-es 50 mM foszfátpufferrel helyettesítették. A mikrostruktúrák besugárzás előtti fagyasztásos-kiengedéses kezelése a modell protosejtek fázishatárait mechanikailag tönkretette (FOLSOME és BRITTAIN, 1981).

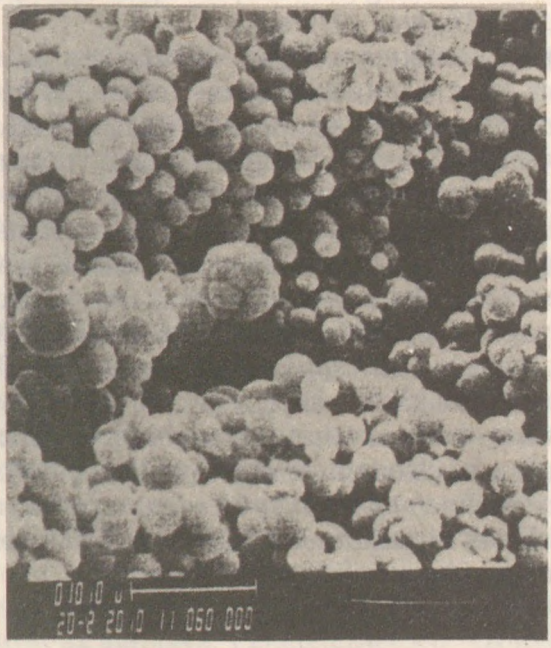
Látható, hogy a karbonát szerves szénné fotoredukálódott. A reakció szerves mikrostruktúrák jelenlétét, továbbá UV 254-nm-es besugárzást igényel. A redukált szén magasabb hozama érhető el, ha a mikrostruktúrák épek. Az oldódó szerves frakciót parciális liofilizálással koncentrálták és szilikagél H-n, vékonyréteg-kromatográfiával különböző oldószerrendszerekben szeparálták. A lemezekből ^{14}C-aktivitás mérésekhez 1 cm széles sávokat vágtak ki. Az alkalmazott jelzés mintegy 70%-a az autentikus ^{14}C-formaldehid standardéval azonos Rf-értékkel vándorolt. Az összes oldódó szerves terméket tovább vizsgálva, abban aminosavakat (glicin, alanin, β-alanin és valin) mutathattak ki. Ezek nitrogénforrá-

sát nem határozták meg. Feltehetően vagy a mikrostruktúrák szerves-anyagából, vagy a légköri nitrogénből származott. Végül, további vizsgálatok alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a formaldehid-protonok jelentős része vízből származhatott. Az anyag egyébként mikrobiológiailag fertőzetlen volt.

1.11.9. CO_2-redukció és N_2-kötés primitív, abiotikus anyagcsere-rendszerekben

SMITH és munkatársai (1981) szerves molibdén-mikrostruktúrákban szén-dioxid-redukciót és nitrogenázaktivitást is mértek. Sejtméretű struktúráik (ásványi szerves komplexek) vízbontást, továbbá szén-dioxid- és nitrogénredukciót fotokatalizáltak. Ebből arra következtettek, hogy az ősi anyagcsere inkább egyszerű, semmint bonyolult kémiai környezetben fejlődhetett. E szerzők a mikrostruktúrákat az alantiak szerint állították elő: 1 l-es lombikban 100 ml 4%-os ammónium-molibdát oldatot, 200 ml 3% diammónium-foszfát oldatot, 100 ml ásványi só oldatot és 100 ml 37%-os formaldehidet elegyítettek. Az ásványi só oldatot úgy készítették, hogy 100 ml desztillált vízben 20 mg kalcium-acetátot, majd nátrium-kloridot, kálium-dihidrogén-foszfátot, magnézium-szulfátot, mangán-szulfátot és kálium-szulfátot egymást követően oldottak, majd még 50 mg ferro-szulfáttal egészítették ki. A kombinált oldatokat 8 órára napfénynek tették ki, ill. xenon-lámpával ekvivalens ideig világították. A besugárzás után a mikrostruktúrákat tartalmazó zavaros sötétkék folyadékot 0,3 μm-es szűrőn át szűrték. A kinyert, majd mosott struktúrákat szobahőmérsékleten exszikkátorban szárították. A szárított mikrostruktúrák összetétele a következő volt: szén 13,75%, hidrogén 2,62%, oxigén 28,96%, nitrogén 8,84%, molibdén 44,50% és vas 0,18%. IR-spektrumuk a formaldehidéhez és az ammónium-molibdátéhoz nagyon közel álló abszorpciós sávokat mutatott. Ez arra enged következtetni, hogy oldhatatlan formaldehid-polimerek és molibdátionok kombinációit tartalmazzák. Pásztázó elektronmikroszkópban parányi szférikus testeknek látszottak *(8. ábra)*. Szén-dioxid-redukciójukat mind a látható fény, mind UV-sugárzás hatására egyaránt megfigyelték. A nem besugárzott kontrolloknak kimutatható aktivitása nem volt. Nitrogénázaktivitásra több tesztet is végeztek. Az acetilénredukciót mind a látható fény, mind UV-sugárzás, a redukció direkt tesztjét pedig a látható fény hatása alatt vizsgálták. Az UV (254 nm)-sugárzással kivitelezendő acetilénredukció céljaira kvarccsövekben 2–2 ml vízben, vagy 2–2 ml 0,1 M glükózban 5–5 mg mikrostruktúrát szuszpendáltak. A cső fejrészét N_2-gázzal áramoltatták át és 0,25 ml acetilént adagoltak.

Az acetilén–etilén arányt folyamatosan mérték. A besugárzott mikrostruktúra-szuszpenzió az acetilén–etilén arány szignifikáns növekedését mutatta (1–3 μM/h/mg etilén). A nem besugárzott kontroll esetében az eredmény negatív volt. A teszt látható fénnyel is pozitívnak bizonyult. Az acetilén fotoredukciója alkalmával felhasznált protonforrás kimutatására víz helyett nehézvizet (^2H_2O) használtak. Kvarccsövekbe zárva 1 ml 99%-os nehézvízben 10 mg mikrostruktúrát szuszpendáltak. E csö-



8. ábra
Ásványi szerves mikrostruktúrák. Szkanning elektronmikroszkópos felvétel (Smith és munkatársai, 1981)

veket N_2-gázzal háromszor áramoltatták át, ill. evakuálták, acetilénnel látták el, majd fotokémiai reaktorban 24 órán át besugározták. Az etilént az acetiléntől gázkromatográfiával szeparálták. Megállapításaik szerint bizonyosnak látszik, hogy az etilénné redukált acetilén többsége a protonokat a nehézvíztől kapta.

1.11.10. Átmenet az élő és az élettelen rendszerek anyagcseréje között

Mindebből arra lehet következtetni, hogy hasonló őssejtek közreműködésével, megfelelő geológiai körülmények között ilyen fotokatalitikus funkciók már a régmúltban is végbemehettek. Ezek a reakciók különben

jellemzőek a prokariotákra, különösen a cianobaktériumokra. Ásványi–szerves struktúrákkal e működések szimulálása megoldható. SMITH és munkatársai (1981) szerint e mikrostruktúrák – legalábbis működési sajátságaikat tekintve – látszólagos anyagcsere-átmenetet képeznek az élők és az élettelenek között.

Megjegyzésre érdemes, hogy e funkciók kimutatása nem meglepő, minthogy az utóbbi években már sikerült igazolni, hogy fémkomplexek fotokatalízist valósítanak meg (SINFELT, 1977; VOORHOEVE és munkatársai, 1977; YAMASE és IKAWA, 1979 stb.).

Feltehetően, még mielőtt a primitív ősóceánban az első élő sejtek megjelentek volna, már számtalan nagyon különböző kémiai felépítésű és élettartamú koacervátum, ill. sejtméretű mikrostruktúra típus létezett. Azok, amelyek véletlenül hasznos polimerizációt kivitelezni képes katalizátorokat tartalmaztak, a többinél feltétlenül nagyobb élettartamúak lehettek. Túlélésük mértéke „anyagcseréjük" komplexitásától és hatékonyságától függhetett. A szigorú kémiai szelekció rendkívül hosszú időn át válogatta, szelektálta a környezetből az anyag- és energiafelvételre és a felvett anyagok beépítésére képes típusokat, közöttük elsősorban is az olyanokat, melyek nem csupán nagy élettartamúak és ellenállók voltak, hanem osztódásukkor e képességekkel a leánycseppecskéket is „ellátták". A kémiai szelekció tehát a későbbi biológiai evolúció előkészítője volt. Annak a mechanizmusnak a fejlődése, amely lehetővé tette, hogy osztódáskor valamennyi leánykoacervátum hozzájusson a túléléshez szükséges reakciók kivitelezéséért felelős katalizátorokhoz, lényegében a genetikai apparátus megjelenéséhez vezetett.

1.12. A sejt–sejt felismerési rendszer evolúciója

A sejt–sejt felismerési rendszereknek, a felismeréshez szükséges kémiai érzékelés membránstruktúráinak stb. az evolúciója talán már az ősi protosejtek, ill. a koacervátumok világában kezdetét vehette. Nagyon valószínű ez, mert a szerves evolúció mindig közösségi anyagcsereszinten haladt. Sajnos az őssejtek lehetséges anyagcserepartnerségéről, kooperációjáról stb. csaknem semmit sem tudunk, és e téren e kérdés megközelítésére még kísérletes munka sem folyik.

Ha végigtekintjük a koacervátumoktól az őssejtekig terjedő evolúciós útra vonatkozó modern szakirodalmat, úgy sajnálattal kell megállapítanunk, hogy a szerzők gyakorlatilag kivétel nélkül a koacevátumok mint egyedek közötti totális versengést és az erre alapuló természetes szelekciót tekintik a fejlődés kizárólagos mozgatórugójának. Teljesen elsikkad az a szempont, hogy a szelekció éppen azokat a koacervátumokat vá-

laszthatta ki, amelyek másokkal kooperálni voltak képesek és olyan koacevátum közösségek jöhettek létre, melyek egymás között egyfajta közösségi anyagcserét valósíthattak meg, ami nagyon meggyorsíthatta a különböző koacervátumtípusok további tökéletesedésének útját is.

1.12.1. A szexualitás feltételezett szerepe a sejt–sejt felismerési mechanizmusok fejlődésében

Nem kétséges, hogy a szexualitás megjelenése az élő világ evolúciójában mérföldkőnek számíthatott. A szexualitás, mely mind az egysejtűeknél, mind a soksejtű szervezeteknél a sejtek közötti genetikai anyag kicserélését teszi lehetővé, az evolúció legfőbb hajtóerejévé vált. A szexuális érintkezés a specifikus felismeréshez megfelelő felszíni struktúrákat igényel, melyek azután a két gaméta típusú sejt párosodását is lehetővé teszik. A sejt–sejt felismerési rendszer evolúciójának a szexualitással minden bizonnyal szoros filogenetikai kapcsolata lehetett (BENNETT és munkatársai, 1972; MONROY, 1978; MONROY és ROSATI, 1979). MONROY és ROSATI (1979) elképzeléseiket arra alapítják, hogy a primitív prokarioták sejtmembránja lipid-kettősréteg lehetett (ez azonban már eleve kétségbe vonható, mert a legprimitívebb prokarioták membránja minden valószínűség szerint izoprenoid típusú „monolayer" volt; *lásd* 515. old.) Minthogy ebbe a kettősrétegbe fehérjék és/vagy glikoproteinek fajspecifikus módon épülhettek be, sőt abban ezek mozoghattak is, ami végső soron a molekuláris organizáció flexibilitásának jelentős potenciálját biztosította, a sejtfelismerési mechanizmusnak is minden bizonnyal a membrán válhatott az alapjává. Feltételezhetően bizonyos „szexualitás-faktorok" kódolhatták azokat a proteineket, melyek azután az ilyen faktorokat viselő sejtek membránjába mint felismerhető struktúrák épültek be. A baktériumokban a konjugáció egy feltételezett F-antigéntől (F: fertilitás) függhet, mely JACOB és munkatársai (1963) elképzelése szerint az F^+ Hfr-hímek felszínén helyezkedik el és ez teszi lehetővé, hogy a gazdaszervezet felismerje azokat a sejteket, melyeknek nincs episzómájuk és hogy az ilyenekkel konjugáljon. A párosodási reakció eredetileg a pozitív sejtekre specifikus felszíni komponens (mely úgy látszik az *E. coli*nál már az F-pilus csúcsánál lokalizált) és a negatív sejtek valamilyen egyéb felszíni komponense közötti kölcsönhatás eredményeként mehetett végbe. Így pl. lehet, hogy a pozitív sejtek felületén lokalizált és a szex-faktor által kódolt molekulák lektinekhez (*lásd* 4.10.15. alf.) lehettek hasonlóak és a negatív sejtek felszínének glikoproteinkomponenseivel léptek kölcsönhatásba. Ezt látszanak megerősíteni a tra-operon révén kódolt proteinekkel kapcsolatban tett megfigyelések

(KENNEDY és munkatársai, 1977). A *tra*-operon azokat a géneket tartalmazza, melyek az F-pilus szintéziséhez, a párosodási aggregátok stabilizálásához, a DNS-transzferhez és ahhoz a felszíni „taszításhoz" *(surface exclusion)* szükségesek, mely az F-sejtek kölcsönhatását más donorokkal megakadályozza. A *tra*-operon kódolta fehérjék a sejttakaróban helyezkednek el! A *tra*-operon a PTraT-membránproteint is kódolja, mely viszont a felszíni taszításért közvetlenül felelős. Ez a tény a sejt–sejt felismerés specificitásának eredetével feltétlenül kapcsolatos lehet. Érdekes módon a magasabb rendű növények inkompatibilitási rendszere a pollencső felszínén lokalizált proteinektől függ, melyek szintézisét ott az ún. S-lokusz ellenőrzi.

1.12.2. A genom és a sejtanyagcsere kölcsönös szabályozása és ellenőrzése

MONROY és ROSATI (1979) nézetei szerint a sejt–sejt kommunikációs rendszer azokból a membránstruktúrákból fejlődhetett ki, melyek eredeti szerepe a párosodási folyamatban a sejtfelismerés volt. Feltehetően már az evolúció nagyon korai szakaszában nemcsak a sejtfelület molekuláris szerveződésében érvényesült a genetikai szabályozás, hanem fordítva is, a genom felett maguk a konjugációban részt vevő felszíni struktúrák is ellenőrzést gyakorolhattak. Ismeretes pl., hogy a konjugáció ideje alatt az F^--sejtekben bizonyos funkciók, így pl. a DNS-szintézis gátlást szenvednek.

1.12.3. A receptorhelyek molekuláris specificitása

Az alacsonyabb rendű eukariotáknál a párosodási reakcióhoz a felismerés evolúciójának további soron következő fontos lépése a receptorhely szigorú molekuláris specifitásának a kialakítása lehetett. A *Hansenula wingei* élesztőgombában például a párosodás valójában a két párosodó sejt felszínén két glikoprotein-molekula kölcsönhatására vezethető vissza. A *Chlamydomonas* fajok esetében az mt^+- és az mt^--sejtek között fúziót tételeznek fel, aminek még ma sem ismert helye a sejtfelszín valamely strukturálisan specializálódott régiója lehet, mely a gaméták érése során differenciálódik. A *Blepharisma* ciliatában az I-es és a II-es párosodási típusok sejtjeinek prekonjugációs történéseit a sejtek által a környezetbe kiválasztott két gamon (gamon I és gamon II) kezdeményezi. Mindkettő ugyanazon párosodási típus sejtjei közötti egyesülés történéseinek indukciójára is képes. Ilyen esetekben azonban az egyesülés steril marad, vagyis egyetlen olyan nukleáris folyamat (meiózis, a gaméták nukleuszainak kicserélődése és fúziója) sem figyelhető meg, mely

akkor fordul elő, ha két különböző párosodási típus sejtjei egyesülnek. A sejtek egyesülése általában az orális régióban észlelhető. Egy bizonyos mutáns *(doublet)* esetében, melynél két orális nyílás is található, ugyanazon párosodási típushoz tartozó sejtek láncait lehet kialakítani, ha a gamon I hatásának tesszük ki őket. Amennyiben az ilyen lánc egyik végéhez a komplementer párosodási típus (vad típus, vagyis egyetlen szájnyílással rendelkező) egy gamon II-vel előkezelt sejtjét csatlakoztatjuk, úgy a konjugációs történések a láncszerű szekvenciának megfelelően azonnal végbemennek, mikor is a start az indukáló sejthez legközelebb állónál észlelhető és sejtről sejtre terjed.

1.12.4. A kemotaxis szerepe a sejtfelismerésben

Ma már baktériumferomonok is ismeretesek (*lásd* 861. old.). A *Streptococcus faecalis*nál a női jellegű sejtek olyan anyagot választanak ki, mely a hímeket kontaktusra és kopulációra ingerli, továbbá plazmidkicserélődést indukál (DUNNY és munkatársai, 1978). Mindez arra enged következtetni, hogy a sejt–sejt felismerési rendszerek és a szexuális ciklus evolúciója legkorábbi lépéseinek kutatásánál mind a kemotaxisra, mind a sejtmembrán specifikus receptorstruktúráira tekintettel kell lennünk.

1.12.5. A szexualitás és a géncsere ősisége

A szexuális ciklus, mely alatt DARLINGTON (1978) megfogalmazásában a konjugáció és a meiózis váltakozását értjük, a sejtmaggal rendelkező szervezetek minden csoportjára jellemző. Paraszexuális ciklusok a prokariotáknál egészen bizonyosan már a prekambriumban kialakultak és ezek akkor jelentős szerepet játszhattak az evolúció meggyorsításában. A baktériumok paraszexualizmusának legelső, legprimitívebb megnyilvánulásairól és ezek evolúciós gyökereiről még nagyon keveset tudunk. Ezek a gyökerek minden bizonnyal több mint 3 milliárd esztendő távolába nyúlnak vissza, amikor a sejteket sejtfal még nem, hanem csupán (valószínűen izoprenoid típusú, ős-) membrán határolta, amelyen át a kiválasztott vonzó hatású anyagok (feromonok) kezdetben csupán a kooperatív táplálkozási közösségek létrejöttét serkenthették. Ezek közösségi anyagcseréje azonban lényegesen meggyorsulhatott akkor, ha közben géncserék is végbementek, melyek révén új, nagyobb hatékonyságú anyagcseretípusok jelenhettek meg. REANNEY (1976) a sejtről sejtre történő génátvitel hatékony mechanizmusainak kialakulását a középső prekambriumra teszi. Elsőnek talán a bakteriofágokhoz hasonlóan fe-

hérje-védőburokba zárt és a környezeten áthatolni képes DNS-szegmentek leadásán és felvételén át bonyolódhatott ez le, amit sejt–sejt kapcsolódás és a közvetlen géncsere követhetett. A génátvitel genetikai szabályozásának mechanizmusa már ekkor kialakulhatott és mindazok a gének is megjelenhettek, melyek a géncsere lebonyolításáért felelős struktúrák információit kódolták. Ezeknek az egykori történéseknek valósághűbb rekonstrukcióját leginkább a jelenleg élő legprimitívebb szervezetek (ősbaktériumok) további tanulmányozásának várható eredményei könnyíthetik majd meg.

1.13. A recens prokariota sejttípus organizációja

1.13.1. A prokarioták és eukarioták összehasonlítása

A biológiai tudomány az élők világát két alapvető nagy csoportra (birodalomra) osztja fel: a prokariotákra és az eukariotákra. Amíg a protozoonok, a gombák és a legtöbb alga a magasabb rendű növényekhez és állatokhoz hasonlóan eukariota, addig a baktériumok és közöttük az ún. cianobaktériumok is kisméretű, viszonylag egyszerű felépítésű sejtjei prokarioták. Az előbbiek membránnal körülvett sejtmaggal rendelkeznek, mely mitózissal osztódik. A prokarioták maganyaga egyszerű, cirkuláris, kettősfonalú DNS-molekula, melyet membrán nem vesz körül, és amelynek replikációja úgy történik, hogy a DNS kettős hélix szétválik, és mindkét fonalra komplementer fonal épül fel. Az eukarioták és a prokarioták maganyagának összehasonlításánál lényeges különbség ismerhető fel a hisztonok jelenléte tekintetében is. Ezek a nukleinsavakhoz kötődő bázikus fehérjék, melyek integráns elemei az eukarioták kromoszómastruktúrájának, és feltehetően a DNS-ről történő információátírás szabályozásában játszanak szerepet, hiányzanak a prokariotáknál. A prokariota sejtekben nemcsak a nukleáris membrán hiányzik, hanem a citoplazmahártya ún. unit membránstruktúrájának megfelelő valamennyi (független) belső membrán is. Nem képeznek raktározó vakuólumokat és ennek megfelelően tartaléktápanyagaik, mint pl. a glikogén, szabadon fordulnak elő a citoplazmában. A prokariota sejt légzési enzimei a citoplazmamembránban vannak lokalizálva. Az eukariotáknál specializált, belső membránból felépült sejtorganellum a mitokondrium, ami a légzés helye. Amíg a növények fotoszintetikus pigmentjei membránkötődésű kloroplasztiszokban fordulnak elő, addig e pigmentek a prokariotáknál vagy a citoplazmamembránnal közvetlenül összefüggő intracitoplazmatikus membránban, vagy nagyon vékony membrántömlőkben (*Chlorobium*-vezikulumok) találhatók, melyek felépítésüket te-

kintve nem azonosíthatók az unit membránnal. Az eukariota sejtek riboszómái viszonylag nagyok, 80 S (SVEDBERG-egység) szedimentációs konstanssal jellemezhetők, ezzel szemben a prokariotáké csupán 70 S-gel. Evolúciós szempontból külön érdekességet jelent, hogy a mitokondriumok és a kloroplasztiszok riboszómái a prokariota sejtekéhez hasonlóak.

A prokarioták sejtfalát általában hálózatos szerkezetű mukopeptidváz alkotja, amelynek felépítésében N-acetil-glükóz-amin és N-acetil-muraminsav vesz részt. Az ősbaktériumok és a sejtfallal nem rendelkező *Mycoplasma* kivételével a muraminsav a prokariotáknál általános előfordulású sejtfalalkotó-elem. Az eukariotáknál viszont nem fordul elő. A nem természetes vagy D-aminosavak, továbbá bizonyos esetekben a lizin helyett szereplő diamino-pimelinsav, hasonlóan csakis a prokarioták tokanyagából, ill. sejtfalából mutatható ki. Ezeket az alapvető különbségeket a *9. táblázat* adatai összefoglalóan szemléltetik.

Az ún. kék–zöldalgákhoz, vagy az új nómenklatúra szerint a cianobaktériumokhoz változatos prokariotatípusok tartoznak, melyek sejtjeik nagyságrendje tekintetében átmenetet képeznek a baktériumok és az eukariota algák között. Fotoszintézisre képesek, ugyanazokat a klorofilltípusokat tartalmazzák, mint az eukariota algák, és a víz oxidálása révén molekuláris oxigént termelnek. E tekintetben különböznek a fotoszintetizáló baktériumok többségétől, melyeknek speciális klorofilljaik vannak és O_2-gázt sohasem produkálnak.

9. táblázat

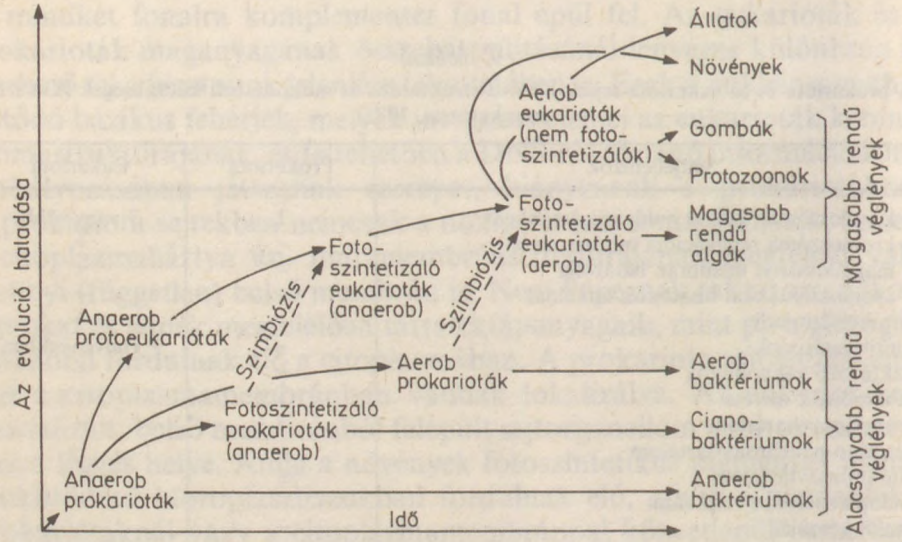
A prokariota és az eukariota sejtek közötti strukturális és működésbeli különbségek (LEVY és munkatársai, 1973)

Sejtjellemzők	Prokariota	Eukariota
A kromoszómák száma nukleáris áreánként	1	3 vagy több
A kromoszóma replikációja mitózis révén	–	+
A magállományt membrán határolja	–	+
A kromoszómákkal hisztonok társulnak	–	+
Mitokondriumok	–	+
Kloroplasztiszok	–	+ (növényekben)
Raktározó vakuólumok	–	+
Riboszómák mérete	70 S	80 S
D-aminosav-tartalom	+	–
Diamino-pimelinsav-tartalom	±	–
Muraminsavtartalom	±	–
Endoplazmatikus retikulum	–	+
GOLGI-készülék	–	+
Lizoszómák (autofagoszómák)	–	+ (állatokban) ± (növényekben)

Mind a cianobaktériumok, mind más, fotoszintézisre képes baktériumok fotoszintetikus pigmentjei általában a sejtmembrán alatt, azzal összefüggő membránképletekben helyezkednek el. A fotoszintetizáló baktériumokban ezek a belső membránok bizonyos környezeti feltételek között (így megvilágítás hatására) „kromatoforáknak" nevezett tojásdad vagy gömbölyű membránképletekké differenciálódnak, melyek összeköttetésüket a citoplazmamembránnal megtartják és komplett fotoapparátust tartalmaznak. Ezzel szemben az eukariota algák fotoszintetikus pigmentjei mindig, a citoplazmába beágyazott autonom membránszervecskékben (kloroplasztiszokban) találhatók. Bizonyítékok igazolják azt a hipotézist, miszerint az eukariota növények és algák kloroplasztiszai endoszimbionta baktériumokból fejlődtek ki.

A cianobaktériumokra (kék–zöldalgák) a siklásnak vagy csúszásnak nevezhető sajátos mozgásmód jellemző, melynek mechanizmusa ma még ismeretlen. Sok fotoszintézisre nem képes baktérium ugyancsak csúszva mozog. Ezek között nem egy annyira hasonlít a kék–zöldalgákhoz, hogy „színtelen" kék–zöldeknek tekintik őket, melyek az evolúció során elveszthették fotoszintetikus pigmentjeiket.

A *9. ábra* JAWETZ és munkatársai után (1976) az eukariota és prokariota mikrobacsoportok evolúciós kapcsolatait mutatja be. Feltehetően a Földön legkorábban létrejött sejttípusok anaerob prokarioták voltak. Ebből az ősi típusból legalább három, de feltehetően több párhuzamos evolúciós vonal jött létre, melyek egyike a fotoszintézishez, másika az



9. ábra

Az élő szervezetek főbb csoportjainak feltételezett evolúciós kapcsolatai

aerob légzéshez, míg a harmadik olyan eukariota strukturális bélyegek kialakulásához vezetett, mint amilyenek a mikrotubuláris rendszerek és a magkomplexitás („protoeukarioták"). Az egykori eukarioták az evolúciós történések sorozatán keresztül jöttek létre. Ilyenek lehettek:

1. Endoszimbiózis kialakulása egy kék–zöldalga és egy anaerob protoeukariota sejt között, amikor is a kloroplasztisz az endoszimbiontából fejlődött ki.

2. További endoszimbiózis létrejötte, melynek során egy aerob prokariota a mitokondrium evolúcióját kezdeményezte. A történéseknek ez a két összefüggő nagy csoportja olyan aerob fotoszintetikus aktivitású eukarioták megjelenését tette lehetővé, melyeket a recens magasabb rendű algákkal hasonlíthatunk össze. A kloroplasztisz elvesztése a protozoonoknak, a gombáknak és a nyálkagombáknak *(Myxomycetes)* a megjelenéséhez vezetett. A napjainkban élő baktériumok és kék–zöldalgák ennek megfelelően olyan alakokat képviselnek, melyek az ősi prokariota csoportokból viszonylag nem sok változással jöttek létre. A prokarioták és eukarioták származásával, prekambriális evolúciójuk problémáival a későbbiekben részletesen foglalkozunk (*lásd* 656. old.).

Egyes nézetek szerint a vírusok az élet legprimitívebb formájának tekinthetők. Sokkal valószínűbbnek látszik azonban, hogy magas szinten organizált, membránnal határolt sejtekből származnak. Mind abszolút parazitizmusuk, mind szoros genetikai rokonságuk a gazdaszervezettel arra utalnak, hogy eredetüket magában a gazdaszervezet genomjában kell keresnünk.

1.13.2. A baktériumok alakja és mérete

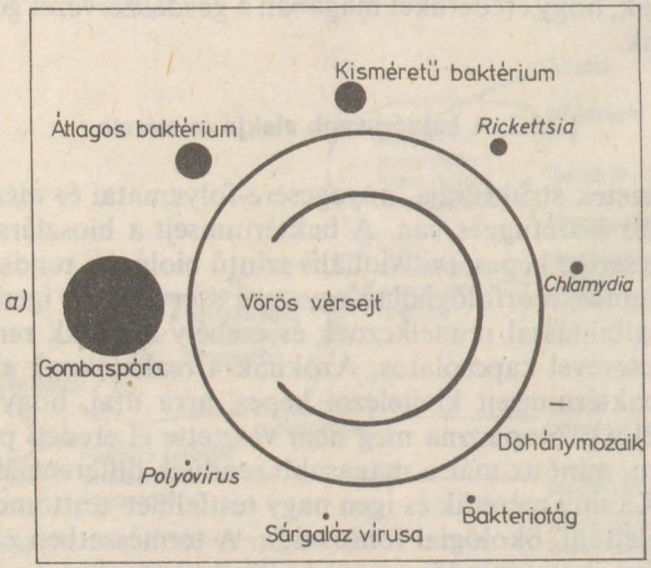
Az élő szervezetek struktúrája, anyagcsere-folyamatai és mérete között a legszorosabb összefüggés van. A baktériumsejt a bioszféra legkisebb önálló anyagcserére képes, individuális szintű biológiai rendszere. Jóllehet a baktériumok morfológiailag egyszerű szervezetek, igen nagyfokú fiziológiai flexibilitással rendelkeznek és csekély méretük rendkívül intenzív anyagcserével kapcsolatos. Azoknak a reakcióknak a sokasága, melyeket a baktériumsejt kivitelezni képes, arra utal, hogy ezeknél a szervezeteknél a protoplazma még nem vesztette el eredeti potenciálját oly mértékben, mint az már a magasabb rendűek differenciált sejtjeinél megtörtént. Kicsiny méretük és igen nagy testfelület–testtömeg arányuk kiemelkedő élettani, ökológiai fontosságú. A természetben ez teszi számukra lehetővé, hogy mindössze néhány sejt gazdaságosan használjon ki és degradáljon végtelenül csekély anyag- és energiaforrást. Másrészt mikroszkópos méretű, de kémiailag komplex szerves anyagok lebontását

kevés, de igen eltérő biokémiai kapacitással és ökológiai toleranciával rendelkező baktériumsejt nagy sebességgel képes megvalósítani lokálisan és *ad hoc* szerveződött, rövid élettartamú közösségi anyagcsere (metabiozis) keretében.

A baktériumok sejtmérete a *Bacillus anthracis* 1,0–1,3 × 3–10 μm sejtdimenziójától, a *Pasteurella tularensis* 0,2 × 0,2–0,7 μm méretén át, a *Mycoplasma* legkisebb, még élő egységnek tekintett 175 nm-es nagyságáig változik.

A rickettsiák és vírusok, melyek szaporodása, ill. szaporíttatása élő gazdasejthez van kötve, méreteiket tekintve fokozatosan vezetnek az optikai feloldóképesség határán túlra. A rickettsiák és a pox vírusok még viszonylag nagyok. Az előbbiek 0,2 × 0,5–1,5 μm méretűek, az utóbbiak 200–350 nm között ingadoznak. Ezektől a vírusok csoportjában már a makromolekuláris dimenziókig terjed a méret: a *Poliomyelitis* vírusának átmérője 25 nm, a száj- és körömfájás vírusáé 22 nm. Összehasonlításul a tojás albumin molekulájának mérete 2,5 × 10 nm.

A testméret és az anyagcsere szorosan összefüggenek egymással. Amíg a szárazföldi emlősökben az elefánttól (4000 kg) a törpe cickányig (4 g) lényegében ugyanazok a mechanizmusok működnek, addig e mechanizmusok a törpe rágcsálók méretével az emlősök testnagyságának alsó határát is megszabják, mivel ezeknél kisebbeknek (melyek különben nem léteznek) energiaszükségletük kielégítéséhez megvalósíthatatlanul gyor-



10.a. ábra

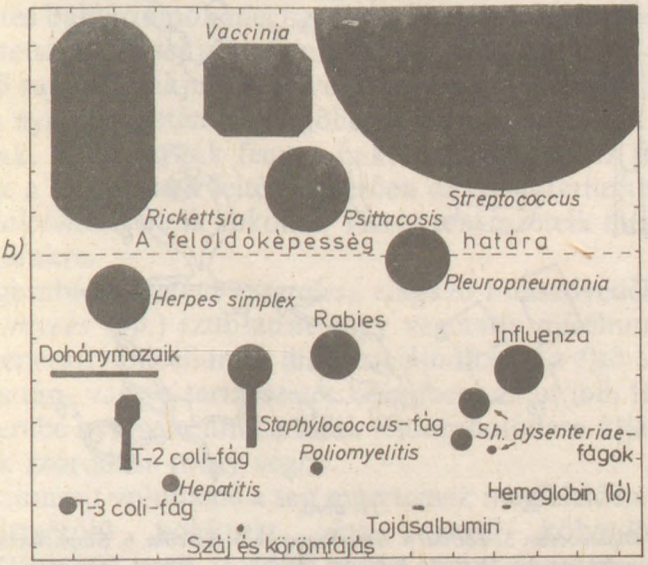
Különböző mikrobák és vírusok viszonylagos nagysága egy, az ábrán bemutatott vörös vértesthez viszonyítva

san kellene tápanyagokat asszimilálni és metabolizálni. Hasonló módon a rovarok tracheáiban az oxigén lehetséges legnagyobb diffúziós sebessége 5–8 cm között szabja meg azt a maximális testnagyságot, amit ilyen mechanizmussal lélegző szervezetek egyáltalán elérhetnek.

A limfocita egyike a legkisebb emlős sejteknek. Átmérője 10 μm, térfogata 524 μ^3. Ez azonban még mindig sokkal nagyobb, mint a *Bacillus anthracis* 22 μ^3, vagy a *Pasteurella tularensis* 0,004 μ^3 térfogatú sejtjei. Úgy tűnik, ez utóbbiak már végső határán járnak az önálló élet lehetséges minimális térfogatának.

Az obligát paraziták lehetséges testméreteinek skálája részben fedi az önálló anyagcserére képes kisebb formákét. Így a *Coxiella burnetii (Rickettsiaceae)* 0,02 μ^3, míg a nagyobb vírusok közé tartozó *Vaccinia* vírus 0,008 μ^3 térfogatú. Ezek tehát nagyobbak, mint a *Pasteurella tularensis* és más szélsőségesen kis baktériumok. A paraziták kisméretű alakjai egészen a száj- és körömfájás vírusának 0,00005 μ^3 volumenéig terjednek és egyre csökkenő mérettel folyamatos sort képeznek.

A baktériumok sejtjei gömb, pálca vagy csavar alakúak *(10-11. ábra)* lehetnek. Az *Actinomycetales* rendbe tartozó baktériumok elágazó sejteket, átmérőjüket tekintve bakteriális nagyságrendű hifákat és az utóbbiakból alkotott hifaszövedéket, ún. micelliumot hozhatnak létre.

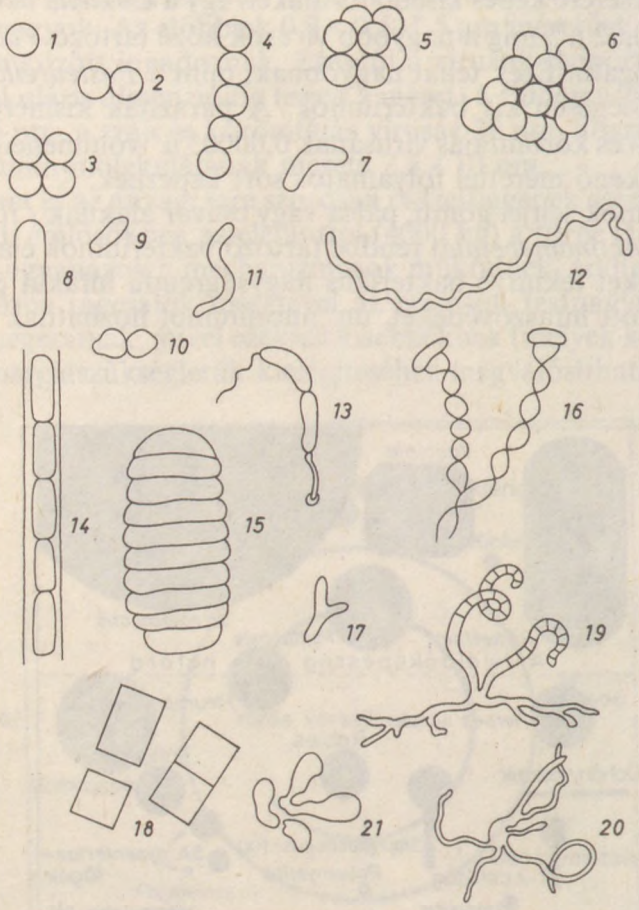


10.b. ábra

Különböző mikrobák és vírusok viszonylagos nagysága. Az alsó mező a látható fény feloldóképességének határa alatti tartomány jelenti. A skálabeosztás 100 nm-t képvisel

A gömb alakú baktériumok vagy *coccus*ok esetében az osztódás után szétváló magányos alakokat *micrococcus*oknak, a párosával együtt maradókat *diplococcus*oknak, a láncképzőket *streptococcus*oknak, míg a nagyobb sejtaggregátumokban (szőlőfürtszerű tömegekben) előfordulókat *staphylococcus*oknak nevezzük. *Tetragenus*ról beszélünk, ha a tér két irányában hasadó kokkuszok négyenként, *sarcina*ról, ha három irányban hasadva nyolcanként maradnak együtt.

A pálcika alakú baktériumok mérete és alakja igen változatos. Fajra jellemzően lehetnek rendkívül rövid kokkoidálisak (pl. *Haemophilus influenzae*), nagyok, több μm hosszúak és 1,5 μm-nél szélesebbek (pl.



11. ábra

1. *Micrococcus*. 2. *Diplococcus*. 3. *Tetrad*. 4. *Streptococcus*. 5. *Sarcina*. 6. *Staphylococcus*. 7. *Vibrio*. 8. *Bacillus*. 9. *Haemophilus*. 10. Osztódó kokkoid alakok. 11. Rövid *Spirillum*. 12. *Spirochaeta*. 13. *Caulobacter*. 14. *Sphaerotilus*-fonal. 15. *Caryophanon latum* óriásbaktérium. 16. *Gallionella*. 17. *Mycobacterium*. 18. Téglatest alakú baktériumok. 19. *Streptomyces*. 20. *Metallogenium*. 21. *Arthrobacter*.

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

Bacillus megaterium), egyik vagy mindkét végükön megvastagodott bunkós alakok (pl. *Corynebacterium difteriae*) stb.

A csavar alakú sejtek legegyszerűbb típusa a vibrio, mely negyed vagy fél csavarulatot képez. A csillókkal mozgó merev spirillumok sejtjei egy vagy gyakorta igen sok kanyarulattal jellemezhetőek. A *Spirochaeta*k ugyancsak sok csavarulatúak, de hajlékony sejtjeik mozgása kontraktibilitásukra vezethető vissza.

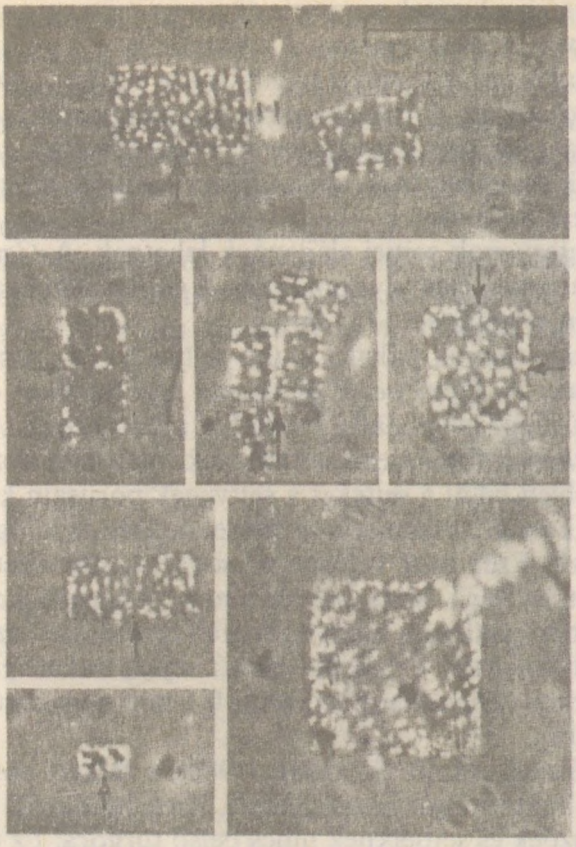
A *Mycobacterium*ok sejtjei elágazóak lehetnek. A *Caulobacter*-sejtek fonalszerű kinövésen mint nyélen ülnek. A *Gallionella* és a *Nevskia* sejtjei nyálkás nyélen települnek *(11. ábra)*.

A *Corynebacterium*ok pálcika alakú sejtjei V-, Y- vagy X-alakúakká módosulhatnak. A *Flexibacter giganteus* egyirányban orientált sejtjei 500 μm hosszúságot meghaladó fonalakat alkothatnak. A cianobaktériumok ún. *trichómái* fonalszerű sejtkötegek, melyeket közös hüvely vesz körül. E hüvelyen belül a sejteket a sejtvégek pórusain keresztül, az ún. plazmodezmákon át, plazmatikus összeköttetés fiziológiai egységekké kapcsolja össze. Ezek már valósággal soksejtű szervezetek. Az 5×100 μm nagyságot is elérő óriás baktériumok (*Caryophanon, Oscillospira* stb.) „gigantikus" alakjai a hiányos sejtfalképződésre vezethetők vissza. A mixobaktériumoknál a pálcika alakú sejtek sokaságának nyálkába ágyazott tömegei *(Chondromyces)* akár 0,5 mm nagyságú termőtesteket hozhatnak létre.

Új felfedezésnek számít (WALSBY, 1980) a telített sós tavakban élő négyszögletes baktériumok megfigyelése. Ezek rendkívül vékonyak, lapszerűek, áttetszőek és sejtjeiknek nincs belső turgora. Ez utóbbi ténynek köszönhető sajátos alakjuk is, mivel e szögletes lapstruktúra belső hidrosztatikus nyomás esetén aligha jöhetne létre. E sejtekben gázvakuólumok vannak. Ezek tartják fenn e baktériumokat a víz felszínén *(12. ábra)*. Ezek a szervezetek feltételezhetően az ősbaktériumokhoz tartoznak és a *Halobacterium*ok rokonai. Tiszta tenyészeteik még nem állnak rendelkezésünkre.

A sugárgombák *(Actinomycetales)* elágazó hifaszövedéke sok fajnál (pl. *Streptomyces spp.*) szubsztrát vagy vegetatív micéliumra, továbbá lég- vagy generatív micéliumra differenciálódhat. Az első aknázva nő a mesterséges táp- vagy a természetes közegben, az utóbbi fonalai a környezet légterébe nyúlnak, ahol a hifák feldarabolódása útján keletkezett artrospórák szóródása megy végbe.

A baktériumsejt volumene a sejt méreteinek megfelelően változó. Egy 1 μm átmérőjű kokkuszt véve alapul köbmilliméterenként $1000 \times 1000 \times 1000$, azaz 1×10^9 sejttel számolhatunk. Ez megfelel 1×10^{12} sejt/cm^3 sűrűségnek. Ebben az esetben a sejtek együttesen 31 000 cm^2 felületet képviselnek. Ezen a hatalmas felületen a környezet-



12. ábra

Négyszögletes baktériumok fáziskontraszt-megvilágításban. A világos foltok gázvakuólumok. A nyilak az osztódás síkjait jelzik. A vonás 10 μm-t jelez (WALSBY, 1980)

tel rendkívül élénk anyagcsere megy végbe. Amennyiben egy felnőtt ember testfelületét 19 000 cm^2-re becsüljük, úgy megállapítható, hogy a baktériumoknak már mindössze 0,6 cm^3-e hasonló méretű felülettel rendelkezik.

A baktériumsejtek vizes közegből centrifugálással ülepíthetők ($2–5 \times 10^3$ ford/perc), átlag 1,07 fajsúlyúak. Kicsiny méretük következtében csekély tendenciát mutatnak a spontán ülepedésre és folyadékkultúrában általában egyenletes eloszlást (zavarosodást) idéznek elő. Minthogy a levestenyészetek felületi feszültsége a sejteket fenntartja, sok aerob baktérium a felszínen lepelt képezve fejlődik.

1.13.3. A baktériumsejt kémiai összetétele

A növekedő fiatal baktériumsejtek mintegy 90%, a kihasznált táptalajokon egzisztáló elöregedő sejtek átlag 75% vizet tartalmaznak. A spórák víztartalma 50% alatt van.

A baktériumsejt száraz súlyát általában 20%-ra becsülik. Gyakorlatilag ezt úgy határozzák meg, hogy valamely baktérium sejttömegéből álló galacsint szárítás előtt és konstans súlyig szárítás után mérnek. Az ilyen galacsinokban azonban a víz több mint 60%-a intercelluláris lehet és nem a baktériumsejtben magában található. Vagyis a száraz súly feltehetően jóval nagyobb. BRATBAK és DUNDAS (1984) ezt igazolták. Különböző baktériumfajoknál 31–57% közötti értékeket mértek. Ennek alapján e szerzők a baktérium-biovolumennek biomasszára (széntartalomra) való átszámításához 0,22 g C cm^{-3} konverziós faktort javasolnak.

Kémiai összetételüket a környezet tápelemkészlete és az értékesíthető tápforrások összetétele jelentősen befolyásolja. A legfontosabb elemek átlagos százalékos megoszlását a baktériumokban a *10. táblázat* mutatja be. A *11. táblázat* egy szaporodó *Escherichia coli*-kultúra kémiai összetételét szemlélteti.

10. táblázat

Baktériumok átlagos elemi szárazanyagra számított összetétele

Elem	Százalékos arány
C	50
O	20
N	15
H	8
P	3
S	1

11. táblázat

Az *Escherichia coli* egy a logaritmikus szakaszban szaporodó kultúrájának kémiai összetétele*

Vegyület	(Szárazanyagra számított százalékos arány [%])
Fehérje	60
Lipid	15
Nukleinsav	
DNS	3
RNS	16
Poliszacharid	3
Alacsony molekulasúlyú anyagok	3

* A sejtek tartaléktápanyagokat nem tartalmaznak

A szárazanyag 10%-át is elérhető mennyiségű ásványi anyagok a baktériumok sejtjeiben főleg a nátrium, kálium, foszfor, kén, vas, kalcium, magnézium stb. sói alakjában vannak jelen. A szárazanyag elsősorban fehérjékből áll (50–80%). A nukleinsavakat a maganyag DNS-e, továbbá a riboszómák RNS-e, a tRNS-ek és a mRNS-ek képezik. A sejtfal aminocukrokat tartalmaz. A tokkal rendelkezők különösen gazdagok lehetnek szénhidrátokban. A lipidek bár minden baktériumból kimutathatók mégis, fajokra jellemzően mennyiségük jelentős eltéréseket mutathat. Így a saválló baktériumokban arányuk a 40%-ot is meghaladhatja. A baktériumsejt szabad aminosavakat, vitaminokat, koenzimeket, pigmenteket, nagyszámú intermedier anyagcseretermékét stb. tartalmazhat.

A kémiai összetétel radikálisan megváltozik, midőn a tenyészet növekedése során a stacioner szakaszhoz közeledik. Ezt elérve ugyanis tartaléktápanyagoknak, mint glikogénnek vagy poli β-hidroxi-butirátnak a felhalmozódása tapasztalható, vagy, mint a GRAM-pozitív baktériumok esetében, a sejtfal fokozott megvastagodása a falanyag százalékos arányában okoz jelentős eltolódást. A sejtek RNS-tartalma is változhat a növekedés sebességének függvényében, amennyiben e sebességet a táptalaj összetétele befolyásolja. Így mennél gyorsabb a sejtosztódás, annál magasabb az RNS-tartalom (LEVY és munkatársai, 1973).

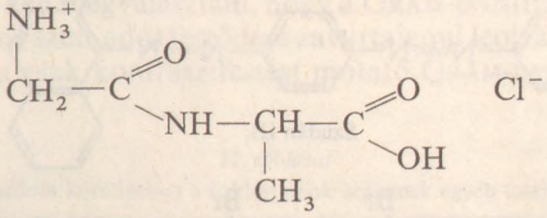
1.13.4. A baktériumok festése

A baktériumsejt szerkezetét gyakran festett készítményekben fénymikroszkóppal vizsgáljuk*.

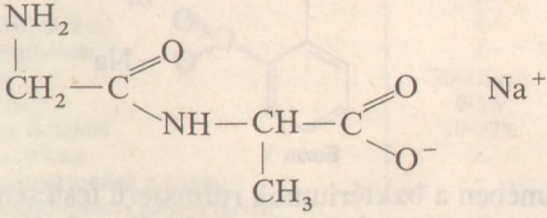
A baktériumsejt alkatelemei festődésének folyamatát fizikai és kémiai tényezők együttesen befolyásolják. Az oldékonyság, a diffúzió, a permeabilitás és az adszorbció e téren fontos fizikai tényezőknek számítanak. A zsírcseppecskék festésénél például döntő a festék zsíroldékonysága. A baktériumok sejtjeiben a festékeket elsősorban is a nukleinsavak és a fehérjék abszorbeálják. A nukleinsavak stabilan savas karaktere (foszfátcsoportjaik negatív töltésűek) eleve megszabja, hogy milyen festékkel

*Példaként itt egy a baktériumok magekvivalensének (nukleusz, nukleoid) kimutatására alkalmazott festési eljárást mutatunk be: fiatal vegetatív sejteket tartalmazó szuszpenzióval, zsírtalanított tárgylemezen, kenetet hozunk létre, amit még nedves állapotban OsO_4-gőz hatásának kitéve fixálunk. Szárítás után a készítményt 60°C hőmérsékletű 1M sósavval 5 percig kezeljük, desztillált vízzel öblítjük, majd festékoldatba (0,25 g azur-I-t, 100 ml desztillált vízben, 2-3 csepp tionil-klorid adagolása közben oldunk; az oldatot frissen készítjük) állítjuk. Másfél-két óra után öblítjük és fedőlemezzel takarjuk. A készítményt mikroszkópban olajimmerziós objektívvel (100x) vizsgálva az egyébként festetlenül maradt sejtekben intenzív kék színű, szabálytalan alakú körzeteket (magekvivalensek) figyelhetünk meg.

reagálnak. A fehérjék viszont a szuszpendáló közeg aciditásától függően, ugyanazon festékkel szemben is eltérően viselkedhetnek. A közeget pl. sósav hozzáadásával megsavanyítva a gyenge savaknak, mint amilyenek a C-terminális aminosav vagy az aszparaginsav és glutamisav második szabad karboxilcsoportja, visszaszorul az ionizációja és az N-terminális aminosavval, továbbá a lizin, arginin és hisztidin szabad aminocsoportjaival hidroklorid sók jönnek létre. Eredményként a fehérje pozitív töltést nyert:



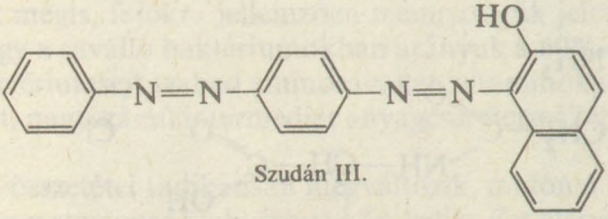
Lúgos közegben, mint pl. nátrium-hidroxid jelenlétében, a karboxilcsoportok ionizált nátriumsói jönnek létre és így a fehérje negatív töltést nyer:



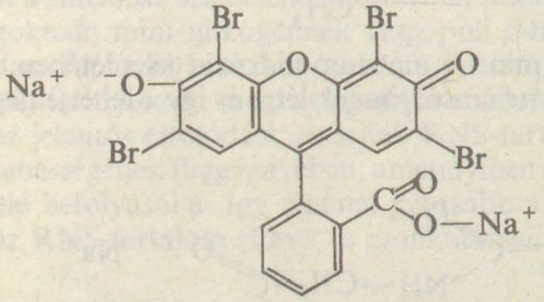
Minthogy a fehérjék felépítésében nagyszámú aminosav vehet részt, melyek között többnek bázikus, ill. savanyú oldalláncai vannak, egy bizonyos pH-értéknél a bázikus aminosavak protonizációjának (H^+-felvétel) és a savanyú karboxilcsoportok ionizációjának mértéke ekvivalens lesz és a molekula nem rendelkezik többé sem pozitív sem negatív töltéstöbblettel. Ez az ún. izoelektromos pont, mely sok protein esetében pH 4,0 és 5,0 között van. Magasabb pH-értékeknél a fehérje negatív, alacsonyabb pH-értékeknél pozitív töltéstöbbletet nyer. A baktériumoknak mind a citoplazmája, mind a membránja tartalmaz fehérjéket, a sejtfalban pedig vagy komplex fehérjék, vagy csak néhány aminosavból alkotott rövid láncok vannak jelen. Következésképpen a fehérjék és más sejtfelszíni alkatelemek a baktériumot elektromos töltésmintázattal ruházzák fel, amelyben a környezet pH-jától függően a pozitív vagy negatív töltések dominálhatnak.

A baktériumok festéséhez bázikus, savanyú és neutrális festékeket használunk. A színes részen pozitív töltésű bázikus festékek (pl. metilénkék$^+$ klorid$^-$; kristályibolya) vonzatuknak megfelelően megfestik a

negatív töltésű baktériumsejteket. A savanyú vagy negatív festékek, mint amilyen az „eozin Y" (nátrium$^+$-eozinát$^-$), negatív töltésűek és ezért ezeket a sejt elutasítja. Ennek következtében a sejt vagy festetlen marad, vagy csak igen gyengén festődik, a háttér azonban színes lesz. A Szudán III-hoz hasonló neutrális festékek vízben oldhatatlanok, de oldódnak zsírokban. Így ezek felhasználhatók a sejtben található zsírzárványok specifikus festésére.



Szudán III.



Eozin Y

A fentiek értelmében a baktériumok rutinszerű festésének kivitelezése alkalikus pH-n tartott, gyengén pufferolt, bázikus festékekkel történik. Az egyszerű bázikus festékek viszonylag szelektivitás nélkül kötődnek mind a sejtek nukleinsavaihoz, mind fehérjéihez, és így viszonylag egyenletes festődés jön létre. Kristályibolya, metilénkék vagy safranin (valamennyien pozitív töltésű festékek) elterjedten használatosak egyszerű festésekhez. Ezek lehetővé teszik a sejtek morfológiájának megismerését.*

*Számos speciális festési eljárást is ismerünk, így pl. különleges sejtfalszerkezetű és kémiai összetételű baktériumok kimutatására. Közülük példaként itt a *Mycobacterium*ok, ill. az un. „saválló pálcikák" festésére alkalmazott ZIEHL–NEELSEN-féle módszert mutatjuk be: A vizsgálandó baktérium tárgylemezen előállított, levegőn szárított kenetét láng felett hővel rögzítjük, óvatosan karbol-fukszin oldattal (10 ml telített alkoholos fukszin-oldat plusz 90 ml 5%-os fenololdat) felülrétegezzük és alulról BUNSEN-égővel, kislánggal, csak gőzölésig melegítjük. A párolgó festékoldat veszteségét utánpótoljuk. 2-3 perc után a festéket leöntjük és a készítményt sósavas-alkohollal (3 ml koncentrált sósav plusz 70 ml 96%-os etanol plusz 27 ml desztillált víz) mindaddig kezeljük, míg a festékanyag kimosódása már nem észlelhető.

Ezután metilénkékkel (LÖFFLER szerint: 30 ml telített alkoholos metilénkék törzsoldat plusz 100 ml vizes, 0,01%-os KOH; használat előtt tízszeresére hígítva) egy percig tartó utánfestés és desztillált vizes öblítés. A készítményt óvatosan szűrőpapírok között szárítjuk. Megítélés mikroszkópos vizsgálat alapján: a saválló pálcikák vörös, mások kék színeződéssel észlelhetők.

1.13.5. Az ún. GRAM-reakció*

A GRAM szerinti festés (Christian GRAM, 1884) mint differenciáló festési módszer ismeretes. Különböző baktériumok eltérő módon reagálnak a GRAM-festésre és a GRAM-reakció a sejtek számos fontos jellemvonásával mutat korrelációt *(12. táblázat)*. E festési eljárás során a GRAM-negatív sejtek alkoholos kezelésre leadják az első lépésben felvett kristályibolya–jód komplexet és elszíntelednek. A soron következő kontrasztfestést úgy kell megválasztani, hogy a GRAM-pozitív sejtek ténylegesen pozitív (bíbor színt adó) festődése zavartalanul leolvasható és elkülöníthető legyen a csak kontrasztfestést mutató GRAM-negatívokétól.

12. táblázat

A GRAM-festődés korrelációja a baktériumok sejtjeinek egyéb tulajdonságaival

A baktériumsejt egyéb tulajdonsága	GRAM-pozitív	GRAM-negatív
Szenzitivitás penicillinnel szemben	+	–
Emészthetőség lizozimmal	+	Csak előkezelés után
Gátolhatóság kristályibolyával	+	–
A rétegek száma a sejtfalban	1	2, ill. több
A sejtfal vastagsága	20–80 nm	10 nm
A sejtfal lipidtartalma	0-3%	11–22%
A sejtfal aminocukor-tartalma	10–22%	2–8%
Teichosav jelenléte a falban	±	–
Aminosavak nagy változatossága a falban	–	+
Sejtfalvastagodás fehérjeszintézis gátlása esetén	+	–

Kimutatták, hogy azok a GRAM$^+$-sejtek, melyeknek sejtfalát a GRAM-festés előtt eltávolították (szferoplasztok), negatívan festődtek, ami arra utal, hogy a festék visszatartásában a falnak elsődleges szerepe van. Ha egy GRAM -pozitív sejtet GRAM szerint megfestenek, majd falát enzimatikusan eltávolítják, a szferoplaszt még festett maradhat. Ez utóbbiból az etalonos kezelés azonnal elvonja a festéket, ami viszont nyilvánvalóvá teszi, hogy előzetesen a sejtfal volt az, ami megakadályozta a festék

* A baktériumsejt GRAM szerinti festésének több változata is ismeretes. Gyakran járnak el az alantiak szerint (DREWS, 1983): 1. A nem túl sűrű baktériumszuszpenziónak tárgylemez felületén létrehozott, légszáraz, hővel rögzített kenetét 3 percig karbolos genciánaibolya oldattal festik. 2. A festék leöntése után néhány csepp Lugol-oldattal utánöblítenek, majd a készítményre újabb Lugol-oldatot csepegtetnek és azt azon két percig hatni hagyják. 3. Ezután, a ferdén tartott tárgylemezen, a festett készítményt 96%-os etanollal (csöpögtetve) néhány másodpercig öblítik, abbahagyva ezt midőn színanyagkioldódás már nem észlelhető. Desztillált vízzel még utánöblítenek. 4. Kontrasztfestés hígított fukszin oldattal az alkohollal színtelenített sejtek újra színezésére. Végül desztillált vizes lemosás, szárítás és mikroszkópos vizsgálat. A GRAM-pozitív baktériumok sejtjei sötét, kékes ibolya színt nyernek, a GRAM-negatívak világos vörösek.

alkoholos kivonását. A festék magában a falban is jelen van, ezért a GRAM-festést joggal tekinthetjük sejtfalfestésnek, jóllehet egyidejűleg a membránt és a citoplazmát is festi. A jódos kezelés nem lényegbevágó lépés a GRAM-festési reakcióban, azonban mégis megkönnyíti a GRAM-pozitív sejtek elkülönítését a GRAM-negatívaktól azáltal, hogy a jód a kristályibolyával komplexet képez és általában megnöveli a festéknek az alkohollal történő eltávolítási idejét. Etanol helyett különben metanolt, izopropanolt, butanolt és acetont is alkalmazhatunk. Számos elmélet született a GRAM-reakció magyarázatára. Jelenleg a legelfogadhatóbbnak látszik, hogy a Gram szerinti differenciálás elsődlegesen a különböző baktériumok sejtfalának eltérő permeabilitási viszonyait tükrözi a 95%-os etanollal (vagy hasonló oldószerekkel) végrehajtott kezelés alkalmával. A GRAM-negatív baktériumok sejtfala nagy százalékban tartalmaz lipideket, míg alacsony százalékban muraminsavkomplexet. Ezenkívül vékonyabb, mint a GRAM-pozitívaké. A koncentrált alkohollal történő kezelés eredményeként a GRAM-negatív baktérium fala oldódik, vagy dezorganizálódik, amely lehetővé teszi, hogy az alkoholban oldódó kristályibolya–jód komplex a sejtből eltávolítható legyen. Eszerint a baktériumsejtek e két típusa közötti eltérés nem kizárólagosan a GRAM-pozitívaknál meglevő bizonyos speciális vegyületekre, hanem a GRAM-negatív sejtfal nagyobb permeabilitására vezethető vissza, midőn koncentrált etanollal kezelik. Ha ez az elmélet helytálló, úgy feltételezhető, hogy ezekből a sejtekből valamennyi oldódó molekula eltávolítható és ezek bármelyikét fel lehetne használni a megváltozott permeabilitás indikátoraként. Ezt az elméletet támasztják alá SALTON (1963) vizsgálatai, aki GRAM-pozitív és GRAM-negatív tesztorganizmusok sejtjeibe ^{32}P-vegyületeket inkorporált, majd tanulmányozta az izotóp leadását különböző koncentrációjú alkoholok hatására. A 90%-nál koncentráltabb alkohol a GRAM-pozitív sejtfal tömörülését vagy dehidratációját idézte elő, amit a ^{32}P kiáramlásának gyors csökkenése tanúsított. Ugyanez a kezelés kevéssé okozott tömörülést a GRAM-negatív sejtfalban, következésképpen a ^{32}P-t tartalmazó vegyületek szabadon távozhattak a sejtből.

A GRAM-reakció egyébként nem tekinthető élesen megkülönböztető bélyegnek. A különböző baktériumok sejtfalának összetételében megnyilvánuló eltérések, miként a GRAM-pozitivitás is, fokozatosak. A különböző GRAM-festődésű mikrobákat a ^{32}P-vegyületek leadása szempontjából is hasonló folyamatos sorrendbe lehet állítani. Érdekes, hogy az elpusztult sejtek GRAM-negatívakká válnak, ami a sejtfal struktúrájának gyors posztmortális megváltozását jelzi.

A GRAM-negatív és a GRAM-pozitív sejtfalak közötti szerkezeti eltéréseket ma már új szempontoknak megfelelően magyarázzák (STACKEBRANDT és munkatársai, 1985). Ezek szerint a GRAM-pozitívak vastag

peptidoglikánja csak kvantitatíve tér el a GRAM-negatívak egyrétegűétől. A *Desulfotomaculum* fajokat GRAM-negatívnak írták le, de az elektronmikroszkópos megfigyelések szerint többrétegű peptidoglikánjuk van. Sok *Clostridium* pozitív festődést csak szaporodása korai stádiumában mutat. Másrészt a sejtfalat kívülről borító fehérje (S–)-réteget (lásd 139. old.) mind a GRAM-pozitív, mind a negatív fajoknál egyaránt észlelték. A GRAM-pozitívak fala még bonyolultabb is lehet, minthogy egyeseknél e fehérje takaróban még lipidek is előfordulhatnak (így pl. a *Deinococcus*nál). Mindez nem igazolja azt a nézetet, hogy a GRAM-negatívak a pozitívakból fejlődtek ki. Feltehető ugyanis, hogy az evolúció során azok a fajok, melyek egyrétegűből többrétegű (negatív → pozitív) peptidoglikánt fejlesztettek, egyidejűleg redukálhatták a negatívakra egyébként jellemző külső membránjukat (lásd 132. old.). Vagyis nem kizárt, hogy a GRAM-pozitívak legalább is bizonyos esetekben negatívakból jöttek létre. Lehetséges, hogy a falszerkezet evolúciójában a valódi baktérumoknál progresszív és regresszív változások többszörösen is végbemehettek.

1.13.6. A baktériumsejt közvetlen megfigyelése

A mikrobák megfigyelésére, mikroszkópos és szubmikroszkópos anatómiájának tanulmányozására optikai lencsékkel és látható fénnyel dolgozó fénymikroszkópot, továbbá elektromágneses lencsékkel és elektronsugarakkal dolgozó elektronmikroszkópot használnak. Az előbbi mintegy ezerszeres, az utóbbi még 100 000-szeres nagyítást is lehetővé tesz. A nagyítás mértékénél a részletek tanulmányozásának lehetősége még fontosabb követelmény. Ezt az objektívek feloldóképessége, vagyis az a tulajdonságuk, hogy vonalakat és foltokat egymástól mennyire képesek elkülöníteni, kell hogy biztosítsa. Az emberi szem feloldóképessége kb. 0,25 mm, ami azt jelenti, hogy ennél kisebb távolságon belül a foltokat, ill. alakzatokat egymástól elkülöníteni már nem képes. A lencsék feloldóképességét a használt fény hullámhossza korlátozza, amennyiben ideális körülmények között az mintegy fele a hullámhossznak. Fénymikroszkópban 0,58 μm hullámhosszú sárga fényt használva, a legkisebb még elkülöníthető távolság kb. 0,25 μm. Ez a távolság ezerszeresére nagyítva 0,25 mm-t tesz ki, ami már eléri az emberi szem feloldóképességének határát. További nagyítás viszont már nem biztosítaná újabb részletek megfigyelésének lehetőségét. Amíg az elektronmikroszkóp feloldóképessége 0,5nm (1 nm, ill. mμ = 10 Å), addig a fénymikroszkópé 250 nm (= 0,25 μm) és az emberi szemé 250 000 nm (= 0,25 mm).

Minthogy a fénymikroszkóp esetében a hullámhossz adott tényező, a jobb feloldás eléréséhez az objektív fénygyűjtő képességét (numerikus

apertúra: NA) kell megjavítani. Nagyobb NA nagyobb feloldást eredményez. Amennyiben a lencse és a baktériumpreparátum között levegő van, a maximális NA = 1,0. Ezt az értéket olajimmerziós lencsékkel, továbbá a lencse és a preparátum között olajkontaktus létesítésével 1,2–1,4-ig növelhetjük.

Az objektív és az okulárlencsék képezik a fénymikroszkóp két fő lencserendszerét. Az okulárlencsék az objektívlencse-rendszerrel felnagyított képet fogják fel és nagyítják tovább. A preparátumot a kondenzátor lencserendszere segítségével a ráfókuszált fénykúp alulról világítja meg.

A fénymikroszkóp lencséinek egyik hibája a szférikus aberráció. Ez lényegében a kép torzulása, amit az idéz elő, hogy a lencse szélein áthaladó fénysugarak gyújtópontja nem esik egybe a lencse középpontján áthaladókéval. E torzulás mértéke változik a felhasznált tárgylemez vastagságával. E hibát nagyobb nagyítások esetén megfelelő vastagságú tárgylemez, olajimmerziós lencsék és olyan olaj használatával lehet kiküszöbölni, melynek az üveggel azonos fénytörési indexe van.

Az élő, tehát nem elölt és festéssel struktúrájában megváltoztatott baktériumok vizsgálatához sötétlátóteres vagy fáziskontraszt-mikroszkópot használunk. Az első esetben az ún. paraboloid kondenzor hatására a látótérbe a sugarak ferdén érkeznek, és mivel így nem juthatnak az okulárba, a látótér sötét marad. Amennyiben a ferdén eső sugarak olyan képletekbe ütköznek, melyek fénytörési indexe eltér környezetüktől, úgy azokról visszaverődnek és a TYNDALL-effektusnak megfelelően, a sötét háttérből fényes ragyogással tűnnek elő.

A fáziskontraszt-mikroszkópban a készítményeken áthaladó fény a sejtek és azok belső alkatelemei vastagságának és sűrűségének megfelelően fázist változtat. Megfelelő optikai rendszer a fáziskülönbségeket fényintenzitás-különbségekké alakítja. Az egyes részleteknek ezáltal megnő a kontrasztja környezetükkel szemben. Hátrány, hogy némileg csökken a feloldás, és hogy a struktúrák körül fényes udvar jelenik meg. E módszerrel a fénymikroszkópban a nagyítás nem fokozható. Elsősorban struktúrák vizsgálatára használatos.

Az antigén–ellenanyag reakciók vizsgálatához fluoreszcens mikroszkópot használnak. Az ellenanyagok ebben az esetben fluoreszkáló festékkel vannak jelölve. Ultraibolya sugarak hatására a festék fluoreszkáló része, a fluorochrom, gerjesztett állapotba kerül és az emberi szem számára látható (általában sárga vagy zöld) hullámhosszú sugarakat bocsát ki. Megvilágításra nagynyomású higanygőzlámpákat használnak. A megfigyelést olyan szűrők teszik lehetővé, melyek kiszűrik az UV-sugarakat, azonban átengedik a hosszabb hullámhosszúságú fluoreszcens fényt.

A transzmissziós elektronmikroszkóp megvilágítási és lencserendszere elvileg megfelel a fénymikroszkópénak, azonban fénysugarak helyett elektronsugarakat használunk, melyeket nem optikai lencsék, hanem elektromágnesek fókuszálnak. Ennek révén nagy nagyítású elektronikus kép jön létre, amit fluoreszcens ernyőre vetítve érzékelhetünk. Ez az ernyő fényképészeti lemezek expozíciója céljából elmozdítható. E mikroszkóp nagy feszültséget igényel (40 000–100 000 Volt), minthogy a növekvő feszültséggel csökken az elektronsugarak hullámhossza. Ezenkívül nagymérvű vákuumra is szükség van, aminek révén el lehet kerülni, hogy az elektronok a levegő molekuláiba ütközzenek és szóródjanak. A vizsgálati anyagot fixálják, dehidratálják, plasztikba ágyazzák és rendkívül finomra (0,1 μm vagy vékonyabbra) metszik. A metszeteket finom rézrácsra helyezik, majd elektronsűrű nehézfém festékkel festik. Árnyékolásuk háromdimenziós hatást vált ki. Ennek céljából a rácsra helyezett szárított anyagot meghatározott szögből nehézfémek, mint wolfrám vagy arany gőzével árasztják el. Így a preparátumnak csupán egyik oldala lesz fedett, a másik takaratlan marad. Ezáltal az elektronmikroszkópos megfigyelés számára háromdimenziós hatás érhető el, ugyanakkor a struktúra finom részletei elvesznek.

Az elektronmikroszkóp segítségével sejtek vagy szövetek tömör vagy meghatározott vastagságot elérő alkatelemeinek finomabb részleteit már nem vizsgálhatjuk, mivel csupán azokat az elektronokat lehet egyetlen síkban fókuszálni, melyek a vizsgálati anyagból azonos energiával lépnek ki. A különböző energiájú elektronok jelenléte a képet homályossá teszi. Annak elérésére, hogy az elektronok nagy százaléka változatlan energiával kerüljön le a tárgyról, nagyon vékony metszeteket vagy karbonreplikákat kell alkalmazni. Az utóbbi esetben a baktérium topográfiájának megfelelő olyan vékony levonatokat készítenek, hogy azok az elektronok számára átjárhatóak legyenek és háromdimenziós képet nyújtsanak. Ebből a célból a rácsra helyezett anyagot két szénelektródát tartalmazó kamrába helyezik. Az elektródák között áthaladó áram egy kevés szenet szublimál, mely mint finom por ülepedik le, beborítva a vizsgálati anyagot. A baktériumokat tartalmazó rézrácsot ezután krómsav 40%-os oldatába merítik. Ebben a réz és a baktériumok feloldódnak, míg a sejtek felszínének struktúráját hűen megőrző szénlenyomat sértetlen marad.

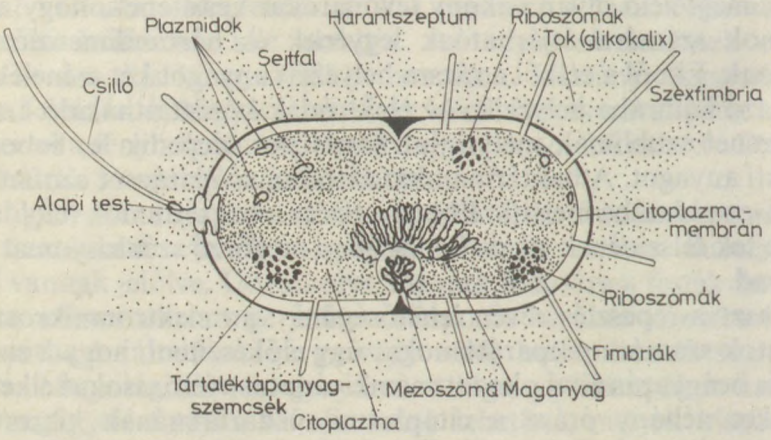
Fagyasztva-repesztés révén lehetőségünk van elektronmikroszkópos vizsgálatok számára preparátumokat úgy előkészíteni, hogy a szokásos fixálás és beágyazás által okozott nemkívánatos változásokat elkerüljük. A sejteket néhány órára a citoplazma víztartalmának kiszorítására 20–30%-os glicerinbe helyezzük. Ezután a preparátumot túlhűtött freonban egy másodperc alatt − 100 °C-ra hűtjük. A fagyott minta metszhető,

bár ennél a hőmérsékletnél sima metszeteket nem kapunk. A sejt különböző rétegeinek megfelelően a metszet felszínén szakadások, tépődések keletkeznek. Vákuumba helyezve a minta mintegy 10–20 nm mélységig jégmentes lesz és a sejt struktúrái a metszet mentén feltárulnak. E felületről a következő lépésben készült karbon- és platinalevonatok a sejt struktúrájának finom, részletekbe menő tanulmányozását teszik lehetővé.

Élő baktériumok mikroszkópos megfigyelését legegyszerűbb módon tárgylemezre cseppentett, majd fedőlemezzel takart baktériumszuszpenzióval végezhetjük. Mozgásképességük megfigyelésére vájt tárgylemezt használunk. Ekkor a szuszpenzió egy cseppjét fedőlemezre helyezzük, majd ezt megfordítva a vájulat fölé illesztjük. Ajánlatos a függőcseppet a külső légtértől a vájulat körszegélyére kent vazelinnel elzárni és így párolgását csökkenteni.

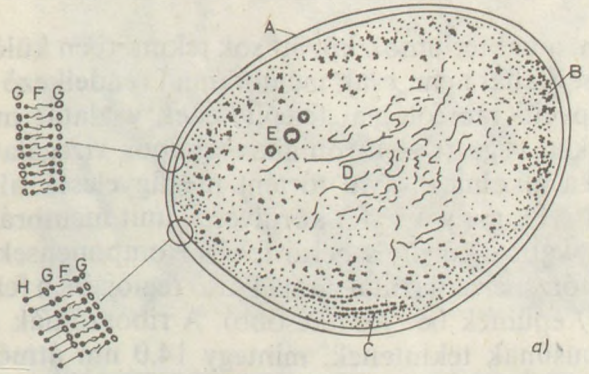
1.13.7. A baktériumsejt legfontosabb szerkezeti elemei

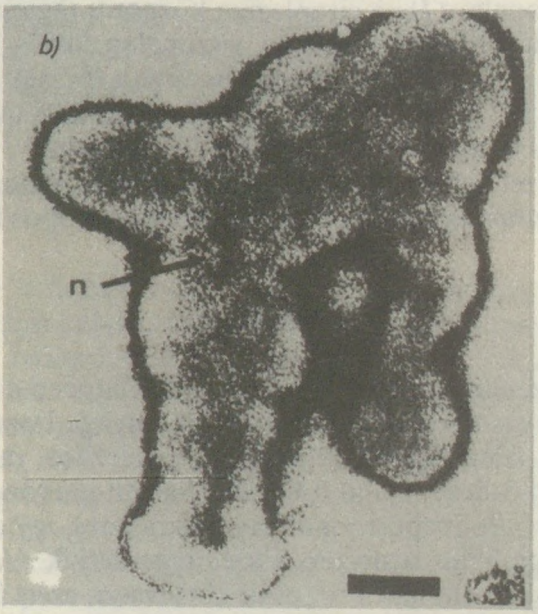
Az átlagos baktériumsejt vázlatos szerkezetét a *13. ábra* mutatja be. A sejtet kívülről a legtöbbször kolloidális természetű poliszacharidokból álló nyálkás burok, a tok veszi körül. A tok alatt az elasztikus, bár eléggé rideg sejtfal található, mely a baktérium állandó alakját biztosítja és ellenáll a citoplazmában uralkodó többatmoszférás nyomásnak. A protoplaszt, vagyis a sejt legfontosabb központi részét képező maganyag + citoplazma, továbbá a sejtfal között a citoplazmamembrán helyezkedik el. Ez igen vékony (0,1 μm alatt) képlet és rendkívül fontos szerepe van a sejtbe befelé és az abból kifelé haladó anyagforgalom szabályozásában.



13. ábra
Az átlagos baktériumsejt szerkezetének vázlata

A mezoszómák a hártya gomolyszerű betüremkedései, melyek többek között az osztódásnál a harántszeptum kialakulásában vesznek részt. A finoman szemcsézett citoplazma igen gazdag riboszómákban, továbbá különböző tartaléktápanyag-szemcséket (keményítő, glikogén, polifoszfát, zsírnemű anyagok stb.) tartalmaz. A csillók vagy flagellumok az





14. ábra

a) A *Mycoplasma*-sejt felépítésének vázlata. *b)* Az 1985-ben felfedezett *Mycoplasma pirum* HRC 70–159 jelzésű törzse egy sejtjének elektronmikroszkópos felvétele (× 150 000). Negatívan festett készítmény. A vonás 100 nm-t jelöl. E mikroba sejtjeinek felületét nagyon finom részecskékből (kb. 3 nm) álló „bolyhos" bevonat (n) borítja. E faj törzseit sejtkultúrákból nyerték (Del Giudice és munkatársai után, 1985)

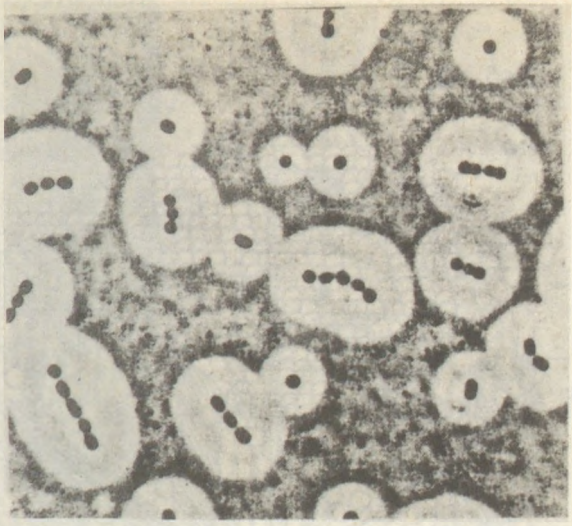
aktív mozgás hatékony szervecskéi. Mindezeket a szerkezeti elemeket a továbbiakban részletesen tárgyaljuk.

A baktériumok struktúraelemei között a maganyagot, a citoplazmát és ennek membránját, továbbá a sejtfalat nélkülözhetetlen létfontosságú elemeknek tartják. Az ún. járulékos képletek, mint amilyenek a csillók, a fimbriák, a spóra és a tok hiánya még nem feltétlenül okozza a sejt pusztulását.

A *14. a. ábra* a baktériumok között sok tekintetben különleges helyzetet elfoglaló, sejtfallal nem, csak membránnal rendelkező *Mycoplasmák* egy sejtje alapvető morfológiai felépítésének vázlatát mutatja be, vékonymetszeteken végzett elektronmikroszkópos vizsgálatok és negatív festési technika alkalmazásával történt megfigyelések alapján. Az ún. plazmalemma *(A)*, mely a sejtet körülveszi, unit membrán lipid-kettősréteget *(F)*, továbbá külső és belső fehérjekomponenseket *(G)* tartalmaz. Néhány törzsnél a plazmalemma külső régiójába a felületből kinyúló elemek *(H)* épülnek be *(lásd* később). A riboszómák *(B)*, melyeket bakteriális típusúnak tekintenek, mintegy 14,0 nm átmérőjűek. Egyes elektronmikroszkópos felvételeken a riboszómák a citoplazmában helikális vagy lineáris sorrendben elrendeződve figyelhetőek meg *(C)*. A DNS finom fonalai *(D)* a citoplazma központi régiójában helyezkednek el. Ezek előfordulási területén viszonylag kevés riboszóma van. A DNS cirkuláris, és méretét, figyelembe véve a törzsek közötti eltéréseket, 5×10^8–5×10^9 dalton közötti értékekre becsülik. A citoplazmában mintegy 18,0–60,0 nm átmérőjű gömbölyű részecskék *(E)* is megfigyelhetők. Ezek összetétele és működése ma még nem ismert. A *14. b. ábra* a *Mycoplasma pirum* egy sejtjének elektromikroszkópos felvételét mutatja be.

1.13.8. A tok

A tápközeg összetételétől és más faktoroktól függően a baktériumsejtet nyálkás, kocsonyás tok veheti körül. A tok anyaga homo- vagy heteropoliszacharid és felépítésében főleg glükóz, galaktóz, ramnóz, mannóz, glükonát, 2-keto-3-dezoxigalaktonát és N-acetil-glükóz-amin-monomérek vesznek részt. Polipeptid tokanyag is ismeretes, így a *Bacillus* fajoknál. A tokot legjobban tusfestéssel szemléltethetjük *(15. ábra)*. Minthogy a tus a tokba nem hatol be, csak körülveszi, ezért fekete háttérben a sejteket tok alkotta világos udvar határolja. Rendkívül fontos tény, hogy a tokos baktériumokat nemcsak amorf tokalapanyag övezheti, hanem a poliszacharid- vagy fehérjekomponensek ökológiai jelentőségű fibrilláris elemeket, és ezekből meghatározott orientációjú szövedékeket alkothatnak. A tok jelenléte a baktérium számára nem létkérdés. Mind-

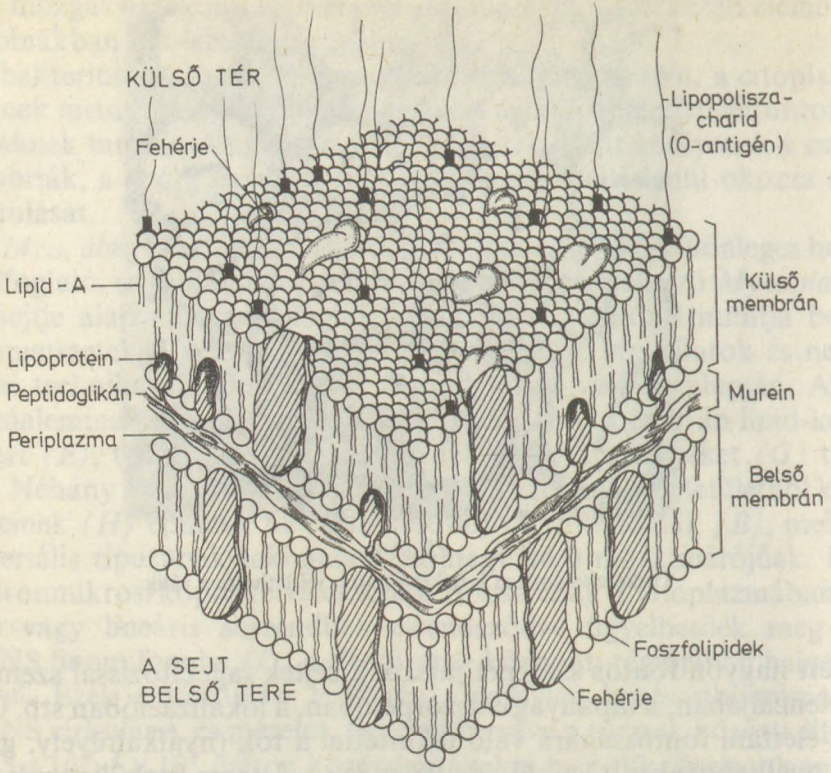


15. ábra
Tuskészítményben a baktériumtok jól láthatóvá válik

emellett nagyon fontos szerepet játszik a sejtek fagocitózissal szembeni rezisztenciájában, a tápanyag-adszorpcióban, a lokalizációban stb. Ökológiai-élettani fontosságára való tekintettel a tok (nyálkahüvely, glikokalix, nyálkaburok stb.) biológiájával még részletesen foglalkozunk (*lásd* 861. old.).

1.13.9. A sejtfalról általában

A sejtfal, mely a baktériumok külső, nagymértékben rigid, alaktartó vázát, kültakaróját képezi, a tok és a citoplazmamembrán között helyezkedik el, és a baktériumsejt létfontosságú alkatelemének tekinthető. Kémiai összetétele a prokarioták különböző csoportjaiban rendkívül eltérő. A fal lehet primitív, egyszerű felépítésű, mint az ún. archaikus baktériumoknál, ahol vagy nincs is igazi szilárd sejtfal, hanem csak fehérje-alegységek laza külső burka *(Methanococcus)*, vagy nem teljesen ismert összetételű, egyszerű heteropoliszacharid takaró *(Methanosarcina)* stb. Már sokkal célszerűbb felépítésű az ún. klasszikus baktériumok között a GRAM-pozitívaknak a sejtfala, amit alapjában véve egyetlen vastag peptidoglikán-réteg alkot. A peptidoglikán bonyolult hálózatát az N-acetil-glükóz-amin és az N-acetil-muraminsav 1–4 kötéssel váltakozva kapcsolódó egységeinek fonalaihoz mint aminocukor-gerinchez csatlakozó peptidoldalláncok és az ezeket keresztkötéssel egymáshoz rögzítő átellenes peptidhidak rendszere alkotja. A fal a legbonyolultabb,

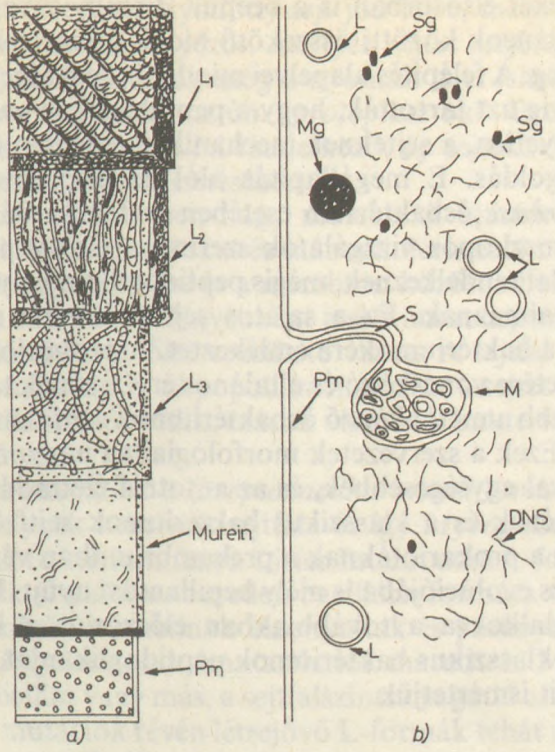


16. ábra

Az *Escherichia coli* sejttakarója. E vázlat egyúttal az *Enterobacteriaceae* család tagjaira általánosan jellemző sejttakaró szerkezetét is szemlélteti (SINGER és NICOLSON, 1972; SMIT és munkatársai, 1975; RAETZ, 1978)

és az evolúciós ranglétrán legmagasabb szintre fejlődött a GRAM-negatív baktériumoknál (pl. *Enterobacteriaceae*), ahol a peptidoglikán (vagy más néven murein) csupán egyetlen molekularéteg vastagságúvá redukálódott, ezt azonban kifelé egy külső unit membrán takarja *(16. ábra)*, melyhez még egy legkülső lipopoliszacharid-réteg is csatlakozik. Az ilyen fal a mikroba és környezete között már sokkal komplexebb, sokoldalúbb és szelektívebb kapcsolatot tesz lehetővé. Az ilyen mikrobák információtartalma is jelentősen gazdagabb.

A *17. ábrán* BARKSDALE és KIM (1977) után kiterjedt elektronmikroszkópos vizsgálatokra alapítva a *Mycobacterium*-sejt sejttakarójának vázlatát mutatjuk be. A citoplazmát közvetlenül a citoplazmamembrán (Pm) határolja. E felett helyezkedik el a tulajdonképpeni mureinréteg, vagy más néven peptidoglikán (Mur). Utóbbin a rostos, kötélzetszerű L_3-megjelölésű falréteg települ, mely szinte összeolvadni látszik a sokkal durvább felületi L_2-réteggel. Az L_2-réteg közvetlenül a felszíni glikoli-



17. ábra

A *Mycobacterium*-sejt kültakarójának és citoplazmájának vázlatos szerkezete elektronmikroszkópos vizsálatok alapján (BARKSDALE és KIM, 1977)

pid- vagy peptidoglikolipid (L_1-)réteg alatt található. A citoplazmamembránról a citoplazma felé szeptum *(S)* növekedik, mely többszörös gyűrődéssel a mezoszómát hozza létre *(M)*. A mezoszóma a nukleoid-DNS magállományával társul. A citoplazmában polifoszfát-szemcsék (*Mg:* metakromatikus granulumok), lipoidális testek *(L)* és bizonyos, nagy sűrűségű granulumok *(Sg)* ugyancsak megfigyelhetők.

A *16.* és a *17. ábrá*k összehasonlítása világosan szemlélteti, hogy még a fejlődés magasabb szintjére jutott baktériumok sejtkültakarójának a szerkezetében is milyen jelentős különbségek vannak. Alapvető megállapítás, hogy a „klasszikus prokarioták" (valamennyi valódi GRAM-pozitív és -negatív baktérium, továbbá a cianobaktériumok) sejtfalának felépítésében, szemben az ősbaktériumokkal, mindig murein (peptidoglikán) vesz részt. Az ősbaktériumok (*Methanobacterium*ok, *Sulfolobus*ok, *Halobacterium*ok stb.) nagy csoportjában típusos peptidoglikán, vagyis murein nem fordul elő. Ma már több mint 100 peptidoglikán-típust

ismerünk, melyeket elsősorban is a beépült diaminosavak tekintetében és a peptidoldalláncok közötti összekötő hidak összetételét illetően különböztetünk meg. A felépítés alapelvei mindenütt egységesek, és egészen a legutóbbi időkig azt tartották, hogy a peptidoglikán valamennyi prokariotánál az egyetlen, a sejteknek mechanikai védelmet nyújtani képes strukturális megoldás. E megállapítás alól az első kivételt a halofil *Halococcus morrhuae* ősbaktérium esetében észlelték. Bár ennek sejtjei az elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint, a GRAM-pozitívakra jellemző vastag fallal rendelkeznek, mégis peptidoglikán helyett heteropoliszacharidot tartalmaznak. Ez a sajátos sejtfal inkább a vörös algák falára, mintsem a baktériumokéra emlékeztet. A prokarioták sablonszerű sejtfalszerkezetére vonatkozó és általános érvényűnek tartott elképzeléseinket leginkább a metánképző ősbaktériumok sejtfalanalízis-eredményei dúlták fel. Ezek a szervezetek morfológiailag nagyon sokfélék, bár fiziológiailag jóval egységesebbek, és az autotróf életmódra elkötelezettek. A metanogének és a klasszikus baktériumok sejtfalszerkezetének összehasonlítása a prokariotáknak a prekambriumban végbement differenciálódásába és evolúciójába is mély bepillantást nyújt. E kérdéskörrel behatóbban foglalkozva a továbbiakban először is a legelterjedtebb sejtfalsablont, a klasszikus baktériumok peptidoglikánját, továbbá ezek sejtfalszerkezeteit ismertetjük.

1.13.10. Szferoplasztok,* protoplasztok, L-alakok és minisejtek

A sejtfal, mely a baktériumsejt alakját határozza meg, nem szemipermeabilis (féligáteresztő) és enzimeket nem tartalmaz. Hibátlan felépülése a normális sejtműködés szempontjából esszenciális fontosságú. A sejtfal merevsége teszi lehetővé, hogy a baktérium az ozmotikus koncentrációk változásának széles skáláját élhesse túl, mivel a citoplazma a fal merev ellenállása miatt nem tud kiterjedni. Ha az élő sejt falát enzimatikus úton eltávolítják, úgy a citoplazmamembrán és legfeljebb falnyomok által

* A szferoplasztok előállításának egyik technikáját, melyet a *Rhodospirillum rubrum* aerob–sötét vagy anaerob–fény kultúrái esetén egyaránt sikerrel alkalmazhatunk, DREWS (1983) után itt közöljük: Először is a tenyészetet centrifugálják és az így nyert sejttömeget foszfát-pufferrel (0,01 M, pH 7,0) és 0,05%-os etilén-diamin-tetraacetáttal (EDTA; Na-só) mossák, majd ezt követően ugyanebben a pufferben, megfelelő sejtsűrűség elérésére törekedve, reszuszpendálják. A kapott sejtszuszpenzió 10 ml-ét 9,6 ml foszfátpuffer, EDTA és 5 ml 50%-os szacharózoldat elegyével egészítik ki. 20 perc elteltével még 0,4 ml lizozimoldatot (5 mg lizozim/2 ml puffer) is adagolnak, ezzel két percig várnak és a kezelt szuszpenziót hirtelen fagyasztják. – 70°C-on akár néhány hétig is tárolható. A szferoplasztok előállítása céljából a szuszpenziót vízfürdőn (35°C) megolvasztják. A meginduló szferoplasztképzést 45 perc után szakítják meg. Ilyenkor fáziskontrasztmikroszkópban már számtalan sötét legömbölyödött sejt-képződmény figyelhető meg. Az ilyen szuszpenziót desztillált vízzel hirtelen hígítva, az ozmotikus nyomásnak már ellenállni nem képes szferoplasztok szétrepednek és szétfolynak.

határolt szférikus (legömbölyödött) sejt jön létre, mely szétrobban, ha hipotónikus környezetbe helyezik. Az ilyen sejtet „*szferoplasztnak*" nevezik. Egyes fajoknál a falnak még a nyomait is el lehet távolítani. Az ilyen abszolút csupasz sejtek az ún. „*protoplasztok*". Ezek tanulmányozása és összehasonlítása a fallal rendelkező, ép sejtekkel sok segítséget jelent a fal funkcióinak felderítésében.

Jóllehet a fal meglehetősen nagy molekulák számára is átjárható, mégis nukleázokat, foszfatázokat és más celluláris enzimeket visszatarthat. Az enzimek ugyanis a fal és a membrán között elhelyezkedő periplazmában fogva maradnak. Egyébként a sejt immunspecifitása jórészt a fal sajátos kémiai összetevőire vezethető vissza. A sejtfal egyes alkatelemei, mint pl. a teichosav és a lipopoliszacharidok, a sejtet exogén eredetű lítikus enzimek hatásától védik, mások viszont a bakteriofágok kötődését teszik lehetővé.

1935-ben KLIENEBERGER a *Streptobacillus moniliformis* egy olyan törzsét izolálta, melynek nem volt sejtfala és így *Mycoplasmá*hoz hasonlított. A fal nélküli baktériumokat a Lister Intézet után L-formának nevezték el, és bár ezek általában az eredeti bacilláris formára visszaváltoztak, mégis egyesek közülük stabilnak bizonyultak és parányi kenhető kolóniák alakjában folyamatosan fenntarthatók maradtak. Mivel faluk nem volt, ezért a penicillin vagy más, a sejtfalszintézist gátló antibiotikum sem hatott rájuk. A mutációk révén létrejövő L-formák tehát igen kellemetlenek lehetnek, ha a mikróba patogén.

Amennyiben a penicillinnel vagy lizozimmal előállított szferoplasztokon egy kevés sejtfal visszamarad, úgy a tapasztalat szerint e két ágens hatásának megszűnésével a sejt képes újra felépíteni sejtfalát. Ha viszont a falnak még a nyomai is eltűntek *(protoplaszt)*, úgy a sejt új falat többé már nem regenerál, és belőle az L-formákhoz hasonló alakok jönnek létre. Az ilyen sejtek méretükben ugyan növekednek, osztódni azonban nem képesek. Amennyiben e sejteket 0,8% agart tartalmazó ún. lágyagar tápközegre visszük át, mely számukra bizonyos mérvű „szilárd támaszt" nyújt, úgy osztódnak és sejtfallal nem rendelkező utódokat hoznak létre. Az ilyen L-formaváltozatok hosszú időn keresztül stabilak maradhatnak, szaporodásuk azonban csak akkor észlelhető, ha tenyésztésük lágyagarban történik. Bizonyos fajoknál, mint pl. a *Bacillus subtilis*nél, megtörténhet a visszaalakulás is az eredeti fallal rendelkező formába. Ilyen reverzió különösen zselatin nagy koncentrációjának, keményagarnak, membránszűrőnek vagy sejtfalfragmentumoknak a jelenlétében váltható ki (LEVY és munkatársai, 1973).

A pálcika alakú baktériumok rendellenes sejtosztódásai alkalmával úgynevezett *„minisejtek" (minicells)* jöhetnek létre. Ezek kicsinyek és sejtmagot nem tartalmaznak. Jóllehet a vad típusú baktériumok tenyé-

szeteiben minisejtek csak ritkán figyelhetők meg, azonban mutáns törzsek szaporodása alkalmával folyamatosan keletkezhetnek. Ilyen minisejt-termelő mutánsokat nyertek az *Escherichia coli*ból, különböző *Salmonella*-fajokból, *Bacillus subtilis*ből stb.

A minisejtek felhasználhatók pl. a citoplazmamembrán komponensei megoszlásának tanulmányozásánál, minthogy ezek membránjai elsősorban is szeptumokat képviselnek, míg a komplett sejtek membránjai szeptum anyagokat csak kis mértékben tartalmaznak és oldalfalakban gazdag sejtekből származnak. A minisejtek és a komplett sejtek membránjait összehasonlítva fény derülhet nemcsak a membránszerkezet néhány jellemvonására, hanem a pálcika alakú baktériumok sejtosztódásának folyamatára is. A *Bacillus subtilis* BD474-törzs esetében a teljes sejtek membránjai több penicillinkötő proteint, glicerin-3-foszfát-dehidrogenázt, szukcinát-dehirogenázt és NADH-dehidrogenázt tartalmaznak, mint a minisejt membránok (SHOHAYEB és CHOPRA, 1985). Ezzel szemben kevesebb laktát- és malát-dehidrogenázt. A minisejtek petidoglikán szintézisére képesek, amit ^{14}C-jelzésű acetil-glükózamin beépítésével tanulmányoztak. Ennek a beépítésnek a mértéke azonban csak 5%-a a komplett sejtek membránjával észleltnek. Mindkettő membránjai azonos poláros lipideket és zsírsavakat tartalmaznak, azonban a teljes sejtek foszfatidil-glicerinben és diglikozil-diacil-glicerinben gazdagabbak, ellenben foszfatidil-etanol-aminban hiányosabbak.

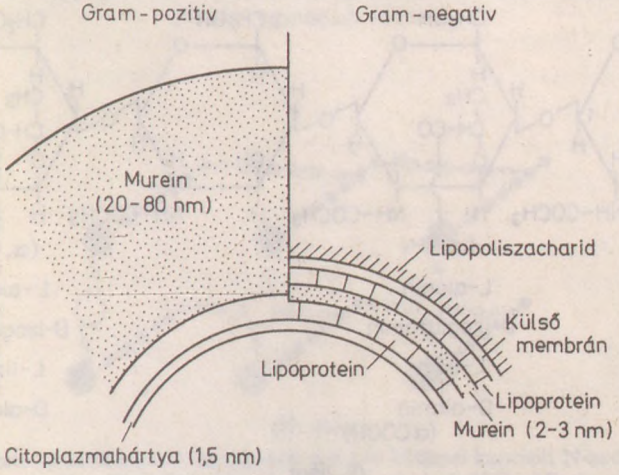
1.13.11. Az eredendően fal nélküli szervezetek

A *Mycoplasma* a prokarioták olyan genusza, ahol a sejtfal hiányzik és ezért e szervezetek pleomorfok. Más prokariotáktól abban különböznek, hogy közülük több faj szterineket igényel, melyeket membránjukba építenek be. Más fajok membránja karotinoidokat tartalmaz. Amint elvárható, nem érzékenyek azokkal az antibiotikumokkal szemben, melyek a sejtfal szintézisét gátolják (pl. penicillin, cikloszerin). Annak ellenére, hogy fallal nem rendelkeznek, viszonylag érzéketlenek az ozmotikus nyomás változásaival szemben. Agarlemezeken parányi kolóniákat képeznek. Amőboid jellegűek. Agarban csomós, hálózatos, göbös struktúrákat alkotnak. Éppen e sajátosságaik folytán, viszonylag könnyen hatolnak át baktériumszűrőkön, ami miatt a vírusokkal is összetévesztették őket. Kezdetben mint *Pleuropneumonia*-szerű szervezetek (PPLO) váltak ismertté, mivel jelenlétüket először bovin *pleuropneumonia* izolátumokban figyelték meg. E genusz egyes ártalmatlan tagjai az emberben is előfordulnak. A *Mycoplasmák*on kívül több más, eredendően fal nélküli baktériumgenuszt is ismerünk. Ilyen pl. a *Thermoplasma*, melynek ismertetésére a későbbiek során (*lásd* 513. old.) visszatérünk.

1.13.12. A murein (peptidoglikán)

A sejtfal kémiai összetétele és szerkezete egyike a baktériumfajok legfontosabb megkülönböztető bélyegeinek. A murein, vagyis a baktériumsejt külső merev takarója biztosítja a sejt fajra jellemző alakját és a citoplazma „fűzőjeként" is szerepel. Feltehetően a GRAM-negatív sejtek esetében a mureinréteg vastagsága csupán egy peptidoglikán-molekuláénak felel meg, és emiatt viszonylag igen vékony, mindössze kb. 10%-át teszi ki a fal szárazanyagának (COSTERTON és munkatársai, 1974). A GRAM-pozitívaknál a murein vastag homogén struktúra, mégpedig sokkal vastagabb, mint a GRAM-negatívak sejtfalának valamennyi rétege együttvéve *(18. ábra)*. Amikor gátolt fehérjeszintézis következtében a GRAM-pozitív baktériumok növekedésében zavarok jönnek létre, és a sejtosztódások száma megritkul, a sejtfal szintézise még intenzíven tovább folytatódhat. Ilyenkor a fal rendkívül megvastagodik. Hasonló kiegyensúlyozatlan növekedési körülmények között a GRAM-negatív baktériumok sejtjeinek külső felületén a fölös mennyiségben szintetizált lipopoliszacharidok parányi gömbök alakjában figyelhetők meg. Bár a GRAM-pozitív baktériumok fala nem rendelkezik elkülönült lipoprotein és poliszacharid rétegekkel, mégis ez sem tisztán csak mureinből épül fel.

A mureinréteg, mely mint mukopeptid, peptidoglikán, mukopoliszacharid vagy glikopeptid is ismeretes, *Mycoplasmák* és az ősbaktériumok kivételével a klasszikus prokariota sejtekre jellemző. A murein alapvető

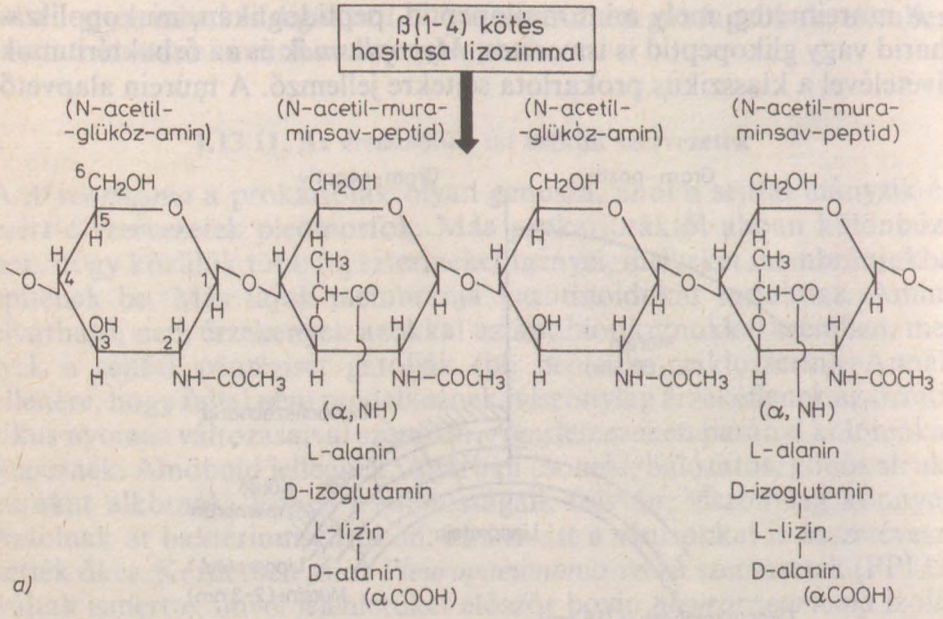


18. ábra

A GRAM-pozitív és a GRAM-negatív baktériumok sejtfalának vázlatos összehasonlítása. Az első esetben a fal egyetlen, igen vastag mureinrétegből áll. A GRAM-negatívak vékonyabb falát több eltérő összetételű és jellegű réteg alkotja

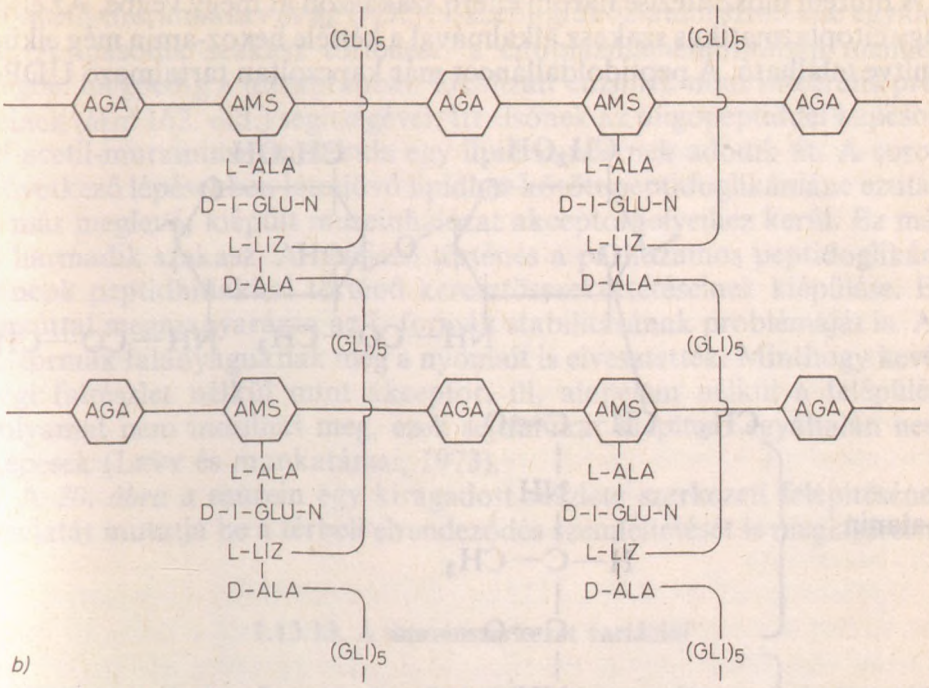
komponensei az N-acetil-glükóz-amin és az N-acetil-muraminsav 1–4 kötéssel váltakozva kapcsolódó molekuláinak láncai *(19. ábra)*. A muraminsav a glükóz-aminnak tejsavval alkotott –3–0– étere. Az N-acetil-muraminsav-molekulákhoz kötődő tejsav szabad karboxilcsoportja rövid oligopeptidet köt meg, így muropeptidek jönnek létre. A „peptidoglikán" megnevezés is az aminocukor-gerincre és a hozzá csatlakozó peptidoldalláncokra utal. A „murein" megnevezés pontosan abban az esetben használható, midőn már a peptidoglikán szomszédos, párhuzamos fonalai peptidek alkotta hidak révén összekapcsolódnak és hálózatot, strukturális egységet képeznek. A hídalkotó peptidek nem azonosak a muraminsavról lelógó oligopeptid-oldalláncokkal. Ez utóbbiak a híd szerepét betöltő peptidet az aminocukor-gerinchez erősítik. A peptidoldalláncok aminosavkomponensei közül különben egyesek nem természetes, D-konfigurációjúak lehetnek, ami egyébként a prokarioták kizárólagos tulajdonsága. A *Staphylococcus aureus* mureinjének építőegységét a 124. oldalon mutatjuk be.

Megfelelő módszerekkel a sejtfal felszakítható, abból a citoplazmamembrán, a citoplazma és más strukturális elemek eltávolíthatók, és az üres fal elkülönítve tanulmányozható.

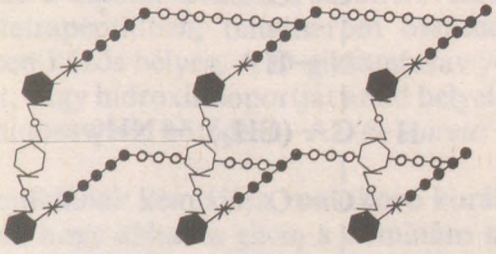


19. ábra

Részletek a *Staphylococcus aureus* mureinjéből. A polimer gerincét az N-acetil-glükóz-amin és az N-acetil-muraminsav *β* (1–4)-kötéssel váltakozva kapcsolt alegységei alkotják. A muraminsav komponensek rövid peptideket kötnek meg, melyek összetétele baktériumfajonként változó. Bizonyos fajokban az L-lizint diamino-pimelinsav helyettesíti, mely különben kizárólag prokarioták



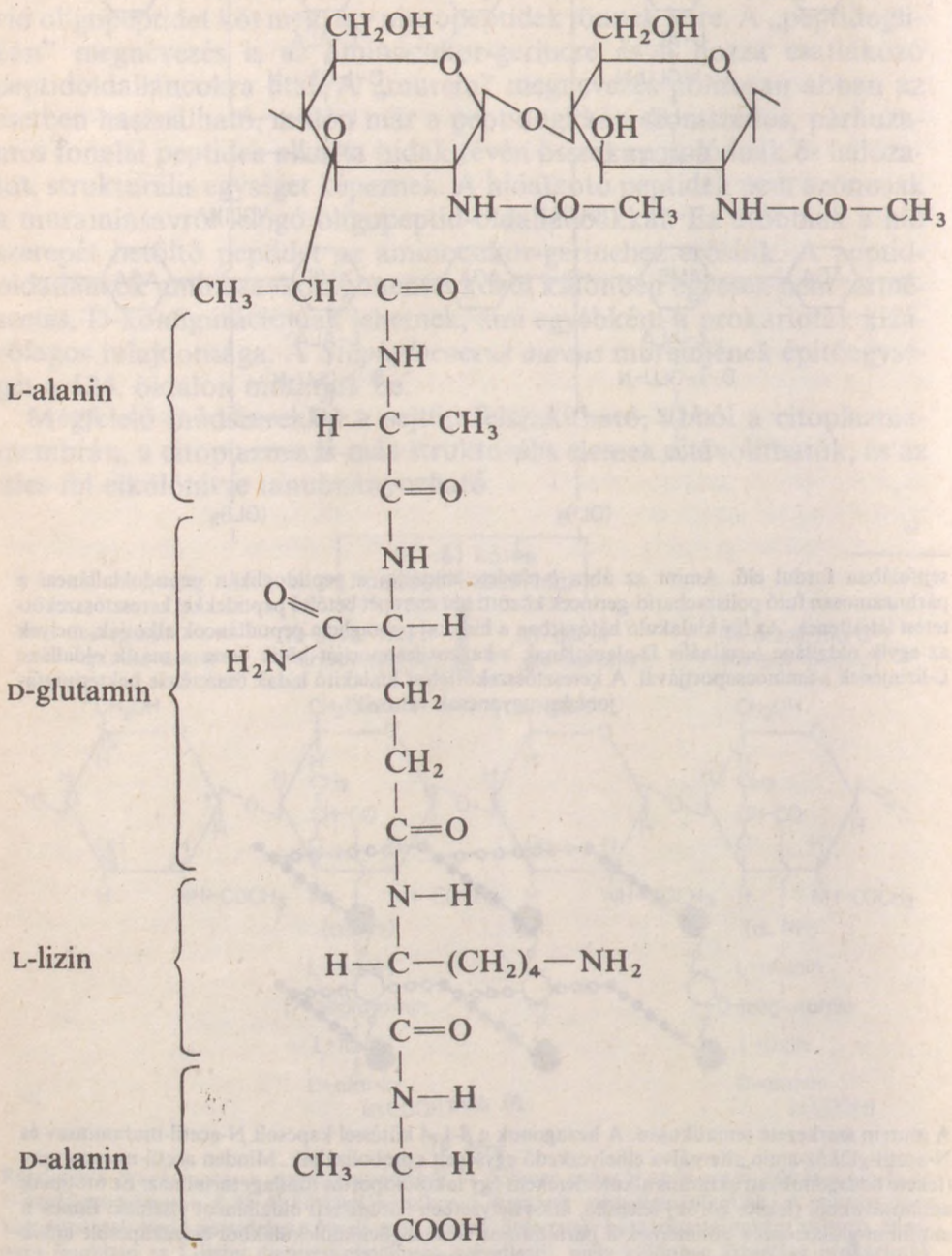
sejtfalában fordul elő. Amint az ábra *b*-részlete mutatja, a peptidoglikán peptidoldalláncai a párhuzamosan futó poliszacharid-gerincek közötti híd szerepét betöltő peptidekkel keresztösszeköttetést létesítenek. Az így kialakuló hálózatban a hidakat pentaglicin peptidláncok alkotják, melyek az egyik oldallánc terminális D-alaninjának α-karboxilcsoportját kötik össze a másik oldallánc L-lizinjének ε-aminocsoportjával. A keresztösszeköttetést kialakító hidak összetétele baktériumfajonként ugyancsak változik



20. ábra

A murein szerkezete sematikusan. A hexagonok a β-1–4 kötéssel kapcsolt N-acetil-muraminsav és N-acetil-glükóz-amin alternálva elhelyezkedő egységeit szimbolizálják. Minden acetil-muraminsav (fekete hexagonok) strukturális alkotóelemként egy laktilcsoportot (csillag) tartalmaz. Ez utóbbiak aminosavakból (fekete körök) felépülő, átlós helyzetben feltüntetett oldalláncot viselnek. Ennek a muramin-glükóz-amin polimernek a párhuzamos láncait glicinmolekulákból összekapcsolt hidak kötik össze

A murein bioszintézise három eltérő szakaszon át megy végbe. Az első vagy citoplazmatikus szakasz alkalmával a kétféle hexoz-amin még elkülönítve található. A peptidoldalláncot már kapcsoltan tartalmazó UDP-



N-acetil-muraminsav és az UDP-N-acetil-glükóz-amin szintézise egyidejű. A második szakasz történései a citoplazmamembránban mennek végbe, mégpedig a membránban lokalizált enzimek mint integráns proteinek (*lásd* 162. old.) segítségével. Itt elsőnek az oligopeptiddel kapcsolt N-acetil-muraminsavmolekula egy lipid karriernek adódik át. A soron következő lépésekben létrejövő lipidhez kötött peptidoglikánlánc ezután a már meglevő, kiépült mureinhálózat akceptorhelyeihez kerül. Ez már a harmadik szakasz. A befejező történés a párhuzamos peptidoglikánláncok peptidhidakkal történő keresztösszeköttetéseinek kiépülése. Ez egyúttal megmagyarázza az L-formák stabilitásának problémáját is. Az L-formák falanyaguknak még a nyomait is elvesztették. Minthogy kevés régi falrészlet nélkül mint akceptor, ill. alapelem nélkül a felépülési folyamat nem indulhat meg, ezek sejtfalukat kiépíteni egyáltalán nem képesek (LEVY és munkatársai, 1973).

A *20. ábra* a murein egy kiragadott részlete szerkezeti felépítésének vázlatát mutatja be a térbeli elrendeződés szemléltetését is megkísérelve.

1.13.13. A mureinszerkezet variációi

Jóllehet, az alapvető szerkezeti felépítés számos változatát is ismerjük (SCHLEIFER és KANDLER, 1972), mégis a *Staphylococcus aureus*, a *Micrococcus lysodeiktus* és az *Escherichia coli* mureinjeinek összehasonlítása fényt vethet bizonyos lényeges különbségekre. Feltehetően az *S. aureus* sejtfalában minden egyes N-acetil-muraminsav-molekula rendelkezik egy négy aminosavból felépített oldallánccal, mely laktilcsoportjához peptidkötéssel csatlakozik. Ezek az aminosavak, sorrendben a muraminsavtól kiindulva: L-alanin, D-glutaminsav, L-lizin és D-alanin. A laktilcsoporthoz kötődő L-alanin, továbbá a soron következő D-glutaminsav előfordulása a tetrapeptidben, mindhárom összehasonlításra kerülő baktérium esetében közös bélyeg. A D-glutaminsav γ-karboxilcsoportja vagy szabad lehet, vagy hidroxilcsoportját amid helyettesíti, vagy peptidkötéssel más aminosavhoz kötődhet. Az *S. aureus* esetében amiddal helyettesítődik.

Az *S. aureus* sejtfalának kémiájára vonatkozó korábbi kutatások már régen felderítették, hogy abban a glicin a domináns alkatelem. Ma már tudjuk, hogy a peptidoglikán párhuzamos láncait öt-öt glicinmolekulából álló hidak kötik össze. A glicinhíd peptidkötéssel csatlakozik az egyik alegységen levő lizin szabad ε-aminocsoportjához és a párhuzamos lánc peptidalegysége terminális D-alaninjának α-karboxilcsoportjához.

A különböző baktériumok mureinjei eltérnek azoknak a muraminsavmolekuláknak a számát illetően, melyekhez peptidalegységek kötődnek,

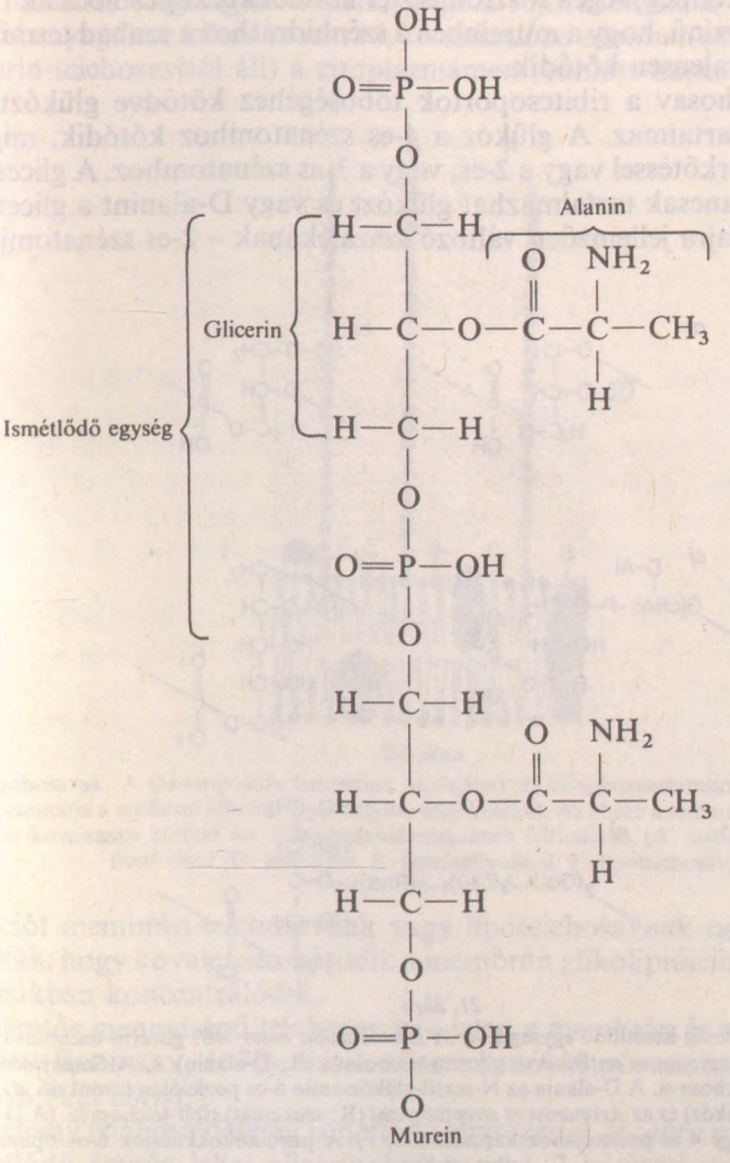
és különböznek azoknak a peptidalegységeiknek a számarányában is, amelyeket peptidhidak kötnek össze. Az *S. aureus*nál lényegében valamennyi muraminsav-molekulának van tetrapeptid-alegysége, és ezeknek a tetrapeptideknek mintegy 93%-a peptidhidakkal össze is van kötve. A keresztkötések ezen nagy száma következtében az *S. aureus* falát „szoros" struktúraként jelölhetjük meg. Jóllehet más baktériumok, mint pl. a *Micrococcus roseus, Streptococcus pyogenes* és a *Lactobacillus acidophilus* tetrapeptid-alegységeiben az aminosavszekvencia, az S. *aureus*éhoz hasonló, mureinjük mégis lazább, minthogy kevesebb muraminsav-molekulájuk visel ilyen tetrapeptidet. Azon felül a kereszthidak nem pentaglicinegységek, hanem L-alanint, L-treonint és D-izoaszparagint tartalmaznak. A híd különben, jóllehet a fajra jellemző, összetételében egyetlen aminosavtól öt aminosavig változhat, és ezáltal is a struktúra szorosságának különböző fokozatai állnak elő. Az *S. aureus* mureinjének további tulajdonsága, hogy az N-acetil-muraminsav-molekulák mintegy 50%-án a gyűrű 6. szénatomján a hidroxilcsoportot O-acetilcsoport helyettesíti.

A *Micrococcus lysodeiktus* GRAM-pozitív baktérium, következésképpen vastag mureinnel rendelkezik, és sejtfalában nincs elkülönült lipoprotein- vagy lipopoliszacharid-réteg. Mureinje alapvetően különbözik az ugyancsak GRAM-pozitív *S. aureus*étól, amennyiben abban a muraminsavmolekuláknak csupán 40%-a visel tetrapeptid-alegységeket. Bár ezeket az alegységeket az N-acetil-muraminsav és az N-acetil-glükóz-amin párhuzamos láncai között peptidhidak kötik össze, mégis e struktúrát a ritka „hálószövés" miatt „lazának" tekintik. Feltehetően ehhez a lazasághoz még az a tény is hozzájárulhat, hogy a peptidhídban, mely a *M. lysodeuctus* fajnál ugyanazon aminosavszekvenciával rendelkezik, mint maguk a tetrapeptid-oldalláncok, ezek a tetrapeptidek többszörös ismétlésben lehetnek jelen. A híd így 12 aminosavgyöknyi hosszúságot is elérhet, aminek révén az egymással összekötött, párhuzamos aminocukorláncok közötti távolság nagyon megnő (LEVY és munkatársai, 1973).

Az *Escherichia coli* mureinje, lévén ez GRAM-negatív baktérium, ultravékony: egyetlen molekularéteg vastagságú. Mureinjében oligopeptidalegység valamennyi N-acetil-muraminsavhoz csatlakozik. Ezeknek az oldalláncoknak a többsége tetrapeptid, némelyek azonban csak tripeptidek. Bennük a lizint diamino-pimelinsav helyettesíti. Csupán mintegy 50%-uk van keresztbe kapcsolva, a többi szabadon marad. Az összeköttetések kiépítésében az egyik aminocukorlánc tetrapeptidjei terminális D-alaninjainak karboxilcsoportjai, továbbá a másik párhuzamos lánc tetrapeptidjei diamino-pimelinsav-gyökeinek aminocsoportjai vesznek részt. Ezt a struktúrát is *„lazá"*-nak tekinthetjük.

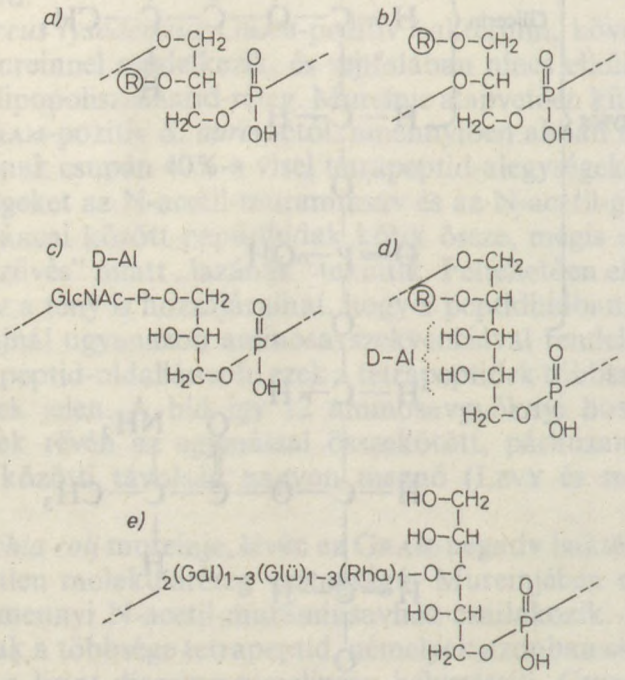
1.13.14. Teichosavak mint falszerkezeti elemek

A GRAM-pozitív baktériumok falának vastag mureinrétegébe a glicerin- vagy ribitfoszfátok, teichosavnak nevezett, vízoldékony polimerjei kovalens kötéssel épülnek be. A 2-es szénatomon alanint hordozó glicerin-teichosav szerkezetét itt mutatjuk be (e helyen különben glükóz is kötődhet):



Az *E. coli B* az egyetlen GRAM-negatív baktérium, mely teichosavat tartalmaz. A legtöbb GRAM-pozitív sejtfalban jelentős mennyiségű teichosav van, mely a fal szárazsúlyának 50%-át, a teljes sejt szárazsúlyának 10%-át teheti ki. Ezek a polimerek azonban nem járulnak hozzá a sejtfal merevítéséhez és nem is esszenciális fontosságúak a sejt számára. Mivel a GRAM-pozitív baktériumok sejtfala nem tartalmaz elkülönült rétegeket, a teichosav magába a murein struktúrájába épülhet be. A ribit- vagy a glicerinegységek foszfodiészter kötésekkel kapcsolódnak *(21. ábra)*, és valószínű, hogy a mureinben a szénhidráthoz a szabad terminális foszfát kovalensen kötődik.

A ribit-teichosav a ribitcsoportok többségéhez kötődve glükózt és D-alanint is tartalmaz. A glükóz a 4-es szénatomhoz kötődik, míg a D-alanin észterkötéssel vagy a 2-es, vagy a 3-as szénatomhoz. A glicerin-teichosav ugyancsak tartalmazhat glükózt és/vagy D-alanint a glicerinalegységek – fajra jellemzően változó százalékának – 2-es szénatomján.

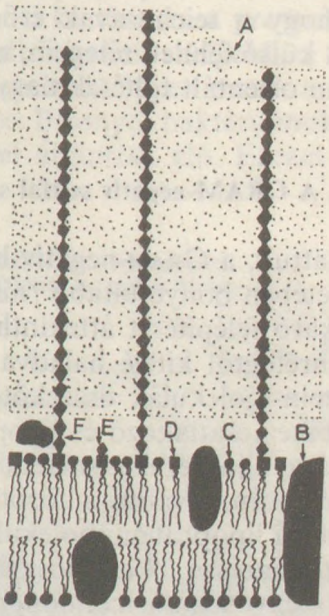


21. ábra

Néhány teichosavféleség ismétlődő egységei. *a)* A *Lactobacillus casei* 7469 glicerin-teichosava (R: D-alanin). *b)* A *Streptomyces antibioticus* glicerin-teichosava (R: D-alanin). *c)* A *Staphylococcus lactis* 13 glicerin-teichosava. A D-alanin az N-acetil-glükóz-amin 6-os pozícióján fordul elő. *d) Bacillus subtilis* (R: glükóz) és az *Actinomyces streptomycini* (R: szukcinát) ribit-teichosava. (A D-alanin a ribit 3-as vagy 4-es pozíciójához kapcsolódik.) *e)* A pneumokokkusztok 6-os típusának ribit-teichosava

Ha a monomer mind glükózt, mind alanint tartalmaz, úgy a glükóz az, amely a glicerinhez kötődik. Felépítésében a glükóztól eltérő más cukrok ugyancsak előfordulhatnak *(lásd 21. ábra)*. Bizonyos *Staphylococcus*ok teichosavja N-acetil-glükóz-amint és N-acetil-galaktóz-amint tartalmaz, melyek glicerinnel váltakozva épülnek be és képezik együttesen a molekula szerkezetének gerincét. A glicerin-teichosav gyakran nem mureinhez kötve, hanem szabadon, a periplazmában fordul elő.

A teichosav legnagyobb mennyisége a sejtfrakcionálás alkalmával a sejtfal anyagához kötődve marad, kis százaléka azonban (mely kizárólag glicerin-teichosavból áll) a citoplazmamembránhoz kapcsolódik. Ezt a



22. ábra

Lipoteichosavak. A GRAM-pozitív baktérium sejtfalának és citoplazmamembránjának modellje, mely bemutatja a sejtfalon áthatoló lipoteichosavmolekulákat. Az ábrán a murein muraminsavegységeihez kovalensen kötődő ún. falteichosavak nincsenek feltüntetve. (A: sejtfal. B: protein. C: foszfolipid. D: glikolipid. E: foszfoglikolipid. F: lipoteichosav)

frakciót membrán-teichosavnak vagy lipoteichosavnak nevezik, és azt találták, hogy kovalensen kötődik a membrán glikolipidjeihez és a mezoszómákban koncentrálódik.

Jelentős mennyiségű teichosav van jelen a membrán és a mureinréteg között (BADDILEY, 1972), feltehetően az utóbbi pórusaiba mintegy benyúlva *(22. ábra)*.

Néhány teichosavféleség ismétlődő egységeit a *21. ábra* mutatja be. Az ismétlődő egység lehet glicerin 1–3 vagy 1–2 kötéssel, lehet ribit 1–5

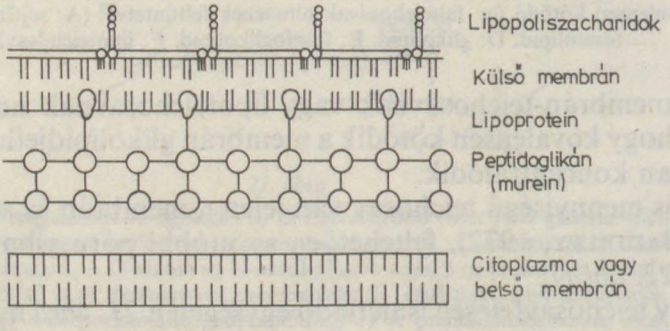
kötéssel kapcsolódva, vagy sokkal komplexebb egységek, amelyekben a glicerin vagy ribit olyan cukrokhoz kötődik mint a glükóz, galaktóz vagy az acetil-glükóz-amin. A láncok 30 vagy ennél több ismétlődő egységet is tartalmazhatnak, jóllehet általában a tíznél kevesebb egységű láncok a közönségesek.

A teichosavak funkcióját nem ismerjük. Azt azonban tudjuk, hogy kiváló antigének és gyakran a baktérium szerológiai specificitását biztosítják, ami arra utal, hogy ilyen esetekben a fal külső felületén helyezkedhetnek el (KNOX és WICKEN, 1973). Néhány baktériumban a bakteriofágok tapadási helyein találhatók. Más esetekben a murein belső oldalán lokalizáltak, így a sejtnek immunspecificitást már nem biztosítanak. Újabban feltételezik, hogy a teichosavak erősen befolyásolhatják az ionok áthatolását a sejt külső felületi rétegein, minthogy a sejtburokban jelenlétük a szabályosan orientált töltések nagy sűrűségét biztosítja.

1.13.15. A GRAM-negatív sejtfal szerkezete

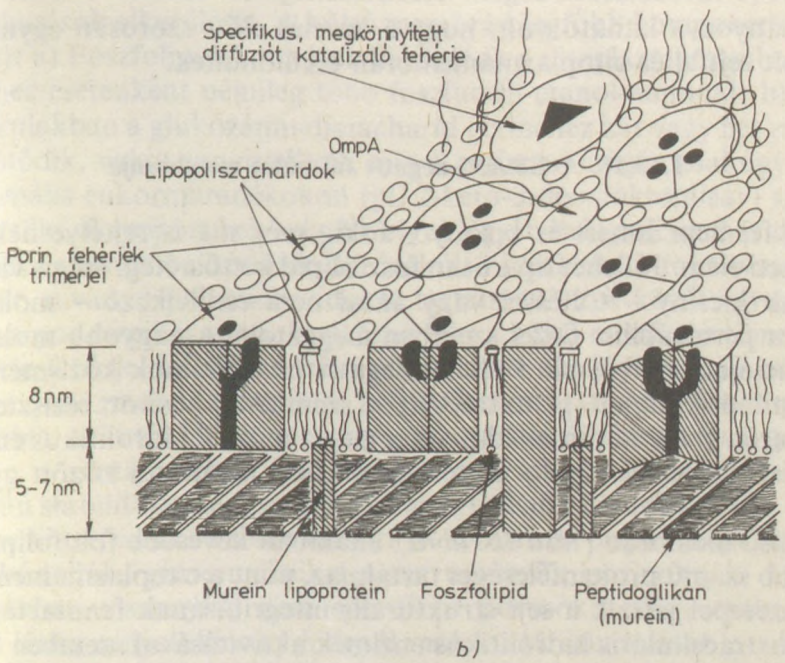
Mint a fentiekben láthattuk, a GRAM-negatív baktériumok sejtfala bár vékonyabb, de szerkezetében bonyolultabb *(lásd 23. ábra)*. A *23. ábra* a GRAM-negatív sejttakaró felépítését áttekinthetően mutatja be. Mint látható, a fal a mureinrétegtől kifelé haladva három további réteget tartalmaz: **1.** Lipoprotein-molekulák összekötő hálózatát. **2.** A külső membránt. **3.** Az előbbihez csatlakozó és lipopoliszacharidból felépült legkülső sejttakarót. Tárgyaljuk ezeket sorrendben!

A külső és a belső membrán, továbbá a közöttük elhelyezkedő murein között szokatlan felépítésű lipoprotein-molekulák létesítenek kétirányú összeköttetést. Ezek proteinrésze 57 aminosavból épül fel, melyben 15 aminosavgyök alkotta szekvenciák ismétlődnek, és a peptidoglikán tetrapeptid-oldalláncához kötődik. Az ellenkező irányú folytatását képező



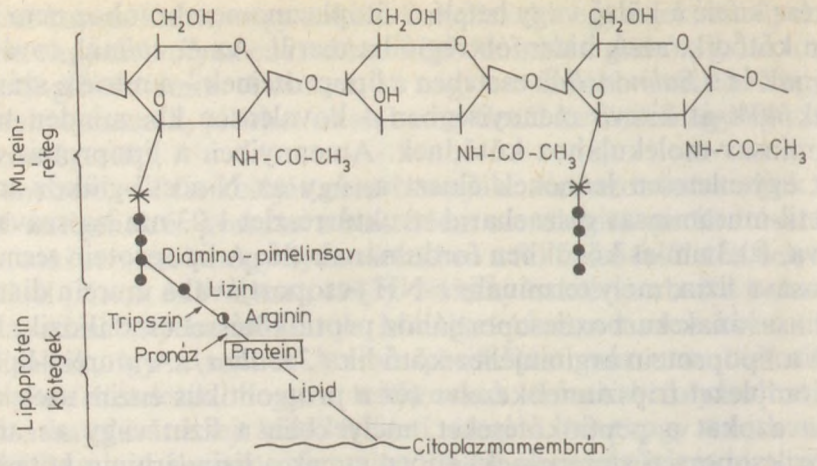
a)

lipidrész kifelé a külső vagy befelé a citoplazmamembránhoz nem kovalensen kötődik, azok hidrofób régióiba merül. Az *E. coli*nál, továbbá a *Serratiák* és a *Salmonellák* esetében a lipoproteinek – a murein szárazsúlyának 40%-át kitevő mennyiségben – kovalensen kb. minden tizedik muraminsav-molekulához kötődnek. Amennyiben a lipoprotein-molekulák egyenletesen lennének elosztva, úgy az N-acetil-glükóz-amin – N-acetil-muraminsav diszacharid struktúrrészlet 1,03 nm hosszával kalkulálva, 10,3 nm-es közökben fordulnának elő. A lipoprotein terminális aminosava lizin, mely terminális ε-NH_2-csoportjával a murein diaminopimelinsavának karboxilcsoportjához peptidkötéssel csatlakozik. Maga a lizin a lipoprotein argininjéhez kötődik *(24. ábra)*. A murein-lipoprotein komplexet tripszinnel kezelve (ez a proteolitikus enzim szelektíven hasítja azokat a peptidkötéseket, melyekben a lizin vagy az arginin karboxilcsoportjai szerepelnek) éppen ennek a lizin–arginin kötésnek a hidrolízise következik be. Bizonyos baktériumok tripszinnel kezelt sejtjeiből vékony metszeteket állítottak elő. Ezeket elektronmikroszkóppal



◄ *23. ábra*

a) A GRAM-negatív sejtek kültakarójának vázlatos szerkezete.
b) Az *Escherichia coli* és a *Salmonella typhimurium* külső membránjának vázlatos ábrázolása figyelembe véve NIKAIDO és VAARA (1985) membránszerkezeti elképzeléseit. A szerkezeti elemek nem teljesen méretarányosan szerepelnek. A specifikus transzportért felelős csatornát az egyszerűség kedvéért monomérnek tüntettük fel. A porin-proteinek feltehetően trimérek



24. ábra

A lipoproteinek feltehetően összeköttetést létesítenek a GRAM-negatív sejtfal mureinrétege és a citoplazmamembrán között is. Az ábrán a nyilak a tripszin és a pronáz támadási pontjait jelzik (LEVY és munkatársai, 1973)

tanulmányozva látható volt, hogy a kezelés előtt szorosan egymáshoz kapcsolt sejtfal és citoplazmamembrán elkülönültek.

1.13.16. A GRAM-negatív fal külső membránja

Sokáig fel nem ismert és bizonyos fokig még ma is rejtélyesnek tűnő szerkezeti elem. Jóllehet tipikusan foszfolipid kettősréteg, mégis viszonylag csak kicsiny – töltéssel vagy azzal nem rendelkező – molekulák számára permeábilis. Ezzel szemben meggátolja a nagyobb molekulák penetrációját, amiből pl. a GRAM-negatív baktériumok közismert, számos antibiotikummal (pl. aktinomicin) szemben tanúsított rezisztenciája következik. E membrán akadályozza meg a termelt hidrolitikus enzimek elszökését is, melyek így a murein és a külső membrán között gyűlnek össze.

A külső membrán *(lásd 16. ábra)* általában kevesebb foszfolipidet és kevesebb számú proteinféleséget tartalmaz, mint a citoplazmamembrán. Nagy szerepet játszik a sejt strukturális integritásának fenntartásában, véd az extracelluláris hidrolitikus enzimek aktivitásával szemben és számos anyagnak (pl. antibiotikumoknak) diffúziós akadályt állít. Receptorokat tartalmaz, melyek bakteriofágokat és colicineket kötnek meg és részt vesz a sejtosztódás, továbbá a konjugáció folyamatában. Vasionok, vitaminok és szénhidrátok felvételi rendszereit tartalmazza, míg a benne lokalizált pórusképző proteinek *(porine)* számos kis molekulasúlyú

anyag felvételét teszik lehetővé. Az ilyen pórusok a membránfelszín töltésmegoszlásától függően megnyílni és zárulni képesek. A viszonylag kis számú főproteinféleségen kívül a külső membránban 10–20 különböző és ritkábban előforduló protein is található. Számuk változó és minthogy gyakorta indukálhatóak, ezért bizonyos körülmények között mennyiségük meghaladhatja a főproteinekét. Az ún. PG 1–2 és PG 1–3 fő- vagy mátrixproteinek a membránban sűrűn egységekbe tömörülve, hexagonális elrendeződésben (7,5 nm-es periodicitással) mutathatók ki. Az egyes egységek feltehetően három proteinmolekulát tartalmaznak. Az ilyen szabályos mintázat normális körülmények között a sejt felszínének mintegy 60%-át takarhatja.

NIKAIDO és VAARA (1985) a külső membránnak tulajdonítják: a lizozimmal, β-lizinnel és a különböző a GRAM-pozitív baktériumokra nagyon toxikus leukocitaproteinekkel szembeni rezisztenciát, a sejt védelmét detergensekkel és emésztő enzimekkel szemben, az antibiotikumok sejtbehatolásának gátlását, a sejtfelszín erős hidrofilitását, mely lehetővé teszi a fagocitózis elkerülését, bizonyos mérvű komplement-rezisztenciát, továbbá a felszíni antigénszerkezet megváltoztatásával specifikus immunhatások elkerülését. A külső membrán legfőbb komponensei (23. b. ábra): a) Foszfolipidek, melyek hasonlóak a citoplazmamembránban levőkéhez esetenként némileg több foszfatidil-etanol-aminnal; b) LPS: e molekulákban a glukózamindiszacharid gerinchez hat vagy hét zsírsavlánc kötődik, valamennyi telített, míg a gerincen magán csakúgy, mint a proximális cukormaradékokon (pl. 2-keto-3-deoxioktonilsav) számos negatív töltésű csoport helyezkedik el; c) Egyéb más poliszacharid komponensek: számos baktériumnál a legkülső szerkezet a tokanyag, mely általában savanyú poliszacharidokat tartalmaz, ezek közül egyeseknek lipid komponenseik is vannak; d) fehérjék: a külső membrán tömegének közel fele fehérje, jóllehet a fehérjeösszetételt néhány ún. „fő-protein" uralja; az ún. „murein-proteinek" a külső-membrán-murein komplexet, az előbbit az utóbbin lehorgonyozva, stabilizálják; OmpA-protein, azokban a mutánsokban, melyekben ez a fehérje hiányzik, a külső membrán stabilitása meggyengül és a konjugációk kivitelezésében defektívek; porinok, ezeket a fehérjéket az *E. coli*ban az *omp*F, *omp*C és *pho*E gének kódolják, géntermékeiket azért nevezzük porinoknak, mivel a membránban viszonylag nem specifikus pórusokat vagy csatornákat hoznak létre, melyek kicsiny hidrofil molekulák áthatolását teszik lehetővé; specifikus diffúzióban részt vevő proteinek, így a LamB-protein, mely az *E. coli* külső membránjában a maltóz és a maltodextrinek áthatolását biztosítja, számos más ilyen specifikus proteint ismerünk még.

Valószínűtlennek látszik, hogy a GRAM-negatív baktériumok alakját

a nagyon vékony mureinréteg határozná meg. E baktériumok alakja, hipotonikus oldatban, a mureinréteg elemésztése után is változatlan marad. A mureinmentes sejtek lízise révén olyan üres „zsákokat" lehet előállítani, melyek még megtartják a sejtek alakját. Az ilyen „zsákok" kb. 70% proteint és 30% lipidet tartalmaznak. Ebből szerves oldószerekkel még a lipideket is eltávolíthatjuk anélkül, hogy a zsák elveszítené alakját. A proteineknek tehát itt formaalkotó szerepük van. A legtöbb membrán esetében a fehérjék a struktúra kialakításában csak alárendelt szerepet játszanak. Úgy látszik, nem így a külső membránnál. Itt a fehérjék valódi struktúraelemek, melyek a membránban szabályszerű, állandóan meg-megújuló elrendeződést mutatnak. A GRAM-negatívak ilyen zsákjaiban, származzanak ezek akár az *E. coli*tól, a *Salmonella typhimuriumt*ól, a *Serratia marcescens*től, vagy a *Spirillum serpens*től, a proteinek összetétele csaknem azonos. Közöttük nagyfokú szerológiai rokonság is kimutatható. A külső membrán fehérjéi kovalens kötésekkel szoros strukturális összeköttetések kialakítására képesek, és az ilyen struktúra még 1%-os SDS-ben főzve sem megy tönkre. Érdekes, hogy szemben az *E. coli* sejtekből előállított ilyen stabil „zsákokkal" a *Spirillum serpens*é proteázok hatására feloldódik. Ez határozottan bizonyítja, hogy a külső membránt ez esetben feltétlenül fehérje–fehérje kölcsönhatások tartják össze, ill. merevítik, ami még inkább érhetővé teszi, hogy a baktérium alakját is a külső membrán determinálja. Az is tény viszont, hogy olyan mutánsokat is izoláltak, melyeknél a külső membrán egyes fő proteinjei hiányoztak, mégis, ezek sem strukturális, sem élettani hiányosságot nem árultak el. Kiderült ugyanis, hogy a hiányzó proteineket másokkal voltak képesek pótolni (SENGBUSCH, 1979). A spirillumok fehérjealegységekből rendkívül szabályos módon felépülő sejttakarójával mint az ún. RS-réteggel részletesen még foglalkozunk (*lásd* 139. old.).

A külső membránra jellemző annak szerkezeti aszimmetriája, amennyiben pl. a lipopoliszacharid molekulák többsége külfelületén helyezkedik el. Úgy tűnik, hogy ez az aszimmetria létfontosságú a bélmikróbák számára. Ezek ugyanis a bélmiliőben a detergens kolátok nagy koncentrációi jelenlétében élnek. Ezzel szemben számos nem enterális baktérium számára külső membránjuk hidrofób anyagokkal szemben átjárhatatlanná tétele kevéssé szükséges, és ezek membránja sokkal szimmetrikusabb is, felületén pedig a foszfolipidek nagy mennyiségben jelennek meg. A bélbaktériumoknál a foszfolipidek csekély mennyisége a külső membrán disztális oldalán *(25. f. ábra)* védelmet nyújt a hatékony és a bélben jelen lévő foszfolipázok ellen is. Az ún rögös („deep rough") LPS-mutánsok külső membránjának külső felületén már sokkal több foszfolipid szerepel *(25. g. és h. ábrák)*, aminek következtében membránjuk inkább

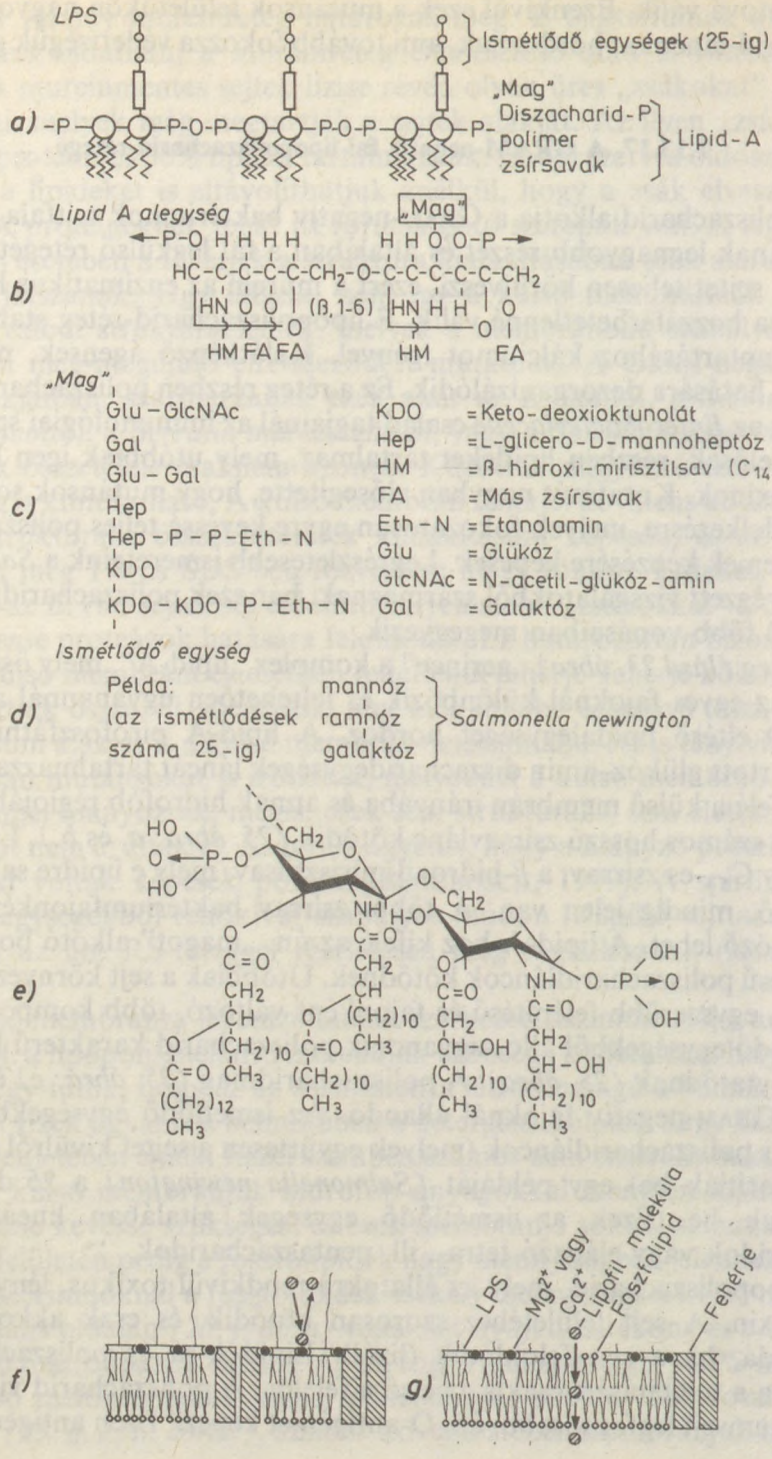
átjárhatóvá válik. Ezenkívül ezek a mutánsok felületükön nagyon rövid szacharid-láncokat hordoznak, ami tovább fokozza védettségük gyengülését.

1.13.17. A GRAM-negatív fal lipopoliszacharid-rétege

Lipopoliszacharid alkotja a GRAM-negatív baktériumok sejtfala szárazanyagának legnagyobb részét és általában a fal legkülső rétegét. Minthogy a sejtet teljesen körülveszi, ezért a murein az enzimatikus hatások számára hozzáférhetetlenné válik. E lipopoliszacharid-réteg stabilitásának fenntartásához kálciumot igényel. Kelátképző ágensek, mint pl. EDTA hatására dezorganizálódik. Ez a réteg részben poliszacharidokat, melyek az *Enterobacteriaceae* család tagjainál az immunológiai specifitásért felelősek, részben lipideket tartalmaz, mely utóbbiak igen hatásos endotoxinok. Kutatását nagyban elősegítette, hogy mutánsok sokasága áll rendelkezésre, melyek fokozatosan egyre kevéssé teljes poliszacharid építőelemek képzésére képesek. Legrészletesebb ismereteink a *Salmonellá*kon végzett vizsgálatokból származnak, bár ezek poliszacharidja az *E. coli*éval főbb vonásaiban megegyezik.

E réteg *(lásd 23. ábra)* „gerince" a komplex „lipid-A", mely összetételében az egyes fajoknál különbözik és feltehetően ugyanannál a fajnál is 8–10 eltérő lipidalegységet hordoz. A lipid-A pirofoszfáthidakkal összetartott glükóz–amin diszacharidegységek láncát tartalmazza, melyhez befelé a külső membrán irányába és annak hidrofób régiójába belemerülő számos hosszú zsírsavlánc kötődik *(25. ábra: a. és b.)*. Ezek között egy C_{14}-es zsírsav, a β-hidroxil-mirisztilsav, mely e lipidre sajátosan jellemző, mindig jelen van. A többi zsírsav baktériumfajonként igen különböző lehet. A lipid-A-hoz kifelé az ún. „magot" alkotó bonyolult felépítésű poliszacharidláncok kötődnek. Utóbbiak a sejt környezete felé hosszú, egyszerűbb felépítésű és fajonként változó, több komponenses, ismétlődő egységekből álló, ugyancsak poliszacharid karakterű láncokban folytatódnak *(25. ábra)*. A poliszacharidmag *(25. ábra: c)* összetétele a GRAM-negatív fajoknál állandó. Az ismétlődő egységekből álló disztális poliszacharidláncok (melyek együttesen a sejtet kívülről bundaként borítják be) egy példáját *(Salmonella newington)* a 25:d ábrán mutatjuk be. Ezek az ismétlődő egységek általában lineáris triszacharidok vagy elágazó tetra-, ill. pentaszacharidok.

A lipopoliszacharid, mely az állatokra rendkívül toxikus, lényegében endotoxin. A sejt felületéhez szorosan kötődik, és csak akkor válik szabaddá, ha a sejt feloldódik (lizál). Lipid-A-ra és poliszacharidra hasadva a toxicitásért csakis az első a felelős. A poliszacharid viszont a baktériumsejt legfontosabb, ún. O-antigénjét képezi. Ezen antigén speci-


LPS
Ismétlődő egységek (25-ig)
a)
„Mag"
Diszacharid-P
polimer
zsírsavak
Lipid-A
Lipid A alegység
„Mag"
b)
HM FA FA
HM
FA
„Mag"
c)
Glu – GlcNAc
Gal
Glu – Gal
Hep
Hep – P – P – Eth – N
KDO
KDO – KDO – P – Eth – N
KDO = Keto-deoxioktunolát
Hep = L-glicero-D-mannoheptóz
HM = ß-hidroxi-mirisztilsav (C14)
FA = Más zsírsavak
Eth – N = Etanolamin
Glu = Glükóz
GlcNAc = N-acetil-glükóz-amin
Gal = Galaktóz
Ismétlődő egység
d)
Példa:
(az ismétlődések
száma 25-ig)
mannóz
ramnóz
galaktóz
Salmonella newington
e)
f)
g)
LPS
Mg2+ vagy
Ca2+
Lipofil molekula
Foszfolipid
Fehérje

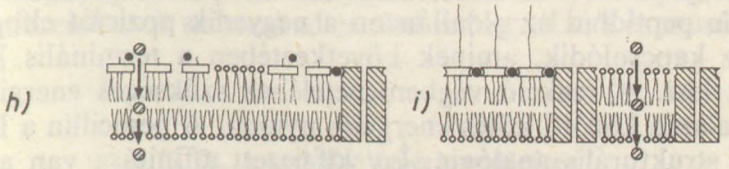
ficitásáért a terminális ismétlődő egységek láncai a felelősek. A lehetséges antigéntípusok száma igen nagy, a *Salmonellák*nál már ezernél is többet ismerünk.

A lipopoliszacharid a külső membránhoz hidrofób kötéssel csatlakozik. Szintézise a belső, vagyis a citoplazmamembránon megy végbe és innen transzporttal kerül végső, külső pozíciójába. Működése ismeretlen. Azok a mutánsok, melyek poliszacharidja különböző hiányosságokat mutat, tenyészetekben normálisan növekedhetnek. Ezzel szemben olyan mutánst, melyben a lipid-A hiányzik, ez ideig még nem figyeltek meg. Feltételezik ezért, hogy a lipid-A-nak létfontosságú szerepe lehet.

1.13.18. A sejtfal lízise

A baktériumsejt számos autolizint tartalmaz: ezek hidrolázok, mint pl. glikozidázok, amidázok és peptidázok, melyek a mureint támadják. Feltehetően fontos szerepet játszanak a sejt növekedésében és osztódásában, azonban aktivitásuk az elpusztult sejt feloldódása (autolízise) alkalmával válik legszembetűnőbbé. Ezenkívül a baktériumok sejtfalát degradáló enzimeket találhatunk olyan eukariota sejtekben is, melyek teljes baktériumsejtek megemésztésére képesek. Így pl. tojásban, protozoonokban vagy magasabb rendű állatok fagocita sejtjeiben.

A lizozim számos GRAM-pozitív baktériumot lizál sejtfaluk közvetlen hidrolízise révén. Ha ez az akció izotónikus oldatban megy végbe, úgy



◄ *25. ábra*

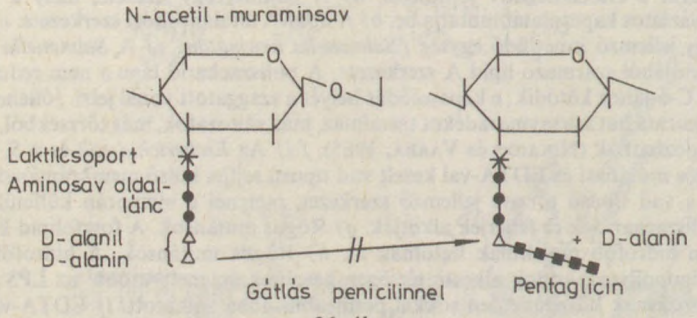
Lipopoliszacharid a GRAM-negatív sejtfalban. *a)* A polimer egy részlete, mely a legfontosabb alkotóelemek vázlatos kapcsolatát mutatja be. *b)* A lipid-A általánosított szerkezete. *c)* Poliszacharidmag. *d)* Egy jellemző ismétlődő egység *(Salmonella newington) e)* A *Salmonella typhimurium* lipopoliszacharidjából származó lipid A szerkezete. A poliszacharid lánc a nem redukáló glükózamin maradék C-6-jához kötődik; e kapcsolódás helyét a szaggatott vonal jelzi. Jóllehet a lipid A itt bemutatott változata hat zsírsavmaradékot tartalmaz, más változatok, más törzsekből, 7 zsírsavmaradékot is hordozhatnak (NIKAIDO és VAARA, 1985). *f-i)* Az *Escherichia coli* és a *S. typhimurium* vad típusú rögös mutánsai és EDTA-val kezelt vad típusú sejtjei külső membránjának feltételezett szerkezete. *f)* a vad típusú törzsre jellemző szerkezet, melynél a membrán külfelületét csaknek teljesen lipopoliszacharidok és fehérjék alkotják. *g)* Rögös mutánsok. A foszfolipid kettős rétegen feltételezhetően hidrofób molekulák hatolnak át. *h)* Rögös mutánsok. A hidrofób molekulák feltehetően a lipopoliszacharidok alkotta térségen hatolnak át, mely utóbbi az LPS-szerkezetben végbement változásnak köszönhetően sokkal permeabilisabbá válhatott. *i)* EDTA-val kezelt vad típusú sejtek. Feltehetően az EDTA-val szelektíven eltávolított lipopoliszacharidok helyét foszfolipid molekulák töltik ki (NIKAIDO és VAARA, 1985)

szferoplasztok vagy protoplasztok nyerhetők. Az enzim támadáspontja az N-acetil-murinsav: N-acetil-glükóz-amin polimer 1–4 β-glikozid kötése. A hidrolízis itt megy végbe. A *Staphylococcus aureus*ban és a *St. lysodeiktus* bizonyos törzseiben az N-acetil-muraminsav 6-os szénatomján szubsztituált 0-acetilcsoport gátolja a lizozim akcióját. Teichosavak a baktériumnak ugyancsak védelmet nyújthatnak lizozimmal szemben. A GRAM-negatív baktériumok általában érzéketlenek lizozimra. Feltehetően ez a tény a lipopoliszacharid- és a lipoprotein-rétegek védő szerepére vezethető vissza. Kelátképző ágensekkel, így EDTA-val előkezelve vagy ismételt fagyasztással és felengedéssel azonban még a GRAM-negatívokat is szenzitívekké lehet tenni.

1.13.19.A penicillin hatása a murein bioszintézisére

A penicillin, mely a GRAM-pozitív baktériumok növekedő sejtjeire letális hatású, sokkal kevéssé aktív a GRAM-negatívokkal szemben. Támadásának helye a murein. Hatástalansága a GRAM-negatívok esetében arra vezethető vissza, hogy ezek mureinje hozzáférhetetlen. Vírusok, *Mycoplasmák*, L-formák és az eukariota sejtek, melyeknek nincs mureinje, érzéketlenek a penicillinnel szemben.

A mureinbioszintézis kezdeti állapotában a muraminsavhoz csatlakozó peptidoldallánc még pentapeptid. Ezen a két terminális aminosav a D-alanil-D-alanin. A murein szintézisének végső stádiumában peptidhidak révén a láncok keresztösszeköttetései alakulnak ki. Ennek során a pentaglicin peptidhíd az oldalláncon a negyedik pozíciót elfoglaló D-alaninhoz kapcsolódik, aminek következtében a terminális D-alanin szabaddá lesz. A reakció végbemeneteléhez szükséges energiát a D-alanil-D-alanin közötti kötés energiája nyújtja. A penicillin a D-alanil-D-alanin strukturális analógja. Így kifejezett affinitása van ahhoz az



26. ábra

A murein bioszintézisének gátlása penicillinnel

enzimhez, mely ezt a speciális dipeptidet ismeri fel. Az enzim a penicillinnel irreverzíbilisen kötődik és így inaktiválódik. Márpedig a peptidhidak záródásának végső lépése megkívánja, hogy ez az enzim – a transzpeptidáz – a muraminsavhoz kötődő peptid terminális részén a D-alanil-D-alaninhoz kapcsolódjék és D-alanil-enzim-komplexet alakítson ki. Ez az előfeltétele ugyanis annak, hogy a D-alanin, mint most már a peptid-oldallánc terminális aminosava, a pentaglicinhíd terminális glicinjével kapcsolódjék. A penicillinnel gátolt transzpeptidáz jelenlétében ez a befejező reakció azonban már nem megy végbe. Így a mureinben a kereszthálózat kiépülése elmarad *(26. ábra)*.

A penicillin alacsony koncentrációja az osztódás során szelektíven gátolja a harántszeptum képződését, de a hosszanti növekedést nem akadályozza. Következésképpen, ilyenkor nagyon hosszú, kígyószerű sejtek jönnek létre. Nagyobb koncentrációk viszont az új sejtfal szintézisének általános és teljes gátlását idézik elő.

A murein növekedése és a sejt osztódása mechanizmusának lényeges eleme, hogy az ún. murein-hidrolázok a zárt mureinburkot több helyen is felhasítják és e merev struktúrán új növekedési pontokat nyitnak meg. Ezek a hidrolázok aktivitásukat a penicillin jelenlétében is zavartalanul kifejtik. Mivel a hatásukra felbontott falrészletek, új falanyag beépítése hiányában, tárva maradnak, a belső 5–20 atmoszférás túlnyomás okozta feszültségnek a murein nem képes többé ellenállni és a feltárt pontokon tovább hasad. Ennek közvetlen következménye a baktérium lízise és pusztulása. Vagyis röviden az új fal szintézise számára a hidrolázok a régi falat megnyitják, de penicillin jelenlétében az új falanyag szintézise helyett a mureinburok szétszakad és tönkremegy (Levy és munkatársai, 1973).

1.13.20. A legkülső fehérje-védőréteg

A spirillumok árnyékolt teljes sejtpreparátumain és izolált falanyagán végzett vizsgálatok arra az eredményre vezettek, hogy a fal külső felszínén globuláris fehérjerészecskék szabályos, hexagonális elrendeződésben egyetlen molekula rétegvastagságú „páncélt" alkotnak. Ez a réteg SDS-al eltávolítható. Az *Aquaspirillum serpens* ilyen szabályos makromolekuláris felületi sejttakaróját, ún. „RS-rétegét", behatóan tanulmányozták. Elektronmikroszkópban igen nagy nagyítással az egyes fehérjeépítő-elemek fogaskerekűnek látszanak: a központi részhez hat nyúlvány csatlakozik. E nyúlványok a szomszédos építőelemek hasonló nyúlványaival kapcsolódnak. A megfigyelések szerint az RS-réteg maga egy vékony, nem strukturált, trimer támasztórétegen jön létre.

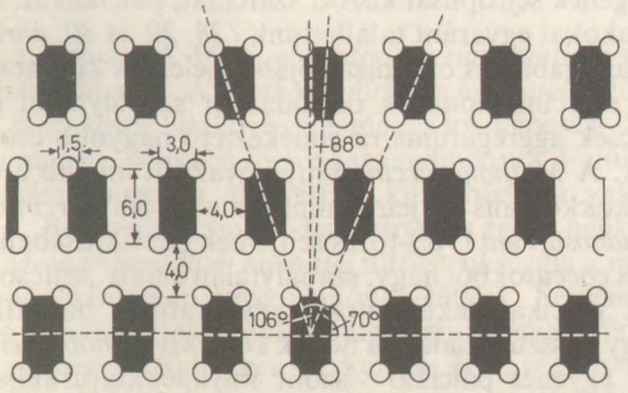
SDS, szulfát, fenol, guanidin, dimetil-szulfoxid és fenollal telített víz az intakt sejtek sejtfaláról az RS-réteget gyorsan eltávolítja. Az RS-rétegek guanidinben oldott anyagából dialízissel tisztított, vízoldékony preparátumot állítottak elő. Amennyiben ez utóbbit olyan sejtfaltöredékkel inkubálták, melyről az RS-réteget előzetesen eltávolították, úgy a faltöredékrészecskékre, mint templátokra új RS-réteg épült fel. Sejtfaltörmelék vagy kalciumionok hiányában ez az újrafelépülés nem következett be. Az ilyen templátokra való *in vitro* felépülést stroncium-, magnézium-, nátrium- és kálciumionok nagy koncentrációi ugyancsak lehetővé tették, azonban alacsonyabb koncentrációkban a nátrium és a kálium már hatástalannak, a magnézium pedig csak gyengén hatásosnak bizonyult. Ha kálcium vagy stroncium kationok nagy koncentrációi jelenlétében a templátokon lényegében „önelrendeződéssel" kialakult RS-réteget utólag víz hatásának tették ki (hígították), úgy a proteinépítő-elemek csak igen kis mértékben váltak szabaddá. Ha viszont a felépüléshez magnéziumiont használtak, úgy a proteinnek már részleges szabaddá válása volt észlelhető. Monovalens kationok jelenlétében történt felépülés után az RS-réteg víz hatására szétesett. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy jóllehet az RS-réteg elemeinek elsőfokú elrendeződésénél ionos erők játszanak szerepet, a struktúra stabilitása specifikus kationok jelenlététől függ, melyek feltehetően a fehérje és az alatta fekvő külső membrán közötti erős „sókötések" létrehozásában működnek közre.

A tisztított RS-készítmények kb. 98% proteint tartalmaznak. A 2%-ban ugyancsak kimutatott szénhidrát jelenlétét műterméknek tekintik. Az RS-protein mind az ultracentrifugálás, a gélelektroforézis, a Sephadexszel végrehajtott kromatográfia, mind a sűrűségi gradienscentrifugálás eredményei szerint homogén. A tisztított RS-protein trimer azonban guanidin jelenlétében monomerekké depolimerizálódik. Aminosavanalízisek alapján a monomerek molekulasúlya 48 000. E nagyon savanyú fehérjében a legnagyobb moláris mennyiségben aszparaginsav, alanin, treonin és glicin van jelen.

Az *A. serpens* RS-rétegének egyik funkciója a spirillum védelme lehet a *Bdellovibrio*k parazitizmusával szemben. Az RS-réteg eltávolítása a spirillumot a *Bdellovibrio* támadására érzékennyé teszi. Ha a lecsupaszított sejtfelületen az RS-proteinek újrafelépülését tesszük lehetővé, úgy a szervezet ismét rezisztenssé válik. Az RS-réteg a sejtek felszínén feltehetően a parazita támadását lehetővé tevő receptorokat takarja el. E réteg másik lehetséges funkciója, hogy a spirillumok külső vagy falmembránjának egy bizonyos fokú merevséget biztosít. Ez a feltevés különösen vonzónak látszik, ha figyelembe vesszük, hogy az *Aquaspirillum serpens*-nél hiányoznak a mureinhez kovalensen kötődő lipoproteinek. Ezek a

lipoproteinek az *Enterobacteriaceae* család tagjainál a külső membránt rögzítik a mureinréteghez. Ismeretes, hogy az *A. serpens* VHA-jelzésű törzse aerált (levegőztetett) kultúrákban, növekedése végső szakaszában lizálódik és elpusztul, amit a közeghez adott kálciumsókkal meg lehet akadályozni. Minthogy az RS-réteg létrejöttéhez kálciumion szükséges, feltehetően ez a réteg szerepet játszhat a lízissel szembeni rezisztenciában. Igaz viszont, hogy egy másik, az ún. VHL-jelzésű törzs, melyet a VHA-hoz hasonlóan egy VH-jelű szülőtörzstől változatként különítettek el, még kálciumionok jelenlétében sem képes RS-réteget szintetizálni, ennek ellenére e réteg nélkül is életképes.

Az *Aquaspirillum putridiconchylium* páncélzata az *A. serpens*énél sokkal komplikáltabb makromolekuláris elrendeződésről tanúskodik. Ennél két strukturált réteg alakít ki egy RS-réteget. Az alegységek lineáris elrendeződésével jellemezhető külső réteg egy belső tetragonális elrendeződésű alaprétegen fekszik. A külső és a belső rétegek egymáshoz való viszonyát a *27. ábra* szemlélteti.



27. ábra

Az *Aquaspirillum putridiconchylium* RS-rétegének felépítése vázlatosan. Az RS-réteg egy belső strukturált (ISL) és egy külső, ugyancsak strukturált rétegből (OSL) épül fel. Az ISL egységeit téglalap alakú blokkok tüntetik fel. Az OSL egységei egyszerű szférikus elemként szerepelnek. A megértés megkönnyítése végett ez utóbbiakat az ábrán üres körök jelképezik. Az elrendeződés szögeinek és méreteinek adatai (nm-ben) az ábrán ugyancsak szerepelnek

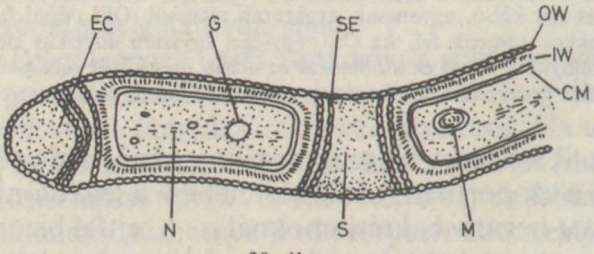
Jóllehet az RS-réteget először spirillumoknál fedezték fel, ez nem csupán ebben a csoportban fordul elő, hanem a legkülönbözőbb GRAM-pozitív és GRAM-negatív baktériumoknál is. A sejtfal bizonyos alkotóelemeinek ilyen, csaknem kristályos elrendeződése sok érdekes spekulációra ad lehetőséget. Az RS-réteg tanulmányozása ma már gyakorlatilag csaknem elválaszthatatlan a külső membrán kutatásától, bár RS-réteg külső membránnal nem rendelkező baktériumokban is észlelhető.

Sleytr és munkatársai (1986) szerint kristályos elrendezésű proteinek vagy glikoproteinek (S-réteg) számos ősbaktériumnál a sejttakaró egyetlen komponensét képezik. Az ilyen ún. S-réteg a legegyszerűbb biológiai membránnak tekinthető és védőszerepet csakúgy betölthet, mint segítséget nyújthat a rögzülésben, a felszínek felismerésében, vagy meghatározója lehet a sejt állandó alakjának. Minthogy az ősbaktériumok S-rétege extrém környezeti viszonyok elviselésére képes, feltételezhető, hogy az ilyen kültakarók a biológiai evolúció korai stádiumaiban az önreprodukáló rendszerek fenntartásában és fejlődésében jelentős szerepet tölthettek be.

1.13.21. Az ősbaktériumok sejtszerkezeti sajátosságai

Az ősbaktériumok legalaposabban tanulmányozott csoportjának a metanobaktériumok négy genuszának sejtfalfelépítésében mind a kémiai összetételt, mind a szubmikroszkópos struktúrát tekintve alapvető eltérések mutathatók ki.

A metanogének sejttípusai között szarcinát, pálcikákat, kokkuszokat és spirális alakokat egyaránt találhatunk *(28. 29. és 30. ábrák)*. A sejtek méreteiben, alakjában és organizációjában jelentős különbségek tapasztalhatók. A szarcina típusúak osztódáskor szabálytalan méretűek, és homokszemcsék aggregátumaira emlékeztető nagyobb csoportosulásokat alkotnak. A *Methanosarcina* sejtjei gyakran inkább a *Geodermatophilus* fajok kokkoidális sejtjeire, mintsem a valódi *Sarcinára* hasonlítanak. A *Methanosarcina* UBS-törzs sejtjeinek életciklusában a kezdetben szimmetrikus *coccus*okból nagy, szabálytalan alakú „sejtcsomagok" jönnek létre. A pálcika alakú sejtek leggyakrabban hajlottak, láncokat alkotnak vagy hosszú fonalakká nőnek ki. A *Methanobacterium arbophilicum* rövid, egyenes pálcikái viszont folyadékkultúrákban fonalakat



28. ábra

A *Methanospirillum* spirális fonala egy szegmentjének hosszanti metszete. Sematikus vázlat elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján. EC: végkomponens; G: granuális zárvány; N: nukleoplazma; SE: szeptum; S: sejtválasztó; M: membrántest; OW: külső fal; IW: belső fal; CM: citoplazmamembrán (Zeikus és Henning, 1975)

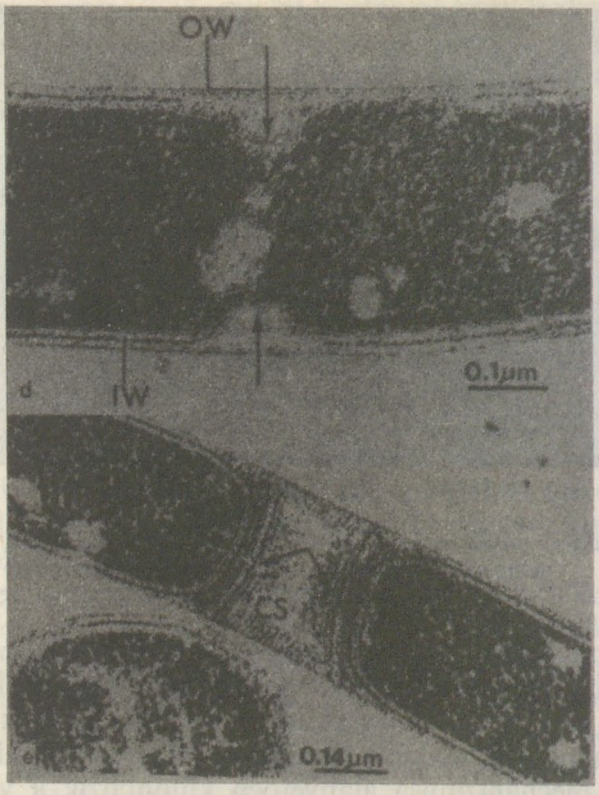


a b

29. ábra

a) Methanobrevibacter smithii sejtjei. *b) Methanosphaera stadtmaniae* sejtjei. Szkanning elektronmikroszkópos felvételek (MILLER és WOLIN után, 1986)

sohasem produkálnak. A *Methanobacterium ruminantium* sejtjei *Streptococcus*okra hasonlítanak. A *Methanospirillum hungatei* különálló, magányos sejtjei nem spirál alakúak, de mozgásra képesek. Növekedésük hosszú, nem mozgó, helikális fonalakat eredményez. Faluk felépítése és osztódásuk mechanizmusa alapvetően különbözik a valódi *Spirillum* fajokétól és a „BERGEY's Manual"-ban leírt más egyéb helikális baktériumokétól. A *Methanospirillum hungatei* ultrastruktúrája a mikrobák világában számos tekintetben egyedülállónak látszik. Sejtjeinek szokatlan végződése és külső sejttakarójuk sajátos struktúrája e fajra rendkívül jellemző. A sejtvégek különleges szerkezetű, ún. „végkomponenst" tartalmaznak. Ez utóbbinak, úgy tűnik, nincs citoplazmája, és azok a strukturális elemek határolják, melyek a külső falburkot is alkotják és a végkomponenst a belső faltól, a membrántól és a sejt citoplazmájától különítik el (*lásd 30. ábra:* ZEIKUS, 1977). A külső sejttakaró alegységei kötegekbe rendeződnek. Ez merev struktúra lehet, mivel az alegységkötegek között törések gyakran figyelhetők meg. A magányos sejtek általában hosszú, görbült pálcikák. Az osztódó sejtek spirális fonalat képeznek, melyekben az egyes sejteket sajátos struktúrák, ún. sejtválasztók szeparálják el. A sejtválasztót a külső fal és a szeptum *(lásd 30. ábra)* határolják. A szeptum szerkezeti alegységei a külső fal egységeihez hasonlóak, és talán működésük is azonos lehet. A sejtválasztók törékenynek tűnnek, és a fonalak általában ezek térségében fragmentálódnak.



30. ábra

Felső kép: A *Methanospirillum hungatei* hosszmetszete. A sejtosztódás kezdete (OW: külső réteg, proteintakaró; IW: „köztianyag") Alsó kép: A sejtosztódás befejeződik (CS: „köztianyag")

1.13.22. A metanobaktériumok sejtfala

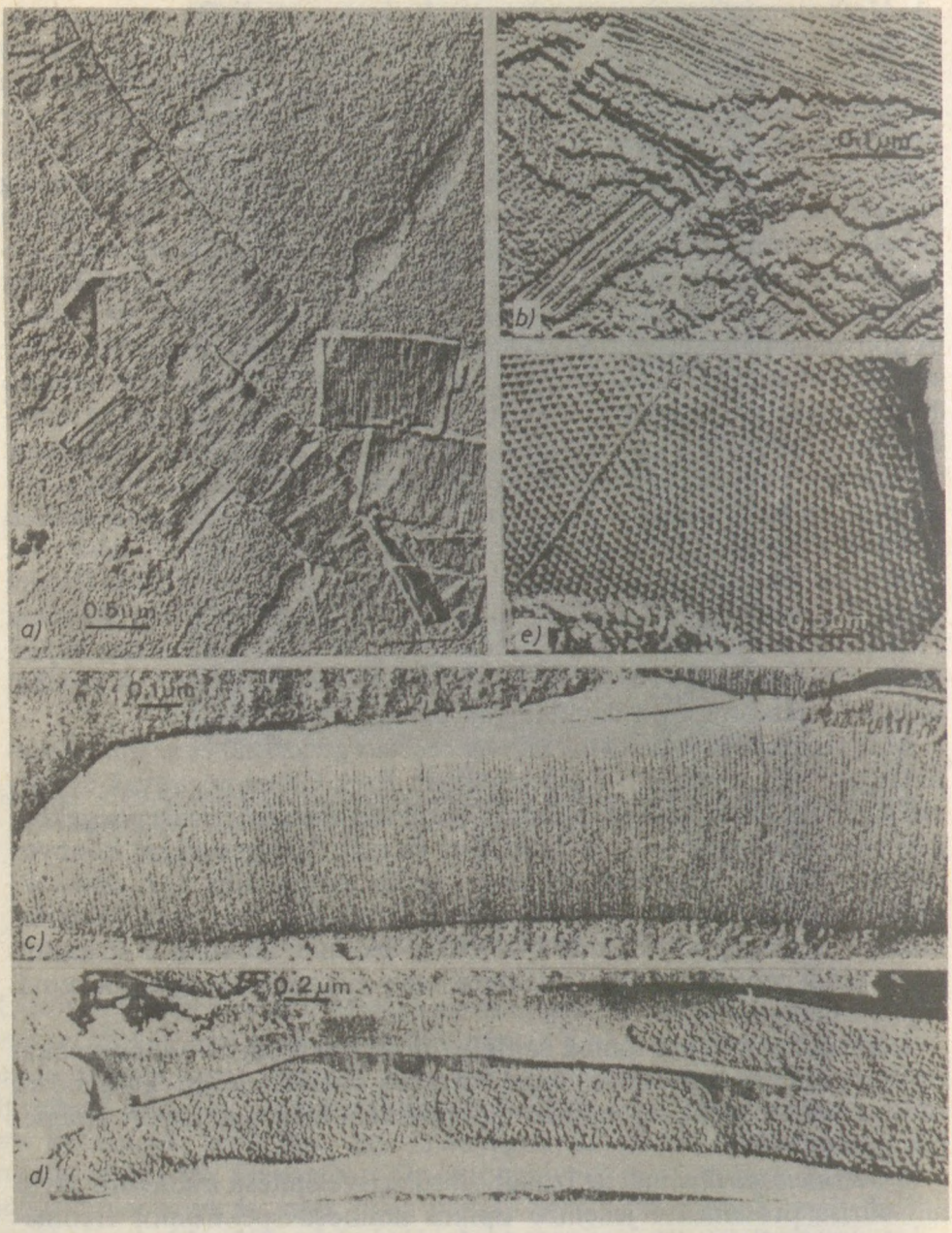
KANDLER (1979) szerint a *Methanosarcina* genuszt egyedül képviselő *M. barkeri* szokatlanul nagy sejtjei kifejezetten GRAM-pozitívak és jellegzetes társulásokban fordulnak elő. Vékonymetszetükben vastag sejtfal figyelhető meg. Ha a sejteket üveggyöngyökkel szétrázzák, majd tripszines kezelésnek vetik alá, úgy falanyaguk az eredeti sejtformát még mindig megtartja. Hasonlóan GRAM-pozitívnak bizonyulnak a *Methanobacterium* fajok is: ezek főleg pálcikaszerű baktériumok, melyeknél azonban a kokkoidális alakoktól a hosszú, megnyúlt pálcikáig minden átmenet megtalálható. A *Methanobacterium arbophilicum* sejtjei hosszú, megnyúlt pálcika alakúak. E pálcikák viszonylag vékony sejtfala még izolált szakkulusz állapotában is megtartja eredeti pálcika alakját, és külsőleg sem különbözik a GRAM-pozitívak preparált szakkuluszától.

A *Methanospirillum hungatei* hosszú, hajlott pálcikái GRAM-negatívak. Kültakarójuk hosszmetszetén *(lásd 30. ábra)* a sejtek felületén vékony külső réteg *(OW)* figyelhető meg. Osztódáskor a szeptumképzésben sem ez, sem az alatta fekvő viszonylag kontrasztgazdag réteg *(IW)* nem vesz részt. Ennél a szervezetnél a citoplazmamembrán az egyetlen komponens, amely a harántszeptumot alakítja ki (!), jóllehet minden más eddig vizsgált baktériumnál e folyamatban falanyag is részt vesz. A sejtvégeken a belső kontrasztgazdag réteg csupán a kettéosztódás befejeződését követően záródik. Midőn a válaszfalak végül is kialakulnak, a sejtek között köztianyaggal kitöltött elválasztó tér marad vissza *(lásd 30. ábra)*. A konvencionális sejtfalpreparálási eljárás a következő ábrán *(31. ábra: a)* látható hosszúkás, szögletes, jellegzetes felületi struktúrát mutató fragmenteket eredményezett. Ezek nyilvánvalóan a hossztengelyre merőlegesen elhelyezkedő fibrillumok, melyek között gyakran hasadások lépnek fel. Fagyasztva repesztett preparátumokon erős nagyításnál látható, hogy kettős fibrillumokról van szó *(31. ábra: b)*. Hasonló felületi struktúra figyelhető meg komplett sejtek felületén is *(31. ábra: c)*. Hosszanti metszeteken *(31. ábra: d)* látható, hogy ez a fibrilláris felszíni struktúra nem egyes sejteket, hanem 3–5 sejtből álló rövid láncokat *(trichoma)* borít. Ezért ezt a kültakarót inkább hüvelynek tekinthetjük, mely a szeptumképzésben nem is vesz részt *(lásd 31. ábra)*. A sejteket sokszor sajátságos összetételű anyag választja el egymástól.

Más viszonyokat találtak a *Methanococcus* genusznál és az ún. „Fekete-tenger"- és „Cariaco"- izolátumoknál. Ezek GRAM-negatívak és *coccus* alakúak. Nincs szilárd sejtfaluk. Ezzel szemben fehérjealegységekből álló felszíni rétegük van, mely SDS-el és más detergensekkel könnyen dezintegrálható, felépítését tekintve pedig tetragonális *(31. ábra: e)* elrendeződésű. Hasonló páncélingszerű struktúrát már más baktériumoknál is megfigyeltek (*lásd* 141. old.), azoknál azonban e struktúra alatt valódi peptidoglikánfal található, mely viszont a *Methanococcus*nál teljesen hiányzik.

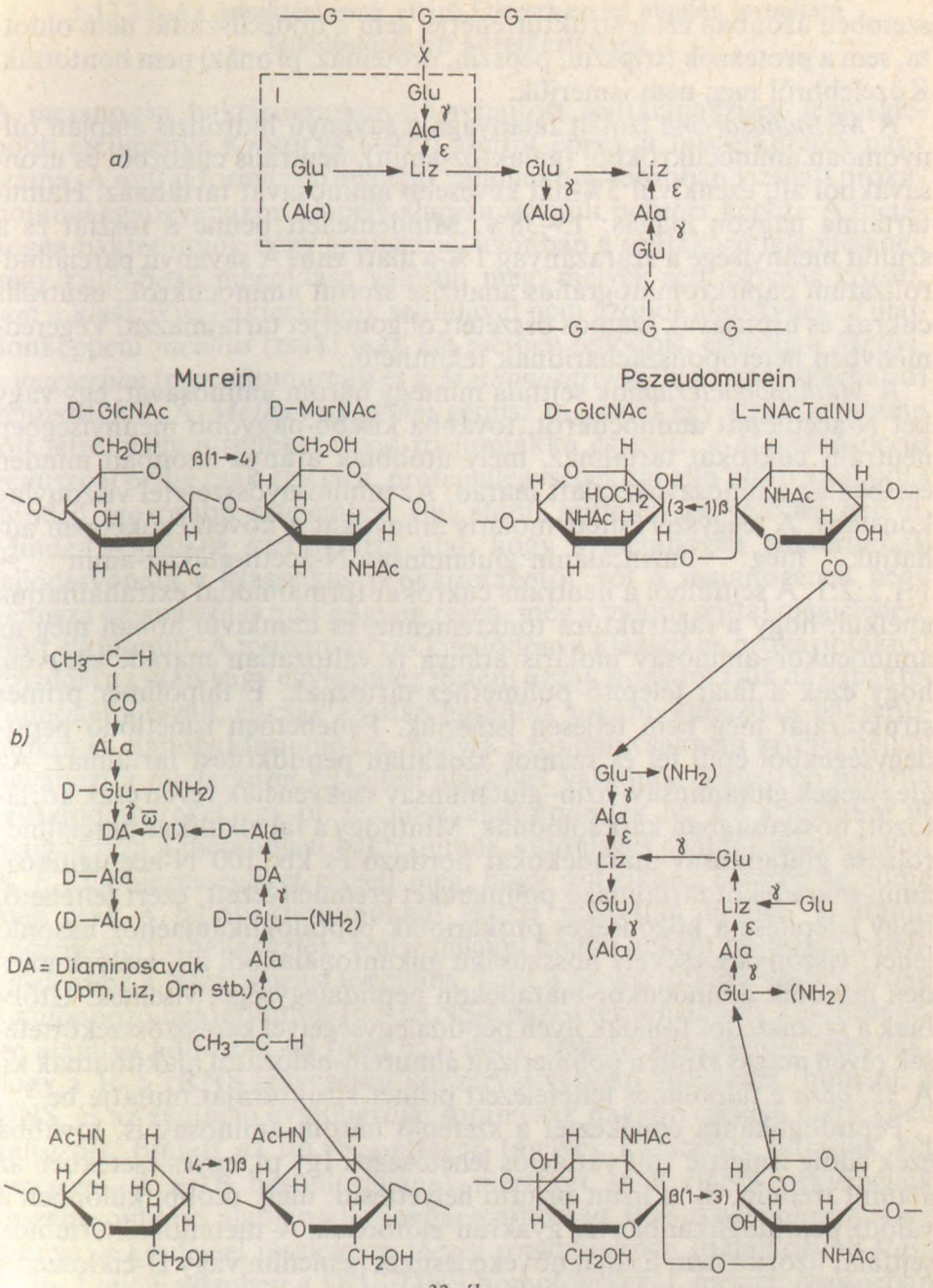
A metanogén baktériumok sejtfala, ill. sejttakarója D-aminosavakat és mureint nem tartalmaz, ezzel szemben összetételében különböző, eddig a baktériumoknál sejtfalkomponensként még nem ismert polimerek szerepelnek.

A *Methanospirillum*nál az izolált, fibrilláris felépítésű kültakaró savas hidrolízise proteinekre jellemző tipikus aminosavspektrumot eredményez. A hidrolizátumban ezenkívül még észlelhető neutrális cukrok aránya 5%-nál kevesebb, míg az ugyancsak kimutatott foszfátoké és szulfátoké 1% alatt volt. Aminocukrot és cukorsavat nem észleltek. A talált aminosavak, a neutrális cukor és a hamu összesen a kiindulási súly 95%-át képezi. Lényegében tehát proteinből áll. A legtöbb fehérjével



31. ábra

a) A *Methanospirillum hungatei* izolált fehérje- „takarója". *b)* Ugyanaz, mint az *a*, azonban fagyasztvarepesztési technikával. *c)* Egy *trichoma* felülnézetben. *d)* A *Methanospirillium hungatei* egy *trichoma*jának hosszmetszete. *e)* A „Fekete Tenger"-izolátum külső proteintakarója



32. ábra

a) A *Methanobacterium thermoautotrophicum* pszeudomureinje feltételezett primer struktúrájának részlete. I: peptidalegység; G: N-acetil-glükóz-amin, ill. N-acetil-galaktóz-amin; X: ismeretlen, ninhidrin-pozitív vegyület; (Ala): az alanin rövidítése zárójelben arra utal, hogy ez az aminosav ebben a helyzetben gyakorta lehasad (Kandler, 1979). *b)* A murein és a pszeudomurein elsődleges szerkezeteinek összehasonlítása KANDLER után (1982)

szemben azonban ezt a struktúrfehérjét sem a dodecilszulfát nem oldotta, sem a proteázok (tripszin, pepszin, proteináz, pronáz) nem bontották. Közelebbről még nem ismerjük.

A *Methanosarcina* izolált falanyaga a savanyú hidrolízis alapján túlnyomóan aminocukrokból (galaktóz-amin), neutrális cukorból és uronsavakból áll, ezenkívül 5%-nál kevesebb aminosavat tartalmaz. Hamutartalma nagyon magas: 15–38%. Mindemellett benne a foszfát és a szulfát mennyisége a szárazanyag 1%-a alatt van. A savanyú parciálhidrolizátum papírkromatográfiás analízise szerint aminocukrok, neutrális cukrok és uronsavak számos összetett oligomerjét tartalmazza. Végeredményben heteropoliszacharidnak tekinthető.

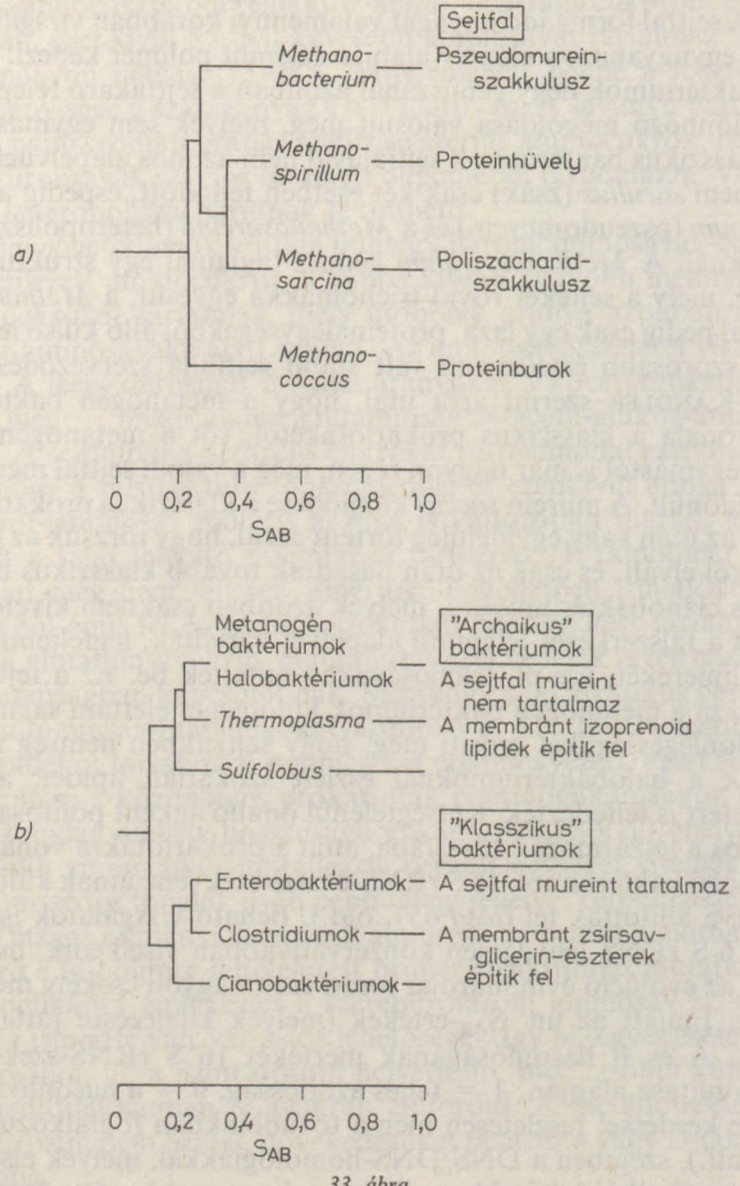
A *Methanobacterium*ok sejtfala mintegy három aminosavat, egy vagy két N-acetilezett aminocukrot, továbbá kisebb-nagyobb mennyiségben neutrális cukrokat tartalmaz, mely utóbbiak aránya azonban minden esetben az aminosavaké alatt marad. Az aminosavösszetétel viszonylag konstans. A leegyszerűsített moláris arányokat a következőképpen adhatjuk meg: linzin:alanin:glutaminsav:N-acetil-glükóz-amin = 1:1,2:2:1. A sejtfalból a neutrális cukrokat formamiddal extrahálhatjuk anélkül, hogy a falstruktúra tönkremenne, és ezenkívül abban még az aminocukor–aminosav moláris aránya is változatlan marad, jelezvén, hogy ezek a falat felépítő polimerhez tartoznak. E falpolimer primer struktúráját még nem teljesen ismerjük. Feltehetően ismétlődő peptidegységekből épül fel és számos szokatlan peptidkötést tartalmaz. Az alegységek glutaminsav–lizin–glutaminsav szekvenciák révén csak korlátozott hosszúságban kapcsolódnak. Minthogy a fal alkalikus parciálhidrolízise glutaminsav-maradékokat hordozó és kb. 100 N-acetilglükózamin-maradékot tartalmazó polimereket eredményezett, ezért feltehető, hogy felépítése a közönséges prokarioták peptidoglikánjáéhoz hasonló lehet: viszonylag csekély hosszúságú glikánfonalakból áll, melyek minden második aminocukor-maradékon peptidalegységet viselnek. Utóbbiak a szomszédos fonalak ilyen peptidalegységeivel keresztösszeköttetések révén magas szinten polimerizált álmurein-hálózatot alakíthatnak ki. A *32. ábra* e falpolimer feltételezett primer struktúráját mutatja be.

Peptidoglikánra emlékeztet a szereplő három aminosav is, továbbá ezek eddig ismertté vált variációs lehetőségei. Így pl. egyes esetekben az alanint treonin, ill. a lizint ornitin helyettesíti, mely utóbbi különben a valódi peptidoglikánban is gyakran előfordul. A metanobaktériumok sejtfalát lizozim nem lizálja, növekedésüket penicillin vagy D-cikloszerin nem gátolja.

1.13.23. Az ősbaktériumok eltérő falszerkezetei alapján levonható fejlődéstörténeti következtetések

A metanogén baktériumokon végrehajtott sejtfalanalízisek legmeglepőbb eredménye KANDLER (1979) szerint éppen a falszerkezetek nagy száma. A sejtfal formaadó anyagát valamennyi korábban vizsgált prokariotánál egyugyanazon alapelv alapján felépült polimer képezi. A metanogén baktériumok négy genuszánál azonban a sejttakaró felépítésének négy különböző megoldása valósult meg, melyek sem egymás között, sem a klasszikus baktériumok sejtfalával nem azonos alapelvűek. Tulajdonképpeni *sacullus* (zsák) csak két esetben fejlődött, éspedig a *Methanobacterium* (pszeudomurein) és a *Methanosarcina* (heteropoliszacharid) genuszoknál. A *Methanospirillum* genusz tagjainál egy strukturprotein jött létre, mely a sejteket rövid trichomákká egyesíti, a *Methanococcus* genusznál pedig csak egy laza, proteinalegységekből álló külső lerakodás minden szorosabb értelemben vett stabil sejtfallá szerveződés nélkül. Mindez KANDLER szerint arra utal, hogy a metanogén baktériumok fejlődésvonala a klasszikus prokariotákétól, sőt a metanogének négy genusza egymástól is már nagyon régen, még a valódi sejtfal megjelenése előtt elkülönült. A murein *saccus* kifejlődése a klasszikus prokariotáknál röviddel az után vagy egyidejűleg történt azzal, hogy törzsük az ősbaktériumokétól elvált, és csak ez után hasadtak tovább klasszikus baktériumokra és cianobaktériumokra, melyek azonban csaknem kivétel nélkül ugyanazt a falszerkezet-felépítési alapelvet variálták, legfeljebb további sejtfalpolimereket, így pl. teichosavakat építettek be. Ez a fejlődési út magyarázza a metanogén baktériumok különleges élettani sajátosságait is. E különlegességüket erősíti meg, hogy sejtjeikben nemrég az eddig még csak a halobaktériumoknál észlelt szokatlan lipidet, a fitanil-glicerin-étert is felfedezték. Kétségtelenül önálló ágként pontosan beleillenek abba a leszármazási törzsfába, amit a prokariotákra vonatkozóan a különböző baktériumok 16 S rRNS-e bázisszekvenciáinak különbségeire alapítva állítottak fel (*lásd* 657. old.). Beható vizsgálatok igazolják, hogy a 16 S rRNS lényegesen konzervatívabban viselkedik, mint pl. a DNS, és az evolúció évmilliárdjai során csak nagyon csekély mértékben változott. Emiatt az ún. S_{AB}-értékek (melyek kifejezésre juttatják két szervezet, A és B hasonlóságának mértékét 16 S rRNS-szekvenciáik összehasonlítása alapján; 1 = teljes azonosság, 0 = a hasonlóság teljes hiánya; e kérdéssel részletesen még a továbbiakban foglalkozunk (*lásd* 1. 36. 1. alf.), szemben a DNS/DNS-homológiákkal, melyek elsősorban is a faji szintű elkülönítésekhez alkalmasak, nagyobb, sőt a legnagyobb rendszertani kategóriák összehasonlításához is felhasználhatók.

Amennyiben a sejtfalanalízisek eredményeit a 16 S rRNS hasonlóságokra alapított dendrogrammal *(33. ábra)* vetjük egybe, úgy a korreláció vitathatatlanná válik és látható, hogy a sejttakaró egyes típusaihoz vezető utak egyúttal a dendrogram egy-egy ágának felelnek meg. Esze-



33. ábra

a) és *b)* A klasszikus prokarioták és a metánképző baktériumok elkülönítése a sejtfalkomponensek megoszlása és a rokonsági kapcsolatok alapján egybevág a 16S rRNS-homológiák mértékének összehasonlításán alapuló dendogrammal (KANDLER, 1979)

rint a prokarioták két fő fejlődési vonala már a sejttakaró „feltalálása" előtt, vagyis rendkívül alacsony hasonlósági fokon (S_{AB} = 0,1) szétválhatott. Maguknak a metanogén baktériumoknak a kezdődő differenciálódása egyrészt a *Methanobacterium* genuszra (pszeudomurein), másrészt a többi metanogén mikroba együttesére már olyan szinten (S_{AB} = 0,25) ment végbe, mint amilyen szinten a klasszikus prokarioták baktériumokra és cianobaktériumokra hasadtak. A metanogén baktériumok csoportján belül egy további, még ugyancsak nagyon korán végbement differenciálódás (S_{AB} = 0,35), a *Methanosarcinához* (heteropoliszacharid) vezetett, míg gyaníthatóan egy már lényegesen későbbi (S_{AB} = 0,5) a *Methanospirillum* genuszt a mindmáig fal nélküli, bár proteinrárakódással védett alakoktól választotta el.

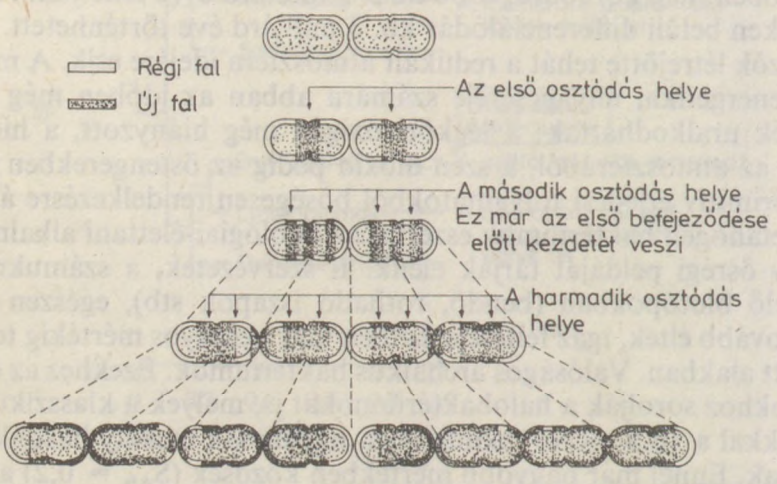
Egyébként a *Methanobacterium* genuszon belüli és a 16 S rRNS-homológiák alapján végrehajtott felosztás ismét csak további párhuzamot mutat a sejtfal kémiájával. A *33. ábrán* nem szereplő IA-csoportjuk pl. pszeudomurein-változatokat foglal össze, míg az M.o.H-törzs és az *M. formicicum* a pszeudomureinen kívül még kiegészítő poliszacharidot is tartalmaz. Az egyes csoportok elkülönülése földtörténeti idejének közvetlen meghatározása természetesen nem lehetséges, minthogy az evolúció során a 16 S rRNS változásának sebességét nem ismerjük. Annak a feltételezésnek az alapján, hogy ez a sebesség a különböző fejlődési vonalak esetében kb. azonos volt, továbbá paleontológiai adatokra támaszkodva legalább relatív megközelítéssel élhetünk. E szerint, miután a cianobaktériumok legrégibb fosszilis leletei több mint 2,5 milliárd évesek, ezért a metanogén baktériumok csoportjának elkülönülését időben még korábbra, több mint 3 milliárd évre tehetjük. A metanogéneken belüli differenciálódás kb. 3 milliárd éve történhetett. A metánképzők létrejötte tehát a redukált atmoszféra idejére esik. A metanogének energetikai anyagcseréje számára abban az időben még ideális feltételek uralkodhattak: a légköri oxigén még hiányzott, a hidrogén viszont az atmoszférából, a szén-dioxid pedig az őstengerekben végbemenő primitív erjedési folyamatokból bőségesen rendelkezésre állt.

A metanogén baktériumok eszerint az ökológiai-élettani alkalmazkodás egy ősrégi példáját tárják elénk. E szervezetek, a számukra még megfelelő biotópokban (bendő, rothadó iszapok stb), egészen a mai napig tovább éltek, igaz feltételezhetően már bizonyos mértékig továbbfejlődött alakban. Valóságos archaikus baktériumok. Ezekhez az ősbaktériumokhoz sorolják a halobaktériumokat is, melyek a klasszikus prokariotákkal a 16 S rRNS tekintetében ugyancsak csekély hasonlóságot mutatnak. Ennél már nagyobb mértékben közösek (S_{AB} = 0,2) a metanogénekkel. A halobaktériumoknál is szembetűnő a szokatlan anyagcsere és sejtkemizmus (halofília, fitanil-glicerin-éter, bíbormembrán), to-

vábbá a sejtfalstruktúra. A *Halobacteriaceae* két genusza közül a *Halobacterium* fehérjealegységekből felépített sejttakaróval rendelkezik, míg a GRAM-negatív *Halococcus*nak vastag heteropoliszacharid fala van. Ez azt igazolja, hogy az evolúció során maguk a *Halobacteriaceae* képviselői is még a murein-*sacullus* kifejlődése előtt saját, a többitől elkülönült fejlődési útjukra tértek és a prokarioták külön törzsének tekinthetők.

1.13.24. A sejtfal növekedése

A baktériumok hasadással osztódnak. A két osztódás között eltelt idő az ún. életciklus, mely komplex biokémiai történések sora. Ennek keretében a sejt tömege és térfogata megnövekedik, megkettőződik, majd két, sejtfallal határolt és teljes értékű kromoszómát tartalmazó sejtre osztódik. Az életciklus időtartama még ugyanazon populáció sejtjei esetében is némileg eltérő lehet. Az életciklus során a makromolekuláris szintézisek meghatározott időbeli sorrendben mennek végbe. A sejtek fehérje-, RNS-, DNS-, murein- stb. szintézisének folyamataiban gyorsuló és csendesülő aktivitási szakaszok vannak. A sejttömeg és térfogat változásai mikroszkópos nyomon követésének nehéz feladatát még leginkább a sejtfal növekedésének tanulmányozásával közelíthetjük meg. A sejtfal anyagával mint antigénnel nyulakat immunizálva specifikus ellenanyagokat állíthatunk elő, melyeket fluoreszcein izotiocianáttal jelölve, ultraibolya fényben fluoreszkálóvá tehetünk. A jelzett antitestek specifikusan reagálnak a sejtfallal, de a sejt más alkatelemeivel nem, így nem akadá-

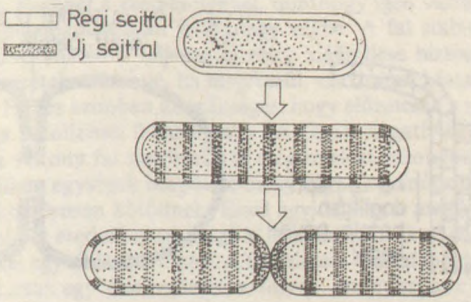


34. ábra

Új sejtfalanyag beépülése a *Streptococcus pyogenes* sejtfalába (MANDELSTAM és MCQUILLEN, 1968)

lyozzák annak normális anyagcseréjét. Következésképpen, nyomon követhető egyrészt a régi fluoreszkáló sejtfal sorsa, másrészt az új, nem fluoreszkáló falanyag lerakódásának a helye. UV-fényben végzett megfigyelések szerint különbségek vannak a GRAM-pozitív és a GRAM-negatív baktériumok között a sejtfal új anyagának lerakódása, ill. a fal növekedési mechanizmusa tekintetében *(34. és 35. ábrák)*. A GRAM-pozitív *Streptococcus pyogenes*nél a sejtfalnövekedés kezdeményezése ekvatoriálisan megy végbe, miközben a sejt régi, jelzett fele mintegy félretolódik. A GRAM-negatív *Salmonella typhosa*nál az új falanyag látszólag szórtan, a már meglevő sejtfalba rakódik le, miáltal a régi fal jelzése mintegy feloldódik. Meg kell azonban itt jegyezni, hogy a jelzett ellenanyagok természetszerűen, csak a sejtfal legkülső „antigénrétegével" reagálnak. Ezért a jelzett és jelzetlen falalkotóelemek megfigyelt eloszlása nem feltétlenül tükrözi azt a mechanizmust, amely szerint az új peptidoglikán a már meglevő strukturális hálózatba beépül. Ez annál is inkább így van, minthogy KOCH (1985.*a*.) után ma már tudjuk, hogy pl. a GRAM-pozitív baktériumoknál az új falanyag beépülése a citoplazmamembrán felől megy végbe, az új rétegnek a régi alá épülésével.

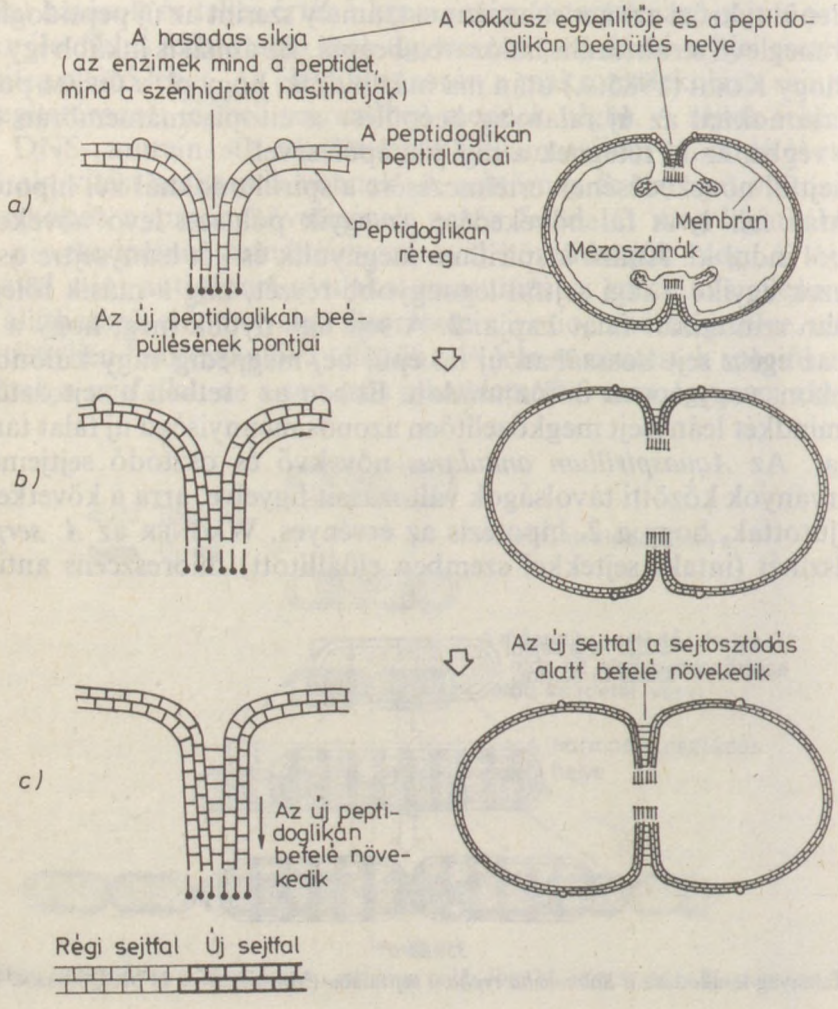
A sejtfal növekedésének értelmezésére a spirillumoknál két hipotézist állítottak fel. **1.** A fal növekedése az egyik póluson levő növekedési pontból indul ki. Amint a spirillum megnyúlik és két leánysejtre osztódik, ezek egyike a régi sejtfal legnagyobb részét, míg a másik főleg az újonnan szintetizált falat kapja. **2.** A sejt úgy nyúlik meg, hogy a régi falba az egész sejt hosszában új fal épül be, mégpedig vagy különböző pontokon, vagy éppen diffúz módon. Ebben az esetben a sejtosztódás után mindkét leánysejt megközelítően azonos mennyiségű új falat tartalmazhat. Az *Aquaspirillum annulatus* növekvő és osztódó sejtjeinél a sejtzárványok közötti távolságok változásait figyelve, arra a következtetésre jutottak, hogy a 2. hipotézis az érvényes. WAGNER az *A. serpens* sejtfelszínét (intakt sejtekkel szemben előállított) fluoreszcens antiszé-



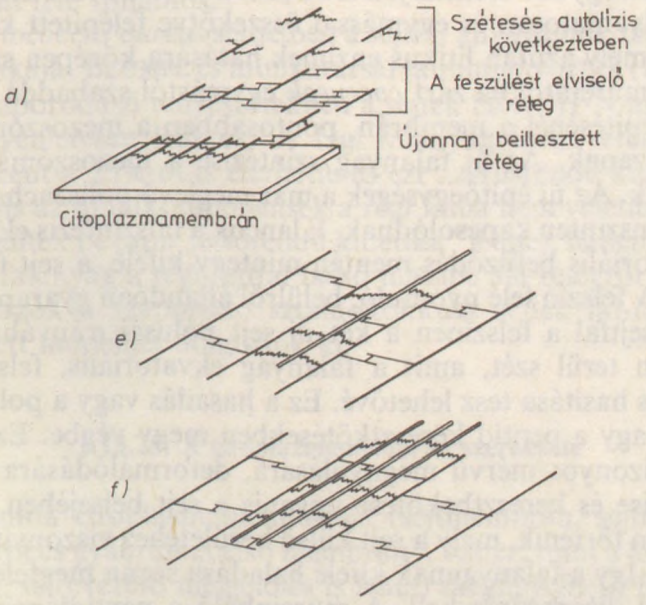
35. ábra

Új sejtfalanyag lerakódása a *Salmonella typhosa* sejtfalába (MANDELSTAM és MCQUILLEN, 1968)

rummal festette. Miután a felesleges antitesteket mosással eltávolította, a spirillumokat friss tápközegbe helyezte. Minden új, a festés után képződött felület festetlen (nem fluoreszkáló) maradt. Az ilyen nem fluoreszkáló régiók először a pólusokon jelentek meg, melyeket később az egész sejt hosszában számos nem fluoreszkáló zóna képződése követett. A nem fluoreszkáló zónák legerőteljesebben a sejtosztódás régióiban jelentkeztek. E módszerrel hasonló eredményeket kaptak a *Spirillum volutans*nál is. Ennél az idő előrehaladtával a sejtfal fluoreszcenciájában egyenletes csökkenés volt tapasztalható. Ez arra mutat, hogy a *S. volutans*ban a sejtfelszín új anyagának diffúz interkalációja ment végbe, vagyis az új szórtan épült be a régibe. A *S. volutans* sejtjei kezdetben még megőriztek egy fénylő, poláris régiót, miután a sejt többi része már nem fluoreszkáló-



vá vált, de később ez is elhalványodott. Az itt ecsetelt immunfluoreszcens vizsgálatok során is intakt, sértetlen sejtekkel szemben preparált antiszérumot használtak. Így feltehetően csupán a felszíni sejtfalréteg átalakulásait figyelhették meg, vagyis az ún. RS- (*lásd* 141. old.), továbbá a lipopoliszacharid-rétegeket. Tény, hogy az RS-réteg tisztított proteinjeivel szemben preparált specifikus antiszérum használata a jövőben lehető-



◄ *36. ábra*

a–c) A *Streptococcus feacalis* sejtfalának növekedése. Az új falanyag a kokkuszok egyenlítőjében jön létre és rakódik le. Az új fal, bár koncentrikusan befelé épül, kifelé is terjed, minthogy a létrejött vastag falat középen enzimek kettéhasítják és így lehetővé teszik elhajlását, legömbölyödését és kifelé terjedését. A sejtfal hasításában elsősorban a peptidkötéseket bontó muramidáz vesz részt, emellett azonban a szénhidrátkomponensek bontása is szerepet játszik.

d) A GRAM-pozitív pálcika alakú sejtek hengeres meghosszabbodásának belülről kifelé haladó falépítő mechanizmusa. Ezeknél a szervezeteknél, minthogy igen vastag fallal rendelkeznek, az új anyag beépülése a citoplazmamembrán felől megy végbe. A fal stabil meghosszabbodását egy a citoplazmamembránnal szomszédos teljesen új réteg aláépülése biztosítja. A növekedésnek ezt a módját alkalmazó szervezetek mureinje, ha megfeszül, maximum kétszeres felület nagyobbodással járó kiterjedésre képes. Ehhez azonban az szükséges, hogy előzetesen a murein legkülső, periferiális, merev rétegének anyaga autolízissel fellazuljon. *e)* A GRAM-negatív baktérium falának kiterjedése. Az élő baktériumban a vékony fal megfeszül és még mielőtt bizonyos kötések specifikus hasítása megtörténne, új oligoglikán egységek beépülése megy végbe oly módon, hogy a régi fal szomszédos szénhidrát fonalaihoz kovalensen kötődnek. Ezzel egyidejűleg a megfeszülő régi kötések egy része hidrolízisen esik át, ami azt eredményezi, hogy a feszülés már az új egységekre is kiterjed, melyek emiatt a régi falelemekkel egy síkba kerülnek. A fal felülete ezáltal megnövekedik. *f)* Ahelyett, hogy a régi falba, helyenként, csak egy lánc beillesztése folyna, amint azt az *e)* ábrán láthatjuk, ez esetben ugyanabba a faltérközbe, a lényegesen nagyobb mérvű felületnagyobbodás érdekében, előre kiépített és egymással előzetesen összekötött láncok egész kötege kerül beillesztésre. A *d–f)* ábrák KOCH (1985.*a*.) után

vé teheti legalább e felületi réteg szintézisének teljes pontosságú tanulmányozását. Az *A. serpens* RS-rétege, mely hexagonális felépítéssel egyenletesen borítja a sejt hengeres részét, a pólusokon már diszkontinuitást mutat.

A sejtosztódás befejező mozzanatai közé tartozik a harántválaszfal kialakulása. Elektronmikroszkópos felvételek arra utalnak, hogy a *Streptococcus faecalis* sejtfalszintézise során az új polimer a *coccus* egyenlítőjében egy sáv mentén jön létre *(36. a.–c. ábra)*. A két leánysejtet először a folyamatosan és egymással összekötve felépített kettős új fal választja el, mely azután lítikus enzimek hatására középen széthasad és a komplett, mureintokba zárt *coccusok* egymástól szabaddá válhatnak. Az új fal kiépítésénél a membrán, pontosabban a mezoszómák fontos szerepet játszanak. Az új falanyag szintézise a mezoszómák mindkét oldalán folyik. Az új építőegységek a már meglevő poliszacharidláncokhoz membránszinten kapcsolódnak. E láncok a falszintézis előrehaladtával az ekvatoriális befűződés mentén mintegy kifelé, a sejt felszíne felé mozognak. A felszín felé nyomuló, belülről állandóan gyarapodó, dupla vastagságú sejtfal a felszínen a két új sejt pólusai irányában szimpla vastagságban terül szét, amit a falanyag ekvatoriális, felszín közeli, szimmetrikus hasítása tesz lehetővé. Ez a hasadás vagy a poliszacharidláncokban vagy a peptid keresztkötésekben megy végbe. Ezenkívül az új murein bizonyos mérvű megnyúlására, deformálódására is szükség van. Szintézise és keresztbekötése ugyanis a sejt belsejében, egy olyan gyűrű mentén történik, mely a sejt külső kerületéhez viszonyítva jelentősen szűkebb. Így a falanyagnak kifelé haladása során megfelelő módon, megnyúlással illeszkednie kell. A mureinháló a peptidláncokban rejlő flexibilitás következtében némileg elasztikus (Levy és munkatársai, 1973).

A Gram-pozitív és -negatív sejtek falépítő mechanizmusainak modern modelljét Koch után (1985) a *36. d.–f. ábrákon* mutatjuk be és ott értelmezzük.

A peptidoglikán gyors befelé növekedése és központi záródása az osztódás síkjában akkor következik be, amikor az új dupla vastagságú sejtfal felszín közeli hasadásának folyamata már lelassul. Más szóval, a falszintézis sebessége meghaladja a hasítás gyorsaságát. Ismeretes, hogy a penicillin alacsony koncentrációi erősen gátolják a keresztfalképződést anélkül, hogy korlátoznák a periferiális falmegnyúlást. Nagy penicillinkoncentrációk a sejtfalszintézist teljesen felfüggesztik, melynek eredménye a sejt belső ozmotikus nyomására visszavezethető szétszakadása. A keresztfal kialakulási folyamata sokkal érzékenyebb a penicillinnel szemben, mivel a fal befelé növekedése a peptidoglikán-szintézis és a transzpeptidáció sebességétől függ.

A baktériumsejt alakja, amit a peptidoglikán külső váz határoz meg, lényegében a vázformáló tényezőktől függ. A sejt jellemző külső alakjának formálását különösen a keresztfal és a periferiális falak kiépítésének gyorsaságában jelentkező különbségek szabályozzák. Ennek megfelelően lekerekített, szögletes, tarajos stb. sejtalakok keletkezhetnek.

A keresztfal végzárásakor a hálózatot alkotó poliszacharidláncok számában fokozatos csökkenésnek kell bekövetkeznie. Ez a csökkenés a zárási pont felé rohamos.

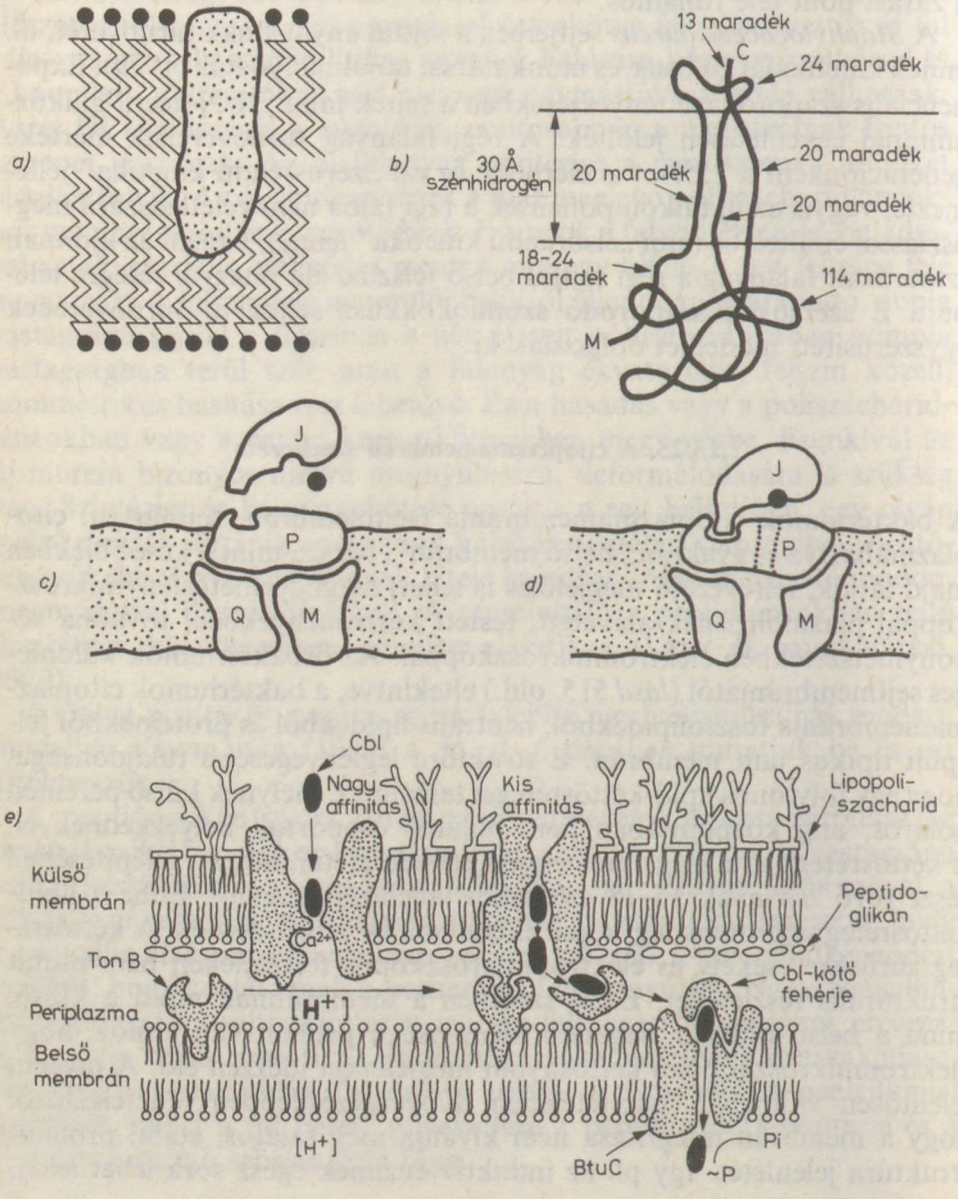
A *Staphylococcus aureus* sejtjeiben a sejtfal anyagainak turnoverét, ill. ennek kinetikáját BLÜMEL és munkatársai tanulmányozták (1979). Exponenciális szaporodású tenyészetekben a sejtek falát ^{3}H-N-acetil-glükózaminnal egyenletesen jelölték. A régi falanyag turnoverének mértéke generációnként a 25%-ot is elérhette és ezt „zérusrendű kinetika" jellemezte, vagyis az új falkomponensek a régi falba nem véletlenszerű megoszlással épültek be (ami „elsőrendű kinetika" lenne), hanem az újonnan szintetizált falanyag a régi sejtfal belső felszíne alá rétegről rétegre települt. E szerzők a szaporodó sztafilokokkusz sejtek fal-turnoverének egyszerűsített modelljét dolgozták ki.

1.13.25. A citoplazmamembrán szerkezete

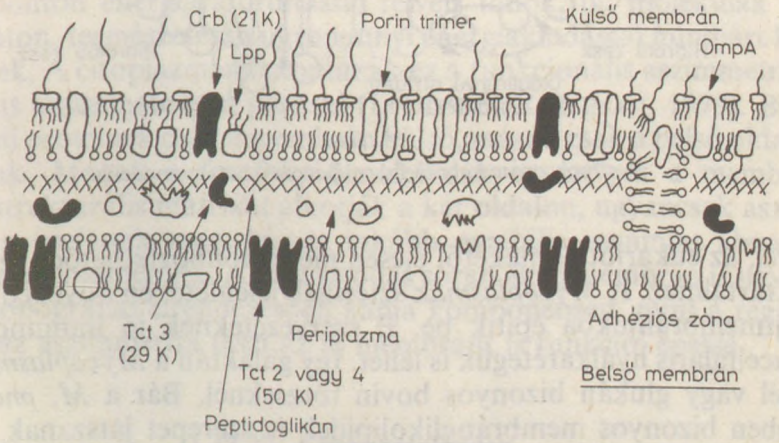
A baktériumok citoplazmamembránja (sejtmembrán, sejthártya, citoplazmahártya és gyakran „belső membrán", bár ez, mint a későbbiekben majd látjuk, félrevezető megjelölés is lehet) megfigyelhető fénymikroszkóppal plazmolízisnek alávetett, festett készítményekben, továbbá vékonymetszetekben elektronmikroszkóppal. Az ősbaktériumok különleges sejtmembránjától (*lásd* 515. old.) eltekintve, a baktériumok citoplazmamembránja foszfolipidekből, neutrális lipidekből és proteinekből felépült tipikus unit membrán. E struktúra leglényegesebb tulajdonsága, hogy egy folytonos lipid-kettősréteget tartalmaz, melynek külső peremén poláros, míg központjában nem poláros csoportok helyezkednek el. E kettősréteg vastagsága arra enged következtetni, hogy a felépítésében részt vevő zsírsavak 15–18 szénatom lánchosszúságúak. Ebbe a lipidkettősrétegbe proteinalegységek ékelődnek be szigetszerűen. A kettősréteg sűrűsége csekély és elektronmikroszkópos felvételeken nem mutat strukturális részleteket. Ezzel szemben a membránnak mind a külső, mind a belső oldalán elegendő mennyiségű protein van ahhoz, hogy elektronmikroszkópban kettősnyom megjelenést idézzen elő. A protein jelentősen változhat összetételében. Következésképpen feltételezhető, hogy a membrán integritása nem kívánja meg sajátos, stabil proteinstruktúra jelenlétét. Így pl. az induktív enzimek egész sora lehet jelen,

vagy hiányozhat a hártyából anélkül, hogy ezzel bármely más működését hátrányosan befolyásolná. A citoplazmamembrán fehérjéi az L-aminosavak teljes spektrumát tartalmazzák. A foszfolipideken kívül még előforduló neutrális lipidek a glicerinnek zsírsavakkal alkotott észterei.

A membrán ^{14}C-glicerinnel specifikusan jelölhető. A *37. a. és b. ábra* a membrán szerkezetét sematikusan mutatja be. Jól látható a folytonos

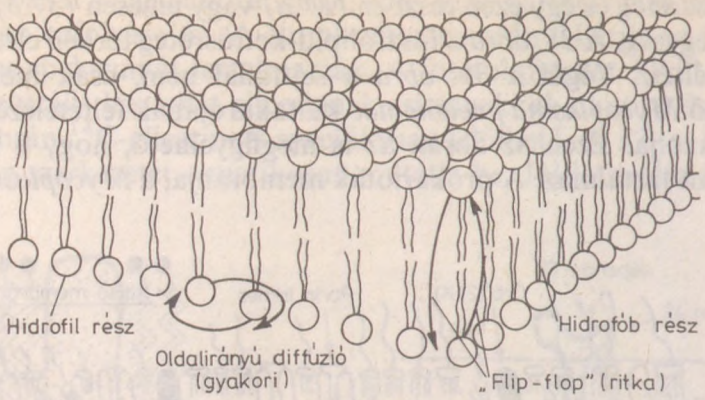


lipid-kettősréteg és egy ezen részben *(37.a)* vagy teljesen *(37.b)* áthatoló fehérje-alegység. A *38. ábra* a foszfolipid-kettősréteg térbeli elrendeződését szemlélteti. Végül a *39. ábra* a sejtfallal nem, csak membránnal rendelkező *Mycoplasma pneumoniae* kültakarójának feltételezett szerkezetét ábrázolja. Ezen az ábrán az is megfigyelhető, hogy a membrán koleszterint tartalmaz. A prokarioták membránja, a *Mycoplasmák* kivé-



◄ *37. ábra*

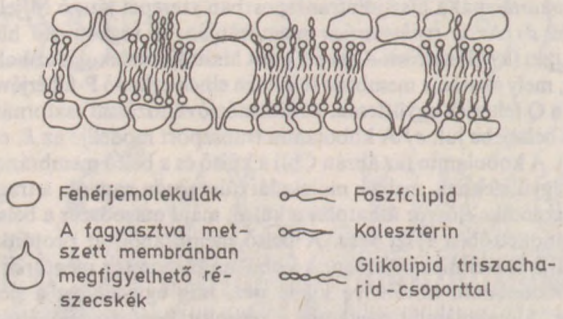
Különböző membrán és membrántranszport modellek. *a)* A foszfolipid kettősréteg modellje egy membránba merülő, de azt nem teljes szélességében átfogó fehérjemolekula körvonalaival. A fekete pont foszforcsoportot szimbolizál, mely glicerinhez kötődik, utóbbiról két zsiracil lánc lóg alá. *b)* A *Salmonella typhimuriumnál* a hisztidintranszportban szerepet játszó M jelzésű membrán-protein lokalizációja. *c)* és *d)* A *S. typhimurium* membránján át végbemenő hisztidin transzport egy modellje FERRO-LUZZI (1984) szerint. A fekete pont hisztidinmolekulát szibolizál. Utóbbi a J szabad fehérjéhez kötődik, mely ezután a membrán felszínén elhelyezkedő P-fehérjével specifikusan kapcsolódik. A P az M és a Q fehérjék együttesen, konformációváltozással csatornát alakítanak ki, melyen át a hisztidin a sejt belsejébe jut. *e)* A kobolamin transzport modellje az *E. coli* esetében (HOLROYD és BRADBEER, 1984). A kobolamin (az ábrán Cbl) a külső és a belső membránon át jut a citoplaszmába. A kobolamin vegyületeknek, melyek molekulái túlságosan nagyok, a transzportja két elkülöníthető folyamatra tagolódik: először áthatolás a külső, majd másodszor a belső membránon. A periplazmatikus tér mindkettőben részt vesz. A belső membránon át protonkoncentrációs grádiens épül ki. Kezdetben, a külső membránban, a kobolamin-receptor még üres és a fokozott affinitás állapotában van. Kobolamin kötőhelye kifelé néz, míg egyidejűleg a periplazmatikus oldalán Ca^{2+}-iont köt meg. A kobolamint megkötve e receptor konformációváltozáson megy át, minek folytán szubsztrátja a belső oldalra kerül. Ugyanakkor a receptor molekulája a belső membrán Ton B-proteinje számára kötőhelyet alakít ki. Amennyiben a pH a periplazmában alacsony (protonkoncentrációs grádiens), a Ton B a receptorhoz kötődik, melyről a Ca^{2+}-ion felszabadul. A receptor konformációváltozása alacsony kobolamin affinitási állapotot eredményez. Következésképpen a kobolamin szabaddá válik. (A Ton B valójában a receptor affinitását csak a Ca^{2+}-hoz csökkenti.) Ezt követően a kobolamin szabad periplazmatikus fehérjéhez kötődik, mely a nagy affinitású belső receptorhoz (BtuC-fehérje) szállítja, melynek segítségével a citoplazmába kerül. *f)* A *Salmonella typhimurium* külső és belső membránjainak modellje KAY és munkatársai után (1984) feltüntetve a trikarboxilát transzportban szerepet játszó fehérjék helyzetét és lokalizációját. A Crb a külső membránban feltehetően porin



38. ábra

A citoplazmamembrán folyadékmozaik sztereomodellje

telével, az eukariota sejtekétől élesen megkülönböztethetően szterineket nem tartalmaz. A *Mycoplasmák* szterinek jelenlétében növekedve ezeket a sejtmembránjukba építik be. E szervezeteknek jó immunogenitású extracelluláris nyálkarétegük is lehet. Így galaktán a *Mycoplasma mycoides*nél vagy glukán bizonyos bovin törzseknél. Bár a *M. pneumoniae* esetében bizonyos membránglikolipidek is szerepet játszanak, mégis e fajnál a legfőbb immunogének a membránproteinek. A glikolipid-molekulák a *M. pneumoniae* sejtek membránjának külső felületén helyezked-



39. ábra

A *Mycoplasma pneumoniae* membránjának valószínű szerkezete, sematikusan. A prokariótáknál csak itt találhatunk membránba beépült szterineket. A sejtfal (murein) teljesen hiányzik. A palack alakú részecskék funkciója ismeretlen

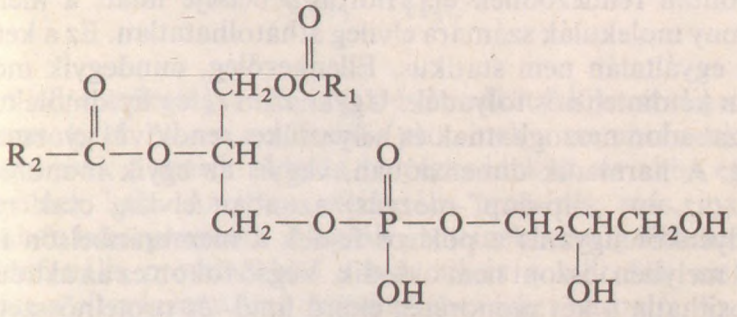
nek el *(lásd 39. ábra)*. E molekulák szénhidrogénláncai a membrán hidrofób lipidrétegébe vannak beágyazva. Ezzel szemben a hidrofil szénhidrátrészek, melyek a szerológiai specificitásért felelősek, a felszínen vannak.

1.13.26. A citoplazmamembrán aszimmetriája

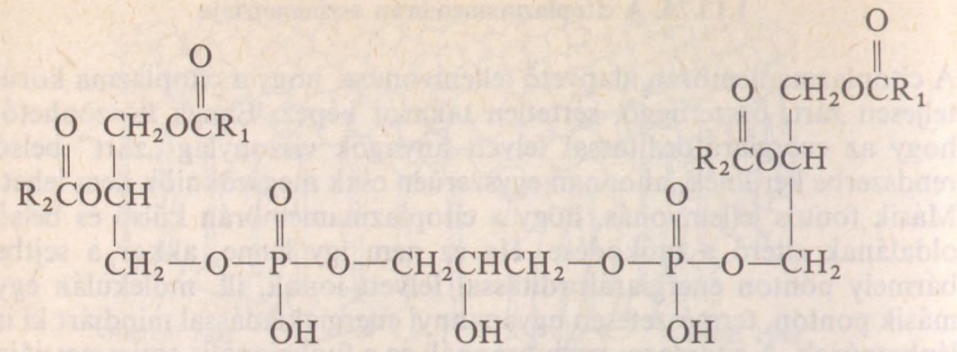
A citoplazmamembrán alapvető jellemvonása, hogy a citoplazma körül teljesen zárt, összefüggő, sértetlen takarót képez. Ennek köszönhető, hogy az energiaráfordítással felvett anyagok viszonylag „zárt" belső rendszerbe kerülnek, ahonnan egyszerűen csak megszökniök nem lehet. Másik fontos jellemvonás, hogy a citoplazmamembrán külső és belső oldalának eltérő a működése. Ha ez nem így lenne, akkor a sejtbe bármely ponton energiaráfordítással felvett ionok, ill. molekulák egy másik ponton, természetesen ugyanannyi energiakiadással mindjárt ki is léphetnének. A citoplazmamembránnak ez a funkcionális aszimmetriája strukturális aszimmetriával párosul (LODISH és ROTHMAN, 1979). Bizonyos típusú proteinek csak a membrán külső, mások csak a belső oldalán lokalizáltak. Maguk a foszfolipid-molekulák is, melyek a membrán alapvető strukturális mátrixát alkotják a két oldalon, ugyancsak aszimmetrikusan oszlanak meg, bár ez inkább parciális, semmint abszolút aszimmetriát eredményez. A sejtosztódás során az új membrán is ugyanabban a topográfiai elrendezésben kapja komponenseit, mint a régi, és csakis ez az aszimmetria teszi az új membránt is funkcióképessé.

1.13.27. A membránlipidek

A membránfoszfolipidek hidrofilrégiója a negatív töltésű foszfátcsoport (PO_4^-). Számos foszfolipidben ehhez egy kompenzáló pozitív töltésű (pl. aminocsoport: NH_2^+) molekula csatlakozik. Ilyen pl. a baktériumok fontos membránkomponense, a foszfatidil–etanol–amin (lásd 163. oldal). Az *E. coli*ban a foszfatidil-etanol-amin az összes membránfoszfolipid 75–85%-át teszi ki. Ezenkívül 10–20%-os gyakorisággal foszfatidilglicerint is kimutathatunk,



továbbá 5–15%-ban kardiolipint:



Az R_1 és az R_2 zsírsavrészek. Ezek főleg palmitinsav (átlag 25–40%-ban), palmitoleinsav:

$$CH_3(CH_2)_5C{=}C(CH_2)_7COOH$$

(átlag 25–40%-ban) és cisz-vakcénsav (átlag 25–35%-ban):

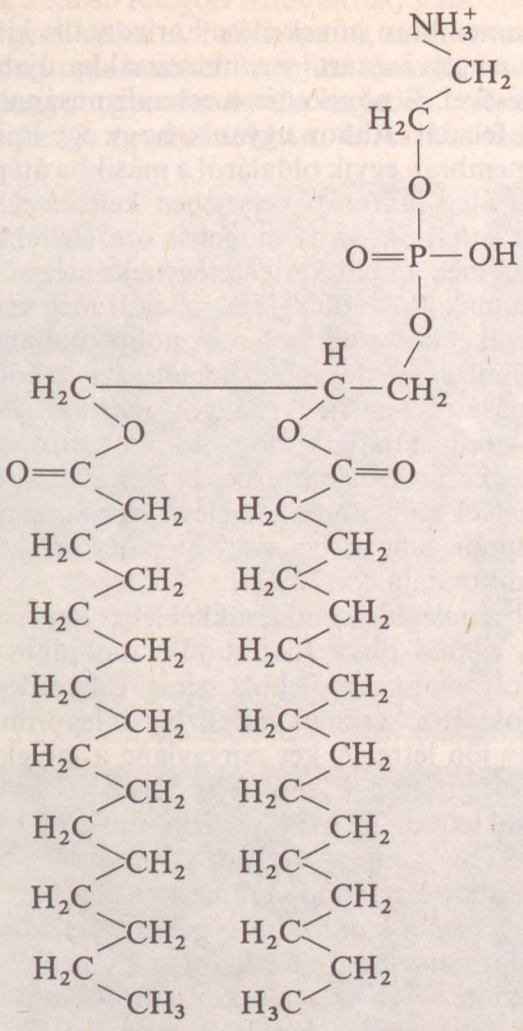
$$CH_3(CH_2)_5C{=}C(CH_2)_9COOH$$

(RAETZ, 1978). Ezenkívül szerepelnek még laurinsav (0–1%), mirisztinsav (1–5%), cisz-9,10-metilén-hexadekanoinsav (1–20%), sztearinsav (0–1%), laktobacillinsav (1–20%) és ritkán 3-D-hidroximirisztinsav.

1.13.28. A „flip-flop" mozgás

Minthogy a membránlipid-molekulák két terminális hidrofil és hidrofób szakasza eltérő oldékonyságú, ezért e molekulák a kettősréteg kialakításánál spontán rendeződnek el. Hidrofób belseje miatt a membrán a vízoldékony molekulák számára elvileg áthatolhatatlan. Ez a kettősréteg azonban egyáltalán nem statikus. Ellenkezőleg, mindegyik monoréteg valójában kétdimenziós folyadék. Ugyanazon réteg lipidmolekulái laterálisan szabadon mozoghatnak és helyzetüket rendkívül gyorsan változtathatják. A harmadik dimenzióban, vagyis az egyik monorétegből a másikba (az ún. „flip-flop"-mozgás) azonban elvileg csak rendkívül lassan. Ilyenkor ugyanis a poláros fejnek a membránbelsőn is át kell hatolnia, melyben viszont nem oldódik. Végső fokon ez az akadályozottság biztosíthatja a két monoréteg eltérő lipid- és proteinösszetételét és állandó aszimmetriáját is. A membránba beágyazott fehérjék az ún. integrált proteinek, méretüknél és lokalizációjuknál fogva legtöbbször a

foszfatidil-etanol-amin



membrán teljes szélességét áthidalják és mindkét felületen szigetet alkotva bukkannak fel. Az ún. periferiális proteinek a membránnak vagy az egyik, vagy csak a másik oldalán helyezkednek el, és abba egyáltalán nem merülnek bele. Az ilyen periferiális proteinek más, magában a membránban lehorgonyzott, integrált proteinekhez rögzülhetnek. Ezekben a periferiális proteinekben a hidrofil és a hidrofób aminosavak megoszlása a citoplazmatikus proteinekéhez lehet hasonló. Az integrált proteinek viszont általában vízben oldhatatlanok, minthogy a felületükön exponált aminosavépítő-alegységek hidrofóbok.

1.13.29. A citoplazmamembrán növekedése

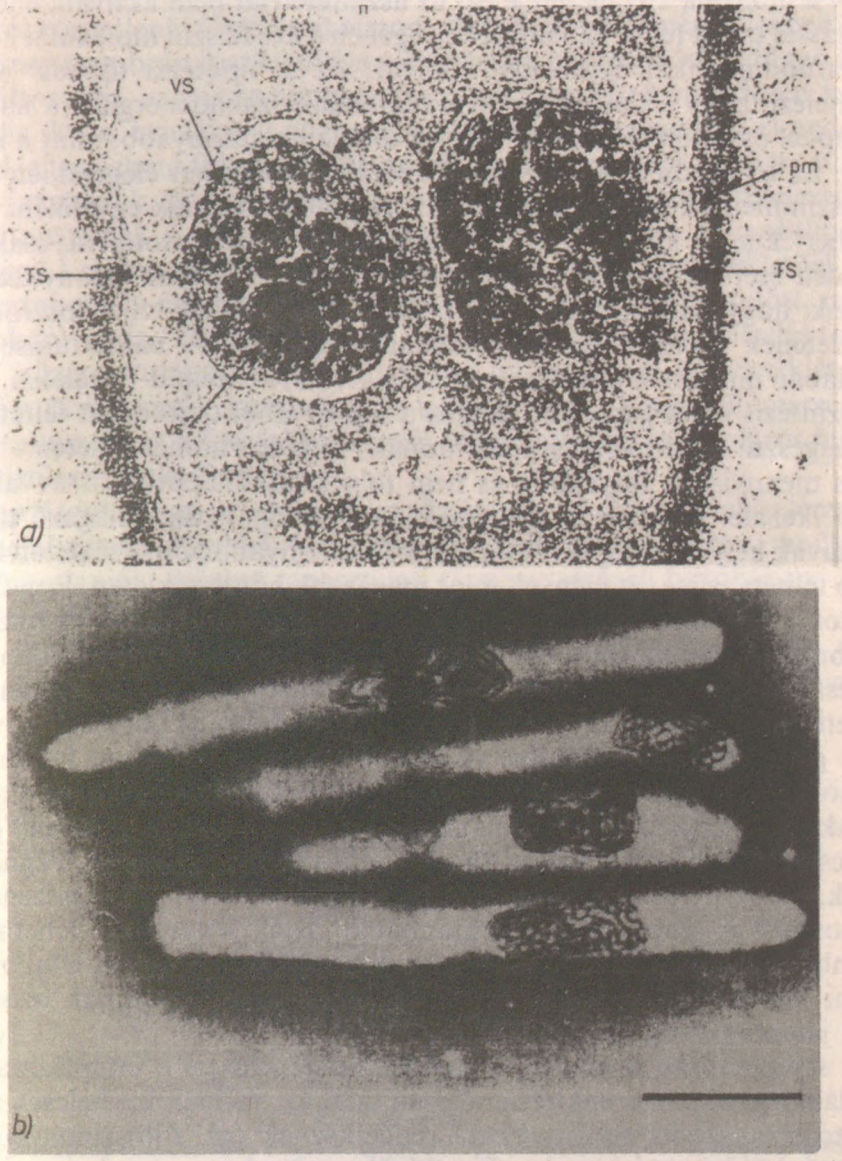
A citoplazmamembrán növekedése horizontális kiterjedéssel megy végbe, vagyis a meglévő „zárt" membránzsákba újabb és újabb anyagok szórt beépülésével. E növekedés mechanizmusának megértése azonban nem könnyű feladat. Ahhoz ugyanis, hogy egy lipid- vagy egy proteinmolekula a membrán egyik oldaláról a másikba átépüljön, hidrofil régióikat a kettősréteg hidrofób belsejében kell átszállítaniok. Ez a régió viszont, mint láthattuk, az aszimmetria őre. Feltehetően pl. az integráns membránproteinek a lipid-kettősrétegen, szintézisükkel egy időben, úgy és akkor hatolnak át és épülnek be, mielőtt még végső, gyűrődött molekulaszerkezetüket elnyerték volna. A polipeptidlánc tehát még azt megelőzően nyomul a membránba, mielőtt azt a konformációt elnyerné, mely behatolását éppen hogy nagyon megnehezítené. Ezenkívül az is nagyon valószínűnek látszik, hogy a lipid-kettősrétegbe elsőnek nem is maga a kérdéses protein hatol be, hanem ezt bizonyos más integráns proteinek, melyek a membránban eleve jelen vannak, mintegy bevezetik. Utóbbiak azután, hogy a be- vagy átépülés befejeződött, a helyszínről esetleg el is diffundálnak.

A lipidek beépülése is szintézisükkel lehet kapcsolatos. Ennek felderítésére az *E. coli*nál pl. a foszfatidil-etanol-amin szintézisét követték nyomon. E folyamat két molekula zsírsavval kezdődik, melyek a donorról glicerin-foszfátra kerülnek, miközben a legprimitívebb foszfolipid, a foszfatidinsav jön létre. A két zsírsavlánc a molekula hidrofób farkát, míg a glicerin-foszfát a hidrofil fejét képezi. A következő lépésben egy foszforilált nukleotid, a CMP, a foszfatidinsav fejrészéhez kapcsolódik, majd ezt követően az újra leváló CMP-t szerin helyettesíti, ami CO_2-t veszít és komplett foszfatidil-etanol-amin jön létre. A szintézis minden lépését egy-egy enzim katalizálja és ezek, egyetlenegy kivételével, a baktérium citoplazmamembránjának integrált proteinjei. Következésképpen mind a szintézisben szereplő szubsztrátok, mind az előállított reakció termékek feltétlenül a kettősrétegben kell hogy elhelyezkedjenek. Eszerint a membrán úgy növekedik, hogy benne *in situ* új lipidek jönnek létre.

A *Bacillus megateriumnál* a citoplazmamembrán nagy mennyiségű foszfatidil-etanol-amint tartalmaz, mely az összes membránlipidnek akár 70%-át is kiteheti. A többi főleg foszfatidil-glicerin. Ebben a foszfatidil-etanol-amin etanol-amin-csoportját egy második glicerin helyettesíti (*lásd* 161. old.).

Úgy tűnik, hogy maguk a lipidprekurzorok már citoplazmatikus eredetűek. Problematikus viszont, hogy ha ezek a membrán citoplazma felőli oldalán jönnek létre, akkor bár nincs akadálya annak, hogy a

plazma menti oldal monorétegének tagjai legyenek, azonban kérdés, hogy miként kerülnek a külső rétegbe. Mint láttuk, a spontán „flip-flop" a két réteg között nagyon ritka. A baktériumok ezzel szemben gyorsan osztódnak, miközben citoplazmamembránjuk tömegét és annak mindkét rétege felületét nagyon gyorsan és „könnyedén" növelik. Ma azt tartjuk, hogy a növekedő membránokban, és csakis ezekben, olyan



40. ábra

a) Mezoszóma. *Bacillus subtilis.* (Elektronmikroszkópos felvétel) *b) Clavibacter xyli* nagy mezoszómákat tartalmazó sejtjei. Negatívan festett készítmény. A sejtek pleomorfak. A vonás 0,5 μm-t jelez (Davis és munkatársai után, 1984)

proteinek vannak, melyek a két réteg lipidkészleteinek bizonyos fokú kiegyensúlyozását hatékonyan elősegítik. Ezek a fehérjék talán nem is a lipidek mozgásának irányát befolyásolják, hanem a két réteg között csupán valamiféle szabályozható átjáró csatorna szerepét töltik be. Ez esetben viszont ellentmondásos helyzet alakulhat ki: hogyan maradhat meg ily módon a membrán alapvető aszimmetriája? Sokan feltételezik, hogy a mikroba anyagcseréje ezt az aszimmetriát nem aktívan, energiakiadással tartja fenn, hanem ez lényegében a két felszín molekulái közötti termodinamikai egyensúlyt tükrözi. Ez a hipotézis többek között feltételezi, hogy a lipidek bizonyos fajtáinak szabadenergiája a nagyon komplex összetételű membrán egyik oldalán alacsonyabb, mint a másikon. Ez az energetikai különbség azonban nem lehet elegendően nagy az aszimmetriák magyarázatára. Az ilyen aszimmetriák egyébként is pl. a fehérjéknek a két réteg közötti megoszlását összehasonlítva, csaknem minden esetben nagyon mérsékeltnek tűnnek. Ma már bizonyítottnak látszik, hogy a membránok működéséhez a sejt közel teljes foszfolipidkészletének jelenléte elengedhetetlenül szükséges. A baktériumsejtnek általában nincsenek nagy, használaton kívüli foszfolipid-tartalékai. A lipidszintézis teljes genetikai gátlása a sejt további osztódását feltétlenül felfüggeszti. A citoplazmamembránnak – minden hőmérsékleten – bizonyos mennyiségű folyékony és nem folyékony állapotú zsírsavval kell rendelkeznie. A telítetlen zsírsavakat ciklopropán vagy elágazó típusú zsírsavak helyettesíthetik. A membrán alacsonyabb hőmérsékleten kevesebb telített zsírsavat igényel, mint magasabb hőmérsékleten. Rendkívül fontos a különböző töltésű és típusú fejrészcsoportoknak egymáshoz viszonyított aránya is. A vad típusú törzsekben a negatív töltésű poláros fejrészcsoportok az összesnek 15–20%-át teszik ki. Ha ez a mennyiség genetikai okokra visszavezethetően megkettőződik, akkor a sejt növekedési gyorsaságában jelentős visszaesés következik be. A foszfatidiletanol-amin-szintézissel szemben, a kardiolipin-szintézis genetikai gátlásának nincs kihatása a mikroba szaporodására és a membránlipid poláros csoportmegoszlásának változását sem vonja maga után. Végül úgy tűnik, hogy a foszfolipid-turnover és -katabolizmus nem esszenciális fontosságú a szaporodás szempontjából. Ezek lényegesek lehetnek a membrán adaptációjában a gyors környezeti változásokhoz, a laboratóriumi körülmények között mért szaporodás viszonylatában azonban nem játszanak nagy szerepet.

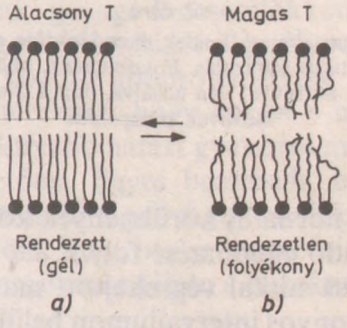
A sejtmembrán legnagyobb méretű módosulásait a citoplazma felé általában azokban a baktériumokban találjuk, melyek kivételesen aktív elektrontranszport-rendszerekkel rendelkeznek (pl. fotoszintetizáló és nitrogénkötő baktériumok). Ezenkívül a citoplazmamembránnak különleges betüremkedései is vannak, mint pl. a mezoszómák (*40. ábra*), amelyekhez speciális funkciók társulnak.

1.13.30 Átmenet a membrán rendezett és rendezetlen (szilárd és folyékony) állapotai között. Az átmenet szabályozása

A membrán mindenkori fizikai állapota alapvetően befolyásolja működését és ezen keresztül a sejt teljes anyagcseréjét. Mint kimutatták, az *E. coli*ban a transzportrendszer rendkívül bonyolult sokoldalú működése a citoplazmamembránban lipidjeinek rendezett, ill. rendezetlenségi állapotától közvetlenül függ, amit viszont alapvetően a hőmérséklet befolyásol. A sejtmembrán foszfolipidjei acilrészének hőmérséklettől függő állapotváltozásait, vagyis az átmenetet a szilárd, szorosan elrendezett hexagonális (kvázi kristályos) állapotból az inkább véletlenszerű elrendeződéssel jellemezhető folyékony állapotba, fázisátmenetnek *(„phase transition")* nevezzük. Ezt a folyamatot más néven rendezettség–rendezetlenségi átmenetnek *(„order–disorder transition")* is hívják. A foszfolipidek zsír (acil-) savláncai a fázisátalakulás kezdete alatti hőmérsékletnél szoros hexagonális elrendeződésűek. Ha az átalakulás befejeződött, úgy a láncok folyékony állapotba jutnak *(41. ábra)*. Mind az átalakulás folyamata középpontjának hőmérséklete (az ún. átmeneti hőmérséklet T_t), mind a fázisátmenet kiindulása és teljessé válása közötti hőmérsékleti intervallum (Δt), a foszfolipidek zsír-aciltartalmától és a poláros fejrész csoportösszetételétől függ.

Úgy látszik, hogy a membrán-kettősrétegek zsírsavösszetétele lényegesen befolyásolja a lipidek fázisátmeneti viselkedését. E téren, modellkísérletek alapján, néhány tapasztalati törvényszerűség birtokában vagyunk *(42. ábra)*. Ezek:

1. A telített zsírsavakkal acilált lipidek T_t-értéke magasabb, mint azoké a lipideké, melyek cisz-helyzetű, egyszeresen telítetlen zsírsavakat



41. ábra

A zsír-acil-láncok elrendeződése a kettős rétegben a lipid fázisátmenet szélső állapotai alatti (alacsony T) és feletti (magas T) hőmérsékleten. A foszfolipid poláros csoportját sötét körök, az acillláncokat hullámos vonalak szimbolizálják

tartalmaznak. Kettős vagy többszörösen telítetlen zsír(acil-)láncok jelenléte a fázisátmenet hőmérsékletét még tovább csökkenti.

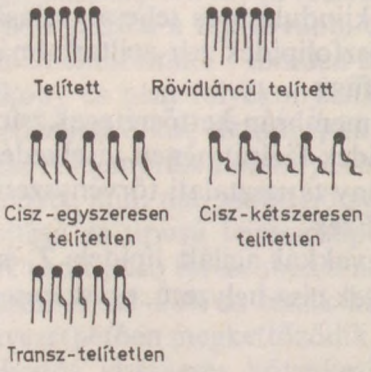
2. A homológ zsírsavakkal szubsztituált lipidek T_t-értéke közvetlenül a lánchosszúságtól függ.

3. Bár a transz-helyzetű telítetlen zsírsavakat tartalmazó lipidek fázisátmeneti hőmérséklete magasabb, mint a homológ cisz-telítetlen származékoké, de azért még alatta van a homológ telített származékokénak.

4. Azok a lipidek, melyekben a zsírsavak elágazó, ciklopropán vagy más terjedelmes oldalcsoportokat tartalmaznak, viselkedésükben nagyon hasonlóak a homológ cisz telítetlen zsírsavakat tartalmazó lipidekhez.

5. A láncok hosszában vagy telítettségében fennálló eltérések kiszélesítik a fázisátmenet intervallumát.

A fázisátmenet hőmérséklete a poláros csoport összetételétől is függ, bár általános érvényű törvényszerűségeket e téren még nem sikerült megfogalmazni.



42. ábra

Különböző zsír-acil-láncokat tartalmazó lipidek elrendeződése a fázisátmenet kezdetét jelentő hőmérsékleti érték alatt. Sematikus ábrázolás. Foszfolipidek, ahol a glicerin-3-foszfátgerinc 1-es helyzetben egy 16 szénatomos zsírsavval van acilálva, míg a 2-es helyzetben különböző típusú zsírsavak szerepelnek

Az *E. coli* sejtjeiben, normális körülmények között, a membrán fizikai tulajdonságainak állandó ellenőrzése folyik. Ez lényegében vagy endogén, vagy tartalék zsírsavakkal végrehajtott manipulációt jelent, melynek eredményeként bizonyos intervallumon belül, a bekövetkező hőmérsékleti változások ellenére, a membrán viszonylag állandó állapotban marad. Korábban feltételezték, hogy a membrán zsír(acil-)csoport összetételének szabályozásáért kizárólag az aciltranszferáz specifitása a fele-

lős. Azok az újabb eredmények viszont, melyek a hőmérsékletnek a zsírsavszintézisre, továbbá egy zsírsavszintetizáló enzimnek a telített és telítetlen acilcsoportok megoszlására gyakorolt hatását igazolták, arra utalnak, hogy a szabályozás a zsírsavszintézis szintjén is végbemegy. Az aciltranszferáz-aktivitás hiányában felhalmozódó abnormálisan hosszú acillláncok nyilvánvalóvá teszik, hogy a zsírsavszintézissel kapcsolatos szabályozás önmagában még nem elegendő a normális foszfolipid-acilcsoport összetétel dinamikus változtatásához. A lipidek fázisátmenetének szabályozása a zsírsav- és a foszfolipid-szintézis szorosan összekapcsolt szintjén realizálódik. Figyelembe véve azt, hogy a membrán mindenkori fizikai állapota mennyire létfontosságú a sejt normális működése szempontjából, az ellenőrzésnek és a szabályozásnak ez a kettős, egymást részben átfedő volta nem meglepő.

1.13.31. A sejtfal és a citoplazmamembrán mint az áthatolás fizikai akadályai

A sejtfal és a sejtmembrán mint két fizikai akadály szerepel, melyeken a tápanyagoknak ahhoz, hogy a citoplazmába juthassanak, keresztül kell hatolniok. Maga a sejtfal, különösen a GRAM-pozitív baktériumok esetében, viszonylag csekély akadályt jelent, minthogy a tápanyagok áthatolásánál elsősorban is a mérettel kapcsolatos korlátozást idézi elő. GRAM-pozitív baktériumokkal végzett kísérletek szerint a sejtfal szitahatását különböző méretnagyságú dextránmolekulákkal mérve, a fal átjárhatóságának maximális határértéke a sejt típusától és a környezeti viszonyoktól függően 10 000 és 50 000 molekulasúly között ingadozik. Eltekintve a GRAM-pozitívak sejtfalának tényleges pórusméret okozta korlátozó hatásától, feltételezik, hogy a töltéssel rendelkező sejtfalalkotóelemek, pl. a teichosavak, gyenge ioncserélőkként hathatnak és ily módon bizonyos tápanyagok áthatolását akadályozhatják. A GRAM-negatív sejteknek többek között lipoprotein-réteg részvételével felépített komplex fala van. Feltételezik, hogy éppen e miatt a fal az áthaladó molekulákra még szelektívebb hatást gyakorol mind a méret, mind azok kémiai természetét illetően. Egyes becslések, bizonyos GRAM-negatív baktériumoknál, az áthaladó tápanyagok molekuláinak maximális méretharátát 2 nm-ben jelölik meg, bár ez megerősítésre szorul. A valóságban az oldott anyagok transzportjában a baktériumsejt tényleges szelektív gátja a sejtmembrán.

Az ezen áthaladó transzportot kísérletesen, legtöbbször radioaktívan jelzett tápanyagokkal követik nyomon.

1.13.32. Az aktív transzport és mechanizmusai

A baktériumok citoplazmamembránjának legfontosabb funkciói:

1. Szelektív permeabilitás és az oldott anyagok transzportja.
2. Elektrontranszport, oxidatív foszforiláció, ATP-szintézis a proton-koncentráció-gradiens energiája terhére (természetesen nem minden baktériumfajnál).
3. Hidrolitikus exoenzimek kiválasztása.
4. *Carrier* (hordozó)-molekulákat tartalmaz és enzimek előfordulási helyéül szolgál, melyek többek között közreműködnek a DNS, a sejtfal-polimerek és a membránlipidek bioszintézisében. Röviden tekintsük át a membránhoz kötött ezen főbb funkciókat!

A baktériumsejt valamennyi katabolikus folyamatában az első lépés a szubsztrátok felvétele, míg az utolsó a végtermékek leadása. Az oldott anyagok transzportját tanulmányozva mindenekelőtt meg kell állapítani, hogy ezek a membránon csupán akkor képesek áthatolni, ha molekuláikra valamilyen hajtóerő fejti ki hatását. Amennyiben a transzport mechanizmusa passzív diffúzió, úgy a hajtóerő a nem elektrolitok esetében az oldatok koncentrációinak differenciája (koncentrációgradiens), ionoknál viszont az elektromos potenciál differenciája a membrán két oldalán (potenciálgradiens), továbbá a koncentráció-gradiens együttesen hatnak. Feltételezések szerint azonban a baktérium membránján néhány molekulának, mint pl. a víznek a kivételével, ha egyáltalán, úgy nagyon kevés vegyület képes csupán a passzív diffúzió révén áthatolni. A legtöbb oldott anyag transzportja specifikus karriert vagy transzport-mechanizmust igényel. A mikrobák szubsztrátfelvétele tehát (szemben az eritrociták glükózfelvételével) nem passzív, minthogy természetes környezetükben a szubsztrátkoncentrációk nagyon alacsonyak, ami miatt a sejtbe irányuló „aktív" szubsztrátakkumulációra van szükség. A végtermékek kiválasztását nem nagyon ismerjük. Ez talán annak tudható be, hogy a legjobban tanulmányozott aerob respiráció végterméke, a szén-dioxid, a sejtet nem ionos diffúzióval hagyja el. Az anaerob fermentációkban azonban más a helyzet. Itt a tejsav, ecetsav, vajsav és a hangyasav a fő végtermékek.

A szubsztrátok és elektrolitok aktív transzlokációjának mechanizmusait így csoportosíthatjuk (MITCHELL, 1967):

1. Az ún. „elsődleges transzlokációkat" kovalens kötéseket bontó és létrehozó kémiai reakciók közvetlenül energizálják. Két további alcsoportosítás lehetséges:

a) A „szállított anyag módosítása" *(solute modification; group translocation)*: ennek során a szubsztrát transzportja kémiailag megváltozta-

tott alakban történik. A legjobban tanulmányozott példa a foszfotranszferáz-rendszer. Az aktív transzport e rendszere keretében, mely bizonyos cukrok (pl. glükóz, mannóz stb.) felvételével kapcsolatos, a szubsztrát a szállítás során foszforilálódik. Az első lépés a citoplazmában zajlik le. Ez a *carrier*-protein foszforilációja a foszfoenol-piruvát terhére. Ezután a foszforilált *carrier* a membrán külső felszínére kerül, ahol megköti a szabad cukrot, majd a citoplazmába szállítja és mint cukorfoszfátot bocsátja szabadon. Számos fakultatív és anaerob baktériumban, közöttük a fotoszintetizáló szervezetekben is megtalálható, hiányzik azonban a szigorúan aerob baktériumokból.

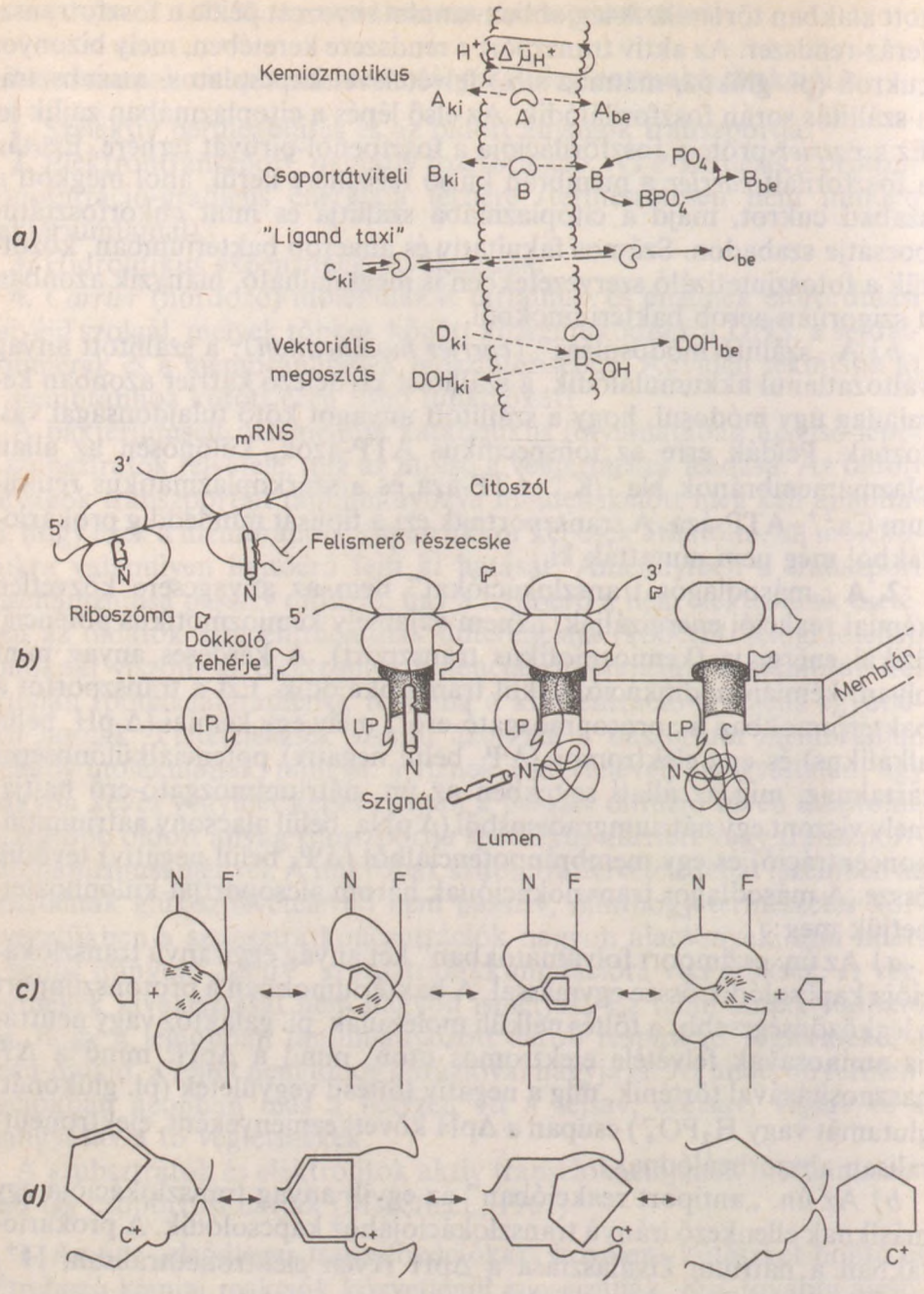
b) A „szállító módosulása" *(carrier modification)*: a szállított anyag változatlanul akkumulálódik, a szállítást kivitelező karrier azonban kémiailag úgy módosul, hogy a szállított anyagot kötő tulajdonságai változnak. Példák erre az ionspecifikus ATP-ázok, különösen az állati plazmamembránok Na^+/K^+–ATP-áza és a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+}–ATP-áza. A transzportnak ezt a típusát mindeddig prokariotákból még nem mutatták ki.

2. A „másodlagos transzlokációkat" nem az anyagcsere közvetlen kémiai reakciói energizálják, hanem valamely kemiozmotikus potenciál fizikai energiája (kemiozmotikus transzport). A kérdéses anyag mint olyan, kémiai modifikáció nélkül transzlokálódik. Ezt a transzportot a baktériumokban a „protonmozgató-erő", mely egy kémiai (Δ pH, belül alkalikus) és egy elektromos ($\Delta\Psi$, belül negatív) potenciálkülönbséget tartalmaz, míg az állati sejtekben az ún. nátriummozgató-erő hajtja, mely viszont egy nátriumgradiensből (Δ pNa, belül alacsony nátriumionkoncentráció) és egy membránpotenciálból ($\Delta\Psi$, belül negatív) tevődik össze. A másodlagos transzlokációnak három alcsoportját különböztethetjük meg:

a) Az ún. „szimport folyamatokban" két anyag egyirányú transzlokációja kapcsolódik össze egymással. A baktériumokban a protonszimport a legközönségesebb; a töltés nélküli molekulák, pl. galaktóz vagy neutrális aminosavak felvétele elektromos úton, mind a ΔpH, mind a $\Delta\Psi$ hasznosításával történik, míg a negatív töltésű vegyületek (pl. glükonát, glutamát vagy $H_2PO_4^-$) csupán a ΔpH következményeként, elektroneutrálisan abszorbeálódnak.

b) Az ún. „antiport reakcióban" az egyik anyag transzlokációja egy másiknak ellenkező irányú transzlokációjához kapcsolódik. A prokariotákban a nátrium kiválasztása a ΔpH révén elektroneutrálisan, H^+/Na^+-antiport révén megy végbe.

c) Az „uniport folyamatokban" valamely anyag transzlokációja máséhoz nem kapcsolódik. Pozitív töltésű ionok, mint pl. a lizin és a kálium, a sejtben a $\Delta\Psi$ révén, elektromos úton akkumulálódnak.



43. ábra

a) Az anyagok aktív transzportjának négy általános modellje BUTTON (1985) után. Felül a kemiozmotikus rendszer. Ez esetben poláros anyagok mint aminosavak, cukrok, vagy ásványi sók transzportja transzporter fehérjével és energiaforrás (ATP; ion grádiens vagy fény) felhasználásával

A *43. a. ábra* az aktív transzport négy újabb felfogású modelljét szemlélteti és magyarázza BUTTON (1985) után. Ezenkívül a *37. ábrán* különböző konkrét transzport mechanizmusok modelljeit láthatjuk FERRO-LUZZI (1984), továbbá HOLROYD és BRADBEER (1984) után.

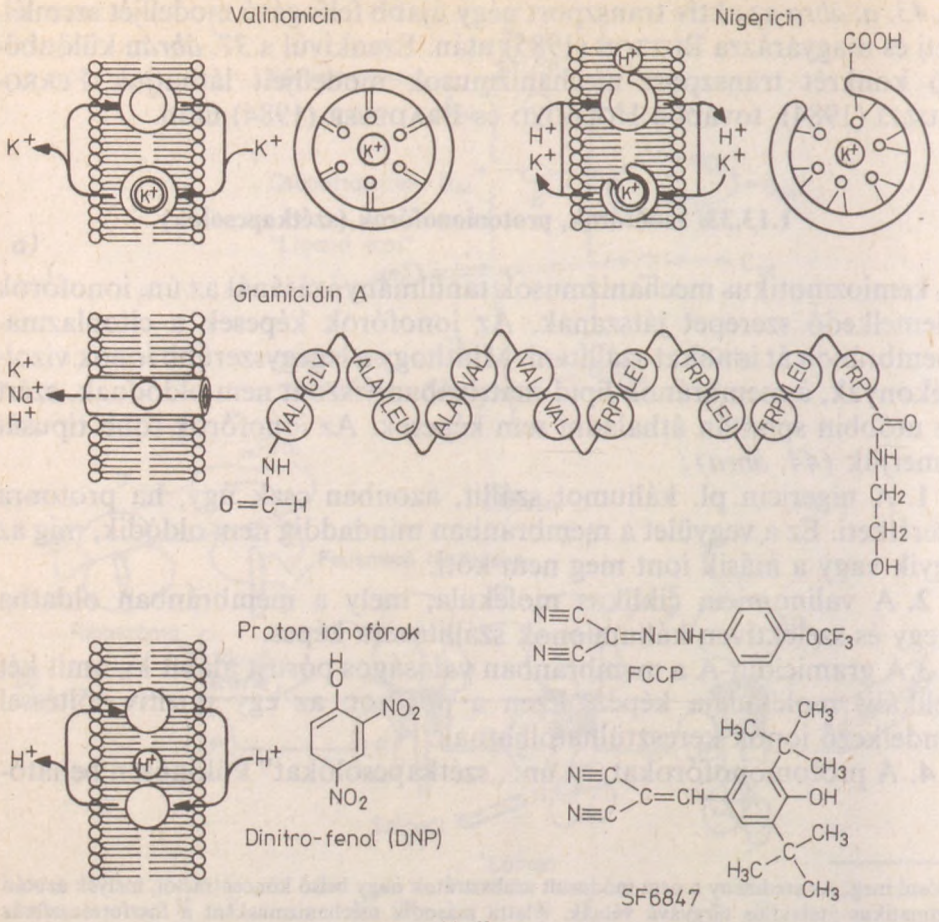
1.13.33. Ionofórok, protonionofórok (szétkapcsolók)

A kemiozmotikus mechanizmusok tanulmányozásánál az ún. ionofórok kiemelkedő szerepet játszanak. Az ionofórok képesek a citoplazmamembránon át ionokat szállítani. Minthogy a legegyszerűbb ionok vízoldékonyak, a membránok lipid-mátrixában viszont nem oldódnak, ezért ez utóbbin spontán áthaladni sem képesek. Az ionofórok több típusát ismerjük *(44. ábra)*:

1. A nigericin pl. káliumot szállít, azonban csak úgy, ha protonra cserélheti. Ez a vegyület a membránban mindaddig nem oldódik, míg az egyik vagy a másik iont meg nem köti.
2. A valinomicin ciklikus molekula, mely a membránban oldatba megy és szelektíven káliumionok szállítására képes.
3. A gramicidin-A a membránban valóságos pórust alakít ki, amit két helikális molekulája képez. Ezen a póruson az egy pozitív töltéssel rendelkező ionok keresztülhatolhatnak.
4. A protonionofórokat, az ún. „szétkapcsolókat" különösen beható-

---

valósul meg. Az eredmény a nem módosult szubsztrátok nagy belső koncentrációi, melyek azután enzimatikus átalakítás tárgyává válnak. Alatta második mechanizmusként a foszfotranszferáz rendszer látható. Cukrok gyakran szerepelnek ebben a transzportban, mely foszforilációval kapcsolatos és olyan szubsztrátok szállításában vesz részt, melyeket membrán karrierjük a megfelelő foszforilázzal hozhat összeköttetésbe. A harmadik transzportmechanizmus, amit gyakran nem ismernek el külön típusnak a „ligand taxi". Ez esetben a szervezet specifikus szállítókat állít elő és választ ki környezetébe. Ezek azután ott a szubsztrátot megkötik és azzal együtt a sejtbe visszatérnek. Ilyenek a sziderofórok, melyek vasat szállítanak. A mikrobák a paraffinsorbeli szénhidrogéneket is ilyen szállítókkal gyűjtik össze és veszik fel. Végül a negyedik az ún. „vektoriális megoszlás" mechanizmusa. Feltehetően ez a túlságosan nem poláros szubsztrátoknál érvényesül. A lipofil szubsztrátoknak a foszfolipidek és a víz között észlelhető kedvező megoszlási hányadosa növelheti a sejtmembrán szénhidrogén koncentrációját. Utóbbi előnyeivel élve a membránkötődésű enzimek belőlük sokkal polárosabb hiroxilezet termékeket állítanak elő (az ábrán D → DOH). Ezek molekulái közül a befelé haladók azután nagy belső koncentrációkkal állhatnak majd az anyagcsere rendelkezésére. *b)* A fehérjék transzmembrán szállításának szignál hipotézise (vázlat RANDALL és HARDY után, 1984). Protein szekréció az endoplazmatikus retikulum membránján át. LP = vezető peptidáz. A dokkoló fehérje és a vezető peptidáz mint membránnal társuló fehérjék szerepelnek. *c)* A membránon keresztüli transzport általános sablonja SCARBOROUGH (1985) után. N és F a membrán proximális, ill disztális oldalait jelzik. A pentagon az átszállításra kerülő molekula általánosított alakja. A párhuzamos vonalak a szállított molekula specifikus atomjaival előnyös kötéses kölcsönhatásokra képes potenciál meglétére utalnak. *d)* Az általános szimport reakció kulcs-stádiumainak modellje (SCARBOROUGH, 1985)



44. ábra
Az ionofórok különböző típusai

an tanulmányozták. Ezek gátolják a foszforilációt, de a respirációs elektrontranszportot stimulálják, ami arra vezethető vissza, hogy képesek a protonkoncentráció-gradienst felszámolni. A protonionofórok gyenge savak, melyek protonokat könnyen vesznek fel és adnak is le, és a membránon át mindkét állapotukban diffundálni képesek.

1.13.34. Permeázok, permeázrendszerek

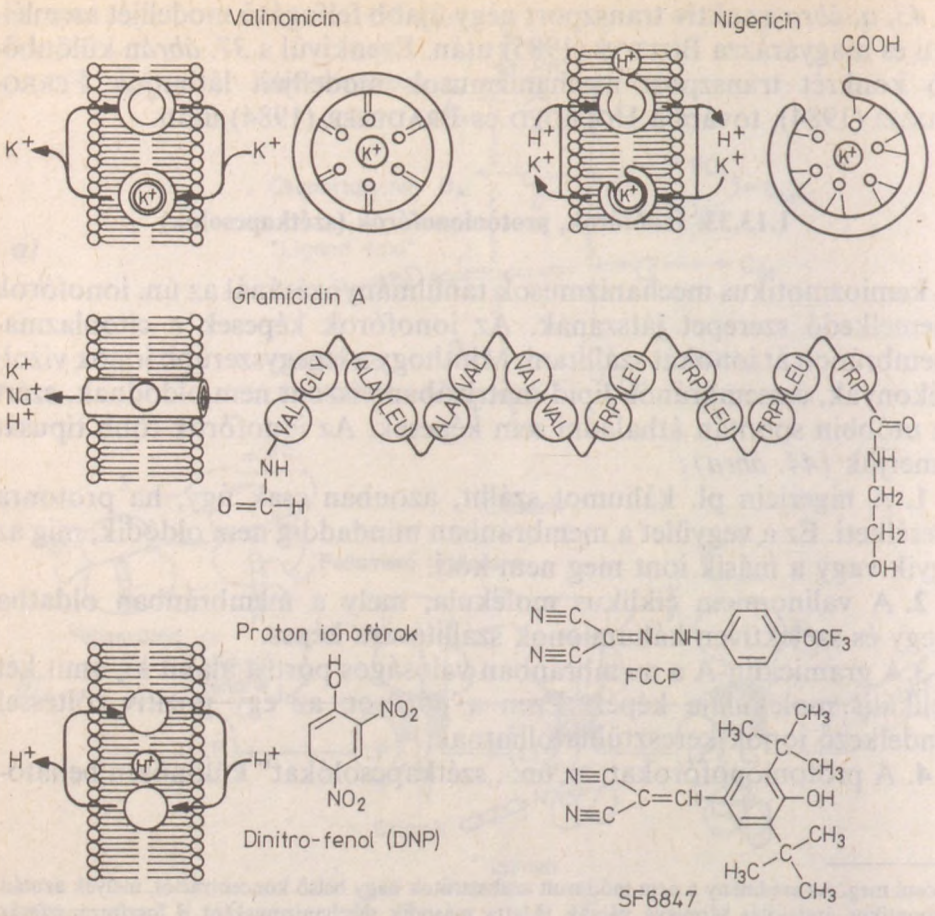
A membrán egyidejűleg ozmotikus gát (töltéssel rendelkező molekulák passzívan nem hatolhatnak át rajta) és összekötő is: specifikus proteineket, ún. permeázokat tartalmaz, melyek vagy a diffúziót segítik elő, vagy

egy meghatározott gradienssel szemben végbemenő, energiaigényes aktív transzportot katalizálnak. Az aktív transzport során (SIMONI és POSTMA, 1975) a sejt a membránon át a citoplazmába kis molekulájú anyagokat (pl. aminosavakat, cukrokat vagy bizonyos anorganikus ionokat) „szivattyúz", miközben ezek szabad belső koncentrációja a külsőnek akár ezerszeresét is meghaladhatja. Az aktív transzport egyik modellje feltételezi, hogy a *carrier*, vagyis a kérdéses anyagot specifikusan megkötő és szállító protein, szubsztrátjával szemben jelentősen csekélyebb mérvű affinitással rendelkezik a sejt belső tere felé és sokkal nagyobb mérvűvel kifelé. Ez a kettős viselkedés a protein harmadlagos struktúrájában végbemenő konformációs változásokra vezethető vissza. Ennek folytán a karrier elképzelt szabad forgása a membránban lényegében befelé haladó transzportot eredményez. A szállítmányától megszabadult, a külső tér felé visszaforduló *carrier*-en egyidejűleg a nagy affinitású konformáció állapotát eredményező változások mennek végbe. A szállító molekula megváltozása energiaigényes.

SCARBOROUGH (1985) szerint a transzporterek (specifikus membránkötődésű fehérjék) legfontosabb feladata, hogy a membránban (melyen át a transzportkatalízis végbemegy) az általuk szállított molekulák számára mind a külső, mind a belső vizes közeg felé egyaránt megfelelő kötési helyekkel rendelkezzenek *(43.c. ábra)*. A korábban feltételezett mobilis karrierek létezését ma már valószínűtlennek tartjuk. Ezzel szemben általánosan elfogadott, hogy a kifelé-befelé váltakozóan nyíló kötési hely elérhetőségét a többé-kevéssé fixált és a membránt áthidaló transzporter molekulák konformációs változásai teszik lehetővé. Elsőnek valamely preformált felületen a szállítandó molekula megkötése történik. Ezt a transzporter konformáció változása követi, ami a kötőhelyet és a hozzá kapcsolódó molekulát az egyik oldalról a másikra fordítja. Valószínűsítik, hogy a felvett molekula konformációs áttételét maga a kötési reakció (amit általában kondenzációs reakciónak jelölnek) hajtja és stabilizálja.

A *43.d. ábra* a fentiek értelmében az általános szimport reakció kulcs helyzeteit mutatja be. Az átvitt molekulát (laktóz, glukóz stb.) a pentagon, míg a mobilizáló iont C^+ szimbolizálja. Az ábrán csak az aktív hely látható. A szimporter kondenzációs reakciót az első és a második, a kiszorítási reakciót a harmadik, végül a transzporter felszabadulását a negyedik stádium szemlélteti.

A sejtben a permeáz termelése szigorú génszabályozásnak van alávetve és egyes permeázok a környezetben megjelenő meghatározott szubsztrátokkal indukálhatók. Az a permeáz-gén, melynek terméke a laktóz aktív membrántranszportjáért felelős, egyúttal része a lac-operonnak. Amikor a sejtbe diffúzióval vagy az egyébként jelen levő igen kevés permeáz segítségével laktóz lép be, ez mint induktor a lac-operon struk-



44. ábra
Az ionofórok különböző típusai

an tanulmányozták. Ezek gátolják a foszforilációt, de a respirációs elektrontranszportot stimulálják, ami arra vezethető vissza, hogy képesek a protonkoncentráció-gradienst felszámolni. A protonionofórok gyenge savak, melyek protonokat könnyen vesznek fel és adnak is le, és a membránon át mindkét állapotukban diffundálni képesek.

1.13.34. Permeázok, permeázrendszerek

A membrán egyidejűleg ozmotikus gát (töltéssel rendelkező molekulák passzívan nem hatolhatnak át rajta) és összekötő is: specifikus proteineket, ún. permeázokat tartalmaz, melyek vagy a diffúziót segítik elő, vagy

egy meghatározott gradienssel szemben végbemenő, energiaigényes aktív transzportot katalizálnak. Az aktív transzport során (SIMONI és POSTMA, 1975) a sejt a membránon át a citoplazmába kis molekulájú anyagokat (pl. aminosavakat, cukrokat vagy bizonyos anorganikus ionokat) „szivattyúz", miközben ezek szabad belső koncentrációja a külsőnek akár ezerszeresét is meghaladhatja. Az aktív transzport egyik modellje feltételezi, hogy a *carrier*, vagyis a kérdéses anyagot specifikusan megkötő és szállító protein, szubsztrátjával szemben jelentősen csekélyebb mérvű affinitással rendelkezik a sejt belső tere felé és sokkal nagyobb mérvűvel kifelé. Ez a kettős viselkedés a protein harmadlagos struktúrájában végbemenő konformációs változásokra vezethető vissza. Ennek folytán a karrier elképzelt szabad forgása a membránban lényegében befelé haladó transzportot eredményez. A szállítmányától megszabadult, a külső tér felé visszaforduló *carrier*-en egyidejűleg a nagy affinitású konformáció állapotát eredményező változások mennek végbe. A szállító molekula megváltozása energiaigényes.

SCARBOROUGH (1985) szerint a transzporterek (specifikus membránkötődésű fehérjék) legfontosabb feladata, hogy a membránban (melyen át a transzportkatalízis végbemegy) az általuk szállított molekulák számára mind a külső, mind a belső vizes közeg felé egyaránt megfelelő kötési helyekkel rendelkezzenek *(43.c. ábra)*. A korábban feltételezett mobilis karrierek létezését ma már valószínűtlennek tartjuk. Ezzel szemben általánosan elfogadott, hogy a kifelé-befelé váltakozóan nyíló kötési hely elérhetőségét a többé-kevéssé fixált és a membránt áthidaló transzporter molekulák konformációs változásai teszik lehetővé. Elsőnek valamely preformált felületen a szállítandó molekula megkötése történik. Ezt a transzporter konformáció változása követi, ami a kötőhelyet és a hozzá kapcsolódó molekulát az egyik oldalról a másikra fordítja. Valószínűsítik, hogy a felvett molekula konformációs áttételét maga a kötési reakció (amit általában kondenzációs reakciónak jelölnek) hajtja és stabilizálja.

A *43.d. ábra* a fentiek értelmében az általános szimport reakció kulcs helyzeteit mutatja be. Az átvitt molekulát (laktóz, glukóz stb.) a pentagon, míg a mobilizáló iont C^+ szimbolizálja. Az ábrán csak az aktív hely látható. A szimporter kondenzációs reakciót az első és a második, a kiszorítási reakciót a harmadik, végül a transzporter felszabadulását a negyedik stádium szemlélteti.

A sejtben a permeáz termelése szigorú génszabályozásnak van alávetve és egyes permeázok a környezetben megjelenő meghatározott szubsztrátokkal indukálhatók. Az a permeáz-gén, melynek terméke a laktóz aktív membrántranszportjáért felelős, egyúttal része a lac-operonnak. Amikor a sejtbe diffúzióval vagy az egyébként jelen levő igen kevés permeáz segítségével laktóz lép be, ez mint induktor a lac-operon struk-

túrgénjeinek, így a β-galaktozidáz, transzacetiláz és a laktóz-permeáz géneknek a derepresszióját idézheti elő (már amennyiben ezt egyéb feltételek is megengedik). Kimutatták, hogy a proteinszintézis gátlását előidéző anyagok, mint pl. a kloramfenikol, a permeázoknak a produkcióját is akadályozzák és a proteininaktivátorok (pl. alkilező ágensek) a permeázok hatását is felfüggeszthetik. Több olyan membránproteint is sikerült izolálni, melyek meghatározott, oldatban lévő molekulafajták iránt rendkívül nagy affinitásúak. Az egyik ilyen protein, melynek molekulasúlyát 32 000 körüli értékben állapították meg, a szulfátion transzportjában vesz részt. A membrán proteintartalmának jelentős százalékát permeázrendszerek elemeinek tekintik. A β-galaktozidáz-rendszeren végzett kinetikai tanulmányok szerint egyetlen sejt a specifikus permeáz akár 8000 molekuláját is tartalmazhatja. Amennyiben figyelembe vesszük, hogy egy sejtnek számos permeázrendszere lehet és ezek mindegyikéhez, a megfelelő tápanyagok és ionok szállításához, nagyszámú specifikus permeázmolekula tartozik, úgy kézenfekvőnek látszik, hogy a membrán permeázmolekulákban igen gazdag.

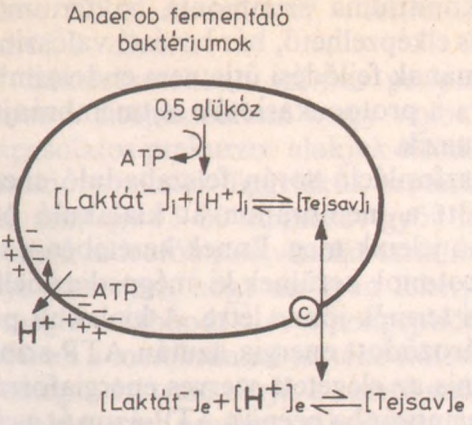
A permeázrendszerek szenzitívek a külső környezet változásaira. Növekvő hőmérséklettel egy bizonyos optimális pontig nő a transzportaktivitás. Az alacsony hőmérséklet gátolja a permeázokat. Proteinekkel vagy lipidekkel reagáló anyagcseremérgek akadályozzák a transzportot. A legtöbb transzportrendszernek pH-optimuma van. Ami specifitásukat illeti, egyesek transzportaktivitása rendkívül széles skálájú, másoké abszolút specifikus. A kationtranszportban részt vevők kifejezetten szelektálnak és molekuláris preferencia-sorrendjük van. Egy ilyen sorrend például:

$$K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+.$$

A laktóz-transzportrendszer működését az *E. coli*ban a belső membrán lipidjeinek rendezett, ill. rendezetlenségi állapota közvetlenül befolyásolja.

1.13.35. Végtermék-kiválasztás

Említettük, hogy a végtermékek kiválasztásáról nem sokat tudunk. *Streptococcus*oknál ezt részletesebben tanulmányozták. A *Streptococcus*ok anyagcseréjükhöz egy molekula glükóznak két molekula tejsavvá alakításával nyernek energiát. A laktát ezután a membránon át uniporttal mint anion egyedül, vagy elektroneutrál szimporttal mint anion plusz



45. ábra

A tejsavkiválasztás az anaerob fermentatív baktériumokban a H^+-átvivő ATP-áztól független folyamat. Ha egy gyenge sav disszociálatlan alakja gyorsan és reverzibilisen halad át a membránon, úgy kívül és belül azonos koncentráció jön létre. Ha a disszociált alak gyakorlatilag áthaladásra képtelen, és ha a belső és a külső disszociációs konstans egyenlő, úgy a savanion megoszlása a membrán által elválasztott belső és külső tér közötti pH-gradiensnek felel meg: a protonkoncentráció és a savanion-koncentráció fordítottan, míg a pH és az anionkoncentráció egyenesen arányosak. c: Carrier; i: belső; e: külső (THAUER és munkatársai, 1977)

egy proton, ill. más kation juthat ki. Sejtszuszpenzióval kivitelezett kísérletekben, külső szubsztrát nélkül azt találták, hogy a protonált alak transzlokálódott, míg az anion nagyrészt áthatolásra képtelennek bizonyult. Ezt az alábbiak is megerősítették:

1. A tejsav megoszlása a sejtek és a közeg viszonylatában megfelelt e két komponens közötti pH-gradiensnek; a laktátkoncentráció nagyobb, és a pH-érték magasabb volt a sejten belül, mint kívül *(45.ábra)*.

2. A tejsavnak ezt a megoszlását a valinomicin és a nigericin ionofórok a protonált alakok transzportjának megfelelő módon befolyásolták. A transzlokáció specifitása és kinetikai tulajdonságai szállítókkal közvetített folyamatra utalnak. A protonhajtóerő a kiválasztást az alacsonyabb koncentrációk felé nem befolyásolta, viszont a felvételt a nagyobb koncentrációk irányába már igen.

1.13.36. A transzporton kívüli egyéb membránfunkciók

1. Elektrontranszport, oxidatív foszforiláció és ATP-szintézis:

A citokrómok és a légzési lánc más enzimei, közöttük bizonyos dehidrogenázok, a sejtmembránban lokalizáltak. Így a baktériumok sejtmembránja funkcionálisan a mitokondriumok belső membránjával analóg. Ez a tény sok biológust arra a megállapításra késztet, miszerint az

eukarioták mitokondriuma szimbionta baktériumból fejlődhetett ki. Mindenesetre az is elképzelhető, bár kevéssé valószínű, hogy az eukarioták mitokondriumának fejlődési útja nem endoszimbiózison át vezetett, hanem e struktúra a protoeukarioták sejtmembránjáról lefűződött mezoszómából származik.

Az oxidatív foszforiláció során felszabaduló energia a sejt belső és külső régiói között a membránon át kialakuló protonkoncentráció-gradiens alakjában jelenik meg. Ennek keretében a sejt citoplazmájából a periplazmába protonok kerülnek ki, mégpedig anélkül, hogy kémiailag kimutatható közti termék jönne létre. A kialakult protonkoncentráció-gradiensben raktározódott energia azután ATP-szintézisre használódik fel. Amikor ugyanis az elégetett szerves energiaforrás energiájával kiűzött protonok a membránba beépült ATP-ázon át a citoplazmába visszafelé folynak, e protonáram energiája anorganikus foszfátból és ADP-ből az ATP-áz révén ATP szintézisét teszi lehetővé. A protonpumpa biokémiájával a későbbiekben (*lásd* 292. old.) részletesen foglalkozunk.

2. Hidrolitikus exoenzimek kiválasztása:

Valamennyi szervezet, mely tápforrásként makromolekuláris szerves polimerekre (proteinekre, poliszacharidokra, lipidekre) van utalva, hidrolázokat kénytelen kiválasztani, melyek e polimereket a membránon áthatolni képes, kisméretű alegységekre bontják. A magasabb rendű állatok az ilyen enzimeket a bélcsatorna üregébe választják ki. A baktériumoknál ezeket az enzimeket a GRAM-pozitív sejtek közvetlenül a külső, extracelluláris környezetbe adják le, míg a GRAM-negatívak a murein és a külső membrán közötti térbe. Az, hogy e proteinek miként kerülnek a GRAM-pozitívaknál a membránon és a falon át a külvilágba, ma még csak kevéssé ismert. Egy *Bacillus*nál pl. megfigyelték, hogy a penicillináz enzim periplazmatikus membrán alkotta hólyagocskákba kerül és a laterális mezoszómák területén a külvilágba jut.

Az exoenzimek kiválasztása WEIDE és AURICH (1979) szerint multifaktoriális folyamat. Maguknak a peptideknek a szintézise a citoplazmában a riboszómakomplexeken megy végbe. Ez helyileg gyakran a citoplazmamembrán belső oldalán történik. Ezt követően membránkötődésű előenzim-monomerek jelennek meg. A végleges, háromdimenziós enzimkonformáció létrejötte vagy a citoplazmamembránban, a periplazmatikus térben, vagy csak extracellulárisan azután, midőn az elemek a sejtfalon már átjutottak, történik meg. Az utóbbi esetben a szabaddá válás pl. a sejtfal pórusain át lehetséges, esetleg a falnak helyileg parciális lízisen kell átesnie és megnyílnia.

Mint láthatjuk, alapvető kérdés, hogy a komplex fehérjemolekulák miként jutnak át a baktériumok membránján. Ma már tudjuk, hogy a GRAM-negatív *E. coli* sejtjei klónozott eukariota fehérjéket szekretálnak

(RANDALL és HARDY, 1984), de miként? – feltehetően úgy, mint az eukariotáknál *(lásd 43. b. ábra.)*.

A GRAM-negatív baktériumokban számos periplazmatikus fehérje van, melyek szintézise a citoplazmában megy végbe. Membránon áti transzlokációjuk kapcsolatos prekurzor alakjuk elsődleges felépítésével, amit érésük során aminoterminális függelékük proteolitikus eltávolítása követ. Ez a függelék mintegy 15–30 aminosav-gyök hosszúságú, és egy legalább 11 gyök hosszú hidrofób szekvenciát tartalmaz. A transzlokáció legtöbb modellje feltételezi, hogy az ilyen fehérjék szintézisénél a kezdeményezést, a meghosszabbodást és a polipeptidlánc terminációját még követi az utóbbinak a membránnal történő kölcsönhatása, a fehérjének a lipid kettős rétegen áti transzferje, a vezető szekvencia proteolitikus elvonása és a teljesen érett protein szabadonválása. Az ún. szignál hipotézis szerint *(43.b. ábra)*, amint a riboszómán a szignál-szekvencia megjelenik, ez azonnal egy a citoszolban szabadon előforduló szignálfelismerő részecskével lép kölcsönhatásba, és a további elongáció mindaddig nem folytatódik, míg az egész komplex a membránban lokalizált „dokkoló fehérjéhez" nem kötődik. A kialakuló nascens polipeptidlánc, meghosszabbodása során, a membránba beépült fehérjecsatornán át, abba fokozatosan behatol. Végül a szignál proteolitikus eltávolítása már a membrán periplazmatikus oldalán megy végbe. Az export proteinekről tudjuk, hogy elsősorban is membránkötődésű poliszómákon szintetizálódnak. A *E. coli*nál pl. így folyik a LamB-külső membránfehérje, a periplazmatikus proteinek, a maltóz- és arabinóz-kötő fehérjék, az alkalikus foszfatáz és a β-laktamáz szintézise. A *Bacillus subtilis*nél a szekretált α-amiláz szintézise stb.

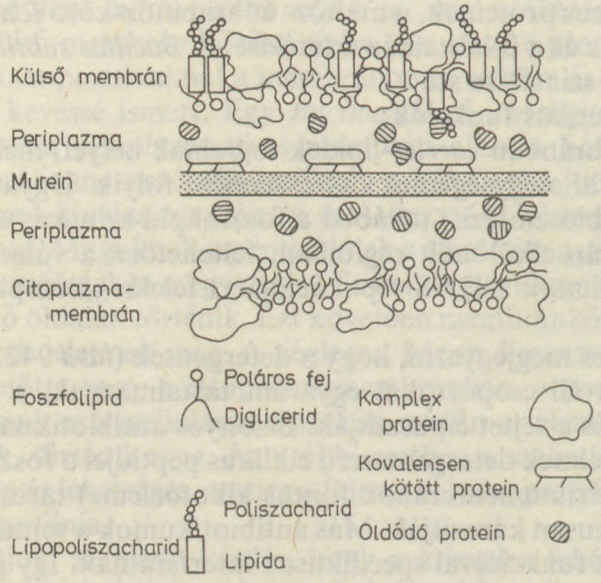
3. Bioszintetikus funkciók:

A sejtmembránban *carrier*-lipidek foglalnak helyet, melyeken többek között a sejtfal alegységeinek összeszerelése folyik. Ugyancsak itt vannak a sejtfal-bioszintézis, továbbá a foszfolipid-szintézis enzimei is. Végül a membrán elkülönült régióiban, feltehetően a válaszfal-mezoszómákban találhatók a DNS replikációjáért felelős „komplex" proteinjei is.

Itt szükséges megjegyezni, hogy a detergensek (*lásd* 942. old.), melyek lipofil és hidrofil csoportokat egyaránt tartalmaznak, a sejtmembránt tönkreteszik és a sejtet elpusztítják. Bizonyos antibiotikumoknak, pl. az ún. polimixineknek detergensszerű ciklikus peptidjei a foszfatidil-etanolamin (a baktériummembránok fontos alkotóeleme) tartalmú membránokat specifikusan károsítják. Más antibiotikumok a sejtmembrán egyes bioszintetikus funkcióival specifikusan interferálnak. Így pl. a novobiocin a DNS és a teichosavak szintézisét gátolja.

1.13.37. A *Pseudomonas*ok sejttakarója

A *Pseudomonas*ok sejttakarója, hasonlóan más GRAM-negatív baktériumokéhoz, több, diszkréten egymásra épülő, makromolekuláris komponensek alkotta rétegből áll. Ezeket, mind fizikailag, mind működésüket tekintve, igen nehéz egymástól elkülöníteni, és a közöttük levő kölcsönhatások feltehetően döntő szerepet játszanak e baktériumok fenotípusos tulajdonságainak megnyilvánulásában. A *Pseudomonas aeruginosa*nál a fal és a membrán legalább kilenc különböző rétegét lehetett kimutatni *(46. ábra)*. E rétegek közül öt (L_1, L_3, L_5, L_7 és L_9) elektronsűrű. A külső membrán foszfolipideket és lipopoliszacharidokat tartalmaz, mozaik vagy lipid-kettősréteg (L_1–L_3) elrendezésben. A *Pseudomonas*ok szerológiai diagnosztikájában fontos lipopoliszacharidok antigénkarakteréért felelős poliszacharid-oldalláncok a sejt felszínéről valószínűleg kifelé nyúlhatnak a sejtet körülvevő környezetbe, minthogy jelenlétük a rájuk ható specifikus ellenanyagok segítségével még az intakt, sértetlen sejtek esetében is kimutatható. A külső membránban ezeken kívül még proteinek is vannak, közöttük lipo- és glikoproteinek. Ezek a fagyasztva repesztett profilok L_2-rétegében részben mint szabályosan rendezett globuláris alegységek figyelhetők meg, melyek a *P. aeruginosa* falából EDTA-val kezelve szabaddá válnak. Az EDTA (komplexon-II: etilén-diamin-tetraecetsav; a fémek kationjait komplexekben köti meg) a glo-



46. ábra

A *Pseudomonas aeruginosa* sejt kültakarója (Vázlat)

buláris alegységek 20–25 nm hosszúságú pálcikákká aggregálódó protein–lipopoliszacharid komplexeit oldatba viszi. Ilyen állapotban mintegy 80% proteint és 20% lipopoliszacharidot tartalmaznak. Elektronmikroszkópban a már így „ürített" fal az eredetitől eltérő megjelenésű. A fal struktúrája azonban utólag, legalábbis részben még helyreállítható. Ehhez magnéziumra is szükség van. A magnéziumionok lehetővé teszik a szolubilizált alkotóelemek egy részének (a protein 85%-ának) reaggregálódását a külső membrán L_2-rétegében. Az így kezelt, majd strukturálisan részlegesen regenerált falú baktériumok életképességüket sem nyerik teljesen vissza, bár ozmotikusan stabilakká válnak. Ez arra utal, hogy az L_2-rétegben ahhoz, hogy e proteinek működhessenek, meghatározott konformációjukra, ill. beépülésük nem akármilyen orientáltságára van szükség. Hogy ez a működés valójában enzimatikus vagy strukturális, ill. mindkettő, még nem ismeretes. A külső membrán alatt az ún. periplazmatikus tér van, melyből ozmotikus sokkal vagy a külső membrán eltávolításával proteineket lehet szabaddá tenni. Más fehérjék viszont a külső membránhoz, ill. a mureinhez kovalensen kötődnek. A periplazmatikus régió (L_4–L_6) központjában a merev mukopeptidréteg, a murein (L_5), helyezkedik el, melynek kapcsolata a külső (fal-) és a belső (citoplazma-) membránnal még csak kevéssé ismert. Legmélyebben a belső, vagy citoplazmamembrán fekszik, mely a külsőhöz hasonlóan feltehetően foszfolipid–protein-mozaik vagy -kettősréteg. A belső membrán a tengeri *Pseudomonas*oknál szárazsúlyuk 12%-át is kiteheti. A GRAM-pozitív baktériumok esetében ez, mint ismert, mintegy 10–20 %. A tengeri *Pseudomonas*ok membránjának kémiai összetétele egyébként a GRAM-pozitív baktériumokéhoz ugyancsak hasonlít, ami igen valószínűvé teszi, hogy általában valamennyi eubaktérium membránjának összetétele és felépítése hasonló lehet *(13. táblázat)*. A *Pseudomonas*ok citoplazmamembránjának viszonylag nagy és molekulárisan gazdag proteintartalma minden bizonnyal rendkívül nagyfokú fenotípusos és genotípusos flexibilitásukat, anyagcsere-rugalmasságukat és közismerten fokozott alkalmazkodóképességüket tükrözi. Ezek részben struktúrfehérjék, specifikus permeázok vagy a membránon, ill. abban lokalizált enzimek, melyek készlete állandóan cserélődhet.

13. táblázat

A citoplazmamembrán kémiai összetétele (a szárazanyag százalékában)

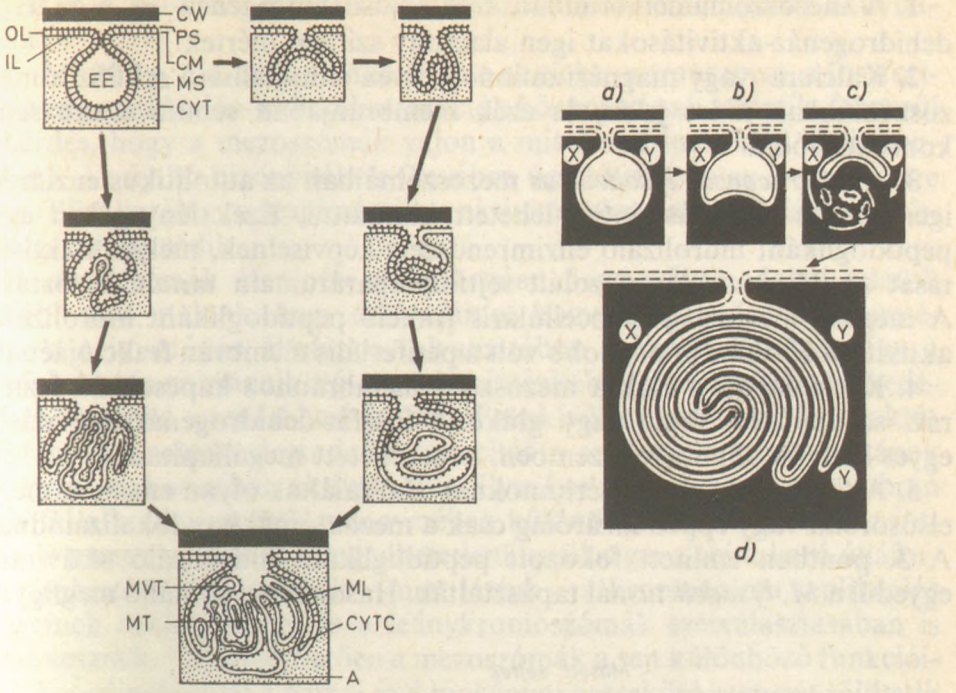
Vegyület neve	Tengeri *Pseudomonas*ok	GRAM-pozitív baktériumok
Protein	62,8	41–75
Lipid	30,5	9–36
Szénhidrát	2,0	0,2–20
Poliizoprenoidok	0,01	0,01

1.13.38. A mezoszóma

A baktériumoknak számos intracelluláris membránstruktúra-típusát mutatták már ki, de ismereteink ezekre nézve még nagyon hiányosak. A már többször érintett mezoszómák *(lásd 40. ábra)* is ezek közé tartoznak. A „mezoszóma" kifejezés, melyet FITZJAMES a *Bacillus*ok citoplazmájában előforduló membrántestek megjelölésére vezetett be, jelenleg széles körben, bár igen eltérő működésű struktúrákra vonatkozóan használatos. A mezoszómák a citoplazmamembrán betüremkedései és nem valószínű, hogy lefűződései lennének *(47. ábra)*. A Gram-negatívoknál kevésbé jól tanulmányozhatók. Ezeknél általában a citoplazmamembránnak csupán egyszerű, befelé irányuló, foltszerűen jelentkező redői.

Ha sejtfalukat gyengén hipotonikus körülmények között lizozimmal eltávolítjuk, úgy megnagyobbodott szferoplaszt jön létre, melynek összefüggő, sima citoplazmamembránján a mezoszómák mint lokális gyűrődések jelentkeznek. Ezzel szemben a GRAM-pozitív baktériumok sejtjeiben a mezoszómák sokkal erőteljesebb struktúrelemek és ezenkívül a számuk is nagy. Itt is a citoplazmamembrán közvetlen kiterjedései, bár finom hólyagocskák vagy csövecskék alakját vehetik fel. Ha a GRAM-pozitív sejteket gyengén hipotónikus oldatban, lizozimmal kezelik, úgy a szferoplaszt felületéről kifelé nyúló, csöves struktúráknak látszanak. Adataink vannak arra, hogy – legalábbis a GRAM-pozitív baktériumoknál – a mezoszómák membránja az alkotó proteinek és foszfolipidek viszonylagos mennyisége tekintetében lényegesen különbözik a differenciálatlan citoplazmamembrántól. Eltérések vannak a jelen levő enzimek tekintetében is, bár e téren az adatok ellentmondóak. Így egyes szerzők azt találták, hogy az általuk tanulmányozott bizonyos mezoszómatípusokból hiányoztak az oxidatív enzimek, így a citokrómok, a borostyánkősav-dehidrogenáz és a NADH-oxidáz. Ezek a tapasztalatok viszont szöges ellentétben vannak mások megállapításaival. Mindenesetre, amennyiben a citoplazmamembrán a sejt életfontosságú működési eleme, úgy felületének a mezoszómaképzés során végbemenő kiterjedése feltétlenül a növekedő sejt előnyét kell hogy szolgálja.

A mezoszómáknak a sejtosztódásban és az endospóraképzésben is speciális funkciókat tulajdonítanak. Sorozatosan készített elektronmikroszkópos felvételek igazolják, hogy sejtosztódás alkalmával a membránszeptum növekedését az ellentétes oldalakon elhelyezkedő mezoszómáknak a sejt centruma felé irányuló „mozgása" kezdeményezi. Hasonlóan, legalábbis a GRAM-pozitív baktériumoknál, a mezoszómák a mitotikus apparátus helyett működve, részt vesznek a replikálódó kromoszóma lehorgonyzásában, ami viszont lehetővé teszi, hogy mialatt a sejt



47. ábra

A mezoszómák kialakulásának feltételezett menete (sematikus vázlat). Bal oldalon: Az ábra számos, elsősorban is a GRAM-negatívaknál megfigyelhető mezoszómaalakzatot mutat be. Ezek lényegében egyszerű struktúrák, melyek a plazmamembrán betüremkedéseinek foghatók fel. Az egyes alakzatokat az első lépésben kialakult gömbölyű membránzsák behorpadása eredményezheti. Az ábrarészletek a számos lehetséges átalakulási út közül kettőt szemléltetnek. A lamelláris és a tubuláris alakokat az elsődleges „zsák" másodlagos invaginációja hozza létre. CW: sejtfal. PS: periplazmatikus tér. CM: citoplazmamembrán. OL: a plazmamembrán sötét részecskékkel takart külső oldala, míg IL a belső oldala. CYT: citoplazma. EE: külső környezet. A másodlagos invaginació alkalmával újonnan szintetizált plazmamembrán a régivel szemben nem harántvonalkázott. MVT: mezoszomális hólyagocskák. ML: mezoszomális lamellák. MT: mezoszomális csövecskék. CYTC: citoplazmacsatorna. A: A kromoszóma feltételezett kapcsolódási helye. Jobb oldali kép: Komplex, multilamelláris, csigaszerű mezoszóma az *E. coli* $O111_a$ törzsnél. Az átalakulások útja a membrán szférikus, zsákszerű betüremkedésétől *(a)* ennek behorpadásán át *(b* és *c)* a bonyolult lamelláris struktúráig *(d)* lényegében a fent vázolt sémának megfelelő. Bár a membrán Y-nal jelzett jobb oldali hajlata is mutat némi szétterjedést, mégis az intenzív mérvű „felcsavarodás" az X, bal oldali szárnyon megy végbe

növekedik és a kromoszóma duplikációja végbemegy, a leánykromoszómák a sejt ellentétes pólusai felé vontatódjanak.

A *48. ábra* GREENAWALT és WHITESIDE (1975) után a mezoszómákban gazdag szubcelluláris frakciók előállításának módszereit foglalja össze. Ezek a szerzők a mezoszóma- és a periferiális membrán enzimatikus aktivitása közötti különbségekre vonatkozó kiterjedt kutatások eredményeit az alábbiaknak megfelelően összegezték:

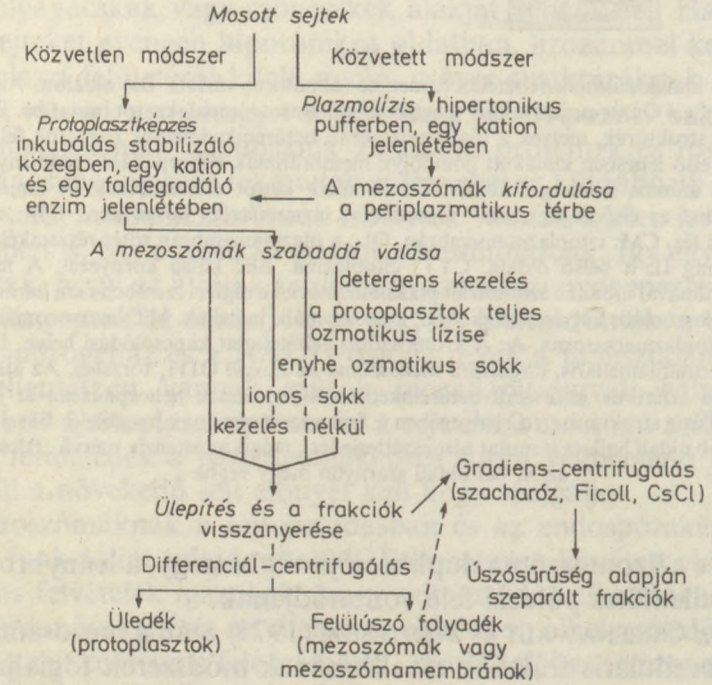
1. A mezoszómamembránban szukcinát-dehidrogenáz- és $NADH_2$-dehidrogenáz-aktivitásokat igen alacsony szinten mértek.

2. Kalcium- vagy magnéziumionok révén stimulálható ATPáz a mezoszómákban nincs jelen, és ezek membránjában semmi esetre sem koncentrálódik.

3. A *Micrococcus lysodeiktus* mezoszómáiban az autolitikus enzimek igen magas aktivitásszintjét lehetett kimutatni. Ezek lényegében egy peptidoglikánt hidrolizáló enzimrendszert képviselnek, melynek aktivitását az *M. lysodeiktus* izolált sejtfalpreparátumain tanulmányozták. A mezoszómagazdag szubcelluláris frakció peptidoglikánt hidrolizáló aktivitása 15–30-szor nagyobb volt a periferiális membrán frakciójáénál.

4. Kizárólagosan csak a mezoszómamembránhoz kapcsolódó észteráz, savanyú foszfatáz vagy glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz-aktivitást, egyes szerzők állításával szemben, nem lehetett megállapítani.

5. A GRAM-pozitív baktériumoknál nem találtak olyan enzimet, mely elsősorban vagy éppen kizárólag csak a mezoszómákban lokalizálódna. A 3. pontban említett fokozott peptidoglikánt hidrolizáló aktivitást egyedül a *M. lysodeiktus*nál tapasztalták. Hasonló egyedülálló megfigye-



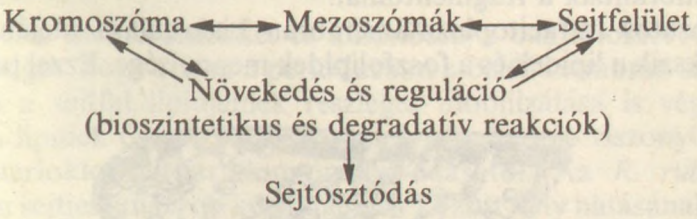
48. ábra

A mezoszómákban gazdag membránfrakciók előállításának legfontosabb módszerei (Összefoglaló áttekintés)

lés, hogy a *B. subtilis* mezoszómái intenzív malát-dehidrogenáz-aktivitásúak.

6. Minthogy a mezoszómákat sokan az elektrontranszport, a foszforiláció és az oxidációs–redukciós reakciók központjának tekintik, felmerül a kérdés, hogy a mezoszómák vajon a mitokondriumokkal ekvivalensek-e?. Az újabb bizonyítékok fényében úgy látszik, hogy semmi esetre sem. Ellenkezőleg, a respiratorikus aktivitás zöme a periferiális membránra korlátozódik.

A mezoszómák szerepére vonatkozóan összegyűlt irodalmi adatok inkább arra utalnak, hogy ezek számos komplex kölcsönhatás keretében, a sejtosztódás általános folyamatában működnek közre. Így a sejtfal- és a membránalkotó-elemek szintézisében, ezek befelé növekedésében, továbbá a sejtfal hasításában. Ezenkívül a mezoszomális struktúrákhoz kapcsolódó degradatív kapacitás a sejtosztódás folyamatának bizonyos szakaszaiban aktiválódhat. Ilyenkor a mezoszóma a membrán és a fal alkotóelemeinek turnoverében különösen fontos szerephez juthat. E turnover viszont elengedhetetlenül szükséges a sejttakaró újjáformálásához. A mezoszómák – mint láttuk – a kromoszóma replikációs helyeinek felelnek meg, és a leánykromoszómák szétválasztásában is részt vesznek. Feltételezhetően a mezoszómák a sejt különböző funkcióinak koordinálásánál a fizikai és a biokémiai összekötő szerepét tölthetik be. Ezt a felfogást sematikusan így lehetne ábrázolni:



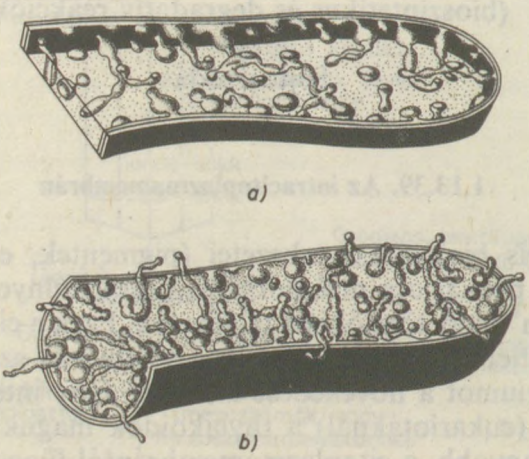
1.13.39. Az intracitoplazmamembrán

A fotoszintézis biológiai szerkezetei (pigmentek, elektronszállítók, enzimek stb.) a prokariota mikroorganizmusok túlnyomó többségénél „*thylakoid*okban" vagy tömlőkben találhatók. Ezek a citoplazma- (unit) membrán közvetlen nyúlványai. Az ilyen struktúrák száma és mérete a sejtben a baktériumot a növekedése alatt érő fény intenzitásától függ. A növényeknél (eukariotáknál) a thylakoidok maguk unit- membrán alkotta, jóval nagyobb, a citoplazmamembrántól független struktúrákban, a kloroplasztiszokban foglalnak helyet. A bíbor kénbaktériumoknál *(Chromatiaceae)* és a nem kén bíborbaktériumoknál *(Rhodospirilla-*

ceae) a tömlők a citoplazmamembrán nyúlványai. Az ilyen tömlők nagyon különbözhetnek organizációjuk fokában. Egyes baktériumokban mint egyszerű hólyagocskák fordulnak elő, másokban mint csöves testek, ismét másokban mint komplex lemezes rendszerek. A fotoszintetikus apparátus kizárólag a zöld kénbaktériumokban *(Chlorobiaceae)* zárt belső, azonban csupán tömlőszerű képletekben (ún. *Chlorobium*-vezikulumokban) található, melyek a citoplazmamembrán alatt, de ennek nem tartozékaként figyelhetők meg. E vezikulumok felépítése nem felel meg a klasszikus unit membránénak. A fotoszintetizáló prokarioták valamennyi nagyobb csoportjában előfordulnak szervezetek, melyeknek gázvakuólumaik vannak. Helyzetszabályozó eszközként szerepelnek, amennyiben a sejtek segítségükkel, szubhidrikus környezetekben, a gravitációval szemben, a tevékenységüknek leginkább megfelelő optimálisan megvilágított vízmélységben folyamatosan tartózkodhatnak. Ezek a fajok, kevés kivétellel, aktív mozgásra képtelenek, ezért vakuólumaik a mozgásképességet pótolják.

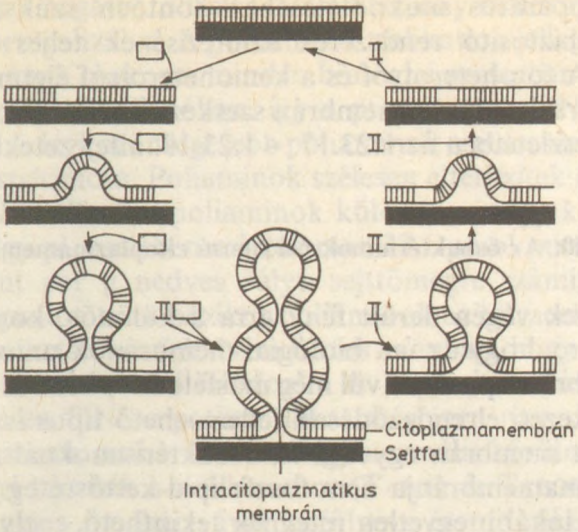
A *Rhodospirillum rubrum* sejtjeiben a bakterioklorofill kiterjedt intracitoplazmatikus membránban foglal helyet. Ez utóbbi a sejt perifériájáról, a sejthártyából származik és bonyolult belső csöves–hólyagos hálózatot alkot *(49. ábra)*. A perifériális membránról befelé, kezdetben szférikus hólyagocskák alakjában, később telt vagy lapított csőrendszerré alakulva ágazik le. Az ún. kromatofórák valójában ennek a csöves belső membránnak a fragmentumai.

A hálózatos intracitoplazmamembrán kialakulása idején a sejtben megnövekszik a lipidek és a foszfolipidek mennyisége. Ezzel párhuzamo-



49. ábra

a) és *b)* A *Rhodospirillum rubrum* belső membránrendszerének hipotetikus háromdimenziós ábrázolása. Sztereo-elektronmikroszkópos felvételek alapján készült rekonstrukció



50. ábra

A *Rhodospirillum rubrum* fotoszintetikusan aktív intracitoplazmatikus membránrendszere fejlődésének és reverziójának (visszafejlődésének) hipotetikus vázlata. A citoplazmamembrán harántvonalkázott szakasza mindazokat a komponenseket reprezentálja, melyek az aerob körülmények között, sötétben növekvő, fotoszintetikus aktivitást nem tanúsító sejtek membránjában jelen vannak. Az üres (nem vonalkázott) membránrészletek reprezentálják a fotoszintetikus apparátus képzéséhez és működtetéséhez szükséges megjelenő, eltűnő, majd újra megjelenő elemeket

san nő a belső membránfelület és különösen a bakterioklorofill-tartalom. Lehetséges, hogy ebben a periódusban a belső membrán szintézisének céljára a sejtfal lipidjeinek részleges mobilizálása is végbemegy, minthogy a lipidek összes mennyiségének növekedése viszonylag elmarad a bakterioklorofill-tartalom gyarapodásától. Az *R. rubrum*ban, amennyiben sejtjeit anaerob körülmények között fény hatásának tesszük ki (vagyis indukáljuk), már 3–6 óra után megjelennek a belső membrán kezdeményei. Feltételezések szerint az adaptáció kezdeti szakaszában a fotoszintetikus apparátus még teljes egészében a periferiális citoplazmamembránba van beépülve. A továbbiakban a bakterioklorofill-tartalom és a fotoszintetikusan aktív membránokra jellemző fehérjék mennyisége az intracitoplazmamembránban is nő. Az a tény, hogy az *R. rubrum*ban az intracitoplazmamembrán légzési aktivitása alacsonyabb, mint a sejtmembráné, arra enged következtetni, hogy az előbbibe főleg a fotoszintetikus elektrontranszport-rendszer épül be. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az intracitoplazmamembránban ugyancsak jelen vannak, bár eltérő arányban, a sejthártya jellemző foszfolipidjei, fehérje alegységei és enzimaktivitásai. A membrándifferenciálódás folyamata mindkét irányban reverzíbilis *(50. ábra)*. Az intracitoplazmamembrán eltűnése a foto-

szintetikus apparátus működtetéséhez döntően szükséges, elektrontranszportot biztosító rendszerek szintézisének teljes represszió jával kapcsolatos. A fotoheterotróf és a kemoheterotróf életmódok változtatásának az intracitoplazmamembrán szerkezetére és működésére gyakorolt hatását részleteiben az 1.23.17. – 1.23.19. alfejezetekben tárgyaljuk.

1.13.40. Az ősbaktériumok ősi típusú citoplazmamembránja

Az 1970-es évek végén derült fény arra a különös, korábban fel sem tételezett tényre, hogy az ún. biológiai membránok univerzálisan elterjedt unit membrán típusán kívül még másféle felépítésű és ettől alapvetően eltérő szerkezeti elrendeződéssel jellemezhető típus is lehet. Az élők világában unit membrán egyedül az ősbaktériumoknál nem található. Ezek citoplazmamembránja nem foszfolipid-kettősréteg alkotta szendvicsstruktúra, inkább egyetlen rétegnek tekinthető, melynek működése a sokkal fejlettebb kettősréteggel szemben igen sok szempontból jóval korlátozottabb.

Az ősbaktériumok között legfontosabb metanogének citoplazmamembránjának lipid frakciója kb. 80% poláros és 20% nem poláros lipidet tartalmaz (MAKULA és SINGER, 1978). A poláros lipidek, többnyire foszfolipidek, izopreonid-glicerin-éter alapon épülnek fel: 10–25% között dialkil-glicerin-diéter, C_{20} – izoprenoid-alkil-láncokkal, 75–90% között dialkil-diglicerin-tetraéter, C_{40}-izoprenoid-alkillláncokkal. A foszfolipidek – úgy látszik – foszfort, foszfátésztert és foszfonsavat is tartalmaznak. A nem poláros lipidek nem ciklikus C_{20}, C_{25} és C_{30} izoprenoid-szénhidrogének. Közöttük a fő komponens a szkvalén és a különböző szkvalénszármazékok. Hasonló összetételű lipideket még csak halobaktériumokban, *Sulfolobus*ban és *Thermoplasmá*ban találtak.

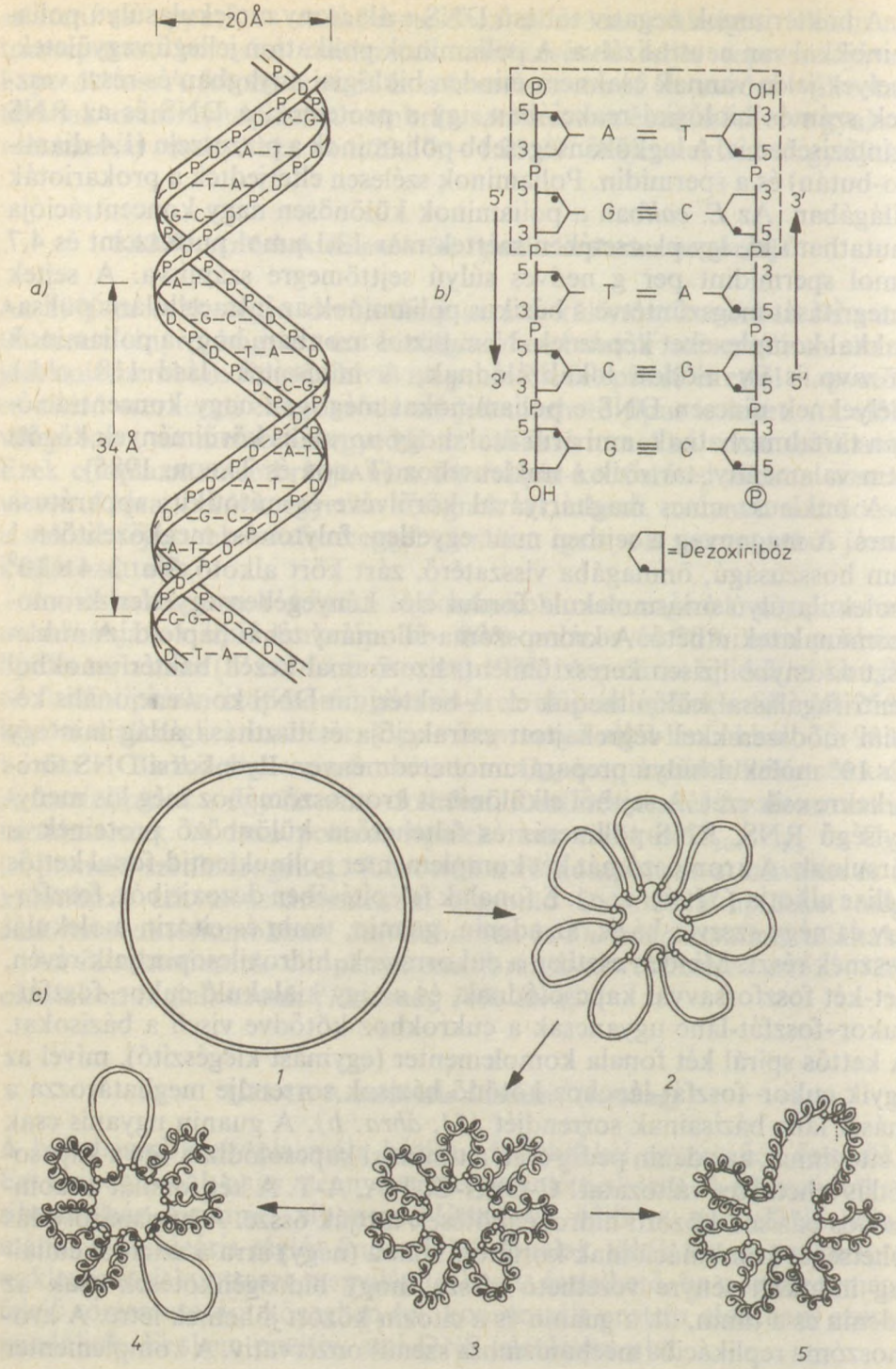
Az ősbaktériumok citoplazmamembránjával részletesen a 515–520. oldalakon foglalkozunk *(lásd* még *145. ábra)*.

1.13.41. A nukleáris állomány (sejtmag)

A baktériumok citoplazmája bázikus festékekkel egyneműen festődik. Ezt a riboszómák nagy mennyiségének jelenléte okozza. A riboszómákat ribonukleáz-enzimmel elbontva, láthatóvá válik a mag-(DNS-)állomány. A nukleáris régiót finom DNS-fonalak töltik be. A prokariota nukleusz fáziskontraszt-megvilágításban is észlelhető, ha a sejteket megfelelő törésmutatójú közegben (pl. koncentrált protein oldatban) szuszpendáljuk. Feulgen-pozitív, ami DNS jelenlétére utal.

A baktériumok negatív töltésű DNS-e alacsony molekulasúlyú poliaminokkal van neutralizálva. A poliaminok polikation jellegű vegyületek, melyek jelen vannak csaknem minden biológiai anyagban és részt vesznek számos biológiai reakcióban, így a proteinek, a DNS és az RNS szintézisében is. A legközönségesebb poliaminok a putreszcin (1,4-diamino-bután) és a spermidin. Poliaminok szélesen elterjedtek a prokarioták világában. Az *E. coli*ban a poliaminok különösen nagy koncentrációja mutatható ki, így pl. esetében mértek már 13,1 μmol putreszcint és 4,7 μmol spermidint per g nedves súlyú sejttömegre számítva. A sejtek integritását megszüntetve a bázikus poliaminok az intracelluláris polisavakkal komplexeket képeznek. Nem biztos azonban, hogy a poliaminok in vivo is ily módon lokalizálódnak. A minisejtek (lásd 118. old.), melyeknek nincsen DNS-e poliaminokat még igen nagy koncentrációban tartalmazhatnak, ami arra utal, hogy normális körülmények között nem valamennyi tartozik a nukleuszhoz (TABOR és TABOR, 1985).

A nukleusz nincs maghártyával körülvéve és mitotikus apparátusa sincs. A maganyag a sejtben mint egyetlen, folytonos, megközelítően 1 mm hosszúságú, önmagába visszatérő, zárt kört alkotó, kb. $3–4 \times 10^9$ molekulasúlyú óriásmolekula fordul elő. Lényegében egyetlen kromoszómának tekinthető. A kromoszóma-állomány tehát haploid. A nukleuszt az enyhe lízisen keresztülment, lizozimmal kezelt baktériumokból centrifugálással különíthetjük el. A baktérium-DNS konvencionális kémiai módszerekkel végrehajtott extrakciója és tisztítása átlag mintegy 5×10^6 molekulasúlyú preparátumot eredményez. Ilyenkor a DNS töredékekre esik szét. A sejtből elkülönített kromoszómához még kis mennyiségű RNS, RNS-polimeráz és feltehetően különböző proteinek is társulnak. A kromoszómát két komplementer polinukleotid-fonal kettős hélixe alkotja *(51. ábra: a)*. E fonalak felépítésében dezoxiribóz, foszforsav és négy szerves bázis, az adenin, guanin, timin és citozin molekulái vesznek részt. Minden esetben a cukorrészek, hidroxilcsoportjaik révén, két-két foszforsavval kapcsolódnak, és az így kialakuló cukor–foszfát–cukor–foszfát-lánc ugyancsak a cukrokhoz kötődve viseli a bázisokat. A kettős spirál két fonala komplementer (egymást kiegészítő), mivel az egyik cukor–foszfát-lánchoz kötődő bázisok sorrendje meghatározza a másik lánc bázisainak sorrendjét *(51. ábra: b)*. A guanin ugyanis csak a citozinnal, az adenin pedig csak a timinnel kapcsolódhat. Így a kapcsolódás lehetséges változatai: C-G, G-C, T-A, A-T. A két fonalat a szomszédos bázisok közötti hidrogénkötések tartják össze. A bázispárosodás lehetséges kombinációinak korlátolt száma (négy) arra a sztereokémiailag indokolt tényre vezethető vissza, hogy hidrogénkötések csak az adenin és a timin, ill. a guanin és a citozin között jöhetnek létre. A kromoszóma replikációs mechanizmusa szemikonzervatív. A komplementer


20 Å
a)
34 Å
b)
A = T
G ≡ C
T = A
C ≡ G
G ≡ C
5′
3′
3′
5′
OH
OH
=Dezoxiribóz
c)
1
2
3
4
5

fonalak elkülönülnek, és mindegyik templátként (mintaként) szolgál nukleotid-alegységek enzimatikus polimerizációja révén végbemenő, új komplementer fonalak felépüléséhez. Az új fonalak bázisszekvenciáját a hidrogénkötések adta lehetőségek szigorúan meghatározzák. Ahol tehát a templáton guanin helyezkedik el, ott az új fonalhoz citozinnal kell kapcsolódnia. Végeredményben tehát két új, az eredetivel megegyező, kettőshélix alakul ki.

A DNS tartalmazza a baktériumsejt felépítéséhez és működéséhez szükséges információkat. A DNS-fonal géneknek nevezett egyes szegmentjei különböző, de meghatározott számú nukleinsav-bázispárt tartalmaznak, és egy-egy enzim vagy struktúrfehérje, vagy az anyagcsere szabályozásában résztvevő protein szintéziséhez szükséges információt kódolják. A gének a kromoszóma géntérképén meghatározott helyeken lokalizáltak. Az egyes gének specifikus bázispár-szekvenciája felelős az általuk kódolt sajátos proteinek aminosav-szekvenciájáért. A génen három-három bázispár, az ún. triplet, a felépítendő fehérje egy-egy aminosavát határozza meg (pl. UUA = leucin vagy ACU = treonin). Nagy molekulasúlyú fehérjéket kódoló gének akár 1000 bázispárt is tartalmazhatnak. Az anyagcsere során a gének vagy blokkolva, represszálva vannak, vagy azokról információ áramlik a fehérjeképzés centrumai, a riboszómák felé. Ez esetben a génekről az információ, első lépésben és enzimatikus úton, a hírvivő vagy „messenger" RNS-ekre (mRNS) íródik át (transzkripció). Ez utóbbiak bázisszekvenciája komplementer a gének – melyekről átíródtak – bázisszekvenciájával. A mRNS által közvetített információ, a sejt riboszómáin, enzimek, továbbá az egyes aminosavakat szállító transzfer RNS-ek (tRNS) segítségével fordítódik le (transzláció) specifikus proteinekre.

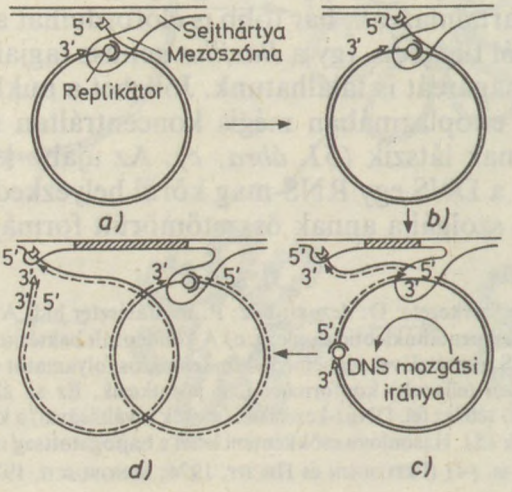
A baktériumok növekvő sejtjei a maganyagnak általában egy vagy két aggregátumát tartalmazzák, bár több is előfordulhat a növekedés sebességétől és a fajtól függően. Így a *Bacillus* genusz tagjainál a sejtben akár hét szegregált magáreát is találhatunk. Jóllehet a nukleusz nincs membránba zárva, a citoplazmában mégis koncentráltan fordul elő, abban gélszerű mátrixnak látszik *(51. ábra: c)*. Az újabb kutatások nyomán valószínű, hogy a DNS egy RNS-mag körül helyezkedik el, mely utóbbi a DNS tartását szolgálja annak összetömörült formájában.

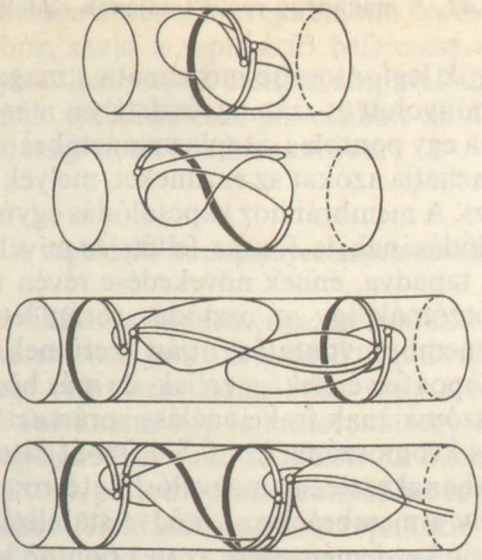
◄ *51. ábra*

a) a DNS kettős hélix szerkezete. D: dezoxiribóz; P: foszfátészter híd; A: adenin; C: citozin; G: guanin; T: timin. *b)* Két pentanukleotid duplexe. *c)* A kondenzált baktériumkromoszóma modellje. Az *1–3* protein és RNS részvételével végbemenő kondenzációs folyamatot szemléltet. Az *1* esetében a kettős fonal fesztelen (ellazult) konformációban jelentkezik. Ez az állapot legalább egyetlen egyfonalú törést *(nick)* tételez fel. DNáz-kezeléssel (*nick*ek kiváltásával) a kondenzált DNS parciálisan fesztelenítetté válik *(5)*. Hasonlóan csökkenteni lehet a hajtogatottság mértékét RNáz kezeléssel is. *(4)* (PETITJOHN és HECHT, 1974; SENGBUSCH, 1979)

A körkörös DNS-kettősspirál egyrészt sűrűn, csavarmenetszerűen tekeredik *(Minorsystem)*, másrészt lazább, kígyózó hajlatokkal periódusosan változó irányban csavarodik *(Majorsystem)*. E DNS-komplexhez kötődő fehérjék (nukleoproteidek), melyek stabilizálhatják e struktúrkomplexet, részben enzimek, részben enzimaktivitással nem rendelkező proteinek lehetnek. A bázikus proteinek vagy a hisztonok hiányoznak. A prokarioták proteinmentesített DNS-e bizonyos értelemben még működésképes. A baktériumsejtek vékony metszeteinek elektronmikroszkópos vizsgálata szerint a DNS egy ponton a sejtmembrán egy befűződéséhez tapad. Ez a kapcsolódás kulcsszerepet játszik a kromoszóma replikációját követően a két testvérkromoszóma szegregációjánál.

Az *E. coli* magállománya mintegy $1–2 \times 10^{-15}$ g DNS-t, míg a *Bacillus megateriumé* ennek négy-ötszörös mennyiségét képviseli. Egy emlős állat sejtjének haploid kromoszómaállománya $3–3{,}5 \times 10^{-9}$ g DNS-t tartalmaz, ami az előbbieknek 800–900 DNS-ekvivalensét jelenti. Gyakorlatilag ez a különbség az információtartalom hatalmas eltéréseit tükrözi vissza. A kromoszóma által tartalmazott információ mennyisége egyenesen arányos hosszúságával. Az egyszerű *Mycoplasma hominis* kromoszómája pl. csak 265 μm, míg a sokkal komplikáltabb *Escherichia colié* 1100 μm hosszú. Ez kb. négymillió nukleinsav-bázispárt tartalmaz, ami, ha génenként 1000 nukleotidot számítunk, összesen mintegy 4000 génnek felelhet meg. A guanin plusz citozin mennyisége a DNS teljes mennyiségéhez viszonyítva a baktériumfajok konstans jellemvonásának számít. E bázispár aránya a DNS-ben bizonyos *Mycoplasmák* és anaerob baktériumok 22%-ától egyes obligát aerobok 74%-áig ingadozik.





e)

52. ábra

A kromoszóma replikációja. *a)* A kromoszóma az ún. replikátorhelyen a mezoszómához kapcsolódik, mely mintegy forgattyúként szolgál. *b)* Az egyik, a felszakadt fonal 5' végével a membrán egy másik, közeli pontjához kötődik. *c)* A kromoszóma a mezoszomális kapcsolódási hely mentén (melyhez a replikáló enzimek rögzülnek) az óramutató járásával ellenkező irányban forgó mozgást végez. Az újonnan szintetizált fonalat szaggatott vonal jelzi. A második membránkötődés helye, a közbeiktatott membránszintézis révén (pontozott szakasz), a testvérkromoszómát tartó mezoszómától fokozatosan távolodik. *d)* A replikációs ciklus befejeződött. Az utolsó lépés a fonalak szabad végeinek összekötése. *e)* A helikális DNS szegregációjának modellje MENDELSON (1982) után. A végükön nyitott hengerek a pálcika alakú baktériumsejt egy szakaszát szimbolizálják. E hengereken belül két rendszer kerül szemléltetésre: a) a sejtfelszíni DNS-szegregáló „szalagok", és b) a replikálódó DNS. A legfelső vázlaton egyetlen ilyen, a sejtfelszíni a henger mentén csavarszerűen görbülő DNS-szegregáló szalag kerül bemutatásra. A kétirányban replikálódó DNS molekula a szalaghoz összeköttetések (o) révén kapcsolódik. A leány-DNS-ek replikációs originjei a szegregáló szalag végeihez kötődnek (o). A kromoszóma-terminus a szegregáló szalag egy köztespontjához kapcsolódik. Mindez a DNS-replikáció és szegregáció egy korai állapotára jellemző, mégpedig közvetlenül a két folyamat kezdeményezését követően. A második vázlaton a folyamat már előrehaladottabb és a szalag helyzete oly módon változott, hogy két vége és ezekkel együtt a leány-DNS-ek originjei már jócskán eltávolodtak. A DNS-terminus helyzete a szalagon továbbra is változatlan. Az említett változások arra vezethetők vissza, hogy időközben újabb sejtfelszíni szalagok (melyek az ábrán nem szerepelnek) anyagának párhuzamos beépülése ment végbe. A harmadik vázlat már azt a helyzetet ábrázolja, amikor a két leánymolekulában még az első befejezése előtt a replikáció második menete is kezdetét veszi. E lépésekkel újabb sejtfelszíni DNS-szegregáló fonalak társulnak, melyek végeihez a megfelelő kromoszóma-originek kapcsolódnak. A terminus még mindig eredeti helyén. Végül a legalsó vázlaton látható, hogy a DNS replikáció első fordulója már teljessé vált, másrészt a harmadik is elkezdődött. A még újabb originek újabb szalagokhoz kapcsolódnak, utóbbiak pedig a már korábban létrejött szalagokhoz. Midőn pedig a terminus is szabaddá válik, e helyen megkezdődik a sejtosztódás folyamata. Ezután a szabad terminus új kapcsolódási helye, mégpedig a legközelebbi régi DNS-szegregáló szalag centruma felé mozdul el. E legalsó ábrán az is megfigyelhető, hogy az új szegregáló szalag két, már korábban létező közé miként iktatódik be. A DNS hossza helyszűke miatt, az ábra minden vázlatán a szalagok hosszához viszonyítva, mintegy 600-szorosan redukálva szerepel

1.13.42. A maganyag replikációjának előfeltételei

A sejtosztódás egyik legfontosabb mozzanata a maganyag replikációja. A folyamat igen bonyolult és számos részletében még tisztázatlan. Elsőnek a kromoszóma egy ponton a citoplazmamembránhoz tapad. A tapadási pont tartalmazhatja azokat az enzimeket, melyek a DNS replikációjában vesznek részt. A membránhoz kapcsolódás egyúttal a leánykromoszómák szegregálódásának is fontos feltétele, mivel ezek a membrán közeli pontjaihoz tapadva, ennek növekedése révén távolodnak el egymástól. A kromoszómák így az osztódás során létrejövő új sejtekbe mintegy fizikai membránvontatás útján kerülnek. A kapcsolódást elektronmikroszkópos felvételek igazolják, de más bizonyítékunk is van. Az *E. coli* kromoszómájának frakcionálása során azt találták, hogy van ennek egy, a teljes kromoszóma kb. 0,5–1,0%-át kitevő szakasza, mely rezisztens az ultrahangkezeléssel megvalósítható roncsolással szemben. Ez az a rész, amely a membránhoz kötődve stabilizálódik.

A DNS replikáció kezdeményezése azon a ponton következik be, ahol a kromoszóma a membránhoz tapad és a továbbiakban ott is marad. A replikációt a kromoszóma mentén működő enzimek hajtják végre. A DNS-nek az a szakasza, mely a membránhoz kapcsolódik, az *E. coli* K 12 és B(r)1 jelzésű törzseiben az arg- és a xilóz-lokuszok között van. Ezt az ún. géndózis vizsgálatok igazolják. Ezek azon az összefüggésen alapulnak, miszerint a sejtben egy gén termékeinek, így az enzimeknek a mennyiségét a kérdéses gén kópiáinak meglevő száma határozza meg. Így, ha egy enzim koncentrációja a sejtben megkettőződik, úgy ez arra utal, hogy az enzimet kódoló gén replikálódott. Mármost a géneknek a kromoszóma kapcsolódási pontja utáni sorrendjét figyelembe véve, feltételezhető, hogy annál hamarabb fog egy gén a sejtben két példányban hatni, mennél közelebb van a kapcsolódási ponthoz, replikációjára ugyanis annál hamarabb kerül majd sor. Ezzel szemben a kromoszóma kapcsolódási pontja előtt lokalizált gének közel a replikáció teljes befejeződéséhez hathatnak majd csak dupla dózisban. Így, folyamatosan vizsgálva a géntermékek dupla dózisainak megjelenését, a géntérképen meghatározhatóvá válik a replikáció megkezdésének, ill. a kromoszóma kapcsolódásának régiója is. Mindezt szinkronizált kultúrák teszik lehetővé, melyekben a sejtek nagyfokú egyidejűséggel osztódnak, és a bennük végbemenő fiziológiai–biokémiai változások egységesen kezelhetők és mérhetők. Van még egy másik módszer is, melyet a kezdeményezési pont helyzetének meghatározására fel lehet használni. Ez az ún. egyidejűsített mutagenezis módszere. Számos mutagén ágens éppen a kromoszóma replikációs pontjánál a leghatékonyabb. Szinkron kultúrákban, ahol a legtöbb sejtben a kromoszóma replikációja egyidejűleg kezdeményeződik, a replikáció mindenkori pontjának helyzete (mutagén hatásra) a mutáló gének sorrendjének vizsgálatával meghatározható.

Az *52. ábra* vázlatosan ábrázolja a replikálódó kromoszóma kapcsolódását a membránhoz, majd a replikáció befejezése után, a fiziológiai sejtosztódást (vagyis a leánysejtek élettani szeparálódását) megelőzően, a leánykromoszómák elkülönülését. Ez utóbbit az ábrán MENDELSON (1982) modelljének megfelelően is bemutatjuk.

1.13.43. A replikáció kezdeményezésének szabályozása

A kromoszóma replikációja kezdeményezésének szabályozását illetően a JACOB és munkatársai által javasolt modell negatív kontrollt tételez fel. E modell szerint egy represszor termelődik, mely a replikátort elzárja. A DNS-replikáció folyamata egy induktor, ill. egy iniciátor bizonyos mennyiségének megjelenésével veszi kezdetét. Az iniciátor, mely feltehetően egy génproduktum, periodikusan termelődhet és szintézise határozhatja meg a represszió feloldását, vagyis a replikáció egy új menetének kezdetét. Itt a géndózis is szerepet játszhat, amennyiben az a gén, mely az iniciátort kódolja, a replikátor pozíciója előtt kell, hogy elhelyezkedjék. Így a replikáció egy menetének csaknem teljes befejeződéséig nincs jelen dupla dózisban. A dupla dózis viszont feloldja a represszió.

A szabályozás egy másik lehetősége, hogy egy regulátorgén által kódolt fehérje közvetlenül az iniciátorhoz kötődik és így hat a replikációra (pozitív kontroll). Feltehető, hogy e fehérje a sejt életciklusa keretében ugyancsak periodikusan termelődik, vagy koncentrációja függvényében hat, mégpedig a géndóziselvnek megfelelően. Végül még egy további alternatíva is lehetséges. Eszerint az iniciátor termelése konstitutív módon megy végbe. A kezdeményezést egy gátló hatású protein szabályozza. Az ezt kódoló gén a replikátor közelében helyezkedik el és átírására közvetlenül a replikáció egy teljes menetének kezdetén kerül sor. Amint a növekedés során a sejt volumene megnő, az inhibitormolekulák felhígulnak és újrakezdeményezés következhet be.

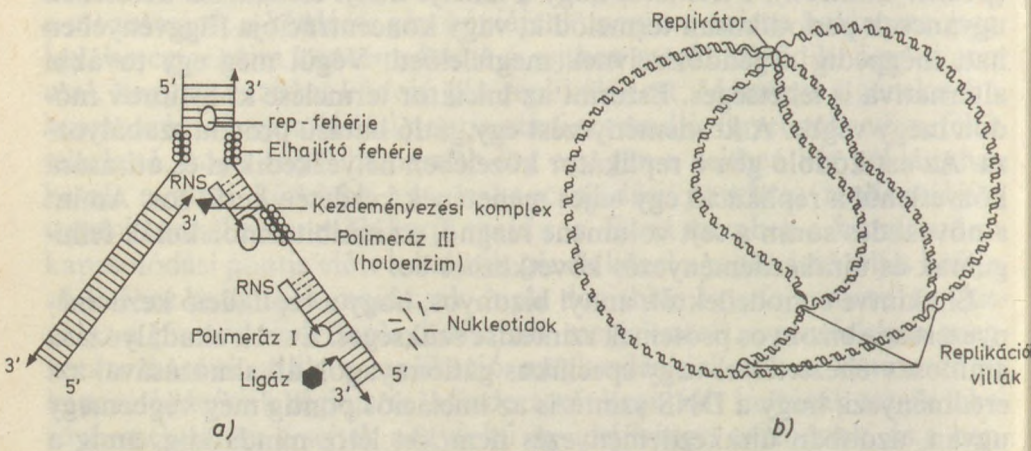
Eltekintve e modellektől, annyi bizonyos, hogy a replikáció kezdeményezéséhez bizonyos proteinek szintézise szükséges. Ennek akadályozása aminosav-éheztetéssel vagy specifikus gátlóanyagok alkalmazásával azt eredményezi, hogy a DNS-szintézis az iniciációs pontig még végbemegy ugyan, azonban újrakezdeményezés nem jön létre mindaddig, amíg a proteinszintézis gátolva van. A kezdeményezésben legalább két protein vesz részt. Az egyik közvetlenül a kezdeményezés előtt termelődik. Ennek szintézisét nem zavarja a kloramfenikol alacsony koncentrációjának jelenléte. A második protein termelése már sokkal korábban észlelhető, és ennek szintézisét a kloramfenikol alacsony koncentrációban is gátolja. A DNS-replikáció folyamata tehát mind térben (a replikátor helye),

mind időben (a replikációs ciklus azon időpontja, amikor az iniciátor proteinek szintetizálódnak) ellenőrizve van.

1.13.44. A replikáció történései

A kromoszóma replikációjának tényleges folyamata a sejtosztódással közvetlenül koordinált, minthogy a DNS-szintézis inhibitorai kihatásukban a sejtosztódást is gátolják. E tekintetben ez idáig főleg a mitomicin C, az UV-fény, a timinéheztetés és a naladixinsav gátló hatását tanulmányozták. A DNS-szintézis gátlása, a DNS-replikációja egy menetének befejezése előtt feltétlenül blokkolja a soron következő sejtosztódást. Ezzel szemben, ha a DNS-szintézist a replikáció menetének befejeződése után gátolják, úgy az utólagos sejtosztódás az esetek egy részében még végbemehet. Az *E. coli* egy exponenciális szaporodási szakaszban levő populációjában a sejteknek még megközelítően 30%-a osztódott ilyen körülmények között. A kromoszómareplikáció kezdeményezése tehát nem kiváltója az elkövetkezendő sejtosztódásnak.

Az *E. coli*ban a kromoszóma replikációs pontja állandó sebességgel halad előre. A teljes lemásolás 37 °C-on, 40 percet vesz igénybe. Feltételezhetően a replikáció sokszor csak egy irányban halad. A *Salmonella typhimurium* és az *E. coli* esetében azonban már kimutatták, hogy a kezdeményezési área mindkét oldalán is végbemehet. A kromoszómán



53. ábra

a) A replikációs villa. Az *Escherichia coli* DNS-ének replikációjánál szerepet játszó proteinek és a replikáció különböző stádiumai (KORNBERG, 1977). Az egyik fonal szintézise diszkontinuus, rövid szakaszokból (SENGBUSCH, 1979). Ahhoz, hogy a rövid, újonnan kialakított DNS-szakaszok (OKAZAKI-fragmentek) összekötése végbemehessen, azokról az RNS-részt el kell távolítani. Ezt a feladatot a ribonukleáz-H és a DNS-polimeráz I látják el, melyek részükről a hiányokat dezoxiribonukleotidokkal töltik be. A tulajdonképpeni összekapcsolást a DNS-ligáz végzi. *b)* Replikációs villák egy replikálódó kromoszómán

replikációs villák (elágazások) haladnak végig, mikor is mindkét fonal lemásolódik *(53. ábra)*. A replikáció az „origintől" indul, és ha kétirányú, úgy a szemben levő „terminus" pont felé szimmetrikusan halad. A korábbi felfogás szerint az egyik fonal párjának szintézise folyamatosan, a másiké szakaszosan (lépésenként) történik, RNS- és DNS-polimerázok részvételével, mindkét esetben 5′ ⟶ 3′ irányban. A „terminus" ponton az egyik fonal felszakad, ami szétcsavarodásukat teszi lehetővé. A fokozatosan kiépülő új fonal a replikációs villától visszafelé haladva OKAZAKI-fragmentekből áll össze. E töredékekből az 5′ végén levő rövid RNS-szakaszt a ribonukleáz-H metszi le, a DNS-polimeráz I a templátnak megfelelően kiegészíti, majd a cukor–foszfát-gerincen a ligáz összeköti. Ezzel szemben a folyamatosan kiépülő új fonal szintézise a replikációs villa szétnyílásának irányában halad. A szintézisek ezen kétirányúsága csak a villa térségének rövid szakaszára vonatkoztatható, mert a teljes DNS-kettőshélix replikációja valójában egyirányú. Jelenleg már azt a nézetet képviseljük, miszerint mindkét új fonal szintézise fragmentekből, diszkontinuusan épül fel (SENGBUSCH, 1979).

Nem kétséges, hogy azon a kromoszómán, melynek folyamatosan megvalósuló replikációjához 40 percre van szükség, egyidejűleg több replikációs villa is jelen kell hogy legyen ahhoz, hogy a sejt 20 perces átlagidővel osztódva, a leánysejtek mindegyikét, minden osztódásnál, teljes, hibátlan felépítésű kromoszómával láthassa el. Ez viszont csak úgy képzelhető el, hogy új kezdeményezés jön létre, még mielőtt az előző replikációs elágazás az egész kromoszómán végighaladhatott volna. A replikáció befejeztével a sejt osztódik. Feltételezhető, hogy egy gyorsan osztódó sejtben egyidejűleg, a kromoszómák számától függően, több sejtosztódási program megvalósulása folyik. A replikáció menetének irányát illetően ma már bizonyított, hogy a sejt a körülményektől függően egyirányú és kétirányú duplikációt egyaránt megvalósíthat.

Az *52. ábrán* láthattuk, hogy a leánykromoszómák szeparálódása milyen mechanizmus szerint történhet. A szegregációit megelőzően azonban a kromoszóma összecsomagolódik. Ez a kompakttá válás RNS közbeépülésével történik. RN-áz hatására a DNS szétterül.

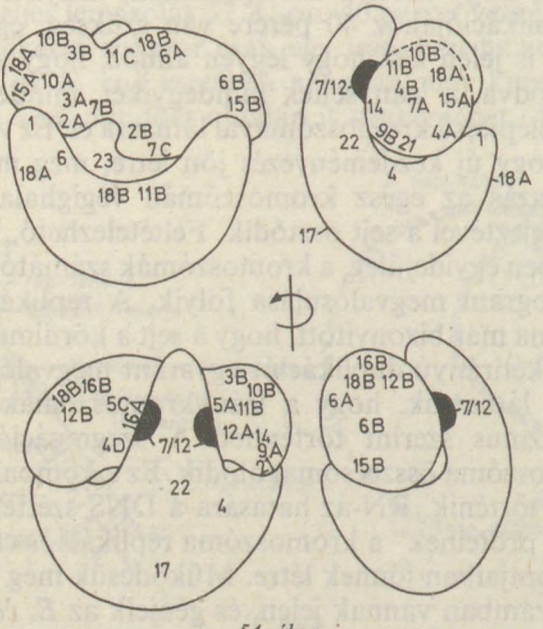
Az „osztódási proteinek" a kromoszóma replikációs ciklusának meghatározott időpontjaiban jönnek létre. Működésük még nem ismert, de a sejtben nagy számban vannak jelen, és génjeik az *E. coli* géntérképén elszórtan, legalább hét lokuszt foglalnak el. Feltételezik, hogy mint enzimek, a membránszintézissel és a peptidoglikán-metabolizmussal lehetnek kapcsolatban.

CLARK és munkatársai egy osztódási proteinnel kapcsolatban érdekes megfigyeléseket tettek. A vizsgálatokat egy hőmérsékletszenzitív mutánssal végezték. E szervezet növekedése 30 °C-on normális. A hőmér-

sékletet 42 °C-ra eltolva a sejtek osztódása hirtelen abbamarad, bár méretük, megnyúlással, tovább növekedik. Visszaállítva a 30 °C-os hőmérsékletet, gyors osztódás figyelhető meg. E jelenség magyarázata: a 42 °C-on fejlődő sejtek inaktív osztódási proteint termelnek, mely azonban 30 °C-on aktiválódni képes. E proteinnek 42 °C-on 0,5 perc a „félélet" ideje, melynek elteltével irreverzíbilisen denaturálódik. Minthogy 42 °C-on szintézise nagyon meggyorsul (megkettőződési ideje kevesebb mint 0,5 perc), ezért e hőmérsékleten a sejtekben osztódási potenciál akkumulálódik. Ez a potenciál az alacsonyabb hőmérséklet visszaállításakor manifesztálódik. Az osztódási potenciál megnyilvánulását a vankomicin gátolja, a cikloszerin nem. Következésképpen ezen osztódási protein a peptidoglikán-bioszintézis egy késői szakaszában vehet részt. A NaCl nagy koncentrációi 42 °C-on is lehetővé teszik a sejtosztódást. Az ok nem ismert.

1.13.45. A riboszómák

A baktériumsejt vékony metszetének elektronmikroszkópos felvételein a citoplazma durván granuláris tömegnek látszik. Ezek a szemcsék



54. ábra

Az *E. coli* komplett 70S (50S + 30S) riboszómájának modellje különböző, elöl-, hátul- és oldalnézetben. A 30S alegység az alsó, nagyobb alegység (50S) nyeregszerű mélyedésébe illeszkedik. A számok az egyes riboszomális proteinek ellen előállított antitestek specifikus kötődési helyeire utalnak. A betűk az antitesteknek egy és ugyanazon proteinen tapasztalt különböző kötődési típusaira céloznak. Az adatokból arra következtethetünk, hogy az alkotó proteinek egyes részei a riboszómafelület más-más helyein exponáltak (TISCHENDORF és munkatársai, 1975; WITTMANN–LIEBOLD és MANZING 1977; SENGBUSCH, 1979)

riboszómák, melyek 15–20 nm átmérőjűek. A sejt RNS-tartalmának 90%-át, szárazsúlyának pedig 40%-át alkotják és a proteinszintézisben vesznek részt. Számuk a proteinszintézis mértékének megfelelő mindenkori igény szerint változik. Így gyorsan növekedő kultúrákban sejtenként 10 000 is lehet, míg éhező kultúrákban sejtenként talán csupán néhány száz. Minden szervezetben a riboszómák két egységből épülnek fel. Ezeket a baktériumoknál 30 S és 50 S szedimentációs konstanssal jellemezhetjük. A proteinszintézis alkalmával ezek kombinációja 70 S riboszómákat eredményez. Az *E. coli* riboszómái 63% RNS-t és 37% proteint tartalmaznak *(54. ábra)*. A 30 S riboszóma RNS-e egyetlen, 16 S szedimentációs konstanssal jellemezhető molekula. Az 50 S riboszóma egy 23 S és egy 5 S szedimentációs konstansú RNS-t tartalmaz. A protein igen összetett, és a kisebbik alegységben legalább 25, a nagyobbikban 32 eltérő komponensből áll.

A 70 S riboszóma, alacsony magnéziumion koncentrációjú (10^{-4} M) oldatban szuszpendálva, két alegységére disszociálhat. Újra reasszociálódik viszont, ha a magnéziumionok koncentrációját 10^{-2} M-ig növeljük. A proteinszintézis folyamán a 70 S riboszómákat mRNS tartja össze, poliszómáknak ismert láncokat képezve. Úgy tűnik, hogy a proteinszintézis alkalmával bizonyos fokú kapcsolódás jön létre a poliszóma és a citoplazmamembrán között is. Az eukariota sejtek riboszómái nagyobbak, 40 S-el és 60 S-el, míg összekapcsolódva 80 S-el jellemezhetőek.

1.13.46. Tartalékanyagok

A baktériumsejtben az energia- vagy a széntartalékként szolgáló vegyületek szintézise és raktározása csak a növekedés bizonyos körülményei között megy végbe. Később azután, mikor pl. a sejt éhezik, vagy friss közegbe kerül, a sejt fenntartására vagy új sejt szintézisére használódnak el. A tartalékvegyületek felhalmozódása leginkább akkor következik be, midőn az új sejtek képződésének feltételei korlátozottak. Így pl. a növekedés stacioner fázisában, vagy amikor a környezetből egy olyan fontos tápelem, mint amilyen pl. a nitrogén, már kimerült. Mindkét esetben, a közegben, a rendelkezésre álló, felhasználható szénforrások feleslege lehet még jelen. A sejtekben tárolt tartalékanyagoknak négy fő típusát különíthetjük el. Az első három jelenléte jellemző lehet bizonyos baktériumokra, míg a negyedik feltehetően valamennyiben előfordul (Levy és munkatársai, 1973).

1. A glikogén: alkálistabil poliglükóz, mely a különböző baktériumokban strukturálisan különbözhet. Előfordul pl. az *Aerobacter aerogenes* vagy az *Escherichia coli* sejtjeiben, mégpedig esetenként olyan nagy

mennyiségben, hogy a sejtek szárazsúlyának 25%-át is kiteheti. Éhezés alkalmával rendkívül gyorsan felhasználódik. Ha glikogénben gazdag sejteket, ammoniumsókat tartalmazó oldatba helyeznek, úgy a glikogén az aminosavak és a fehérje szintéziseihez szükséges energia és szénváz fedezésére gyorsan degradálódik. A glikogéntartalékok nincsenek membránba zárva. Oldhatatlanságuk következtében a citoplazma ozmotikus koncentrációját nem befolyásolják. A glikogénszemcséket megfesthetjük hígított jódoldattal. Ilyenkor a sejtben mint vöröses vagy bíborszínű képletek tűnnek elő.*

2. Lipidek: az általánosságban vett lipid kifejezés zsíroldó szerekben – mint pl. etiléterben vagy acetonban – oldható anyagokra vonatkozik. Egyes festékek, mint pl. a Szudán-fekete, olajlipidekben szelektíven oldódnak és ezeket mikroszkóppal is megfigyelhetővé teszik. A poli-β-hidroxi-vajsav, a baktériumokban a leggyakoribb lipidek egyike. Jóllehet intracelluláris felhalmozódásának általános körülményei hasonlóak a glikogénéhez, mégis e lipid nagy mennyiségének képződése csak meghatározott szénforrások jelenlétében megy végbe. Például, az acetátok és butirátok kitűnő prekurzorai.**

A *Pseudomonas solanacearum* és a *Bacillus megaterium* nagy mennyiségű-poli-β-hidroxi-butirátot képes raktározni. E lipid a *Pseudomonas* esetében a sejtek szárazsúlyának akár 60%-át is kiteheti. Megállapítást nyert, hogy legalábbis a *B. megateriumnál*, a raktározott lipid fehérjetermészetű, és nem unit membrán típusú, membránba zárt. Mindemellett, a glikogénhez hasonlóan, e polimerek oldhatatlansága a biztosítéka annak, hogy a sejt belsejében uralkodó ozmotikus nyomás szintjét nem befolyásolják.

3. Anorganikus polifoszfátnak mint nagy energiatartalmú vegyületnek a raktározása olyan esetekben folyik, midőn a sejt, szükségleteit meghaladó mennyiségű energiaforráshoz jut. Így pl. akkor, amikor annak ellenére, hogy a külső energiaforrás (pl. glükóz) még bőségesen a sejt rendelkezésére áll, a sejtszintézis mértéke mégis elenyészően csekély, minthogy más elengedhetetlenül fontos tápanyagforrások (pl. szulfátok) már kimerültek. Nagy energiatartalmuk ellenére a polifoszfátokról mégsem állíthatjuk, hogy energiatartalékok, mivel még akkor sem szolgálhatják a sejt ATP-szintjének fenntartását, amikor már egyéb energiaforrások régen kimerültek. Ugyanis e polimer energiája, monomerekké

*A baktériumsejt poliszacharid szemcséit a krómsav–Schiff-reakció segítségével mutatják ki. A baktériumkenetet OsO_4 gőzben vagy 96%-os etanollal rögzítik, sötétben, 20 percig, 4%-os krómsavval kezelik, majd áramló vízben öt percig mossák. Ezt követően 15 percig kénessavas fukszinnal festik. Kénessavval néhány percig öblítenek, deszt. vízzel mossák és levegőn szárítják.

**A poli β-hidroxi-vajsav kimutatására a baktériumkenetet 70%-os alkoholban készített 0,3%-os Szudán-fekete-B-vel harminc percig festjük, xilollal öblítjük, majd 0,5%-os vizes safraninnal 5 percig ellenfestjük (Drews, 1983).

történő hidrolízise alkalmával hő alakjában vész el. Ezek tehát csak tartalékanyagok, és elsősorban is mint foszforforrás jöhetnek számításba a nukleinsavak és a foszfolipidek szintéziséhez. A polifoszfátok megjelölésére használt „volutin" és „volutinszemcse" kifejezéseket a diftéria-„bacillusok" leírásánál alkalmazták először. Savanyú jellegűek, bázikus festékekkel erősen festődnek. E szemcséket gyakorta mint „metakromatikus granulumokat" is ismertetik, minthogy toluidinkékkel vagy metilénkékkel festve a festék eredeti színétől eltérő más színt vesznek fel. Ez a színváltozás azonban nem a pH-ra és nem is oxidációs–redukciós hatásokra vezethető vissza. Egyes vélemények szerint a festék megváltozó abszorpciós spektruma annak tulajdonítható, hogy integrálódik a foszfátpolimerbe, és így már polimerizált festék effektusát nyújtja. A baktériumok polifoszfátja akár 500 foszfátegységből álló láncot is alkothat. Következésképpen a molekula oldhatatlan és az ozmotikus nyomást nem befolyásolja.

A fotoszintetikus aktivitású bíborkénbaktériumok a szulfidokat elektronforrásként használják és a létrejött elemi ként raktározzák sejtjeikben. Bizonyos kemolitotróf, ill. mixotróf baktériumok, mint pl. a *Beggiatoa,* a szulfidok oxidációja révén jutnak energiához, miközben sejtjeikben ugyancsak elemi kén keletkezik és raktározódik. Amikor a szulfidok mennyisége a közegben erősen megcsappan, az elemi ként szulfáttá oxidálják.

4. Jóllehet a riboszómákat nem tekinthetjük tartalékanyagoknak, mégis tény, hogy a növekedés során szintetizálódnak, viszont éhezés alkalmával a fenntartás és a reprodukció szükségleteit szolgálják. Mivel fehérjéből és RNS-ből állnak, kitűnő aminosav-, ribóz-, foszfát-, továbbá adenin-, guanin-, uracil- és citozinforrások. A riboszómák száma a baktériumsejtben direkt relációt mutat a kultúra növekedési gyorsaságával, midőn ez utóbbit a közeg tápanyaggazdagsága szabja meg. A gyorsan növekedő sejtek nagy mennyiségű riboszómát tartalmaznak. Éhezés esetén viszont a sejt riboszómáit hasznosítja a túlélés érdekében. Sok baktériumban ezek képezik a szén és az energia egyetlen tartalékforrását, és feltehetően valamennyi baktériumban egyaránt fontos tartaléknak számítanak.

A riboszómáktól eltekintve – melyek nélkülözhetetlenek a növekedés számára, és az éhezés napjaiban a túlélést biztosítják – kérdéses, hogy e tartalékanyagok akkumulációja előnyt jelent-e a sejteknek. Azok a tanulmányok, melyeknek célja volt felderíteni, hogy vajon a tartalékanyagok nagy mennyiségét tartalmazó sejtek túlélőképessége nagyobb-e, mint az ezeket nem tartalmazóké, nem vezettek határozott, e kérdést egyértelműen eldöntő eredményekhez.

A baktériumokban még nagyon különböző, más egyéb zárványokat

is találhatunk. Az ún. magnetoszómák magnetithez hasonló vaszárványok. Hordozójuk pozitív magnetotaxissal az üledékek irányában tájékozódik. A *Bacillus thuringiensis*nél pl. a parasporális proteinkristályok a *Lepidopterák*ra – ezek béltraktusán át – ható inszekticid toxinok. A kénbaktériumokban *(Achromatium)* észlelhető kalciumkarbonát- és oxalátkristályok szerepéről nem sokat tudunk. A cianobaktériumoknál talált cianoficin-szemcsék (∅ 500 nm-ig) valószínűen nitrogéntartalék-anyagok. Az ugyancsak a cianobaktériumoknál megfigyelhető fikobiliszómák (∅ 35–50 nm), melyek a fotoszintetikus lamellákra tapadnak, a fényabszorpcióval és ehhez kapcsolódóan a klorofillra haladó elektrontranszporttal állhatnak kapcsolatban. A *Thiobacillus neapolitanus*nál ún. karboxiszómákat írtak be. Ezek poliéder alakú zárványok, melyek ribulóz-1,5-difoszfát-karboxilázt tartalmaznak.

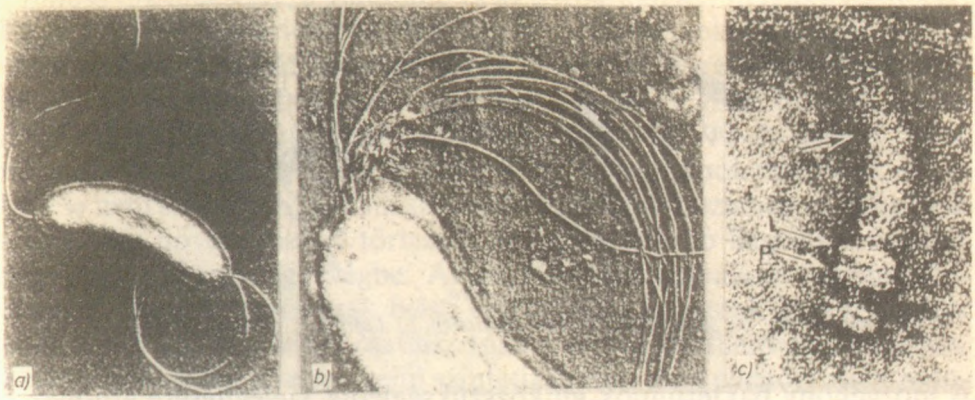
1.13.47. A citoplazma

Jóllehet ennek a sejt legtöbb enzimét magába foglaló frakciónak *(Grundplasma; cytosol; hyaloplasma)* meghatározott struktúrát nem tulajdoníthatunk, mégis hangsúlyozni kell, hogy ez tartalmazza a sejt fehérjéinek több mint 50%-át. Itt vannak a szénhidrát-metabolizmus enzimei, melyek közreműködnek az EMBDEN–MEYERHOF-út, a pentóz-foszfát-út, a glioxalát-ciklus, a citrátkör stb. anyagcsereútjain. Hasonlóan itt található a kataláz, és itt fordulnak elő a különböző dehidrogenázok, proteázok, észterázok, a mRNS-ek, a tRNS-ek és a proteinszintézisnél szereplő enzimek. Ugyanezen frakció tartalmazza a sejt oldható tartalék építőelemeit: aminosavakat, nukleotidokat, a szénhidrát-metabolizmus intermedierjeit, szervetlen molekulákat stb., melyeket a sejtből vagy forró vízzel, vagy hideg 5%-os triklór-ecetsavval lehet extrahálni.

Egyre növekvő mennyiségű bizonyítékkal rendelkezünk, hogy a citoplazmában bizonyos fokú organizáció uralkodik. Alig valószínű, hogy az enzimek ebben véletlenszerűen fordulnak elő.

1.13.48. Az aktív mozgás; a csillózat típusai

Az aktív mozgásra képes baktériumok sejtjeit csillók hajtják előre. A csillók finom, fonalszerű, rendszerint hosszú képletek, melyek a sejt felszínéről nyúlnak annak környezetébe *(55. ábra)*. Az eukariotáknál az ilyen képleteket ha rövidek, csillóknak *(cilia)*, ha hosszúak, ostoroknak



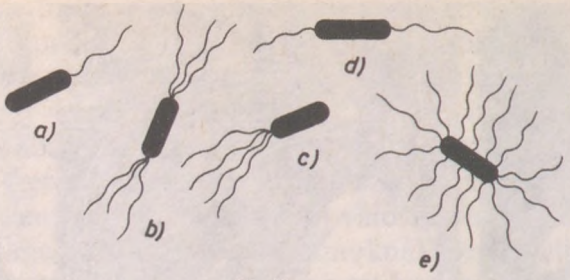
55. ábra

Csillós sejtek és csillóalkotóelemek elektronmikroszkópos felvétele. *a) Herbaspirillum seropedicae.* Csillós sejt (BALDANI és munkatársai, 1986). *b) Spirillum serpens.* Poláros flagellumok sejtvégi elrendeződése (× 32 500). *c)* GRAM-negatív baktérium. Csilló alapi test. DE PAMPHILIS és ADLER (1971) után

(flagella) nevezik. A baktériumoknál, tekintet nélkül a hosszméretre, a magyar nyelvű irodalomban minden esetben a csilló megjelölés, míg az angolban a flagellum (többes szám; flagella) használatos. Mindamellett egyes baktériumok (pl. *Xanthomonas*) polárisan elhelyezkedő egy vagy néhány, igen hosszú „csillóit" az ostor kifejezéssel célszerűbbnek látszana illetni.

A csillók nem a sejtfalból, hanem a falon áthatolva, a citoplazmamembránból erednek, s így a lizozimkezeléssel nyert, fal nélküli protoplasztok csillóikat megtarthatják. Fénymikroszkóppal nem láthatók. Mindössze 10–25 nm átmérőjűek, azonban nagyon hosszúak, így 15–20 μm hosszméretűek is lehetnek. A baktériumokat másodpercenként testük hosszának több mint hússzoros távolságára, akár 50 μm/másodperc sebességgel repíthetik előre. A baktériumok nem minden fajának van csillója. A csillókkal aktív mozgásra képeseknél viszont a csillók száma, mérete és elhelyezkedése fajra jellemző. E tekintetben az alábbi főbb típusokat különböztethetjük meg *(56. ábra)*: **1.** *Monotrich;* a sejt egyetlen, polárisan (az egyik póluson) elhelyezkedő csillóval rendelkezik. **2:** *Lofotrich;* polárisan több csilló is megfigyelhető. **3:** *Amfitrich;* mindkét póluson egy-egy csillóval. **4:** *Lofoamfitrich;* mindkét póluson több csillóval, és végül **5:** *Peritrich;* a csillók szórtan, a sejt egész felületén előfordulnak.

Az aktív mozgásképesség felderítése céljából nagy nagyítású, száraz objektívvel függő cseppkészítmények szélét figyeljük. Anaerob vagy fakultatív anaerob mikrobák mozgásképességének megállapítására kevés glükózt tartalmazó, félmerev (lágy-) agarközeget tűvel oltunk be.



56. ábra

A csillózat típusai: *a) Monotrich, b) Lofo-amfitrich, c) Lofotrich, d) Amfitrich, e) Peritrich*

A mozgékony baktériumok glükózszükségletük kielégítésére átnőnek a félig szilárd tápagaron, ami abban jellegzetes diffúz zavarosodást eredményez.

A csillók elhelyezkedésének fénymikroszkópos megfigyeléséhez mind a csillóhoz (megnövelve annak vastagságát), mind a festékhez kötődni képes pác alkalmazása szükséges.*

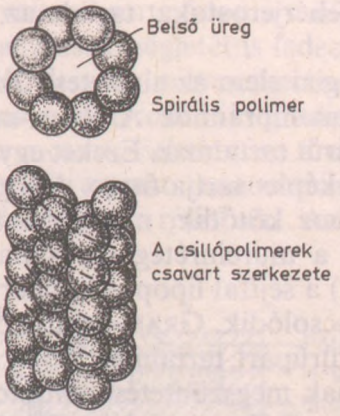
1.13.49. A prokariota csilló szerkezete

A csilló morfológiailag három részből áll. Az *első*, mely a festett készítményekben észlelhető, az ún. filament. Ez kizárólag a flagellin nevű fehérje rostjait tartalmazza. E rostok száma háromtól hatig változhat. A *Bacillus pumilus*nál a globuláris proteinek alkotta hat fonal mintegy kötélszerű szerkezetet alakítva fonódik össze. A teljes filament csavart lefutású. Ebben a spirális struktúrában az egyes rostok úgy fonódnak össze, hogy a filament hosszában egy belső üres csatorna jön létre *(57. ábra)*. A flagellinfehérje összetételében baktériumfajonként változó, bár van állandó jellemvonása is. Így pl. ilyen a cisztein hiánya, az aromás

*A csillófestés nagy gyakorlatot igényel, és sikertelenség esetén célszerűbb elektronmikroszkópos megfigyelésekhez folyamodnunk. Fénymikroszkópos vizsgálatok számára szánt preparátumok készítésénél minden üvegneműt, mely a tárggyal és a festékekkel érintkezésbe kerül gondosan zsírtalanítanunk kell. Ha a folyadéktenyészet fiatal mozgó sejtjeit centrifugálással szándékozunk összegyűjteni, úgy azokat előbb 5%-os neutralizált formalinoldattal rögzítjük. A tárgylemezre cseppentett sejtszuszpenziót nem kenhetjük szét, hanem csak mozgatással szétfolyatjuk. Amikor a készítmény párolgási vesztesége már jelentős, de gyakorlatilag még nedves, BLENDEN és GOLDBERG szerint pácoljuk és festjük. E célból először is 2–4 percig páchatásnak tesszük ki. A pác, amit gondosan megszűrve óvatosan öntünk a készítményre: 5 g tannin, 1,5 g $FeCl_3$, 2 ml 15%-os formalinoldat és 1 ml 1%-os NaOH 100 ml desztillált vízben elegyítve és oldva. E pácot azután desztillált vízzel öblítjük le, majd a készítményt féltől egy percre festékoldattal rétegezzük. utóbbi összetétele: ezüstnitrát ($AgNO_3$) 90 ml-nyi 2%-os oldatába 25–30%-os ammóniák oldatot mindaddig csepegtetünk, míg a kezdetben fellépő csapadék újra oldatba nem megy. Ezután ezüstnitrát oldatot csöpögtetünk addig, amíg gyenge zavarosodás nem jelentkezik. A festést megszüntetve készítményünket újra leöblítjük és levegőn szárítjuk.

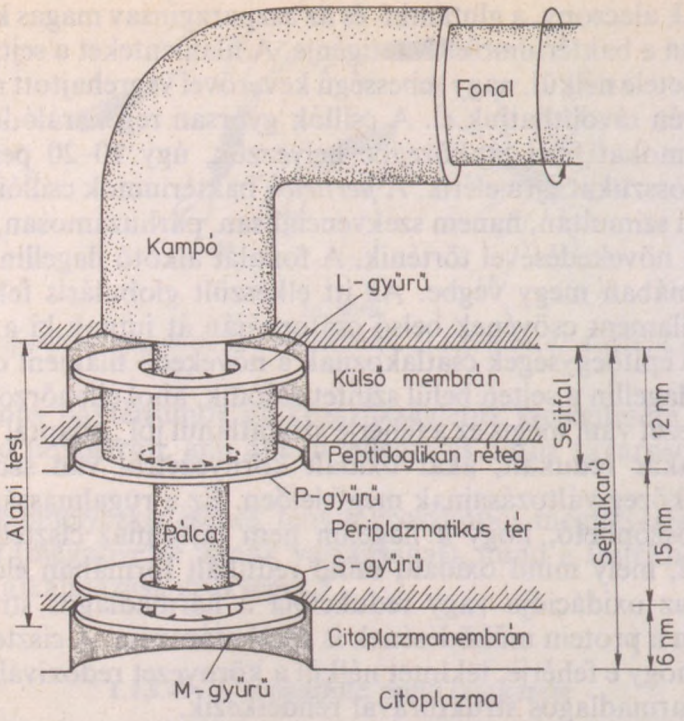
aminosavak alacsony, a glutamin- és az aszparaginsav magas kvantitása. Ez a protein a baktériumok H-antigénje. A filamenteket a sejtről, annak tönkremenetele nélkül, nagy sebességű keverővel végrehajtott rövid idejű kezelés révén távolíthatjuk el. A csillók gyorsan regenerálódnak, és ha a baktériumokat friss tápközegbe helyezzük, úgy 10–20 percen belül normális hosszukat újra elérik. A *peritrich* baktériumok csillóinak növekedése nem szimultán, hanem szekvenciálisan, párhuzamosan, magának a sejtnek a növekedésével történik. A fonalat alkotó flagellin szintézise a citoplazmában megy végbe. Az itt elkészült globuláris fehérjeépítőelemek a filament csövének belső csatornáján át jutnak ki a sejtből és mint újabb építőegységek csatlakoznak a növekedő filament csúcsához. Jóllehet a flagellin a sejten belül szintetizálódik, ahol ellenőrzötten redukált környezet van, mégis ez a fehérje szokatlanul jól „adaptál", és képes működni akár redukált, akár oxidált környezetről van szó, a sejtet körülvevő közeg változásainak megfelelően. Ez a rugalmasság annak a ténynek köszönhető, hogy a flagellin nem tartalmaz ciszteint, azt az aminosavat, mely mind oxidált, mind redukált formában előfordul és amelynek az oxidációja vagy redukciója a harmadlagos struktúra és ennek révén a protein működésének is meghatározója. A cisztein hiánya biztosítja, hogy e fehérje, tekintet nélkül a környezet redoxiváltozásaira, konstans harmadlagos struktúrával rendelkezik.

A csilló *második* morfológiai alkotóeleme az ún. kampó, mely a sejtfalon keresztülhatoló, hüvelyszerű szerkezet. Ez köti össze a filamentet az alapi testtel *(58. ábra)*. A kampó ugyancsak spirális szerkezetű és felte-



57. ábra

A baktériumcsilló filamentjének több, fonalas polimerből felépített, csavarodott szerkezete. A teljes csillót a polimerizált flagellin 3–5 kötélszerűen összefonódott lánca, ill. fonala képezheti



58. ábra

A GRAM-negatív baktériumok csillója alapi testének, továbbá kampójának szerkezete és elhelyezkedése. Vázlat a méretek (nm-ben) feltüntetésével (DE PAMPHILUS és ADLER, 1971)

hetően összefonódott fehérjerostokat tartalmaz. Kémiája és működése ma még kevéssé ismert.

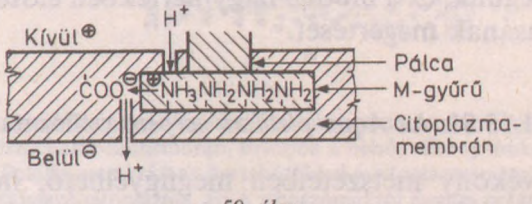
A *harmadik* morfológiai elem az alapi test. Ez rögzíti a kampót és a filamentet a citoplazmamembránhoz. A GRAM-negatív baktériumokban az alapi test két pár gyűrűt tartalmaz. Ezeket egy, a kampóban folytatódó pálcikaszerű tengelyképlet tartja össze. A legbelső gyűrű (M-gyűrű) a citoplazmamembránhoz kötődik, míg a disztális pár belső gyűrűje (P-gyűrű) valószínűleg a mureinréteghez csatlakozik. A disztális pár külső gyűrűje (L-gyűrű) a sejtfal lipopoliszacharid-rétegéhez, illetőleg a külső membránhoz kapcsolódik. GRAM-pozitív baktériumokban az alapi test csak egyetlen gyűrűpárt tartalmaz.

A sejtfal integritásának megszüntetése antibiotikumokkal vagy lizozimmal akadályozza a csillók szintézisét. Emellett a mozgásképesség megtartásához érintetlen sejtfal mindig szükséges. Mozgásképes sejteket lizozimmal kezelve, csillókat viselő szferoplasztokat kaphatunk, ezek azonban képtelenek csillóikat használni.

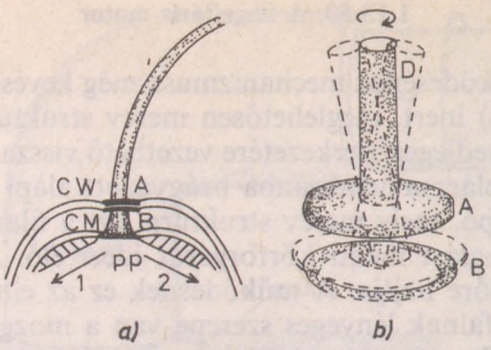
1.13.50. A flagelláris motor

E szerkezetek működésének mechanizmusa még kevéssé ismert. A csilló filamentje (fonala) inert, meglehetősen merev struktúra, ami a fehérje hullámszerű, negyedleges szerkezetére vezethető vissza. Feltételezhetően a mozgást a citoplazmamembránba beágyazott alapi korong rotációja vezeti be. A kampó, mely merev struktúra, ezt a filamentre viszi át és annak ezzel kúppalást menti körforgását idézi elő. A forgó filament viszont a sejtet előre hajtja. A működésnek ez az elmélete számításba veszi, hogy a sejtfalnak lényeges szerepe van a mozgásban és, hogy a filamentben magában energiaelőállító és -átvivő reakciók nem játszódnak le.

A csillóműködés mechanizmusának megismerésére rendkívül kiterjedt kutatások folynak (BERG, 1975, GLAGOLEV és SKULACHEV, 1978 stb.). Úgy tekintik, hogy a spirális flagellum rotációjának a motorja, az ún. „flagellar motor" maga az alapi test a gyűrűrendszerével egyetemben. LARSEN és munkatársai (1974) szerint a mozgás energiaforrása az oxidatív foszforiláció valamely intermediere lehet és nem az ATP. A fotoszintetizáló *Rhodospirillum rubrum* helyváltoztatását tanulmányozva GLAGOLEV és SKULACHEV (1978) arra a megállapításra jutottak, hogy a csillómozgás és a csillók alapi testét viselő membránon át kialakuló hidrogénion-elektrokémiai gradiens ($\Delta\mu_{H^+}$) között közvetlen kapcsolat lehet. Kimutatták, hogy a baktérium mozgása enzimatikus úton előállított, vagy mesterségesen kialakított $\Delta\mu_{H^+}$-komponensekkel, vagyis elektromos potenciállal ($\Delta\Psi$) és ΔpH-val kísérletesen is kiváltható. Valószínű tehát, hogy a protonok visszafelé áramlása, pl. protonvezető csatornákon át a citoplazmába valamilyen módon a csillókat mozgásban tartja, és egyúttal e mozgás energiaszükségletét is fedezi. Az még nem világos, hogy a hidrogénionok ténylegesen milyen mechanizmusnak megfelelően haladhatnak a hidrogénion-elektrokémiai gradiens irányában, működtetve ezáltal a flagelláris motort. Feltehetően a citoplazmamembránban lokalizált M-gyűrű az, amely a protonkoncentrációs differencia kiegyenlítődési folyamatában elsődlegesen részt vesz. Az *59. ábra* e szerzők után



59. ábra
Az alapi test rotációjának modellje (GLAGOLEV és SKULACHEV, 1978)



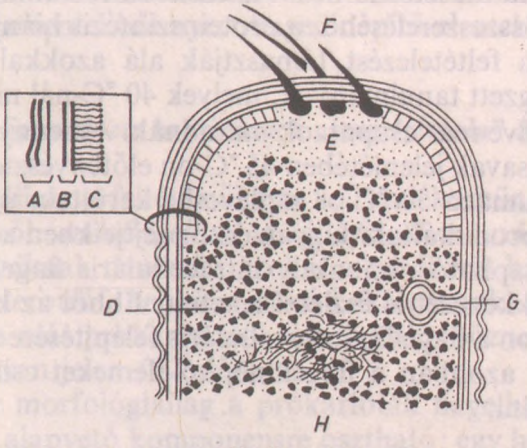
60. ábra
Sematikus modell, mely a csilló filamentjének az alapi szerkezet forgó mozgása révén kiváltott köröző mozgásmechanizmusát mutatja be (VAITUZIS és DOETSCH, 1969)

a $\Delta\mu_{H^+}$-révén kiváltott M-gyűrűrotáció egy lehetséges mechanizmusának sémáját mutatja be. Tételezzük fel, hogy az M-gyűrűn körös-körül protonakceptor-csoportoknak (így aminoknak) rövid távközökkel megmegszakított folyamatos sávja helyezkedik el. Adott pillanatban e csoportok egyike a felső protonvezető járatba nyílik. Ugyanakkor az alsó protonvezető csatorna bejáratánál egy negatív töltésű csoport, pl. egy karboxilátcsoport helyezkedik el. Az aminocsoport protonálása a $-COO^-$- és az $-\overset{+}{N}H_3$-csoportok közötti vonzást váltja ki. Minthogy azonban az $-\overset{+}{N}H_3$ az M-gyűrűhöz stabilan kötődik, az utóbbinak el kell mozdulnia ahhoz, hogy az $-\overset{+}{N}H_3$ a $-COO^-$-csoport közelébe férkőzhessen. A két protonvezető járat közötti távolság azonos a két szomszédos aminocsoport közötti távolsággal. Következésképpen az M-gyűrűnek ez a mozgása most már a legközelebbi $-NH_2$-csoportot illeszti a felső járathoz, ami újabb elmozdulást fog eredményezni stb. Végeredményben a $-COO^-$- és az $-\overset{+}{N}H_3$-csoportok meg-megújuló kölcsönhatása folytán a H^+-ok az alsó járaton át a citoplazmába kerülnek, míg az alapi test folyamatosan forgómozgást végez (*60. ábra*). Bár még további bizonyítékokra van szükségünk, ez a modell nagymértékben elősegíti a csillómozgás mechanizmusának megértését.

1.13.51. Az *Aquaspirillum serpens* csillózata

Az *A. serpens* vékony metszeteiben megfigyelhető, hogy a csillók a membránon és a sejtfalon keresztülhatolnak és közvetlenül a membrán alatt kicsiny gombszerű képződményben végződnek. Feltételezik, hogy

ez megfelel más GRAM-negatív baktériumok gyűrűket viselő alapi testének. A sejt mindkét poláris helyzetű flagelláris régiójában *(61. ábra)*, a citoplazmamembrán alatt kb. 20 nm mélyen, újabb vékony membrán található, mely rövid, a metszetben korlátnak látszó összeköttetésekkel kapcsolódik az előbbihez. A sorozatos metszetek tanúsága szerint a sejt két végében ez a „poláris membránnak" nevezett struktúra egy félgömbszerű, középpontjában a csillók kilépésére átlyukasztott sapka alakjában van jelen. Ilyen struktúrákat már más helikális (csavart) baktériumoknál is megfigyeltek. A spirillumok e poláris membránjának funkciója ismeretlen. Fennáll a lehetőség, hogy a mozgás kifejtéséhez szükséges energia termelésében van szerepe. Az *A. serpens*ben a citoplazma közvetlenül a poláris membrán alatt, továbbá a csillók alapi testének körzetében viszonylag nagyon kevés riboszómát tartalmaz. Egy másik szokatlan jellemvonás, hogy a sejtfal kültakarója (a lipopoliszacharid-membrán) a poláris régióban nem mutatja azt a sajátos hullámosságot *(61. ábra)*, amely különben az egész testfelületre jellemző. Az *A. serpens* csillói anyagának nyers szuszpenzióit dietil-aminoetil-cellulóz oszlopon, foszfátpuffer jelenlétében végzett adszorpció, majd utólag nátrium-kloriddal történt eluálás révén tisztították. A csillók tisztított anyaga fehérjén kívül 1,5% szénhidrátot is tartalmaz. A szénhidrátot a proteintől nem lehetett elválasztani még akkor sem, ha savval vagy hővel monomerekké disszociáltatták és utólag Sephadex G-50-en kromotografálták. Jóllehet ez arra



61. ábra

Az *Aquaspirillum serpens* poláris régiója vékonymetszetének sematikus ábrázolása. A: Sejtfal (a külső, trilamináris, lipopoliszacharid-falmembrán, továbbá a belső, vékony mukopeptidréteg). B: Citoplazmamembrán. C: Poláris membrán az összekötőkkel a citoplazmamembrán felé. D: A riboszómákat gazdagon tartalmazó citoplazma. E: A riboszómáktól mentes poláris mátrix. F: csillók; az ábrán az alapi test és a kampó nincsenek feltüntetve. G: Citoplazmamembrán-befűződés *(mezoszóma)*. H: Nukleoplazma (HOLT, 1978)

enged következtetni, hogy a flagellin glikoprotein lehet, mégis ennek kifogástalan bizonyítása a szénhidrát és a protein közötti kovalens kötés kimutatásától függ. Az *A. serpens* flagellinmonomerjei akrilamid-gél-elektroforézis alapján igen egyszerűeknek mutatkoztak, melyek molekulasúlya kb. 40 000. Az aminosav-analízisek a cisztein és a triptofán hiányát eredményezték, és csupán kevés hisztidin, prolin és tirozin jelenlétét igazolták. A legnagyobb mennyiségben alanin, aszparagin- és glutaminsav mutatkozott. Az *A. serpens* flagellinje, más bakteriumokéhoz hasonlóan, ugyancsak tartalmaz egy kevés szokatlan aminosavat, az ε-N-metillizint.

Az *A. serpens* csillótlanított egyedeinek csillóregenerációja gyorsan végbemegy. Kimutatták, hogy kb. 10 perc alatt a csilló normális hosszúságának már a fele újra szintetizálódhat, ami megfelel 0,5 μm/perc fonalkiépülési sebességnek. Egyes közlések szerint a csillótlanított *A. serpens* csillóit és mozgásképességét egyetlen osztódási periódus alatt nyeri vissza, ami 30 °C-on 70 percnek felel meg. A regeneráció kloramfenikol jelenlétében, mégpedig ennek olyan koncentrációjában is végbemegy, mely különben már elegendő lehetne ahhoz, hogy megakadályozza a ^{14}C-vel jelzett aminosavak beépülését a regenerálandó csillókba. Ha a sejteket, a csillótlanítás előtt, jelzett aminosavak jelenlétében tenyésztették, úgy később a kloramfenikol jelenlétében regenerálódott csillók erősen jelzettekké váltak. Ez arra enged következtetni, hogy az *A. serpens* sejtjében valahol az előregyártott flagellinépítő-elemeknek működő raktára vagy raktárai létezhetnek. Az ezekben felhalmozódott építőelemeket a csillók összeszereléséhez a proteinszintézis hiányában is fel lehet használni. Ezt a feltételezést támasztják alá azokkal a kondicionált mutánsokkal végzett tanulmányok, melyek 40 °C-nál magasabb hőmérsékleten növekedve már csupaszok maradnak. Amennyiben ezeket ^{14}C-vel jelzett aminosavak jelenlétében 45 °C-on előtenyésztették, majd klóramfenikolt tartalmazó 30 °C-os táplevesbe kerültek, úgy ez utóbbiban jelzett csillókat produkáltak. Ugyanakkor sejtjeikben a specifikus ellenanyagokkal kicsapható rádioaktív intracelluláris flagellin mennyiségének jelentős csökkenését is észlelni lehetett. Ebből az következik, hogy a mutáns 45 °C-on a flagellin intracelluláris felépítésére és raktározására még képes volt, azonban a flagellinépítő-elemeket csillókká már nem tudta összeszerelni.

1.13.52. Csillószerkezet-változatok az *Escherichia coli*nál

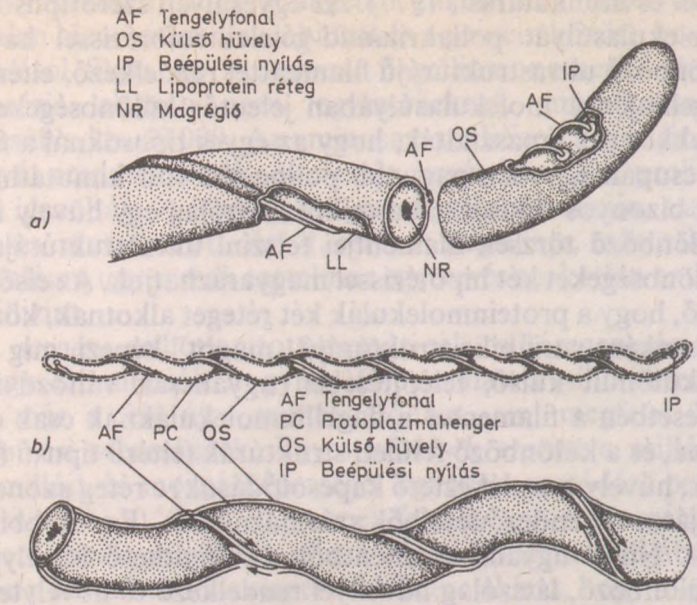
Az *E. coli*nál az eltérő csilló- vagy H-antigének alapján a törzsek közötti szerológiai tipizálásra is lehetőség van. A különböző H-antigénnel rendelkező szerotípusok csillóinak filamentje eltérő felszíni ultrastruktúrát

mutat (LAWN és munkatársai, 1977). Az egyes ilyen szerotípusok flagellinjének molekulasúlyát poliakrilamid-gélelektroforézissel határozták meg. A különböző ultrastruktúrájú filamenttel rendelkező, eltérő szerotípusok flagellinjének molekulasúlyában jelentős különbségeket észleltek. Ugyanakkor azt tapasztalták, hogy az egyes típusoknál a filamentből mindig csupán egyetlen nagyobb polipeptid volt kimutatható még akkor is, ha bizonyos típusoknál a csillót látszólag egy hüvely is körülvette. A különböző törzsek filamentjei felszíni ultrastruktúrájában jelentkező különbségeket két hipotézissel magyarázhatjuk. Az első esetben feltételezhető, hogy a proteinmolekulák két réteget alkotnak, közülük az egyik a törzsenként variábilis struktúrájú „magot" képezi, míg a másik egy ettől elkülönült külső, felépítésében ugyancsak változó hüvelyt. A második esetben a filamentet a flagellinmolekuláknak csak egyetlen rétege alkotná, és a különböző felületi struktúrák (eltérő típusú fonatok, csavarulatok, hüvelyre emlékeztető kapcsolódások) e réteg azonos molekuláinak sajátos elrendeződéseiből származnának. Ez utóbbi látszik valószínűnek. Nincs ugyanis filamentből elkülöníthető hüvelyprotein. Amikor a különböző, látszólag hüvellyel rendelkező és hüvelytelen filamentű szerotípusok tisztított csillóanyagából nyert proteint SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel tanulmányozták, esetenként csupán egyetlen nagyobb polipeptidsávot lehetett észlelni. Igaz, feltételezhető, hogy ugyanaz a protein más-más társulásban mind hüvelyt, mind belső magot is képezhet, de a vizsgálatok ezt sem támasztották alá. Keresztpolimerizációt lehetett (minden kombinációban) kimutatni a látszólag hüvelyes és az enélküli filamentekből nyert flagellinépítő-elemek között.

1.13.53. A *Spirochaeta* baktériumok „tengelyfonala" (belső ostor)

A csillókkal foglalkozva feltétlenül meg kell emlékeznünk a *Spirochaeták* ún. belső ostoráról *(endoflagellum, axiális fibrillum, axial fibril)* is. Általában *Spirochaetáknak* nevezzük azokat a rendkívül hajlékony, GRAM-negatív, kemoheterotróf, helikális alakú baktériumokat, melyek morfológiailag minden más prokariotától abban különböznek, hogy sejtjeikben belső ostor van jelen *(62. ábra)*.

A belső ostor morfológiailag a prokarioták flagellumához hasonló, amennyiben két alapvető komponensre osztható; egy hosszú ostorszerű részre, amit hüvely borít és egy rögzítő szerkezetre *(insertion apparatus)*, mely egy kampóra, körkörös duzzanatokra, ill. gallérképletekre *(annular swellings)* és nyaki részre differenciálódik *(63. ábra)*. Az ostorszerű rész szubstruktúrája a bakteriális csillók ostorának szubmikroszkópos felépítéséhez lehet nagyon hasonló. Az utóbbival ellentétben az axiális fibril-



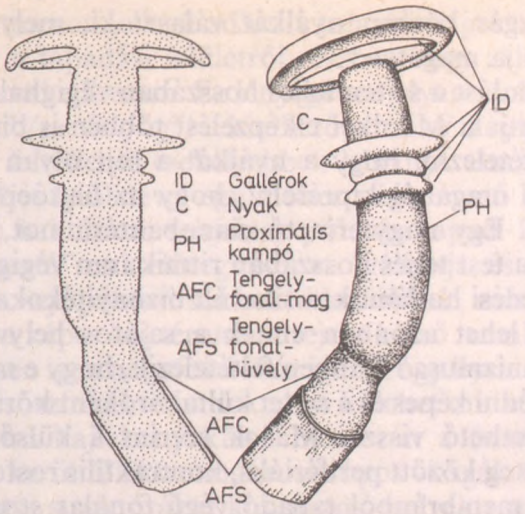
62. ábra

A *Spirochaeták* legfontosabb anatómiai komponenseinek sematikus vázlata elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján. Felszíni nézetben (HOLT, 1978)

lum filamentje teljesen „belső" struktúra, mely az egész baktériumsejtet kívülről körülzáró, ún. külső sejthüvely belső rétege és a protoplazmahenger (= sejtfal + citoplazmamembrán + citoplazma) legkülső rétege között helyezkedik el. Az axiális fibrillum vagy fibrillumok a protoplazmahenger körül tekeredne. Átmérőjük az ostorhüvellyel együtt kb. 18–21 nm. A filament „magjának" átmérője 10–16 nm. Ez a mag globuláris alegységek hosszanti soraiból áll. Az ostor magját körülvevő hüvely anyaga lipidszolvensekkel extrahálható. A kampó 14–17 nm átmérőjű és 40–70 nm hosszú, továbbá a protoplazmahenger felé, ill. abba hajlik, ami a rögzítést segíti elő. A gallérok száma a különböző fajoknál változó. 20–40 nm átmérőjűek. A sejt vége felé a protoplazmahenger szubterminális mélyedésébe illeszkednek.

Az axiális fibrillumok aminosav-analízise arra utal, hogy kémiailag hasonlóak a baktériumcsillók flagellumához. Gazdagok aszparagin- és glutaminsavban, alaninban, leucinban és glicinben. A tirozin, a triptofán és a cisztein hiányzik. A fibrillumok nagyfokú érzékenységet mutatnak hidrogénkötést megszakító vegyületekkel és fehérjedenaturánsokkal szemben, míg nukleázokkal és proteázokkal szemben alig szenzibilisek.

Bár minden jel arra utal, hogy az axiális fibrillumok a sejt helyváltoztatásban alapvető szerepet játszanak, működésüket egyelőre mégis az ismeretlenség homálya fedi. Minthogy a gallérok a citoplazmamembrán-



63. ábra

A *Spirochaeták* belső ostorát a *Leptospirá*nál ostorhüvely burkolja. Maga az axiális fibrillum ott, ahol a kampó régiójába megy át, összeszűkül. A kampót az ún. „protoplazmahenger" külső rétegében elliptikus, gallérszerű duzzanatok horgonyozzák le. A „nyak" a proximális és a disztális gallérok között helyezkedik el (HOLT, 1978)

nal tartanak összeköttetést, ez arra utal, hogy az axiális fibrillum a maga teljes egészében ugyanolyan szerepet tölthet be, mint a prokariota csilló (*lásd* 206. old.) A körkörös gallérok úgy illenek a membrán egy-egy mélyedésébe, mint valami gömbcsuklós foglalatba, aminek folytán szabadon foroghatnak, lehetővé téve, hogy maga a kampó és a hozzá csatlakozó ostor is foroghasson és a sejt mozgatásának funkcióját töltse be. E mozgatáshoz szükséges energia a protoplazmahenger citoplazmamembránjában termelődhet. Feltehetően itt is valamiféle flagelláris motor (*lásd* 207. old.) dolgozik. A gallérképletek a forgáson kívül vibrálhatnak is, ami természetesen áttevődhet az axiális fibrillum filamentjének teljes hosszára. BERG (1976) modellje szerint az axiális fibrillumok rotációja a szemirigid protoplazmahenger és ennek külső flexibilis hüvelyének rotációját váltja ki.

1.13.54. A csúszómozgás mechanizmusa

Ún. „csúszómozgást" a baktériumok nagyon különböző genuszaihoz tartozó szervezeteknél figyelhetünk meg. Ezt a mozgásmechanizmust szilárd–folyadék és feltehetően levegő–folyadék érintkezési felületeken juttatják érvényre. Az irodalomban a csúszómozgásra kétféle magyarázatot is találunk:

1. A sejt mozgás közben nyálkát választ ki, melynek segítségével mintegy előre tolja magát.

2. Az előrehaladást a sejten teljes hosszában végighaladó kontrakciós hullámok biztosítják. Mindkét elképzelést többen is bírálták.

Nehéz pl. feltételezni, hogy a nyálkát a sejt olyan erővel és olyan tömegben tudná magából kipréselni, hogy az hajtóerőül szolgálhatna (WALSBY, 1968). Egy nagytermetű cianobaktériumot, az *Oscillatoriát* tanulmányozva a test teljes hosszában ritmikusan végighaladó összehúzódási és elernyedési hullámokra sikerült bizonyítékokat szerezni (HALFEN, 1973). Mi lehet azonban ennek a sajátos helyváltoztatásnak a finomabb mechanizmusa? Többen feltételezik, hogy e mozgás egy nagymértékben gyűrődni képes és a sejtet kültakaróként körülvevő membrán működésére vezethető vissza. Mások szerint a külső membrán és a peptidoglikán-réteg között perifériális, kontraktilis rostok helyezkedhetnek el, avagy a membránból tapadó végű fonalas struktúrák, pilusok nyúlnak ki és a sejt előrehaladása ezek segítségével történik (*lásd* MACRAE és MCCURDY, 1975, 1976). Kétségtelen tény az is, hogy a csúszó baktériumok képesek mozgásmódot is változtatni, és elszakadhatnak attól a felülettől, amelyre tapadnak, vagyis náluk a tapadással egybekötött helyváltoztatás csak átmeneti megoldás. Vitathatatlanul kimutatott nyálkatermelésük legvalószínűbb szerepe az lehet, hogy vízi miliőkben ez megkönnyíti tartós összeköttetésüket különböző felületekkel.

HUMPHREY és munkatársainak (1979) kutatásai már mélyebb bepillantást nyújtottak a flexibakterek *(Flexibacter sp.)* csúszási folyamataiba. Ezeknél a csúszómozgáshoz a sejtnek magának különösebb flexibilitása nem látszik lényeges követelménynek. A mozgó sejt elé, a haladás irányába kiválasztott nyálka jelenléte pedig arra utal, hogy ez esetben valamiféle energikus nyálkakilövellés, mely a baktériumsejt előrelendítésében játszana szerepet, ugyancsak valószínűtlen. Ehelyett a nyálka, mely a csúszómozgás során a sejt alá kerül, megfelelő körülményeket teremthet a szükséges átmeneti (ún. STEFAN-) adhézió megvalósulásához, továbbá a horizontális ellenállást csökkenti (megjegyzés: A STEFAN-adhézió azt az állapotot írja le, amikor két felület csúsztatás nélküli, hirtelen, egymásra merőleges irányú szétválasztásához sokkal nagyobb erő szükséges, mint e két felület egymáson végbemenő horizontális elmozdításhoz). Valamely bakteriális STEFAN-kötőanyag *(Stefan adhesive)* legfontosabb követelménye, hogy vizes környezetben is elegendően nagy viszkozitású legyen ahhoz, hogy a sejtnek a tapadási felülethez megfelelő adhéziót biztosítson. Ezt a követelményt a tanulmányozott *Flexibacter* törzseknél olyan extracelluláris nyálkás váladék tölti be, mely anyagi természetét tekintve glikoproteinnek bizonyul, és lineáris kolloidokra jellemző viszkózus tulajdonságokat árul el. E nyálkának

egyébként csak átmeneti jellegű adhezív tulajdonságai teszik azt is lehetővé, hogy a sejt a tapadási felületről részben vagy akár a maga teljes egészében fel is emelkedhessen. Ez lényegében olyan „fokozatos leszakadási folyamatnak" *(peeling-off)* tekinthető, amikor a szeparálódást megakadályozó erők feltétlenül csekélyebbek lehetnek annál, amit az egész test hirtelen és teljes felületével egy időben végbemenő leválása igényel. A legtöbb csúszó baktérium sejtjeinek pólusán tapad. Ez a „fokozatos leszakadás folyamatá"-nak elősegítését szolgálhatja, és azzal lehet kapcsolatban, hogy a sejt pólusai sokkal hidrofóbbak, mint többi felszíne. A csúszómozgásra képes baktériumok sejtjei külső membránjának redőzöttsége ténylegesen igen nagyfokú (bár igaz, hogy ilyen mérvű redőzöttségét egyes nem csúszó baktériumoknál is ki lehet mutatni). A *Flexibacter*nél ez a nagyon hajlékony külső membrán a felszínnel közvetlen érintkezésbe nem kerül. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal nem sikerült olyan fibrilláris struktúrákat kimutatni, melyek szabályos összehúzódási és elernyedési hullámokat idézhetnének elő. A *Flexibacter*ekben a rugalmas külső membrán és az alatta fekvő sokkal merevebb peptidoglikán-réteg közötti meg-megszűnő és újra meg újra létrejövő összeköttetések szabályozott váltakozása révén egyfajta ritmikus kontrakció képzelhető el. Ennek igazolására kiterjedt kutatásokra van még szükség.

1.13.55. A fimbriák

A fimbriák (vagy *pili* = *fimbriae*, egyes számban *pilus*) a csillóknál rövidebb és finomabb, megközelítően egyenes lefutású, fonalas, üreges, fehérjékből felépített, a mozgásban szerepet nem játszó, pálcikáknak látszó, a sejt felületén akár 200–300 példányban is előforduló képletek, melyek a GRAM-negatív baktérium sejtjein elektronmikroszkóppal figyelhetők meg. Rendeltetésük nagyrészt ismeretlen. Tapadóképességük révén a sejtet külső objektumokhoz rögzíthetik. Elképzelhető, hogy üreges szerkezetük a citoplazmamembrán és a külső környezet között összeköttetést teremthet (a GRAM-negatívak extracelluláris enzimeket a falon át nem adnak le). A fimbriák sem valamennyien azonos típusúak. A rövid, egyenes, átlagos fimbriáktól különbözik az *E. coli* „szexpilus"-a. Ez a „hím" és a „női" jellegű sejtek közötti kontaktust hozza létre. Helikális, csöves szerkezete biztosítja, hogy a konjugáció alkalmával a hím jellegű donor (F^+) teljes kromoszómája, ill. ennek egy részlete vagy csak maga a kromoszómát vontatni képes, DNS-ből álló, önálló genetikai elem, az episzóma (mely különben a pilus képződését is genetikai ellenőrzés alatt tartja) a női jellegű, recipiens (F^--) sejtbe jusson. E szexpilus gyakran fágrészecskékkel borított, minthogy ezek számára specifi-

kus receptorokat tartalmaz. A fág a pilushoz tapad, DNS-ét annak belsejébe bocsátja, ahonnan az a pilus csatornáján át a recipiens-sejtbe jut.

Az *E. coli* sejtjeit tehát elektronmikroszkóppal tanulmányozva, felületükön háromféle fonalas képletet figyelhetünk meg:

1. Közönséges fimbriák (rövid, egyenes sörték). Átmérőjük: 7 nm.
2. Szexpilus (hosszabb, némileg flexibilis). Átmérője: 8,5 nm. Szexpilus rendszerint csak egy vagy kettő van.
3. Csillók (leghosszabbak és erőteljesek; nagyon hajlékonyak). Átmérőjük: 25 nm.

Erős rázatással a sejtek elvesztik szexpilusukat és utólag már konjugációra képtelenné válnak. WEIDE és AURICH (1979) az *E. coli*nál kétféle szexpilust különböztetnek meg: az F-pilust, mely maximum 20 μm hosszú és 7,5–13,5 nm átmérőjű, továbbá az I-pilust, mely 2 μm hosszú és 6–12 nm átmérőjű. Az F-pilus nemcsak az F-faktor, hanem az R-faktorok (*lásd* 617. old.) átvitelében is részt vesz. Az I-pilus pl. a colicinplazmidok átviteléért felelős. Az I-pilusok létrejöttét kódoló gének az R-faktorok DNS-ében lokalizáltak. F- és I-pilusok egyidejűleg ugyanazon a sejten is jelen lehetnek. Mindkettő lehet fágreceptor is. Az F-pilusok a fonalas DNS-fág f1-et és az RNS-fág f2-t egyaránt felfogják. Az elsőt csakis a pilus csúcsán, a másodikat már nem a csúcson. Az I-pilusok viszont a fonalas DNS If1- és DNS If2-fágokra specifikusak.

1.14. Az anaerob anyagcsere

Az ősi primitív, reduktív atmoszférában megjelent legelső mikroorganizmusok anaerobok voltak. Az ilyen ősi típusú sejtek legjellemzőbb tulajdonságai feltehetően a következők lehettek:

1. Anaerob fermentációra képes.
2. GRAM-pozitív, vagyis egyszerű felépítésű sejtfal, esetleg még ez is hiányzik.
3. Gömb alak, ami a kiszáradással szemben bizonyos fokú rezisztenciát biztosít.
4. Aktív mozgásra nem képes.
5. Spórát nem képez.
6. Növekedéséhez (a minimális enzimkészlet következtében) aminosavakat, vitaminokat, purinokat és pirimidineket feltétlenül igényel. Az ilyen ősmikrobák anyagcseréjére a ma élő anaerob mikrobák tanulmányozása alapján következtethetünk.

1.14.1. A prokariota anyagcsere leegyszerűsített sablonja

A mai anaerob vagy aerob baktériumsejt sokirányú működést fejt ki. Ezek közül egyesek, mint pl. a mozgás, a lumineszcencia vagy a tokanyagok szintézise többnyire nélkülözhetőek. A növekedést viszont valamennyi működés közül a legfontosabbnak kell tekintenünk. A növekedés fogalmát általában úgy definináljuk, mint a sejttömeg gyarapodását, vagy a sejt valamennyi komponensének számbeli növekedését. A sejtszaporodás a növekedés közönségesen fellépő, de nem esszenciális következménye.

Minthogy a legfontosabb sejtalkotóelemek (kromoszómák, fehérjeszintetizáló enzimek, enzimek, membránok, falak, flagellumok) makromolekulákból épülnek fel, a mikrobiális sejt anyagcseréje legfontosabb funkciójának is a makromolekulák szintézisét tekinthetjük. Ezek megfelelő alegységeikből, így a proteinek aminosavakból, a nukleinsavak nukleotidokból, a poliszacharidok egyszerű cukrokból, a lipidek glicerinből, ill. más alkoholokból, zsírsavakból, továbbá (foszfolipidekben) speciális alegységekből, mint például a kolinból stb. épülnek fel.

Az alegységek kondenzációját (két szerves molekula kapcsolódása víz kilépése közben; e folyamat fokozatosan előrehaladva polikondenzációt eredményez) minden esetben azok aktiválása kell, hogy megelőzze. Így megfelelő energiagazdag kötéssel olyan szubsztituens csoporttal kapcsolódnak, mint amilyen a foszfát (P), pirofoszfát (PP), adenozin-monofoszfát (AMP) vagy a koenzim-A (CoA). Az aktiváló csoport kötésenergiája ezután a kondenzációhoz szükséges energiát fedezi, miközben maga az aktiváló csoport lehasad. Az ilyen aktiváló csoportok végső forrása általában az adenozin-trifoszfát (ATP).

A makromolekulán belül az alegységek végső elrendeződésének determinációja két lehetséges mód valamelyike szerint történik. A nukleinsavak és a proteinek esetében templát (minta) szerint irányítottan: a DNS a saját és a különböző típusú RNS-ek, a mRNS viszont a proteinek szintéziséhez szolgál templátként. (Egyes oligo-, ill. polipeptid típusú antibiotikumok kivételesen nem templáton szintetizálódnak.) Másrészt viszont, a szénhidrátokban és a lipidekben az alegységek elrendeződését teljesen az enzimspecificitások határozzák meg.

A makromolekulák szintézisének folyamataiból kiindulva, az anyagcsere legalapvetőbb funkcióit három pontban foglalhatjuk össze:

1. Az alegységek előállítása az anyagcsere intermedierjeiből.
2. ATP előállítása ADP-ből és anorganikus foszfátból.
3. A redukálóképesség (mint $NADPH_2$) biztosítása, minthogy bizonyos esetekben a közegből felvett szubsztrát oxidáltabb állapotú, mint a bioszintézis produktumai.

A makromolekulák alegységeihez zsírsavak, monoszacharidok, aminosavak, purinok és pirimidinek tartoznak. Mindezek a környező közegből közvetlenül is felvételt nyerhetnek, azonban számos mikroorganizmus glükózból mint szénforrásból, ammóniából mint nitrogénforrásból és pl. szulfátból mint kénforrásból egyeseknek vagy valamennyinek a szintézisére is képes lehet. A bioszintetikus utak negatív végtermékszabályozás alatt állnak, beleértve mind az enzimszintézis represszióját, mind az enzimműködés gátlását. Következésképpen az alegységek szintézisére mindaddig nem kerül sor, amíg azok a közegben felvehető állapotban jelen vannak. Utóbbiak hozzáférhetőségét a baktériumok membránjában található specifikus transzportrendszerek működése segíti elő. Így ezek révén az alegységek külső koncentrációjával szemben 100–1000-szeres belső koncentrációk alakulhatnak ki.

Amennyiben valamelyik építőelem (alegység) nem áll rendelkezésre, úgy a sejt bioszintetikus úton maga állítja elő. A bioszintetikus utak viszonylag kevés számú anyagcsere-intermedierből indulnak ki. Így például valamennyi alifás aminosav négy intermedierből származik: piruvát, 3-foszfoglicerát, oxálacetát és α-ketoglutarát. A fenil-alanin, tirozin és triptofán aromás gyűrűje a D-eritróz-4-foszfát és a P-enolpiruvát kondenzációjával jön létre. A hisztidin szénvázának legnagyobb része pentóz-foszfát eredetű. A pirimidingyűrűt az aszparaginsav és egy karbamilcsoport kapcsolódását követő gyűrűvé záródás alakítja ki. A puringyűrű glicin, formiát, szén-dioxid, továbbá a glutamin és aszparaginsav amido- vagy aminocsoportjai részvételével végbemenő kondenzációk során jön létre. A zsírsavak szintézise elsődlegesen acetátból mint építőelemből történik. Az egyszerű cukrok viszont a hexóz-foszfátból kiinduló átalakulások termékei.

A bioszintetikus utak lényegében valamennyi élő szervezetben azonosak. Igaz, a különböző organizmusokból a bioszintetikus enzimrendszerek egyike vagy másika hiányozhat. Ez esetben a megfelelő makromolekuláris alegységeket a környezetből kell beszerezniök. Az ember például nyolc aminosav felvételére szorul rá.

Az építőalegységek, amennyiben nem külső forrásból származnak, a bioszintetikus utakon az anyagcsere ún. „kulcsintermedier"-jeiből épülnek fel. Utóbbiak a legtöbb szervezetben közös, viszonylag kevés anyagcsereút termékei. A bioszintézis e „kulcsintermedier"-jei: az Embden–Meyerhof-úton létrejövő glükóz-1-foszfát (glükóz-1-P), 3-foszfoglicerinaldehid, P-enolpiruvát, piruvát; a direkt oxidáció révén előállított pentóz-foszfátok és a D-eritróz-4-foszfát (D-eritróz-4-P); a TCA-ciklusból az acetil-CoA, oxálacetát, α-ketoglutarát és a szén-dioxid.

Ami az ATP előállítását illeti, a nem fotoszintetizáló szervezeteknél két általános mechanizmus szerint történik:

1. Szubsztrát szintű foszforiláció és
2. Elektrontranszport-foszforiláció.

Mindkét esetben ADP-ből és anorganikus foszfátból (Pi) valamely anyagcsere-köztitermék kémiailag kötött energiájának hasznosításával ATP-t állítanak elő. A szubsztrát szintű foszforiláció megjelölést leggyakrabban az EMBDEN–MEYERHOF-út két lépésére alkalmazzuk, melyeknél energiagazdag foszfátkötések keletkeznek. Az első a glicerinaldehid-3-foszfát (glicerinaldehid-3-P) oxidációja NAD segítségével, Pi jelenlétében. Ekkor 1,3-difoszfoglicerinsav jön létre és az új foszfátcsoport ADP-re transzlokálódik. A második esetben, midőn a glicerinsav-2-foszfát vizet veszít és foszfoenol-piroszőlősavvá alakul, a foszforcsoport kis energiájú kötésből nagy energiatartalmú kötésbe terelődik és ADP-re transzlokálhatóvá válik. A szubsztrát szintű foszforilációnak megfelelő analóg folyamattal állunk szemben akkor is, midőn az α-ketoglutarát a citrátciklus keretében borostyánkősavvá oxidálódik. E folyamat egyik intermedierje a szukcinil-CoA. A CoA kötésenergiája azután ADP + Piből ATP előállítására használható fel.

Az ATP-előállítás másik útja az elektrontranszport-foszforiláció. Az aerobok respirációja során egy elektronpár a redukált NAD-ról az oxigénre kerül. Az elektronok útja eközben a citoplazmamembránba épült flavoproteineken és citokrómokon át vezet. E folyamat a membránon át protonkoncentráció-gradienst épít ki, mely membránkötődésű ATP-szintetázon át egyenlítődik ki, miközben nagy energiájú foszfátkötések szintetizálódnak.

A katabolizmus számos oxidatív lépése, melynek során ATP jön létre, a NAD vagy a NADP redukciójával kapcsolatos. Amennyiben a szénforrásként felhasználásra kerülő vegyület olyan redukált vagy még redukáltabb, mint a bioszintézis átlagos termékei, úgy oxidációja hozzájárul a „redukálóképesség" *(reducing power)* növeléséhez. Ha viszont a kérdéses szénforrás oxidáltabb, mint a bioszintézis átlagos termékei, úgy a sejt nettó redukálóképességéhez egy másik kiegészítő szénforrás molekuláinak szén-dioxidig történő oxidációjával juthat. A baktériumsejt a közegből, minimális igényeinek kielégítésére, szén-, energia- és különböző elem-(nitrogén, kén, foszfor)-forrásokat kénytelen igénybe venni. A szénforrás anyagcseréje a „kulcsintermedier"-eket szolgáltatja, melyekből a sejt a makromolekulák alegységeit szintetizálja. Az energiaforrások oxidálása, mind az ATP-szintézis, mind a redukálóképesség biztosítása útján a bioszintézis folyamatainak „meghajtását", valamint az alegységek ATP révén történő aktiválását szolgálja. Az aktivált alegységek makromolekulákká polimerizálódnak, melyek önelrendeződése a sejt struktúráját alakítja ki. A nettó eredmény a sejt növekedése, mely általában, de nem mindig, sejtosztódással kapcsolatos.

A szén- és energiaforrás ugyanazon molekula is lehet (pl. glükóz), de különböző molekulák is (pl. szén-dioxid mint szénforrás, ammónia mint energiaforrás). Ha a sejt valamelyik bioszintetikus útja hiányzik, úgy az út végtermékét a közegből „növekedési faktorként" kell felvennie. Ha bioszintetikusan kompetens sejteket végtermékekkel látunk el, úgy ezek felhasználására állítódnak be, és endogén szintézisüket felfüggesztik.

A sejtnek környezetéből az oxidációs folyamatok céljaira terminális hidrogénakceptorra is szüksége van. Az aerobok esetében ez az oxigén; az anaeroboknál lehet valamely szerves vegyület vagy a szénforrás katabolizmusának valamely szerves melléktermék, de lehet szervetlen vegyület is (pl. nitrát). Így számos baktérium fermentációs aktivitást fejt ki és növekedik glükóz jelenlétében, melyet szén- és energiaforrásként, továbbá (katabolizálva) hidrogénakceptorként egyaránt felhasznál.

A mikroorganizmusokban számos, csak rájuk jellemző, sajátos anyagcsereutat találunk, mind a katabolizmus (pl. ENTNER–DOUDOROFF-út; a β-ketoadipat-út stb.), mind a bioszintézisek (glioxalátciklus, nitrogénkötés, mureinszintézis, sejtfal-lipopoliszacharidok szintézise, tokanyagszintézis, tartalékanyagok szintézise stb.) területén (JAWETZ és munkatársai, 1976).

1.14.2. Az energiaszerzés és -konzerválás legfontosabb általános típusai az élők világában

E rövid áttekintés után térjünk vissza az energianyerő és -konzerváló folyamatokra. Az ATP szintézise a nem fotoszintetizáló baktériumokban, oxidációs–redukciós reakciók során történik. Utóbbiakat az alábbi, általánosított, egymáshoz kapcsolt „fél"-reakcióknak foghatjuk fel:

$$\text{Oxidációs „fél"-reakció: H-donor} \xrightarrow{-2H} \text{oxidált termék}$$

$$\text{Redukciós „fél"-reakció: H-akceptor} \xrightarrow{+2H} \text{redukált termék}$$

(a H egy elektront és egy protont jelent)

Amennyiben e két „fél"-reakció redoxipotenciálja elegendően különböző, úgy egyidejűleg ADP-ből és anorganikus foszfátból végbemenő ATP szintézissel kapcsolódhat össze. Az energiaszolgáltató oxidációs–redukciós folyamatok során a mikroorganizmusok különböző típusai eltérő típusú hidrogéndonorokat és -akceptorokat használnak. A hidrogéndonorok szerves vagy szervetlen vegyületek egyaránt lehetnek. A hidrogénakceptor lehet molekuláris oxigén, de nagyon gyakran más anorganikus

14. táblázat

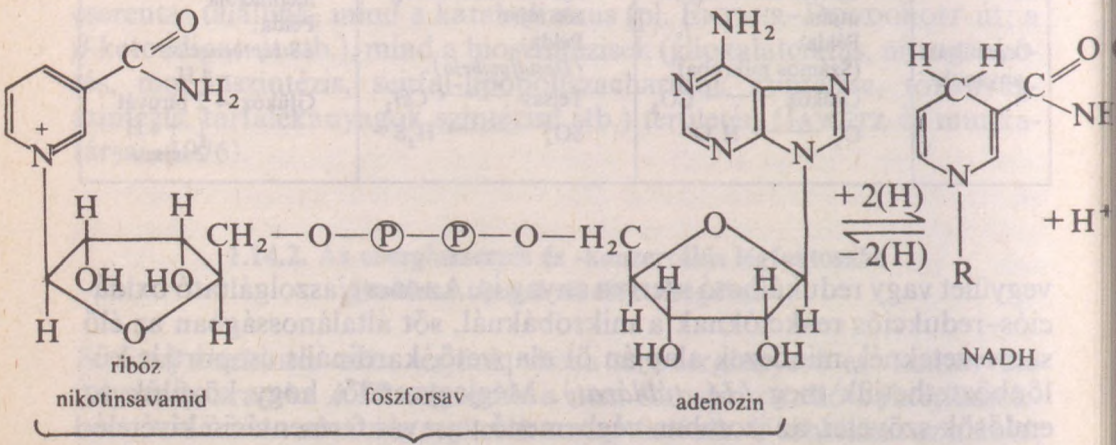
A mikroorganizmusok energiaszolgáltató oxidációs–redukciós reakcióinak fő típusai

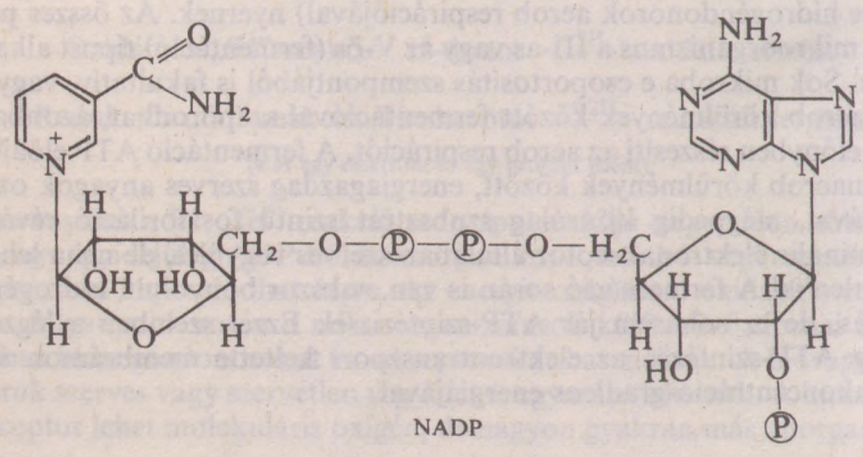
Hidrogén-donor	Hidrogénakceptor		
	O_2 (aerob légzés)	NO_3^-, SO_4^{2-}, CO_2 (anaerob légzés)	Szerves vegyületek (fermentáció)
Anorganikus anyagok	I. Aerob légzés szervetlen anyagokkal mint elektrondonorral Példa: *(Nitrosomonas)* $NH_3 \longrightarrow NO_2^-$ $O_2 \longrightarrow H_2O$	II. Anaerob légzés szervetlen anyagokkal mint elektrondonorral Példa: *(Thiobacillus denitrificans)* $S \longrightarrow SO_4^{2-}$ $NO_3^- \longrightarrow N_2$	Nincs
Organikus anyagok	III. Szerves anyagok elégetése aerob légzés útján Példa: (Számos mikroba) Glükóz $\longrightarrow CO_2$ $O_2 \longrightarrow H_2O$	IV. Szerves anyagok elégetése anaerob légzés útján Példa: *(Desulfovibrio)* Tejsav $\longrightarrow CO_2$ $SO_4^{2-} \longrightarrow H_2S$	V. Szerves anyagok fermentációja Példa: *(Streptococcus)* $-4\,H$ Glükóz → 2 piruvát ↓ $+4\,H$ 2 tejsav

vegyület vagy redukálható szerves anyag is. Az energiaszolgáltató oxidációs–redukciós reakcióknak a mikrobáknál, sőt általánosságban az élő szervezeteknél, mindezek alapján öt alapvető, kardinális csoportját különböztethetjük meg *(14. táblázat)*. Megjegyzendő, hogy közülük az emlősök szövetei, az izomban végbemenő tejsavas fermentáció kivételével, energiát kizárólag a táblázat III-as kategóriája szerint (vagyis a szerves hidrogéndonorok aerob respirációjával) nyernek. Az összes parazita mikroorganizmus a III-as vagy az V-ös (fermentáció) típust alkalmazza. Sok mikroba e csoportosítás szempontjából is fakultatív, vagyis pl. anaerob körülmények között fermentációval szaporodhat, azonban mégis előnyben részesíti az aerob respirációt. A fermentáció ATP előállítása anaerob körülmények között, energiagazdag szerves anyagok oxidációjával, mégpedig kizárólag szubsztrát szintű foszforiláció révén. A terminális elektronakceptor általában szerves vegyület, de néha lehet szervetlen is! A fermentáció során is van, sokszor bonyolult, hidrogénszállítás, de ez sohasem jár ATP-szintézissel. Ezzel szemben a légzés mindig ATP-szintézis, az elektrontranszport keltette membrámon áti protonkoncentráció-gradiens energiájával.

1.14.3. A piridinnukleotidok szerepe az anaerobok anyagcseréjében

Anaerob körülmények között a hidrogénszállításban részt vevő koenzimek a NAD^+- és a $NADP^+$-piridinnukleotidok. Ezek a koenzimek a hidrogénnek a szubsztrátról történő elvonása alkalmával a dehidrogenázhoz kötődnek, redukálódnak, majd midőn a hidrogént egy másik szubsztrátnak továbbadják, visszaoxidálódnak. A NAD^+ és a $NADP^+$ oxidációja és redukciója azonos módon történik, a különbség csupán az, hogy bizonyos dehidrogenázok specifikusan vagy csak az egyikkel, vagy csak a másikkal kapcsolódnak. Az anaerob baktériumok koenzimként mint hidrogénátvivőt általában csak a NAD^+-ot használják, míg az aerob baktériumokban többféle $NADP^+$-dependens dehidrogenáz is működik.





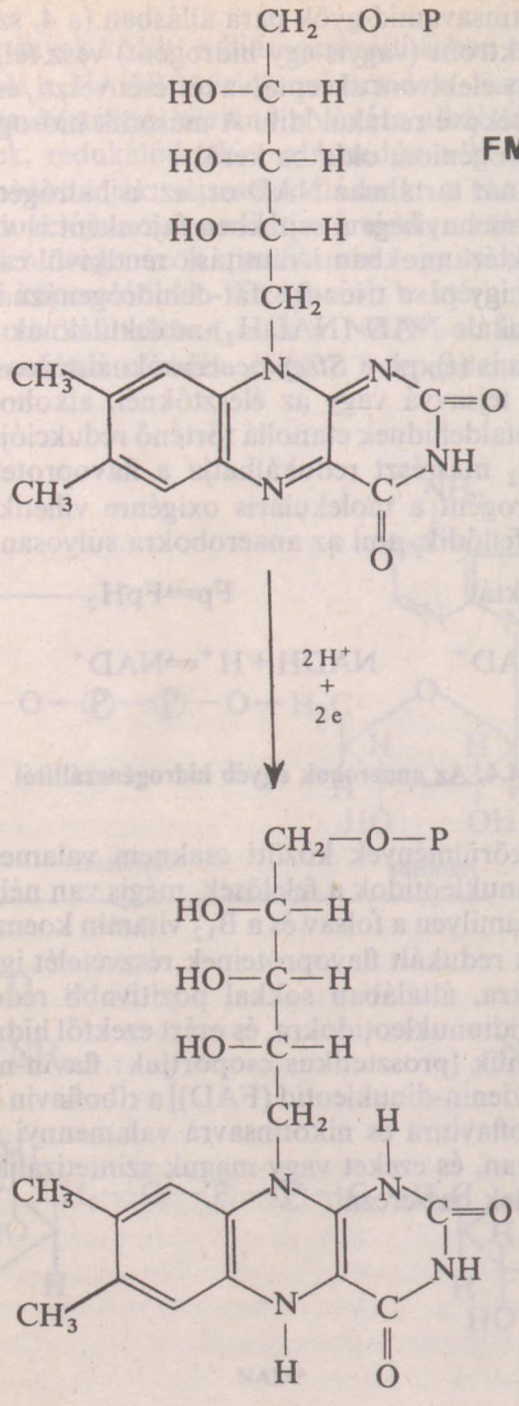
A nikotinsav a piridinnukleotidok vitamin alakja. A piridinnukleotidokban levő nikotinsavamid-gyök para állásban (a 4. szénatomon) egy protont és egy elektront (vagyis egy hidrogént) vesz fel, míg kvaterner nitrogénatomja egy elektront akceptálva töltését veszti, és öt vegyértékűből három vegyértékűvé redukálódik. A második hidrogén megmaradó protonja mint hidrogénion, oldatba kerül.

Minden baktérium tartalmaz NAD-ot, ezt a hidrogénátvivő koenzimet, mégis ennek mennyisége a sejtekben fajonként is változó lehet, és egyes anaerob baktériumokban kvantitása rendkívül csekély. A NAD számos enzimnek, így pl. a trióz-foszfát-dehidrogenáznak is, hidrogénakceptora. A redukált NAD ($NADH_2$)-molekuláknak egy része még oxigén jelenlétében is (!), pl. a *Streptococcus*oknál tejsav-dehidrogenázzal, a piruvátnak tejsavvá vagy az élesztőknél, alkohol-dehidrogenáz segítségével, az acetaldehidnek etanollá történő redukciójához használódik el. A $NADH_2$ másrészt redukálhatja a flavoproteineket, melyek viszont a két hidrogént a molekuláris oxigénre vihetik át, miközben hidrogén-peroxid fejlődik, ami az anaerobokra súlyosan mérgező:

$$\begin{array}{lll} \text{piruvát} \rightleftharpoons \text{laktát} & Fp \rightleftharpoons FpH_2 \longrightarrow & O_2 \\ & & \downarrow \\ NADH + H^+ \rightleftharpoons NAD^+ & NADH + H^+ \rightleftharpoons NAD^+ & H_2O_2 \end{array}$$

1.14.4. Az anaerobok egyéb hidrogénszállítói

Jóllehet anaerob körülmények között csaknem valamennyi hidrogén átviteléért a piridinnukleotidok a felelősek, mégis van néhány létfontosságú reakció, mint amilyen a folsav és a B_{12} vitamin koenzim-alakjainak kialakítása, melyek redukált flavoproteinek részvételét igénylik. Ezekre a hidrogénszállítókra, általában sokkal pozitívabb redoxipotenciál a jellemző, mint a piridinnukleotidokra, és ezért ezektől hidrogént vesznek át. Kötött koenzimük [prosztetikus csoportjuk: flavin-mononukleotid (FMN), ill. flavin-adenin-dinukleotid (FAD)] a riboflavin koenzim-alakja. Ennélfogva riboflavinra és nikotinsavra valamennyi mikroorganizmusnak szüksége van, és ezeket vagy maguk szintetizálják, vagy külső forrásból kénytelenek beszerezni.


FMN
2 H+
+
2 e

A szigorúan anaeroboknál is előforduló ferredoxin oxidoredukcióra képes, vastartalmú (a baktériumoknál hét vasatommal), alacsony molekulasúlyú, hisztidint, metionint vagy triptofánt nem tartalmazó fehérje (elektrontranszporter), melyre az erősen negatív redoxipotenciál jellemző. Potenciálja megközelítően a standard hidrogénelektródáéval azonos, és az anaerob anyagcserében a molekuláris hidrogénnek mint redukáló ágensnek a felhasználását teszi lehetővé.

Jóllehet, általában az anaerob mikroorganizmusok citokrómokat nem tartalmaznak, mégis azok, amelyek nitrátokat vagy szulfátokat terminális elektronakceptorként használnak, ilyen *„carrier"*-ekkel is rendelkeznek.

1.14.5. Az erjesztési folyamatok általános felosztása

A fermentációk típusait három csoportba sorolhatjuk:

A) Az EMBDEN–MEYERHOF-féle glikolitikus lebontási úthoz csatlakozó fermentációk.

B) A hexóz-monofoszfát-söntre (pentóz-foszfát-sönt, ill. a glükóz direkt oxidációja) alapuló fermentációk.

C) Különböző speciális utakon végbemenő fermentációk.

1.14.6. Az EMBDEN–MEYERHOF-út

Minthogy az EMBDEN–MEYERHOF-út számos erjedési folyamat alapját képezi *(15. táblázat)*, először röviden ezzel foglalkozunk.

A felfedezőinek tiszteletére EMBDEN–MEYERHOF-útnak nevezett glikolízis lényegében minden cukorfermentációra képes szervezetben azonos. Ennek az anyagcsereútnak *(64. ábra)* néhány olyan jellemvonása van, melyek alapján feltételezhető, hogy bolygónkon az első nagyon hatékony és ezért fennmaradt szénhidrát-anyagcsereút lehetett. Feltételezések szerint az első primitív anaerob baktériumok igen kevés enzimmel rendelkezhettek, és ezért aminosavakat, vitaminokat és nitrogénbázisokat az őket körülvevő „táplevesből" szereztek be. Az EMBDEN–MEYERHOF-út, mely nem állít elő a test felépítéséhez közvetlenül felhasználható vegyületeket, e primitív baktériumok energiaszükségletét fedezte. A ma élő szervezetek közös eredetére utal, hogy a glikolízis növényekben, állatokban és baktériumokban egyaránt felismerhető. Evolúciós szempontból ugyancsak fontos tény, hogy ennek az útnak az enzimei oldékonyak és nem igényelnek különleges organizációt, koenzimigényük is minimális és működésükhöz bizonyos ionokon kívül az egyébként nagyon hasonló struktúrájú ADP (adenin-ribóz-P~P) és NAD^+ (adenin-

15. táblázat

AZ EMBDEN–MEYERHOF-úthoz kapcsolódó mikrobiális fermentációk

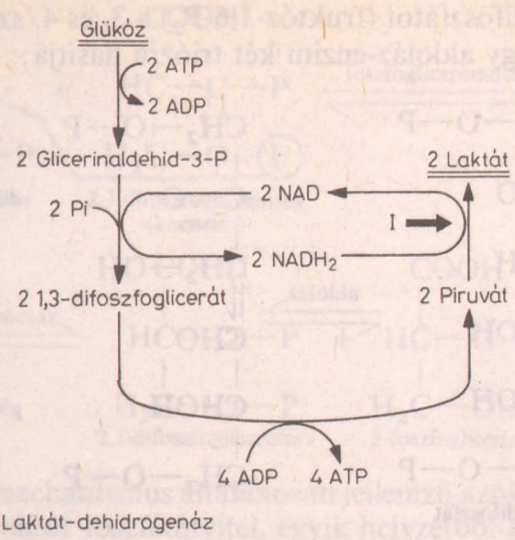
Fermentáció	Mikroorganizmusok	Termékek
Etilalkohol	Élesztők	Etilalkohol, szén-dioxid
Tejsav (homofermentatív)	*Streptococcus* Egyes *Lactobacillus* fajok	Tejsav (az energianyújtó szénforrásnak legalább 90%-át teszi ki)
Butilén-glikol	*Enterobacter* *Aeromonas* *Bacillus polymyxa*	Etilalkohol, acetoin, 2,3-butilénglikol, szén-dioxid, tejsav, ecetsav, hangyasav (összesen 21 mol sav/100 mol fermentált glükóz)
Propionsav	*Clostridium propionicum* *Propionibacterium* *Corynebacterium diphtheriae* *Neisseria* spp. *Veillonella* spp. *Micromonospora*	Propionsav, ecetsav, borostyánkősav, szén-dioxid
Vegyes sav	*Escherichia* *Salmonella* *Shigella* *Proteus*	Tejsav, ecetsav, hangyasav, borostyánkősav, hidrogén, szén-dioxid, etilalkohol (az összes sav: 159 mol/100 mol fermentált glükóz)
Butilalkohol–vajsav	*Butyribacterium* *Zymosarcina maxima* *Clostridium* spp. *Neisseria* spp.	Butilalkohol, vajsav, aceton, izopropil-alkohol, ecetsav, etilalkohol, hidrogén, szén-dioxid

ribóz-P ~ P-ribóz-nikotinamid) jelenléte feltétlenül szükséges. A hexózok degradációjának más útjai, úgy tűnik, az EMBDEN–MEYERHOF-út különböző változatai.

A glikolízis anyagcsereútját a glükóz foszforilációja kezdeményezheti. E lépéshez a hexokináz enzimre van szükség, mely viszont koenzimként magnéziumot igényel. E reakció során egy mol ~P kerül felhasználásra:

$$\text{glükóz} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{hexokináz}} \text{glükóz-6-P} + \text{ADP}$$

Jóllehet ezt a reakciót mind a növényi, mind az állati szövetekben a glükóz foszforilációja általános módjának tekinthetjük, és bár mindazok a baktériumok, melyek glükózt mint szénforrást hasznosítani képesek, rendelkeznek hexokinázzal, mégis tény, hogy a glükózmolekulák hasznosításuk során már a membrántranszport alkalmával a transzportmechanizmus lényeges fontosságú lépéseként foszforilálódnak. Ilyen körülmények között viszont feltételezhető, hogy a citoplazmában szabad



64. ábra

A glükóznak az EMBDEN–MEYERHOF-úthoz csatlakozó tejsavas fermentációja

glükóz nem is fordulhat elő. Ez a feltételezés valószínűen helytálló is valamennyi anaerob és fakultatív anaerob baktérium esetében. A glükóz foszforilációjának ebben a második, a transzporttal kapcsolatos rendszerében nem az ATP a foszfátdonor, hanem elsősorban is az EMBDEN–MEYERHOF-út egy intermedier vegyülete, a foszfoenol-piroszőlősav (PEP):

$$\text{glükóz} + \text{PEP} \rightarrow \text{glükóz-6-P} + \text{enolpiroszőlősav}$$

Az aerob baktériumoknál és az eukariota sejtekben a glükóz a membránon foszforiláció nélkül is áthaladhat (LEVY és munkatársai, 1973), ezért ezek citoplazmája már tartalmaz szabad glükózt, melyet a hexokináz foszforilálhat.

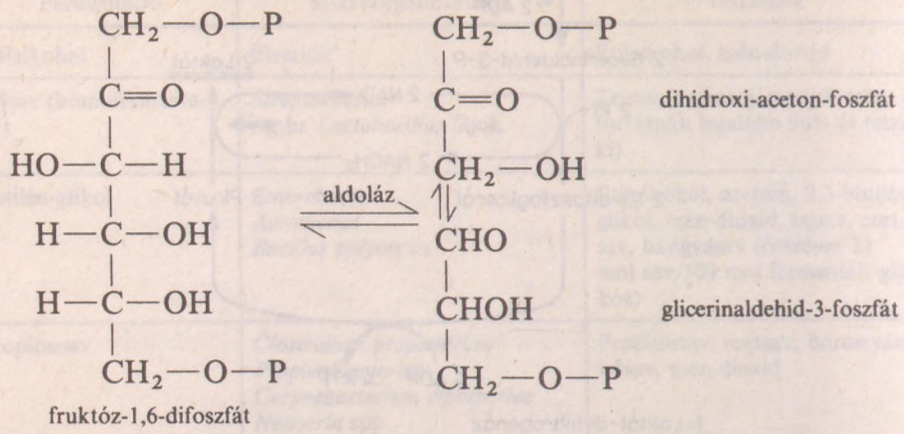
A glükóz-6-P-ot egy izomeráz fruktóz-6-P-á alakítja, miáltal az 1. szénatomon primer alkohol jön létre, készen a következő lépésre, mely ugyancsak foszforiláció:

$$\text{glükóz-6-P} \xleftrightarrow{\text{glükóz-foszfát-izomeráz}} \text{fruktóz-6-P}$$

Ez a második foszforiláció megint csak egy ~P terhére történik:

$$\text{fruktóz-6-P} + \text{ATP} \xleftrightarrow{\text{foszfofruktokináz}} \text{fruktóz-1,6-P}_2 + \text{ADP}$$

A fruktóz-1,6-difoszfátot (fruktóz-1,6-P_2) a 3. és 4. szénatomok közötti C–C kötésnél egy aldoláz-enzim két triózra hasítja:

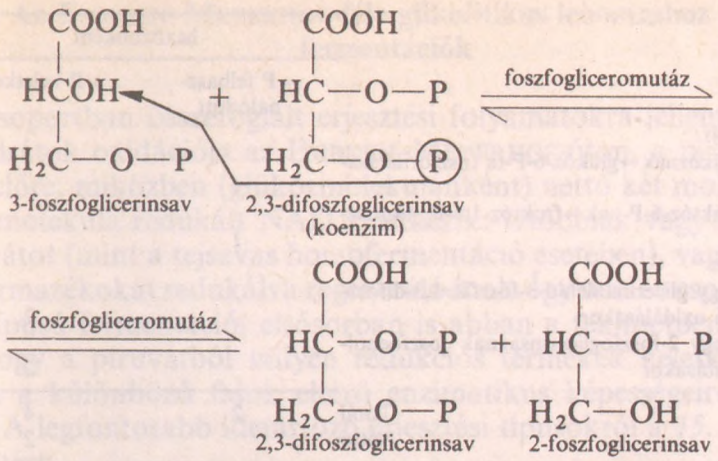


fruktóz-1,6-difoszfát

E két trióz között egyensúlyi állapot áll fenn, azonban, minthogy a további reakciók a glicerinaldehid-3-foszfátból indulnak ki, ezért gyakorlatilag e vegyület két molekulájával kell számolnunk. A trióz-foszfát-izomeráz a két triózt energiabefektetés nélkül egymásba alakítja át.

A glicerinaldehid-3-foszfát, NAD^+-koenzim közreműködésével, oxidoreduktáz hatására glicerinsav-foszfáttá oxidálódik, miközben triózonként egy NAD^+ redukálódik. Minthogy e lépésnél végbemenő hidrogénelvonás nagy energiafelszabadulással jár, ez anorganikus foszfát segítségével nagy energiájú kötés szintézisére használható. Így először glicerinsav-1,3-difoszfát keletkezik (a szerves sav–foszforsav kötés nagy energiájú), mely azután közvetlenül, triózonként egy ADP-ből egy ATP szintézisét biztosítva, glicerinsav-3-foszfáttá alakul. Ezt a reakciót magnézium jelenlétében egy kináz katalizálja.

A következő lépés célja a foszfátcsoport átvitele a 3. szénatomról (ahol a foszforsav egy alkoholos csoportot észteresít) a 2. szénatomra. Ez a 2,3-difoszfoglicerinsav koenzim segítségével megy végbe, melynek 2. és 3. szénatomján egy-egy foszfátcsoport van. Az enzim a koenzim 3. szénatomjáról a foszfátcsoportot a szubsztrát 2. szénatomjára viszi át. E reakció eredményeként a foszfátcsoport a termék 2. szénatomján helyezkedik el és egy molekula koenzim marad vissza. Vagyis más szóval, a szubsztrát átalakult koenzimmé és a koenzim szabad termékké lett.



Az itt felvázolt mechanizmus általánosan jellemző azokra az enzimatikus reakciókra, amikor foszfátátvitel, egyik helyzetből a másikba, egyazon molekulán belül megy végbe. Így pl. a glükóz-1-P, glükóz-6-P-á alakítása során a koenzim a gkülóz-1,6-P_2. A ribóz-5-P átalakítása ribóz-1-P-á, a ribóz-1,5-difoszfát koenzimmel történik.

Ezt a lépést, a foszfopiroszőlősav-hidratáz (enoláz) enzim segítségével, a következő energiatermelő reakció követi, mégpedig a foszfoenol-piroszőlősav nagy energiájú foszfátkötésének (enol~P) kialakítása. A glicerinsav-2-foszfát az enoláz hatására vizet veszít és foszfoenol-piroszőlősavvá, alakul. Minthogy azonban a kettős kötés mellett elhelyezkedő hidroxilcsoportok savanyú jellegűek, a foszforcsoporttal kapcsolódva nagy energiatartalmat képviselnek. Így tehát a foszfátcsoport kis energiájú kötésből nagy energiájúba terelődött.

Ezután az enolpiroszőlősav-foszfát~P-ja ADP-ből ATP szintézisében vesz részt, amikor is enolpiroszőlősav keletkezik, mely nem enzimatikus úton a sokkal stabilabb piroszőlősavvá konvertálódik.

$$\underset{\text{enolpiroszőlősav}}{CH_2{=}COH{-}COOH} \rightleftharpoons \underset{\text{piroszőlősav}}{CH_3{-}CO{-}COOH}$$

Azoknál a baktériumoknál, melyek anaerob körülmények között tejsavat képeznek, az EMBDEN–MEYERHOF-út utolsó lépése a piroszőlősav redukciója tejsavvá a redukált NAD^+ egyidejű regenerációjával. E végső reakcióban szereplő $NADH_2$ hidrogénje a glicerinaldehid-3-foszfát oxidációjából származik.

Összegezve tehát:

	hexózonként	
	~P felhasználódott	~P keletkezett
Energiafelhasználás:		
a) 1 mol~P a glükóznak→glükóz-6-P-tá foszforilálásához	1	
b) 1 mol~P a fruktóz-6-P-nak→fruktóz-1,6-P_2-tá foszforilálásához	1	
Energiaelőállítás:		
a) 1 mol P egy-egy glicerinaldehid-3-foszfát 1,3-difoszfoglicerinsavvá oxidálásakor		2
b) 1 mol P egy-egy 2-foszfoglicerinsavnak foszfoenolpiruváttá alakításakor		2
Totál	2	4
Nettó		2
Hidrogéntranszfer:		
a) 1 mol NAD^+ redukálódott egy-egy glicerinaldehid-3-foszfát oxidálásakor		
b) 1 mol $NADH_2$ oxidálódott egy-egy piroszőlősav redukciója alkalmával	változás nincs	

Végeredmény:

$$\text{glükóz} \rightarrow 2\ \text{tejsav} + 2{\sim}\text{P},$$

$$\text{vagy glükóz} \rightarrow 2\ \text{tejsav} + 14\,000\ \text{kal}$$

Egy mol glükóznak szén-dioxiddá és vízzé történő elégetésekor 2 871 596 joule (686 000 cal) szabadenergia-felszabadulás megy végbe. Ezzel szemben az EMBDEN–MEYERHOF-út e potenciális energiakészletnek csupán kicsiny frakcióját teszi hozzáférhetővé. Ennek az energiának legnagyobb része még a két mol tejsavban maradt, ill. egy része hő alakjában veszett el.

Ha egy szervezet tartaléktápanyagként glikogénnel rendelkezik, úgy széneházés alkalmával ezt használja fel. A glikogéntől glükóz-6-foszfátig vezető lépések energiaráfordítást nem igényelnek. A glikogént mint szubsztrátot felhasználva, hexózegységenként nettó három~P nyerhető.

$$\text{glikogén} + n\ H_3PO_4 \overset{\text{foszforiláz}}{\rightleftharpoons} n\ \text{glükóz-1-P}$$

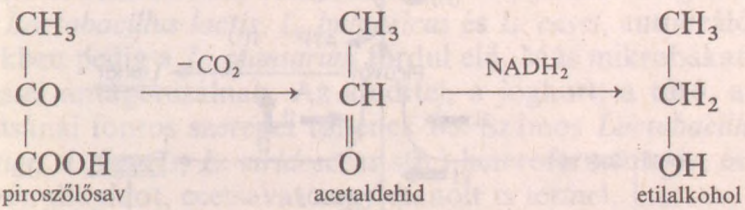
$$n\ \text{glükóz-1-P} \overset{\text{foszfoglükomutáz}}{\underset{\text{glükóz-1,6-P}}{\rightleftharpoons}} n\ \text{glükóz-6-P}$$

Ezek után térjünk át a különböző típusú erjesztési folyamatok tárgyalására!

1.14.7. Az EMBDEN–MEYERHOF-féle glikolitikus lebontáshoz csatlakozó fermentációk

Az e csoportban összefoglalt erjesztési folyamatokra jellemző, hogy a szénhidrátok oxidációja az EMBDEN–MEYERHOF-úton, a piroszőlősavig halad előre, miközben (glükózmolekulánként) nettó két molekula ATP és két molekula redukált NAD keletkezik. Utóbbiak vagy közvetlenül a piruvátot (mint a tejsavas homofermentáció esetében), vagy más szerves származékokat redukálva regenerálódnak. Így tehát e csoport különböző típusú fermentációi elsősorban is abban a tekintetben különböznek, hogy a piruvátból milyen redukciós termékek keletkeznek, ami viszont a különböző fajok eltérő enzimatikus képességeire vezethető vissza. A legfontosabb idetartozó erjesztési típusokról a *15. táblázat* ad áttekintést.

1. *Etilalkoholos erjedés:* élesztőkben főleg anaerob körülmények között glükózból a glikolízis útján piroszőlősav, majd ebből etilalkohol és szén-dioxid lesz. A piroszőlősav a piruvát-dekarboxiláz enzim (kofaktor: tiamin-pirofoszfát) közreműködésével szén-dioxidot veszít, miközben acetaldehiddé alakul. Utóbbi $NADH_2$-tal, alkohol-dehidrogenáz hatására, alkohollá redukálódik:



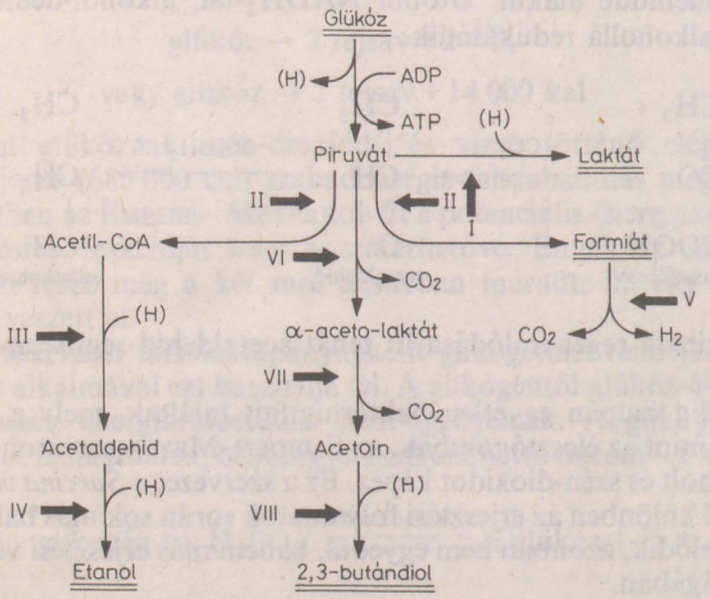
A koenzimek regenerálódása itt tehát acetaldehid segítségével történik.

Mindeddig csupán egyetlen baktériumfajt találtak, mely a glükózt, ugyanúgy, mint az élesztőgombák, az EMBDEN–MEYERHOF-úton át bontva etilalkoholt és szén-dioxidot képez. Ez a szervezet a *Sarcina ventriculi.* Etilalkohol különben az erjesztési folyamatok során sok más baktériumnál is termelődik, azonban nem egyedül, hanem más erjesztési végtermékek társaságában.

Az alkoholos erjesztést az iparban és a mezőgazdaságban széles körben hasznosítjuk. A legfontosabb használatban levő erjesztők eukarioták, melyek nem tartoznak az ősi fermentatív szervezetek (baktériumok) sorába. Valójában anaerob körülmények között huzamosabb időn keresztül aktív életmódra és szaporodásra nem képesek, és mint csaknem minden eukariota (aerob szervezet) oxigén hiányában a fermentációt

csupán átmenetileg, energiaszerzésre és létfenntartásra használják. A sütőipari élesztő, a *Saccharomyces cerevisiae* szelektált törzsei oxigén jelenlétében gyorsan szaporodnak, míg hiányában erőteljesen fermentálnak. A kenyér nyers tésztájában alkoholos erjedéssel szén-dioxidot termelnek, és így a kenyeret laza, lukacsos szerkezetűvé teszik. A *S. cerevisiae* és a *S. carlsbergensis* törzsei a komlózott sörlevet erjesztik, és a sör minősége nagyrészt tőlük függ. A különböző keményítőtartalmú nyersanyagokat (burgonya, kukorica stb.) cefrézés (malátakészítés, gőzölés, cukrosítás) után a szeszgyárakban *S. cerevisiae* törzsekkel erjesztik, míg a kierjedt cefréből a szeszt „főzéssel" állítják elő. A gyümölcscefréket borélesztőkkel oltják. Ezek színtenyészetei a fajélesztők. A kierjedt cefrét üstökben ismételten lefőzve, 40–60% szesztartalmú pálinkákat nyernek. A *S. vini* legjobb törzseivel erjesztett mustból kitűnő minőségű borokhoz jutnak. Egyes fajélesztő-törzsekkel 19 tf% fölötti alkoholtartalmú bort is nyertek.

Amennyiben az élesztőkultúrák jó átlevegőzését biztosítjuk, úgy az alkoholtermelés visszaszorul. Ez az ún. PASTEUR-effektus. A glükóz oxigénnel sokkal kedvezőbben kihasználható energetikailag, mint erjesztés-



I = Laktát-dehidrogenáz; II = Piruvát-formiát-liáz;
III = Acetaldehid-dehidrogenáz; IV = Alkohol-dehidrogenáz;
V = Formiát-hidrogén-liáz; VI = α-aceto-laktát-szintáz;
VII = α-aceto-laktát-dekarboxiláz; VIII = 2,3-bután diol-dehidrogenáz.
Acetoin = $CH_3-CO-CHOH-CH_3$; 2,3-bután diol = $CH_3-CHOH-CHOH-CH_3$.

65. ábra
Butilén-glikolos fermentáció

sel. Így azonos asszimilált szénmennyiség esetén is a glükózfogyás aerob körülmények között jóval csekélyebb. A PASTEUR-effektust nem maga az oxigén váltja ki, mivel a légzési láncot mérgekkel gátolva, az alkoholtermelés oxigén jelenlétében is tovább folyik. A glükózlebontás szabályozásában, vagyis a PASTEUR-effektus kiváltásában, az adenilátrendszer (ATP/ADP/AMP/Pi) döntő szerepet játszik. Feltehetően a folyamatosan üzemelő légzési lánc mentén az ADP olyan gyorsan alakul át ATP-vé, hogy az EMBDEN–MEYERHOF-út számára kielégítő mennyiségű ADP és anorganikus foszfát többé már nem áll rendelkezésre.

2. *Homofermentatív tejsavas erjedés:* a *Streptococcus lactis, Lactobacillus delbruckii* stb. glükózon növekvő tenyészeteiben a piroszőlősav tejsavvá redukálódik. Hexózmolekulánként két tejsavmolekula keletkezik. A redukció a NAD^+ regenerálódását eredményezi (64. ábra). A tejsav általában 2%-os koncentrációban állítja meg az erjedési folyamatot.

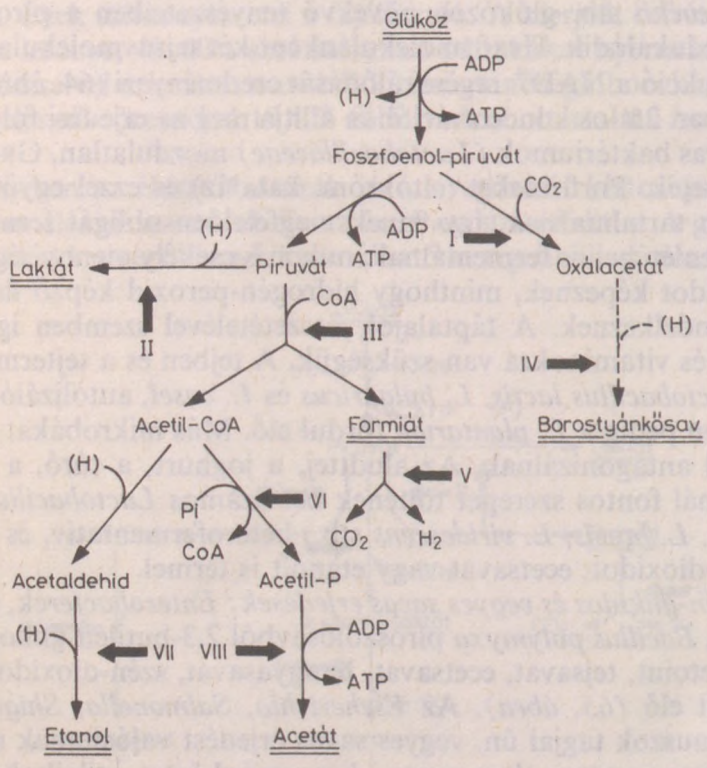
A tejsavas baktériumok *(Lactobacillaceae)* mozdulatlan, GRAM-pozitív szervezetek. Porfirineket (citokróm, kataláz) és ezzel együtt légzési láncot sem tartalmaznak, így ennek megfelelően obligát fermentálók. Oxigén jelenlétében is fermentálnak, mikor is csekély mennyiségű hidrogén-peroxidot képeznek, minthogy hidrogén-peroxid képző flavinenzimekkel rendelkeznek. A táptalajok összetételével szemben igényesek, fehérjékre és vitaminokra van szükségük. A tejben és a tejtermékekben főleg a *Lactobacillus lactis, L. bulgaricus* és *L. casei,* autolizáló növényi szövetekben pedig a *L. plantarum* fordul elő. Más mikrobákat a tejsavtermeléssel antagonizálnak. Az aludttej, a joghurt, a túró, a siló stb. előállításánál fontos szerepet töltenek be. Számos *Lactobacillus* faj (*L. fermentum, L. brevis, L. viridescens* stb.) heterofermentatív, és tejsavon kívül szén-dioxidot, ecetsavat vagy etanolt is termel.

3. *Butilén-glikolos és vegyes savas erjedések: Enterobacter*ek, az *Aeromonas* és a *Bacillus polymyxa* piroszőlősavból 2,3-butilén-glikolt, etilalkoholt, acetoint, tejsavat, ecetsavat, hangyasavat, szén-dioxidot és hidrogént állít elő *(65. ábra).* Az *Escherichia, Salmonella, Shigella* és a *Proteus* genuszok tagjai ún. vegyes savas erjedést valósítanak meg, miközben tejsav, ecetsav, hangyasav, borostyánkősav, etilalkohol, szén-dioxid és hidrogén termelődik *(66. ábra).*

E folyamatok során a piroszőlősav részben hangyasavra és acetil-CoA-n át ecetsavra bomlik. A hangyasav felhalmozódhat (pl. a *Salmonella typhi*nél), vagy tovább bomlik szén-dioxidra és hidrogénre. E két gáz aránya az *E. coli*nál 1:1 (*lásd 66. ábra*). A tejsav a fentebb már ismertetett úton jön létre. Etilalkohol, szemben az élesztőkkel, acetil-CoA-n át, az acetilcsoport acetaldehiddé és ennek etilalkohollá történő redukálásával keletkezik. A P-enolpiruvátból PEP-karboxiláz hatására, szén-dioxid-felvétellel oxálecetsav ($COOH—CH_2—CO—COOH$) keletke-

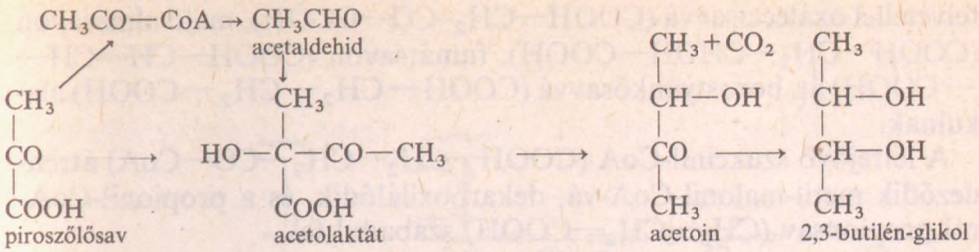
zik, majd ez utóbbi borostyánkősavvá ($COOH—CH_2—CH_2—COOH$) redukálódik és felhalmozódik.

Piroszőlősavból acetil-CoA-n át keletkezett acetaldehid, egy molekula piroszőlősavval reagálva acetolaktátot eredményez, melynek dekarboxilezésével acetoin képződik. Az ekkor szabaddá vált szén-dioxid a szén-dioxid és hidrogéngázok arányát az első javára tolja el, ami az acetoin-képzőkre jellemző. Az acetoin további redukciójával 2,3-butilén-glikol (2,3-butandiol) termelődik (míg az acetoin esetleges oxidációja diacetilt vagy más néven butándiont eredményezhet: $CH_3—CO—CO—CH_3$):



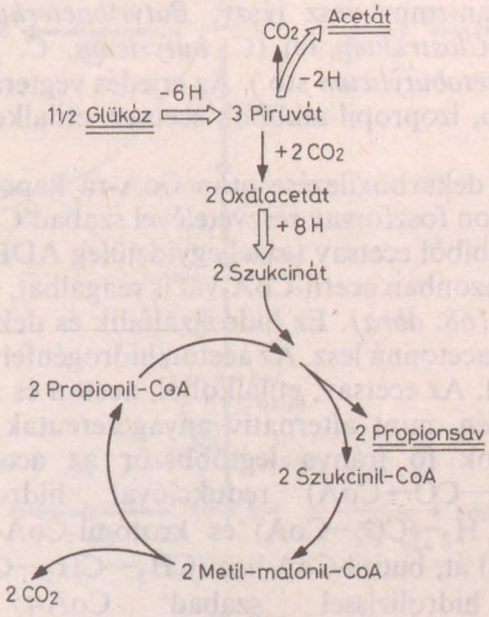
I = PEP-karboxiláz;
II = Laktát-dehidrogenáz;
III = Piruvát-formiát-liáz;
IV = Malát-dehidrogenáz, fumaráz és fumarát-reduktáz;
V = Formiát-hidrogén-liáz;
VI = Foszfotranszacetiláz;
VII = Alkohol-dehidrogenáz;
VIII = Acetát-kináz.

66. ábra
Vegyes-savas fermentáció



Acetoint gombák is termelnek, bár nem teljesen azon az úton, mint a baktériumok. A gombáknál jelentős mérvű piruvát-dekarboxiláz-aktivitást észlelhetünk. Fokozott piruvát-termelés esetén ez az enzim nemcsak ecetaldehidet, hanem acetoint is előállít.

4. *Propionsavas erjedés:* számos mikroorganizmus (*Clostridium, Corynebacterium, Neisseria, Micromonospora* stb.) képes glükózból propionsavat, ecetsavat, borostyánkősavat és szén-dioxidot előállítani. *Propionibacterium* fajoknál a propionsav, ecetsav és a szén-dioxid produkcióját másfél molekula glükózra kalkulálva 2:1:1 arányban észlelték. Az erjedési folyamat során a piroszőlősav egy részéből szén-dioxid és ecetsav keletkezik *(67. ábra)*. Más piroszőlősav-molekulák szén-dioxid-



67. ábra
Propionsavas fermentáció

felvétellel oxálecetsavvá ($COOH—CH_2–CO—COOH$), majd almasavon ($COOH—CH_2—CHOH—COOH$), fumársavon ($COOH—CH=CH—COOH$) át, borostyánkősavvá ($COOH—CH_2—CH_2—COOH$) alakulnak.

A létrejövő szukcinil-CoA ($COOH—CH_2—CH_2—CO—CoA$) átrendeződik metil-malonil-CoA-vá, dekarboxilálódik, és a propionil-CoA-ról propionsav ($CH_3—CH_2—COOH$) szabadul fel.

A propionsavas erjesztés két típusát különböztethetjük meg:

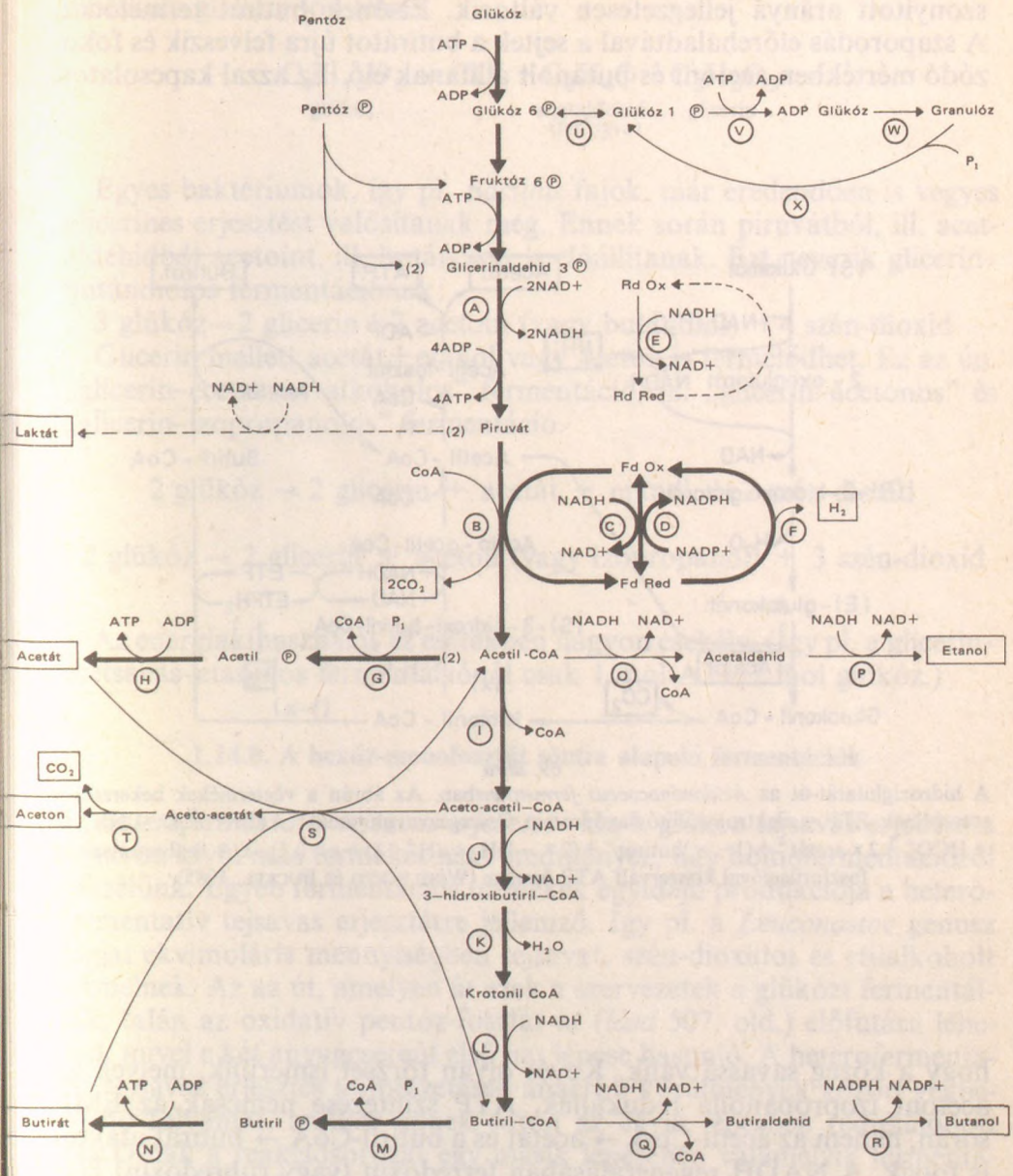
A) A *Propionibacterium*oknál jellegzetes köztes termékként metil-malonil-CoA szerepel.

B) A *Clostridium propionicum* esetében intermedierként akriloil-CoA jelenik meg.

A *Propionibacterium*ok morfológiailag korinebaktérium kinézésűek. Szemben a tejsavas erjesztőkkel, porfirineket (pl. citokrómot) tartalmaznak. Tejben sohasem fordulnak elő. Leginkább a kérődzők gyomor- és béltraktusában szaporodnak, ahol a növényi szénhidrátokból vagy a citrát-kör intermedierjeiből és glicerinből zsírsavképzésben vesznek részt. Ezeket az anyagokat konvencionális úton piruváttá alakítják, mely a fentebb megadott sablon szerinti propionát-képzéshez használódik el. A propionsavas erjesztés második (B) típusánál az átalakulások biokémiája ma még kevéssé ismert.

5. *Butilalkoholos–vajsavas fermentáció:* e folyamatokban ugyancsak számos mikroorganizmus vesz részt: *Butyribacterium, Zymosarcina, Neisseria* és sok *Clostridium* faj (*C. butyricum, C. pasteurianum, C. amylobacter, C. acetobutylicum* stb.). Az erjedés végtermékei: butilalkohol, vajsav, aceton, izopropil-alkohol, ecetsav, etilalkohol, hidrogén és szén-dioxid.

A piroszőlősav dekarboxilezése után CoA-ra kapcsolódik, majd az egyik alternatív úton foszforsav részvételével szabad CoA és acetil-foszfát jön létre. Utóbbiból ecetsav (ezzel egyidejűleg ADP-ből ATP) keletkezik. Az ecetsav azonban acetil-CoA-val is reagálhat, amikor acetoacetil-CoA képződik *(68. ábra)*. Ez hidrolizálódik és dekarboxilezés után szabad CoA-vá és acetonná lesz. Az aceton hidrogénfelvétellel izopropil-alkoholt szolgáltat. Az ecetsav, etilalkohol, aceton és izopropanol produkciói a *68. ábrán*, mint alternatív anyagcsereutak szerepelnek. Az erjedési folyamatok fő iránya legtöbbször az aceto-acetil-CoA-tól ($CH_3—CO—CH_2—CO—CoA$) redukcióval, hidroxi-butiril-CoA-n ($CH_3—CHOH—CH_2—CO—CoA$) és krotonil-CoA-n ($CH_3—CH=CH—CO—CoA$) át, butiril-CoA-hoz ($CH_3—CH_2—CH_2—CO—CoA$) vezet, mely hidrolízissel szabad CoA-t és vajsavat ($CH_3—CH_2—CH_2—COOH$) szolgáltat. A vajsav butilalkohollá ($CH_3—CH_2—CH_2—CH_2OH$) redukálódhat. Az erjedési termékek mi-

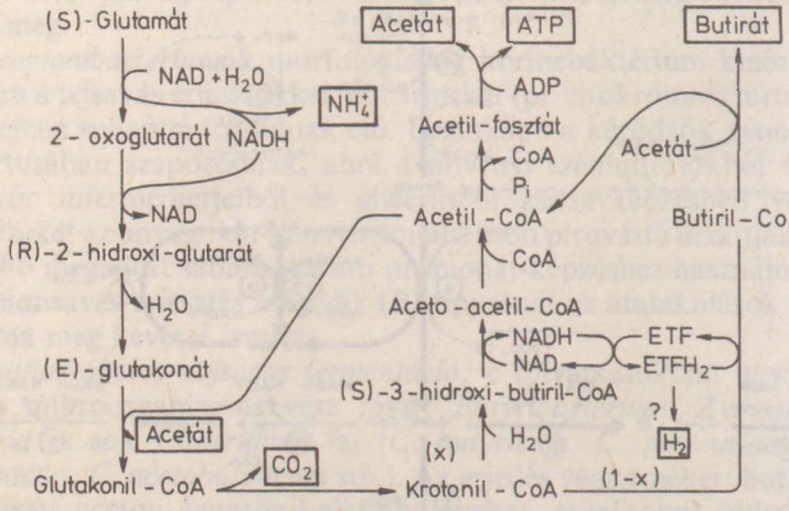


68. ábra

Butilalkoholos–vajsavas fermentáció a *C. acetobutilicum*nál (JONES és WOODS, 1986; A reakciókban résztvevő enzimekre betűjelzések utalnak)

nőségi megoszlását nem csupán a faji, ill. törzsi identitás, hanem a tenyészkörülmények, így a hőmérséklet, pH stb. is befolyásolják.

Az erjesztési folyamatok során az erjesztési termékek egymáshoz viszonyított aránya jellegzetesen változik. Elsőnek butirát termelődik. A szaporodás előrehaladtával a sejtek a butirátot újra felveszik és fokozódó mértékben acetont és butanolt állítanak elő. Ez azzal kapcsolatos,



69. ábra

A hidroxiglutarát-út az *Acidaminococcus fermentans*ban. Az ábrán a végtermékek bekeretezve szerepelnek. ETF = elektronszállító flavoprotein. Összegezve: glutamát$^-$ + $(2+1)H_2O \rightarrow NH_4^+ +$ + $HCO_3^- + 2 \times$ acetát$^-$ + $(1-x)$butirát$^-$ + $(2x-1)H_2 + xH^+$; $(1 > x > 0{,}5)$, x = szubsztrátszintű foszforilációval konzervált ATP összege (WOHLFARTH és BUCKEL, 1985)

hogy a közeg savassá válik. Kevés olyan törzset ismerünk, melyek az acetont izopropanollá redukálják. ATP szintezése nemcsak az EMP során, hanem az acetil-CoA → acetát és a butiril-CoA → butirát utakon is folyik. A NADH regenerálásában ferredoxin (vagy rubredoxin) H_2-képzéssel vesz részt.

6. *Glicerines erjedés:* Élesztők alkoholos erjesztésénél észlelték, hogy ha az acetaldehidet, mely az etanol prekurzora, elvonják, úgy etanol

helyett glicerin termelődik. Az acetaldehid kicsapása nátrium-biszulfittal az EMBDEN–MEYERHOF-útról származó NADH-t a dihidroxi-aceton-foszfátra tereli, ami glicerinképzéshez vezet. Glükózmolekulánként egy molekula glicerin jön létre:

$$\underset{\text{glükóz}}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow CO_2 + \underset{\substack{\text{acetaldehid}\\(\text{felfogva})}}{C_2H_4O} + \underset{\text{glicerin}}{C_3H_8O_3}$$

Egyes baktériumok, így pl. *Bacillus* fajok, már eredendően is vegyes glicerines erjesztést valósítanak meg. Ennek során piruvátból, ill. acetaldehidből acetoint, ill. butándiolt is előállítanak. Ezt nevezik glicerin–butándiolos fermentációnak:

3 glükóz → 2 glicerin + 2 acetoin (vagy butándiol) + 4 szén-dioxid

Glicerin mellett acetát + etanol vagy aceton is termelődhet. Ez az ún. „glicerin–ecetsavas–alkoholos" fermentáció, ill. „glicerin–acetonos" és „glicerin–izopropanolos" fermentáció.

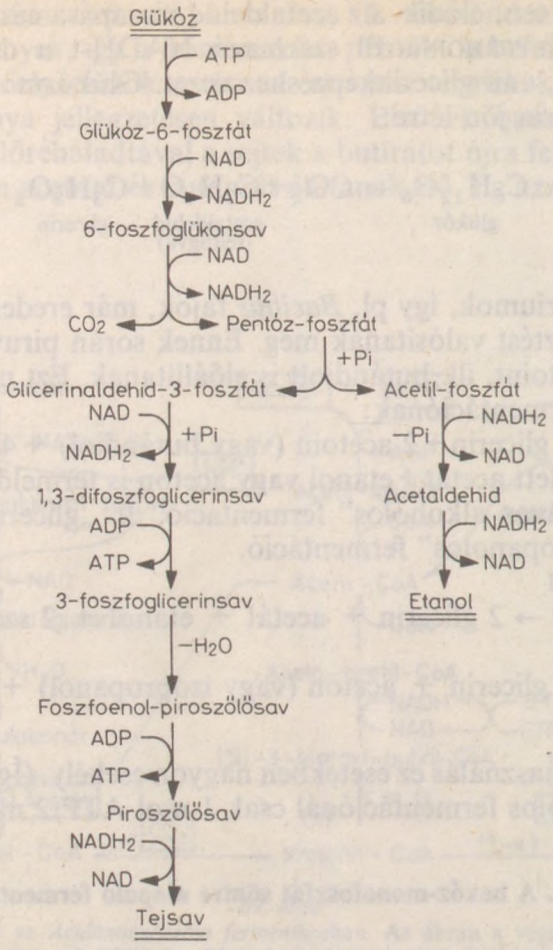
2 glükóz → 2 glicerin + acetát + etanol + 2 szén-dioxid

2 glükóz → 2 glicerin + aceton (vagy izopropanol) + 3 szén-dioxid

Az energiakihasználás ez esetekben nagyon csekély. (Így pl. a glicerin–ecetsavas–etanolos fermentációnál csak 1 mol ATP/2 mol glükóz.)

1.14.8. A hexóz-monofoszfát söntre alapuló fermentációk

1. *Heterofermentatív tejsavas erjesztés:* Ha a glükóz tejsavas erjedése a tejsavon kívül más terméket nem eredményez, úgy homofermentációról beszélünk. Egyéb fermentációs termékek egyidejű produkciója a heterofermentatív tejsavas erjesztésre jellemző. Így pl. a *Leuconostoc* genusz tagjai ekvimoláris mennyiségben tejsavat, szén-dioxidot és etilalkoholt termelnek. Az az út, amelyen át ezek a szervezetek a glükózt fermentálják, talán az oxidatív pentóz-foszfát-út (*lásd* 507. old.) előfutára lehetett, mivel e két anyagcsereút első hat lépése hasonló. A heterofermentatív tejsavas erjesztés természetesen anaerob körülmények között végbemenő folyamat, amikor ennek során az egyik lépésben redukálódott NAD-nak a reakciósorozat egy másik lépésében valamelyik fermentációs köztitermékkel újra kell oxidálódnia. Különbség mutatkozik abban is, hogy szemben a pentóz-foszfát-úttal, itt nem a $NADP^+$ szerepel hidrogénszállítóként, hanem a NAD^+. Ezenkívül a heterofermentatív

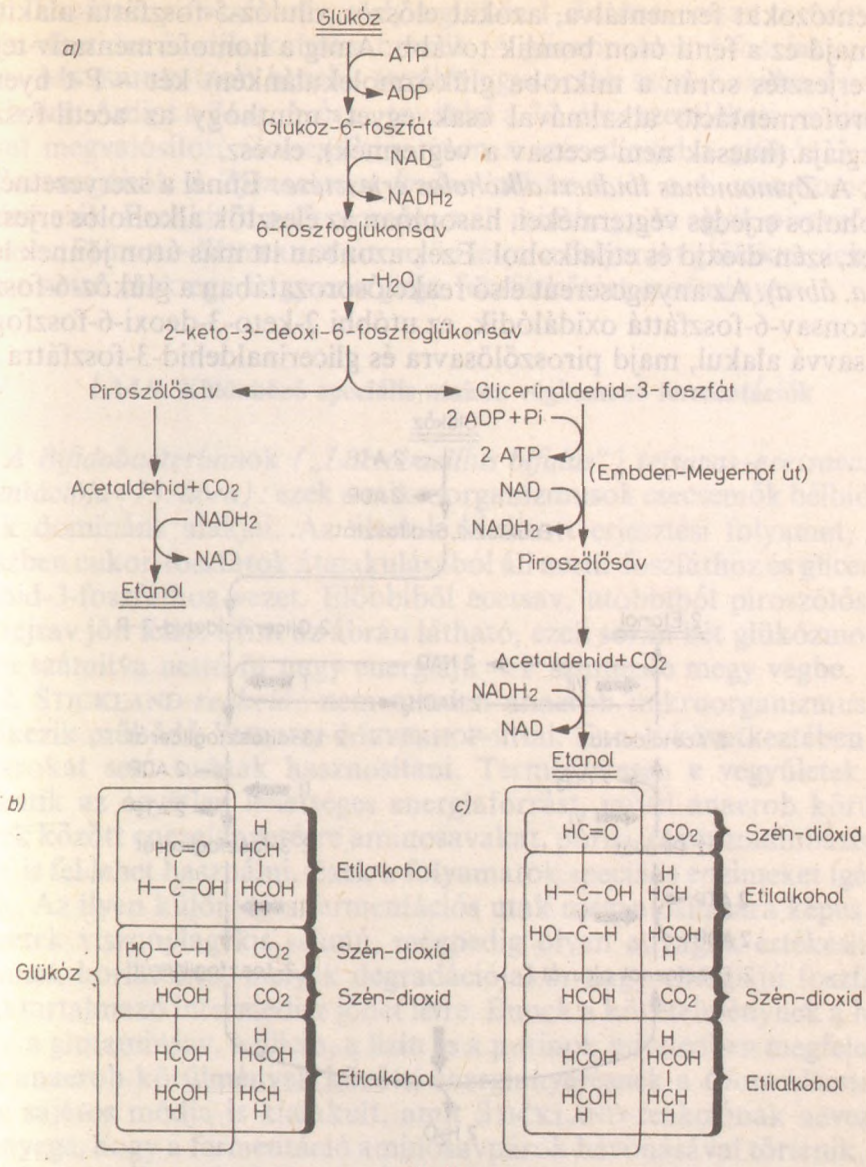


70. ábra

A glükózból kiinduló tejsavas heterofermentáció

tejsavas erjesztők itt nem használnak transzketolázt vagy transzaldolázt.

A *70. ábra* a glükóz tejsavas heterofermentációjának anyagcsereútjait szemlélteti. A glükóz-6-foszfát NAD-koenzimmel 6-foszfoglükonsavvá, majd újabb NAD redukciójával 3-keto-6-foszfo-glükonsavvá alakul, mely dekarboxileződik, szén-dioxidot és ribulóz-5-foszfátot eredményezve. Utóbbi átalakul xilulóz-5-foszfáttá, s ez azután a foszfoketoláz enzim hatására, szervetlen foszfát felvételével, glicerinaldehid-3-foszfátra és acetil-foszfátra hasad. Előbbiből piroszőlősavon át, az EMBDEN–MEYERHOF-úton, tejsav lesz, míg az utóbbi, nagy energiájú foszfátkötés szintézise nélkül, etilalkohollá redukálódik.

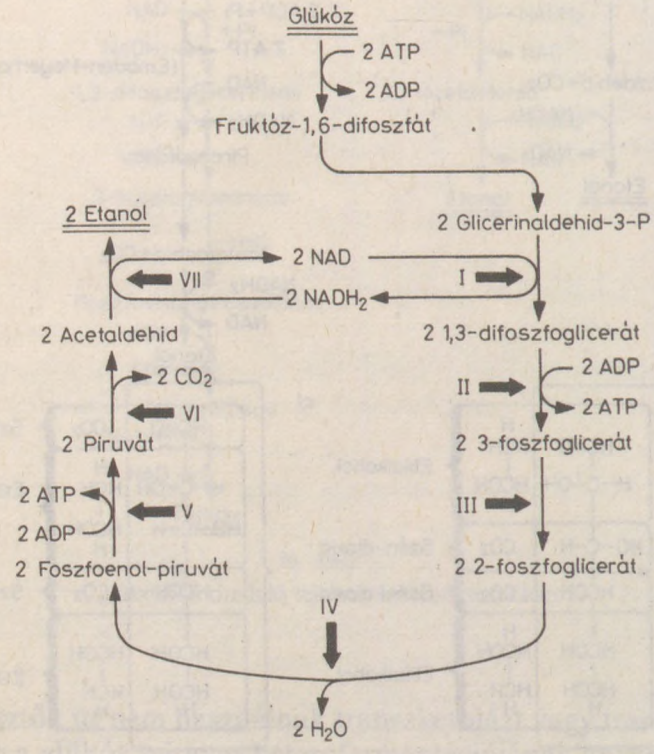


71. ábra

a) A *Zymomonas lindneri* glükózból kiinduló alkoholos fermentációja. *b)* és *c)* Az alkoholos fermentáció során a glükóz hat szénatomos molekulája négy töredékre esik szét. A szén-dioxidban megjelenő szénatomokról származó hidrogéneket az etilalkohol-fragmentek vették át. Az egyik úton, a glükóz élesztők által végrehajtott alkoholos erjesztési folyamata során, ezek az oxidációs–redukciós reakciók a sejtnek két energiagazdag foszfátkötés-szintézisét teszik lehetővé. Ekkor a két molekula szén-dioxid a glükóz 3. és 4. szénatomjából származik. A *Zymomonas lindneri* alkoholos erjesztésekor második lehetőségként a hexózmolekulánként produkált két szén-dioxid, a glükóz 1. és 4. szénatomjaiból ered. Minthogy ennél a baktériumnál az egyik piroszőlősav nem glicerinsav-3-foszfáton át jön létre, a sejt csupán egy nettó nagy energiájú foszfátkötést szintetizálhat. Az ilyen fermentációk során keletkezett etilalkohol az energia nagy részét még kémiailag kötve tartalmazza, amit az aerob mechanizmusok szabadíthatnak fel

Pentózokat fermentálva, azokat először xilulóz-5-foszfáttá alakítják át, majd ez a fenti úton bomlik tovább. Amíg a homofermentatív tejsavas erjesztés során a mikroba glükózmolekulánként két ~P-t nyer, a heterofermentáció alkalmával csak egyet, minthogy az acetil-foszfát energiája (hacsak nem ecetsav a végtermék), elvész.

2. A *Zymomonas lindneri alkoholos erjesztése:* Ennél a szervezetnél az alkoholos erjedés végtermékei, hasonlóan az élesztők alkoholos erjesztéséhez, szén-dioxid és etilalkohol. Ezek azonban itt más úton jönnek létre (*71.a. ábra*). Az anyagcsereút első reakciósorozatában a glükóz-6-foszfát glükonsav-6-foszfáttá oxidálódik, ez utóbbi 2-keto-3-deoxi-6-foszfoglükonsavvá alakul, majd piroszőlősavra és glicerinaldehid-3-foszfátra ha-



I = Gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz;
II = 3-foszfoglicerát-kináz;
III = Foszfoglicerát-mutáz;
IV = Enoláz;
V = Piruvát-kináz;
VI = Piruvát-dekarboxiláz;
VII = Alkohol-dehidrogenáz.

72. ábra

A glükóz élesztők kiváltotta etanolos fermentációja

sad. Ezután a piroszőlősav, mely a glükóz 1–3 szénatomjait tartalmazza, szén-dioxidra és etilalkoholra bomlik. A glicerinaldehid-foszfát az EMBDEN–MEYERHOF-úton bomlik tovább ugyancsak szén-dioxidra és etilalkoholra. Amint a *71.a., b.* és *c.*, továbbá a *72. ábra* szemlélteti, az élesztők által megvalósított fermentációs úton a szén-dioxid a glükóz 3. és 4. szénatomjából, a *Zymomonas lindneri*nél az 1. és a 4. szénatomokból származik. Ezenkívül a *Zymomonas*nál, minthogy az egyik piroszőlősav nem az EMBDEN–MEYERHOF-úton jön létre, a folyamat glükózmolekulánként nettó csak egy nagy energiájú foszfátkötést eredményez.

1.14.9. Különböző speciális utakon végbemenő fermentációk

1. *A Bifidobacterium*ok (*„Lactobacillus bifidus"*) *tejsavas–ecetsavas fermentációja (73. ábra):* ezek a mikroorganizmusok csecsemők bélbiótájának domináns alakjai. Az általuk kiváltott erjesztési folyamat, mely részben cukor-foszfátok átalakulásából áll acetil-foszfáthoz és glicerinaldehid-3-foszfáthoz vezet. Előbbiből ecetsav, utóbbiból piroszőlősavon át tejsav jön létre. Mint az ábrán látható, ezek során két glükózmolekulára számítva nettó öt nagy energiájú ~P szintézise megy végbe.

2. STICKLAND-*reakció:* nem minden anaerob mikroorganizmus rendelkezik működő EMBDEN–MEYERHOF-úttal. Ennek következtében ezek cukrokat sem tudnak hasznosítani. Természetesen e vegyületek nem jelentik az egyetlen lehetséges energiaforrást, mivel anaerob körülmények között energianyerésre aminosavakat, purin- és pirimidinbázisokat stb. is fel lehet használni. Ezek a folyamatok speciális enzimeket igényelnek. Az ilyen különleges fermentációs utak megvalósítására képes szervezetek viszonylag kis számú, mégpedig olyan anyagok értékesítésére vannak korlátozva, melyek degradációjakor nagy energiájú foszfátkötést tartalmazó intermedier jöhet létre. Ennek a követelménynek a hisztidin, a glutaminsav, a glicin, a lizin és a purinok mindenben megfelelnek. Az anaerob körülmények közötti energianyerésnek a *Clostridium*oknál egy sajátos módja is kialakult, amit STICKLAND-reakciónak nevezünk. Lényege, hogy a fermentáció aminosavpárok bevonásával történik, amikor is az egyik oxidálódik, a másik elektronakceptorként szolgál, miközben nagy energiájú foszfátkötések szintetizálódnak. E folyamatok keretében alifás aminosavak (alanin, leucin, izoleucin, norvalin és valin) oxidálhatók. A közvetlen termékek a megfelelő ketosavak és az ammónia. A következő lépésben a ketosav NAD-dal oxidálódik és szén-dioxidot veszít. A redukálódó aminosavak a glicin és a prolin:

$$\text{alanin} + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons \text{piruvát} + NADH + H^+ + NH_3$$

$$\text{piruvát} + NAD^+ + \text{CoASH} \rightleftharpoons \text{acetil S-CoA} + CO_2 + NADH + H^+$$

$$\text{acetil S-CoA} + H_3PO_4 + ADP \rightleftharpoons \text{acetát} + ATP + \text{CoASH}$$

$$2\ \text{glicin} + 2\ H_3PO_4 + 2\ ADP + 2\ NADH + 2H^+ \rightleftharpoons 2\ \text{acetát} + 2\ NAD^+ + 2\ ATP + 2\ NH_3$$

Összegezve:

$$\text{alanin} + 2\ \text{glicin} + H_2O + 3\ H_3PO_4 + 3\ ADP \rightarrow 3\ \text{acetát} + 3\ NH_3 + 3\ ATP + CO_2$$

A nagy energiájú foszfátok előállítása a NADH-ról a glicinre irányuló elektron-, ill. hidrogénátvitel révén arra utal, hogy ezt a folyamatot közti *„carrier"*-ek közvetíthetik, ami némileg az elektrontranszportra emlékeztet.

A *Clostridium tetani* e fenti úton fedezi energiaszükségletét, amit röviden így írhatunk fel:

$$\text{alanin} \xrightarrow{-4\,H} \text{ecetsav} + NH_3 + CO_2$$

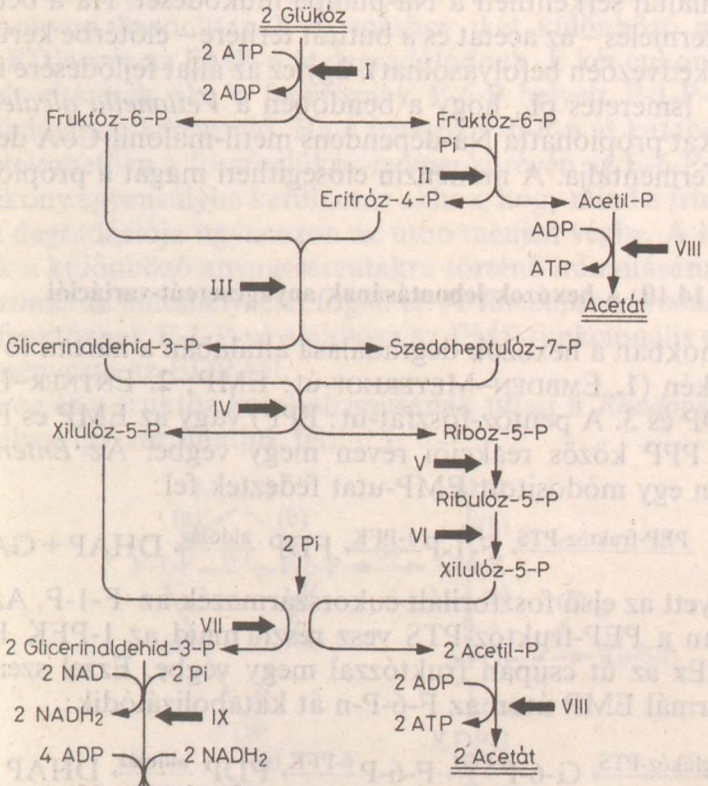
$$2\ \text{glicin} \xrightarrow{+4\,H} 2\ \text{ecetsav} + 2\ NH_3$$

Ismeretes olyan fermentáció is, melynek egyedüli szubsztrátuma az alanin:

$$3\ \text{alanin} + 2\ H_2O \rightarrow 2\ \text{propionsav} + \text{ecetsav} + CO_2 + 3\ NH_3$$

3. A *69. ábra* az *Acidaminococcus fermentans*ban lezajló, glutamátból kiinduló és acetátot, továbbá butirátot eredményező ún. hidroxiglutarát út vázlatát mutatja be. A feltüntetett reakciókat katalizáló enzimek többségét az *A. fermentans* sejtmentes kivonataiban már kimutatták, és kettő kivételével a *Peptostreptococcus asaccharolyticus*ban is jelen vannak. Az út közös része (S)glutamáttól krotonil-CoA-hoz vezet és két, a sejtekben nagy mennyiségben jelen lévő NAD-dependens dehidrogenáz kezdeményezi. Azok az anaerob baktériumok, melyek a glutamátot 2-hidroxiglutaráton és glutakonáton át acetátra és butirátra fermentálják, glutakonil-CoA-dekarboxilázokat tartalmaznak. Ezeket a biotindependens enzimeket megtalálták az *A. fermentans*, a *P. asaccharolyticus* és a *Clostridium symbiosum* membránjaiban. A monenzin, ez a Na-ionofor, e két utóbbi baktérium szaporulathozamára specifikus hatást fejt ki. Jelenlétében a kapott szaporulatértékek a glutamáttal elvártnak mindenben megfeleltek. Hiányában azonban a per mól glutamátra számított létrejött sejttömeg kétszer olyan nagy volt! Honnan a plusz energiaigény fedezete? Feltételezik, hogy a monenzin specifikusan azt a nátrium-

gradienst teszi tönkre, melyet a glutakonil-CoA-dekarboxiláz a dekarboxilezéskor felszabaduló szabadenergia terhére állít elő és amely a *P. asaccharolyticus*ban olyan arányú energiakonzerválást tehet lehetővé, mint maga a fermentációs szubsztrátszintű foszforiláció. Valószínűsítik, hogy a karboxiláz gerjesztette nátriumgrádiens extraenergiája a glutamát fermentáció hatékonyságát az optimális szintre igazíthatja. A *Clostridium tetanomorphum*nál ilyen Na-pumpát nem mutathattak ki. E megállapítások rengeteg problémát vetnek fel. Így nem ismerünk még Na-dependens ATP-szintetázt. Jelenleg WOHLFARTH és BUCKEL (1985) azt



I = Hexokináz + Glükóz-6-P-izomeráz;
II = Fruktóz-6-P-foszfoketoláz;
III = Transzaldoláz;
IV = Transzketoláz;
V = Ribóz-6-P-izomeráz;
VI = Ribulóz-5-P-3-epimeráz;
VII = Xilulóz-5-P-foszfoketoláz;
VIII = Acetát-kináz;
IX = A homofermentatív úton is közreműködő enzimek.

73. ábra

A *Bifidobacterium* révén megvalósított glükózfermentáció útja

tartják, hogy a *P. asaccharolyticus* azon szervezetek közé tartozik, melyekben a ΔμNa ugyanazt a szerepet tölti be, mint másokban a ΔμH. Szerintük a nátriumszivattyúként szereplő glutakonil-CoA-dekarboxilázt hordozó szervezetekben észlelt nagy szaporulathozam monenzin révén felszámolható. A *P. asaccharolyticus*ban, Na^+-gradiens segítségével, molnyi dekarboxilezett glutakonil-CoA-ra számítva 0,6 mól ATP-vel ekvivalens energia konzerválódhat. Így válik érthetővé a monenzinnek a szarvasmarha növekedésére gyakorolt serkentő hatása. Ez ugyanis a glutamát fermentációját a mikroba szaporodásától részlegesen szétkapcsolja, miáltal serkentheti a Na-pumpa működését. Ha a bendőben a propionáttermelés – az acetát és a butirát terhére – előtérbe kerül (amit a monenzin kedvezően befolyásolhat), úgy ez az állat fejlődésére feltétlenül előnyös. Ismeretes pl., hogy a bendőben a *Veilonella alcalescens* a szénhidrátokat propionáttá Na-dependens metil-malonil-CoA dekarboxiláz révén fermentálja. A monenzin elősegítheti magát a propionáttermelést.

1.14.10. A hexózok lebontásának anyagcsereút-variációi

A baktériumokban a hexózok degradálása általában a három fő anyagcsereút egyikén (**1.** EMBDEN–MEYERHOF-út: EMP; **2.** ENTNER–DOUDOROFF-út: EDP és **3.** A pentóz-foszfát-út: PPP) vagy az EMP és PPP, ill. az EDP és PPP közös reakciói révén megy végbe. Az *Enterobacter aerogenes*ben egy módosított EMP-utat fedeztek fel:

$$\text{fruktóz} \xrightarrow{\text{PEP-fruktóz-PTS}} \text{F-1-P} \xrightarrow{\text{1-PFK}} \text{FDP} \xrightarrow{\text{aldoláz}} \text{DHAP} + \text{GAP}$$

F-6-P helyett az első foszforilált cukorszármazék az F-1-P. Az F-1-P előállításában a PEP-fruktóz-PTS vesz részt, majd az 1-PFK FDP-vé alakítja át. Ez az út csupán fruktózzal megy végbe. Ezzel szemben a glükóz a normál EMP úton az F-6-P-n át katabolizálódik:

$$\text{glükóz} \xrightarrow{\text{PEP-glükóz-PTS}} \text{G-6-P} \xrightarrow{\text{PGI}} \text{F-6-P} \xrightarrow{\text{6-PFK}} \text{FDP} \xrightarrow{\text{aldoláz}} \text{DHAP} + \text{GAP}$$

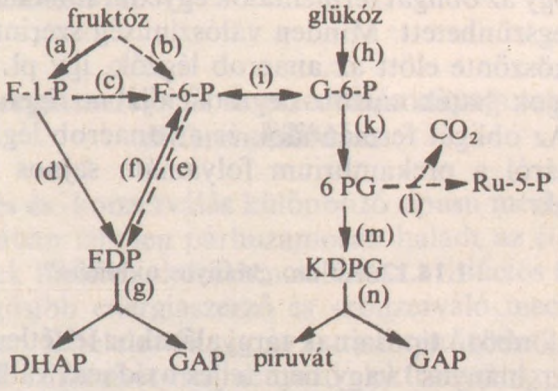
(GAP: glicerinaldehid-3-foszfát; PEP: foszfoenol-piruvát; DHAP: dihidroxi-aceton-foszfát; FDP: fruktóz-1,6-difoszfát; PTS: foszfotranszferáz; PFK: foszfofruktokináz.)

A glükóz és fruktóz metabolizmusának ezt az útját több más baktériumfajnál is kimutatták. A *Rhodospirillaceae* családtagjai között csak kevés fajról ismeretes, hogy a hexózokat, mint szubsztrátot hasznosítani képes. A *Rhodospirillum rubrum* a fruktózt az EMP-úton katabolizálja. A *Rhodopseudomonas capsulata* fruktózon növekedő sejtjei foszfoenol-piruvát-fruktóz-foszfotranszferázt, továbbá 1-foszfofruktokinázt,

kis mennyiségben fruktokinázt és 6-foszfofruktokinázt is tartalmaznak. Jóllehet a fruktózon növekedő sejtek még az ENTNER–DOUDOROFF-út valamennyi enzimjével, a fruktóz-1,6-difoszfatázzal és a foszfoglükóz-izomerázzal is rendelkeznek, mégis a fruktóz katabolizmusában az ENTNER–DOUDOROFF-út nem vesz részt, és csupán a glükóz degradációját szolgálja. A vizsgálatok arra utalnak, hogy e szervezetnél a glükóz és a fruktóz katabolizmusa az ENTNER–DOUDOROFF- és egy módosított EMBDEN–MEYERHOF-úton egymástól funkcionálisan elkülönülnek.

E megállapításokat tekintve a legszembetűnőbbnek látszik az a tény, hogy egy baktériumban két olyan cukor, mint a glükóz és a fruktóz, melyek annyira hasonlítanak egymáshoz, két különböző anyagcsereúton, az EDP-n és az EMP-n át degradálódnak. E két cukor lebontásánál észlelt eltérések oka a fruktóznak F-6-P helyett F-1-P-vé történő foszforilációjában keresendő. Ha a fruktóz F-6-P-n át katabolizálódna, úgy feltételezhetően a foszfoglükóz-izomeráz révén az F-6-P és a G-6-P elég hatékony egyensúlyba kerülhetne ahhoz, hogy mind a fruktóz, mind a glükóz degradációja ugyanazon az úton menjen végbe. A hexózmolekuláknak a különböző anyagcsereutakra történő irányításánál a foszfoglükóz-izomeráz kulcshelyzetet foglal el. A *Rhodopseudomonas capsulatá*ban a fruktóznak F-1-P-vé alakítása az EMP funkcionális elkülönülését eredményezte az EDP-től.

A glükóz és a fruktóz katabolizmusának útjait a *Rhodopseudomonas capsulatá*ban így vázolhatjuk fel:



A kihúzott vonal arra utal, hogy az enzimaktivitás kimutatható volt. A szaggatott vonal jelzi, hogy az enzimaktivitás vagy nagyon alacsony volt, vagy ki sem lehetett mutatni. Az enzimek: *a)* PEP-fruktóz-PTS, *b)* fruktokináz, *c)* foszfofruktomutáz, *d)* 1-foszfofruktokináz, *e)* 6-foszfofruktokináz, *f)* fruktóz-1,6-difoszfatáz, *g)* fruktóz-1,6-difoszfát-aldoláz, *h)* glükokináz, *i)* foszfoglükóz-izomeráz, *k)* glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, *l)* 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz, *m)* 6-foszfoglükonát-dehidratáz, *n)* 2-keto-3-deoxi-6-foszfoglükonát-aldoláz.

1.14.11. Az anaerobok világa

Mielőtt az oxidatív légkör kezdeti méreteiben kibontakozott volna, vagyis több mint 2 milliárd évvel ezelőtt, az anaerob, heterotróf, fermentáló baktériumok számtalan típusa, azóta rég kiveszett faja létezhetett már. Közöttük nagyfokú differenciálódás mehetett végbe egyrészt az erjesztésekhez felhasznált szén-, ill. energiaforrások tekintetében, másrészt a különböző anaerob miliőkhöz való adaptációjukat illetően. A legősibb fermentálók, több mint 3,6 milliárd éve, természetesen még abiotikus úton képződött redukált szénvegyületeket erjesztettek. Később a fermentált szerves anyagok már elsősorban biológiai eredetűek lehettek és főleg az anaerob fotoszintetizálók állították elő őket. A fermentáció első típusai feltehetően egyszerűek voltak és az ismertetett STICKLAND-reakcióhoz hasonló mechanizmusok szerint zajlottak le. Az EMBDEN–MEYERHOF-úthoz kapcsolódó erjesztések, bár ezek is rendkívül ősiek, csak később fejlődhettek ki. Az oxidatív légkör megjelenésekor a fermentálók nagyon visszaszorulhattak, és elterjedésükben főleg a még fennmaradt anaerob régiókra (iszapokra stb.) korlátozódtak. Mindemellett fejlődésük még ezután is tovább tartott, egészen a mai napig, minthogy a kibontakozó magasabb rendű élővilág, elsősorban is a növényzet által kifejlesztett újabb és újabb szerves struktúrák anaerob degradációjához, módosított fermentatív anyagcsereutak adaptálásával alkalmazkodtak. A mai obligát fermentálók tehát korántsem azonosak az ősiekkel. Megjegyzendő, hogy az obligát fermentálók egyeduralma már az ősi reduktív légkörben megszünhetett. Minden valószínűség szerint ugyanis már az új légkör beköszönte előtt az anaerob légzők, így pl. a nitrátlégzők a szerves anyagok hatékonyabb degradációjában igen fontos szerepet játszhattak. Az obligát fermentálók és az anaerob légzők számarányának alakulásáról a prekambrium folyamán, sajnos nincsenek tárgyi bizonyítékaink.

1.14.12. Az ún. „hiányos oxidáció"

Az erjedés különböző típusainak tárgyalásakor feltétlenül el kell különítenünk az ún. „hiányos" vagy nem teljes oxidáció válfajait. Ezek során a mikroba környezetébe elégtelenül lebontott szerves anyagokat (ecetsavat, a citrát-ciklus különböző savait stb.) bocsát ki. Ez tapasztalható pl. oxigén jelenlétében is, amikor a mikroba bizonyos enzim vagy enzimek elégtelensége következtében egyes, egyébként tipikus anyagcsere-köztitermékeket már nem képes tovább oxidálni. Néha egyesek az ilyen folyamatokat következetlenül „aerob fermentációnak" jelölik meg. Az ecetsavas baktériumok, ha tenyészeteikbe primer vagy szekunder alko-

holokat juttatnak, úgy azokon ipari fontosságú oxidációkat hajtanak végre. Így etanolból ecetsavat, izopropanolból acetont, glicerinből dihidroxi-acetont, szorbitból szorbózt, mannitból fruktózt stb. állítanak elő és halmoznak fel. Az *Acetobacter*ek azonban semmiképpen sem anaerob fermentálók. Sőt ellenkezőleg, fermentálni képtelen, tipikus légzési anyagcseréjű, obligát aerobok, melyek terminális elektronakceptora az oxigén.

Azzal, hogy a hiányos vagy nem teljes oxidációkat a gyakorlatban „fermentációnak" jelölik, egy általánosan elfogadott, ugyanakkor pongyola nomenklatúra is kialakult. Laboratóriumokban vagy üzemekben az aerob mikroszervezeteket átlevegőztetett „fermentorokban" tenyésztik, az ezekből nyert tenyészfolyadékot „fermentlének" nevezik stb. Így „fermentáltatják" az obligát aerob *Streptomyces*eket antibiotikum, aminosav, vitamin stb. termelésére. Hasonlóan a szteroid vegyületek mikrobiológiai átalakítására (leggyakrabban a β-helyzetű hidroxilcsoport bevitele a 11-es szénatomra vagy a Δ^1-es kettős kötés létrehozása) az oxigénigényes törzseket „fermentorokban" tenyésztik. Az *Aspergillus niger* törzsekkel citromsavra és glükonsavra, a *Gibberella fujikuroi*val gibberellinekre „fermentálnak". „Fermentorokat" használnak az iparban különböző enzimkészítmények mikrobiológiai előállítására: amilázt *Bacillus*okkal, *Clostridium*mal, *Aspergillus niger*rel; pektinbontó enzimeket penészgombákkal; invertázt élesztőkkel; aszparaginázt az *E. coli*val; cellulázt penészgombákkal és baktériumokkal; sztreptokinázt a *Streptococcus haemolyticus*szal stb.

1.15. Az energiaszerzés és -konzerválás anyagcsereútjainak differenciálódása

Az energiaszerzés és -konzerválás különböző típusú mechanizmusainak evolúciója valójában teljesen párhuzamosan haladt az élővé válás és a primitív élőlények biokémiai differenciálódása evolúciós folyamataival. A lehetséges legősibb energiaszerző és -konzerváló mechanizmusokat kutatva korábban feltételezték, hogy a szubsztrátszintű foszforilációt követően az ATP szintézisét eredményező elektrontranszport-foszforiláció elsőnek a kemotróf (kemoorganotróf) anaerob szervezetekben jelenhetett meg. Ma már bizonyítékaink vannak, hogy az energiakonzerválás eme módja szigorúan anaerob foto- és kemolitotróf baktériumokban is a legősibb időkben kifejlődhetett (Koch, 1985.*b*.).

Az evolúció útjai a baktériumoknál csakúgy, mint a magasabb rendű szervezeteknél is, igen tekervényesek lehettek. Először is nem lehet vitás, hogy még a ma élő legprimitívebb anaerobok sem azonosak 3 milliárd

évnél idősebb őseikkel. Egy keveset minden anaerob szervezet „modernizálódott". Másodszor, egyes anaerob baktériumokról ma már úgy tudjuk, hogy fakultatív anaeroboktól származnak, melyek kizárólagosan anaerob környezetben tevékenykedve, végül is elvesztették azt a korábban már egyszer megszerzett képességüket, hogy az oxigént elektronakceptorként hasznosítsák. Ezért ezek anyagcseréjét tanulmányozva, evolúciójukra csak a legnagyobb óvatossággal következtethetünk.

Az energiaszerzés és -konzerválás mechanizmusainak fejlődését tárgyalva, először is a redoxipotenciál fogalmával, majd az ATP-rendszer sajátosságaival foglalkozunk. Ezután az energetikai anyagcsere feltételezett evolúcióját és a citokróm-c molekulacsaládot mutatjuk be.

1.15.1. Az oxidációs–redukciós (O/R)- potenciál fogalma

Biológiai rendszerekben az energiaelőállítás és -konzerválás az elektronoknak egyik vegyületről a másikra történő átvitele alkalmával vagy valamilyen módon ezen átvitel közvetlen következményeként megy végbe. A donor oxidálódik, az akceptor redukálódik. Az egyes vegyületeket aszerint, hogy meghatározott körülmények között inkább elektrondonorként vagy -akceptorként szerepelnek-e, bizonyos tendencia jellemzi. Ezt a tendenciát a vegyület sajátos elektródpotenciálja vagy oxidációs–redukciós *(O/R)*-potenciálja fejezi ki. A negatívabb potenciálú vegyületek a pozitívabb potenciálúakkal összekerülve az elektrondonor szerepére hajlamosak. Az elektron tényleges átadása ilyenkor energialeadással jár együtt. Ennek a leadott energiának a mennyiségét a két vegyület potenciálja közötti különbség határozza meg. Az O/R-potenciál kifejezését szolgáló standard alapját a hidrogénelektródának pH = 0 esetén önkényesen nullában megállapított feszültségértéke képezi, amikor a hidrogén a következő egyenletnek megfelelően, 50%-ban ionizált állapotú:

$$\tfrac{1}{2}H_2 \rightleftharpoons H^+ + e^- \quad (E_0' = -420 \text{ mV})$$

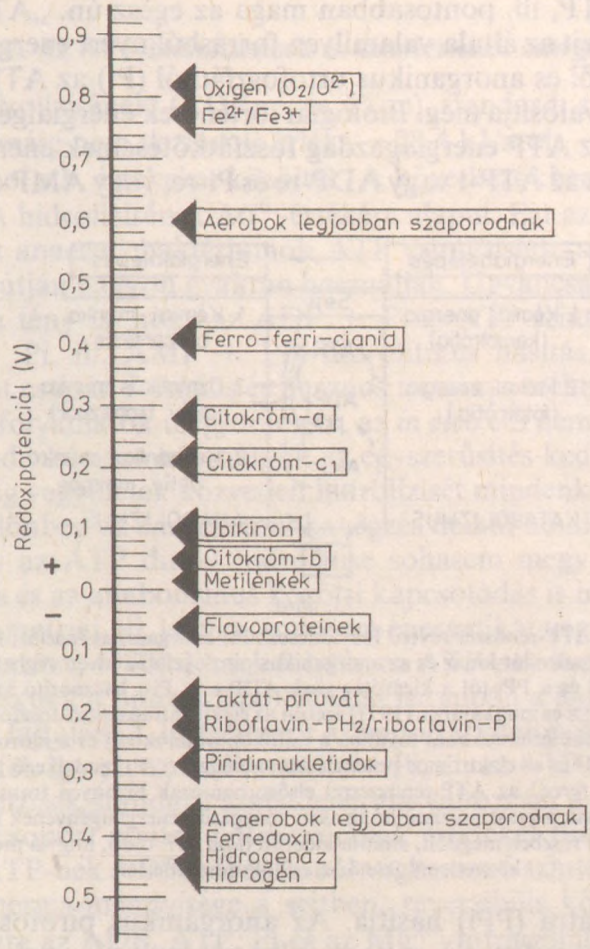
Az *O/R*-potenciált, szokásosan, mint E_0'-t fejezik ki, mely pH = 7,0 esetén a félig redukált rendszer potenciálja. Az E_0' a hidrogénelektróda esetében −420 mV. A skála másik végén az oxigén redukciójának E_0' értéke +820 mV.

$$O + 2e^- \rightleftharpoons O^{2-} \quad (E_0' = +820 \text{ mV})$$

Ha két vegyület között, melyek potenciálkülönbsége 100 mV, elektronpár adódik át, úgy a leadott energia 19,26 kJ, ill. 4600 cal/mol. Minthogy egy nagy energiájú foszfátkötés, legalább 29,31 kJ, ill. 7000 cal/mol energiát képvisel, ezért a donor és az akceptor között csaknem

200 mV potenciálkülönbségnek kell lennie ahhoz, hogy oxidáció alkalmával egy nagy energiájú foszfát képződéséhez elegendő energia szabadulhasson fel.

A *74. ábra* tájékozódásul különböző vegyületek redoxipotenciál értékeit hasonlítja össze.

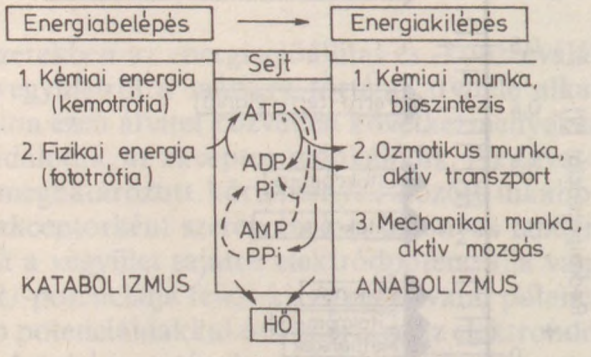


74. ábra

A redox-skála. pH = 7,0 esetén az oxidációs–redukciós potenciál −0,4 és +0,8 V között változik. A metilénkék a nulla alatti értékeknél válik színtelenné. A skálán néhány biológiailag fontos vegyület annál a potenciálnál szerepel, melynél félig oxidált, félig redukált állapotban van jelen. A redoxipotenciál–különbség a szabadenergia mértéke. A hidrogén és az oxigén közötti potenciálkülönbség 0,81–(−0,42) = +1,23 V, ami −238,65 kJ, ill. −57 kcal/mol szabadenergiának felel meg. A redukált NAD potenciálkülönbsége az oxigénnel szemben +1,12 V, ami már kevesebb (−217,71 kJ, ill. −52 kcal) szabadenergiának felel meg. Ez az energiaérték egy lépésben még mindig túl magas az ATP-szintézishez, ezért energiarészletekre kell tagolódnia

1.15.2. Az ATP-rendszer

A baktériumok anyagcseréje, miként valamennyi élő sejté, lévén nyílt rendszer, állandó anyag- és energiaforgalommal jellemezhető. Minden sejt rendelkezik olyan rendszerrel, mely a felvett kémiai energiát biológiailag hasznosítható energiává alakítja és az utóbbit munkavégzésre fordítja. A „biológiai energia" univerzális molekuláris akkumulátora és szállítója az ATP, ill. pontosabban maga az egész ún. „ATP-rendszer" *(75. ábra)*. A sejt az általa valamilyen forrásból nyert energia felhasználásával ADP-ből és anorganikus ortofoszfátból (Pi) az ATP endergonikus szintézisét valósítja meg. Biológiai történések energiaigényének fedezésére ezután az ATP energiagazdag foszfátkötéseinek energiájából merít. Ezenközben az ATP-t vagy ADP-re és Pi-re, vagy AMP-re és anorganikus pirofoszfátra (PPi) hasítja. Az anorganikus pirofoszfatáz és az adenilát-kináz minden élő sejtben jelen vannak, és ezek az enzimek biztosítják, hogy az AMP és a PPi a katabolizmus csupán ADP-t és Pi-t hasznosító folyamataihoz kapcsolódhassanak (THAUER és munkatársai, 1977):



75. ábra

Energiaátalakítás az ATP-rendszer révén. Rövidítések: Pi: anorganikus foszfát; PPi: anorganikus pirofoszfát; – – →: Az adenilát-kináz és az anorganikus-pirofoszfatáz révén végbemenő összeköttetést jelzi az AMP-től és a PPi-től a kizárólag csak ADP-t + Pi-t hasznosító katabolizmus felé. Egyesek, így pl. THAUER és munkatársai (1977) szerint az elektrontranszport-foszforiláció mechanizmusával rendelkező baktériumokban, továbbá a mitokondriumokban és a kloroplasztiszokban a pH-gradienssel (Δ pH) és az elektromos potenciálkülönbséggel ($\Delta\Psi$) rendelkező „protonmozgató-erő" *(proton motive force)* az ATP-rendszerrel elsősorban csak bizonyos transzportfolyamatok energizálásában, és nem a bioszintézisek és az aktív mozgások energiaigényének fedezésében lehet ekvivalens. Ez a nézet részben megdőlt, amióta kiderült (*lásd* 207. old.), hogy a protonmozgató-erő közvetlenül felelős a csillók mozgatásáért

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + Pi \qquad \Delta G^{0'}_{obs} = -31{,}8 \text{ kJ/mol}$$

$$ATP + H_2O \longrightarrow AMP + PPi \qquad \Delta G^{0'}_{obs} = -41{,}67 \text{ kJ/mol}$$

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2\ ADP \qquad \Delta G^{0'}_{obs} \approx +0 \quad kJ/mol$$

$$PPi + H_2O \longrightarrow 2\ Pi \qquad \Delta G^{0'}_{obs} = -21{,}92\ kJ/mol$$

Megjegyzés: $\Delta G^{0'}_{obs}$ = a reakciók szabadenergia-változása 10^{-3}M szabad Mg^{2+}-koncentráció, 0,25 ionerősség és pH 7 esetén.

1.15.3. Az ATP hidrolízisének és szintézisének energetikája

Az ATP hidrolízisének (ADP-re és Pi-re) standard szabadenergiája ($\Delta G^{0'}_{obs}$) mindmáig nem tisztázott érték: −28,4 kJ/mol; −31,80 kJ/mol; −36,57 kJ/mol stb. értékeket közöltek. A következőkben használt érték az acetil-CoA hidrolízisének $\Delta G^{0'}$-értékére alapul. Ezt az energiagazdag vegyületet az anaerob baktériumok ATP szintézisére, szubsztrátszintű foszforiláció útján nagyon gyakran használják. Ugyancsak megjegyzésre érdemes az a tény is, hogy az ADP + Pi → ATP-szintézis és az ATP → ADP + Pi, ill. AMP + PPi hidrolitikus hasítás fogalmai nem egyebek, mint csupán formális és hasznos terminus technikusok, melyeket összetett folyamatok megjelölésére, az *in vivo* elő nem forduló hidrolízisre és kondenzációra használunk az egyszerűsítés kedvéért. A sejt az energiagazdag vegyületek közvetlen hidrolízisét mindenképpen megakadályozza, különben az energia munkavégzés nélkül hő alakjában veszne el. Minthogy az ATP direkt hidrolízise sohasem megy végbe, ezért a katabolizmus és az anabolizmus közötti kapcsolódás is inkább jellemezhető sztöchiometriai, ill. kémiai, mintsem energetikai vagy fizikai alapon (Banks és Vernon, 1970). Ennek folytán az ATP-nek és más energiagazdag vegyületeknek a hidrolízispotenciálja is csupán a kémiai reaktivitás egy bizonyos fajtájának, legtöbbször a csoportátviteli potenciál mértékének fogható fel. Így pl. az ATP → ADP + Pi, ill. az ATP → AMP + PPi irányú hidrolízisek standard szabadenergia-változásai a foszforcsoport, ill. az adenilcsoport átviteli potenciáljának mértékét tükrözik.

Egy mol ATP-nek ADP-ből és Pi-ből végbemenő szintéziséhez szükséges szabadenergia-mennyisége a sejtben, reverzíbilis körülmények között, többnyire az ADP, ATP, Pi és az Mg^{2+} intracelluláris koncentrációitól és a pH-tól függ. Teljes biztonsággal e paraméterek egyike sem ismert. Szaporodó anaerob baktériumokban az ATP és az ADP koncentrációja átlag kb. 2 mM, ill. 1 mM. Az aerob *Bacillus cereus* sejtjeiben a magnéziumionok koncentrációja 6 mM és ez az érték független a tenyészközeg Mg^{2+}-szintjétől (Schmidt és munkatársai, 1971). Az *E. coli*ban a Mg^{2+} intracelluláris koncentrációja 10^{-6} M és 10^{-2} M között ingadozik és követi a Mg^{2+} -ionoknak a táptalajon belül változó tö-

ménységét. Az anaerob baktériumok intracelluláris foszfátkoncentrációiról nincsenek értékelhető adataink. A *Streptococcus faecalis*ban az intracelluláris foszfátkoncentráció, a fermentált energiahordozó szubsztráttól függően 6 és 60 mM között ingadozik. Ami az anaerob baktériumok intracelluláris pH-értékeit illeti, ezek a tenyészközeg pH-értékeitől is függenek és szervezetről szervezetre is változnak. A legalacsonyabb pH-t a *Clostridium pasteurianum*ban mérték: pH = 6,0. A legmagasabb értéket a *S. faecalis*ban találták: pH 8,5. Ezeket a paramétereket figyelembe véve az ATP-hidrolízis szabadenergiája megközelítően −43,9 kJ/mol (pH 7,0-nél), −41,8 kJ/mol (pH 6,0-nál), és −50,2 kJ/mol (pH 8,5-nél).

1.15.4. Az ATP-rendszer egyensúlya

Valamely anaerob baktérium szaporodó kultúrájában 1 g (nedves súlyú) sejt szintézise alkalmával általában kb. 20 nmol ATP fogy, míg az ATP intracelluláris koncentrációja kb. 2 mM (2×10^6 nmol). Nyilvánvalóan az ATP-rendszernek csupán katalitikus szerepe van. A sejttömeg egyszeri megduplázódása alkalmával ugyanis az ATP megközelítően 10 000-szer forgalmazódik (THAUER és munkatársai, 1977).

Az ATP-rendszernek a mindenkori ATP-előállítói és -fogyasztói reakciók közötti kinetikai egyensúly állapotában kell lennie. A kisebb kapacitású folyamatok a sejtszaporodás sebességét korlátozó faktorokká lépnek elő. Az aerob szervezeteknél általában az anabolizmus, míg az anaeroboknál a katabolizmus a szaporodás sebességének korlátozója.

Az anyagcsere-folyamatok energiaátalakításaiban az adenilátrendszer katalitikus szerepe az ATP-fogyasztás és -regenerálás szoros koordinálását igényli. Az ún. adenilát-energiaterhelés [(ATP + 0,5 ADP)/(ATP + ADP + AMP)] nagyon különböző táplálkozási körülmények esetén is meglehetősen konstans marad (DECKER és PFITZER, 1972; DIETZLER és munkatársai, 1974).

1.15.5. Az energiakonzerválás és -hasznosítás hatékonysága

Az energia konzerválása a katabolizmus folyamatai során, miként annak hasznosítása az anabolizmus alkalmával, sohasem 100%-os hatékonyságú. Az átalakításra kerülő energia egy része hő alakjában mindig veszendőbe megy. Az anaerob baktériumokban 1 mol ATP szintéziséhez ADP-ből és Pi-ből, az intracelluláris pH-tól függően −41,8 és 50,2 kJ/mol közötti energia szükséges. Ennek következtében valamely katabolikus folyamatnak ahhoz, hogy foszforilációval kapcsolódhasson, e két ener-

giaérték közötti szabadenergia-változással kell együtt járnia. Ezek is csupán akkor elegendőek, ha az ATP-előállító folyamat teljesen reverzíbilis, vagyis ha a rendszer nagyon közel vagy éppen egyensúlyi helyzetben van:

$$S \rightarrow P \qquad \Delta G = -43{,}9 \text{ kJ/mol}$$

$$ADP + Pi \rightarrow ATP + H_2O \qquad \Delta G = +43{,}9 \text{ kJ/mol}$$

$$S + ADP + Pi \rightarrow P + ATP \qquad \Delta G = 0 \text{ kJ/mol},$$

ahol P: reakciótermék; S: szubsztrát. Az ilyen idealizált *in vitro* folyamatok termodinamikai hatékonysága (ζ) 100%:

$$\zeta = \frac{n \times \Delta G(ATP \rightarrow ADP + Pi)}{\Delta G(S \rightarrow P)} \times 100\%,$$

ahol n a reakció során előállított ATP mennyisége molokban. Ismeretes, hogy a mitokondriumokban az elektrontranszport-foszforiláció során az ATP-szintézis teljesen reverzíbilis. A membránkötődésű ATP-ázok (ATP-szintetázok) az áramló protonok energiájával ADP-ből és Pi-ből ATP-t szintetizálnak, de szükség esetén az ATP hidrolízisének energiájával protonkoncentráció-gradienst is előállítanak. Számos enzim, melyek az anaerob baktériumokban a szubsztrátszintű foszforiláció útján ATP szintézisében vesznek részt, ugyancsak teljesen reverzíbilis folyamatokat katalizálnak. Sok adat utal arra, hogy számos, az energiakonzerválásban közvetlenül részt vevő reakció az egyensúlyi állapothoz nagyon közel megy végbe, vagyis, hogy az ATP szintézisének (ADP-ből és Pi-ből) a termodinamikai hatékonysága az energiakonzerváló reakciókban megközelítheti a 100%-ot (THAUER és munkatársai, 1977).

1.15.6. Az élő rendszerek energiagazdálkodása

Az élő sejtek – mint láttunk – nyílt rendszerek. Az élet irreverzíbilis folyamat. Alapvető tény, hogy valamely egyensúlyi állapotú rendszer környezetén képtelen munkát végezni. A rendszer reakciói tehát legalább részben irreverzíbilisek kell hogy legyenek. Az ATP-fogyasztó folyamatokról (anabolizmus) tudjuk, hogy általában teljesen irreverzíbilisen haladnak; a szerves anyag szintézisének átlagos termodinamikai hatékonysága kevesebb, mint 10%. Ennek folytán elméletileg, az energiakonzerválásban részt vevő, akár valamennyi reakció (nem csupán azok, amelyek a foszforilációhoz közvetlenül kapcsolódnak), közel vagy éppen az egyensúlyi állapot közelében működhetne anélkül, hogy a szervezet

ennek következtében elveszítené munkaképességét. Az energiakonzerválás ilyen típusú anyagcseréjét azonban nem lehetne szabályozni, mint ahogy a reakciókat sem. Márpedig a szabályozás itt is nélkülözhetetlen, mivel az élő sejt számára nemcsak az a fontos, hogy ATP egyáltalán szintetizálódjon, hanem az is, hogy megfelelő időben, mennyiségben és a szükséges sebességgel jöjjön létre. Ez talán a legdöntőbb oka annak, hogy fiziológiai körülmények között a legtöbb szervezet általános energiaelőállítási és -konzerválási anyagcseréjének is legalább egy, általában azonban több mint egy reakciója ugyancsak irreverzíbilisen halad. Példa erre a glikolízisben a hexokináz-, a foszfofruktokináz- és a piruvátkináz-reakció, továbbá a respirációs láncban a citokróm-α_3 oxidációja oxigénnel. Következésképpen, az energianyerő és -konzerváló anyagcsere-folyamatoknak, vagyis az ATP szintézisének termodinamikai hatékonysága is mindig jelentősen 100% alatt van.

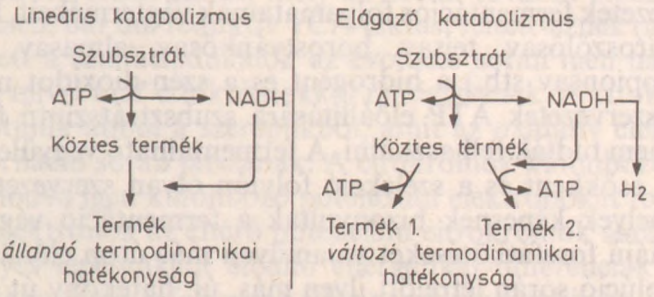
Az ATP-képzés és az ehhez a folyamathoz járuló energiaszolgáltató reakciók sztöchiometriai kapcsolódása, az energiatranszfer meglehetősen merev „kvantizációját" mutatja, amennyiben energiakonzerválásra, vagyis egy nagy energiájú foszfátkötés kialakításához csupán −41,8 és −50,2 kJ/mol közötti energia hasznosíthatódhat. A lényegesen kevesebb energiát felszabadító, exergonikus folyamatok valójában az általánosságban vett hatékonyságot csökkentik. Ez a megállapítás érvényes az erősen exergonikus reakciók e két energiaértéket meghaladó energiafrakciójára is (pl. piruvát-kináz-reakciók és a foszfoketoláz-reakciók).

1.15.7. Hol lehet az energiagazdálkodás hatékonyságának felső határa?

Az élő szervezetek anyagcsere-folyamatai hatékonyságának felső határát elméletileg még nem számították ki. A tapasztalat azonban azt mutatja, hogy a folyamatok összességére vonatkoztatva, a 80%-nál (a *Proteus rettgeri* piruvát-fermentációja) magasabb értékek nagyon valószínűtlenek. Az anaerobok többsége 25–50% közötti hatékonysággal dolgozik. A termodinamikai hatékonyság még oxigénnel mint elektronakceptorral és működő elektrontranszport-rendszerrel sem nagyon javul (pl. glükóz fermentációja tejsavvá [ζ = 44%]; a glükóz respirációja szén-dioxiddá [ζ = 59%]), míg maga az ATP-nyereség (g = a metabolizált szubsztrát moljaira előállított ATP molokban) rendkívüli mértékben megnő (glükózfermentáció [g = 2]; glükózrespiráció [g = 38]).

1.15.8. Lineáris és elágazó katabolizmus

A legtöbb szervezet energianyerő és -konzerváló anyagcseréje konstans ATP-bevétellel járó, lineáris katabolikus folyamatokkal jellemezhető *(76. ábra)*. Példák erre az aerob respiráció és a tejsavas homofermentáció. E folyamatok termodinamikai hatékonysága gyakorlatilag változatlan. Számos anaerob baktérium energetikai anyagcseréje azonban elágazó *(lásd 76. ábra)*, mikor is az egyes ágak eltérő ATP-nyereséggel és az ATP-szintézis eltérő termodinamikai hatékonyságával jellemezhetők. A termékek előállítását az egyik ágon az ATP-szintézis nagyon magas,



76. ábra

Az ATP-szintézis konstans termodinamikai hatékonyságával jellemezhető lineáris és a változó hatékonyságú, elágazó katabolizmus összehasonlítása

míg a másik ágon csak alacsony vagy éppen nulla termodinamikai hatékonysága jellemezheti. A két részfolyamat viszonylagos rátái úgy illeszkednek, hogy az általános ATP-nyereség és az ATP-szintézis termodinamikai hatékonysága optimálisak legyenek. Ilyen elágazó katabolikus folyamatoknak jó példái a *Clostridium kluyveri* etanol-acetát-fermentációja, a *C. pasteurianum* glükózfermentációja, a *Lactobacillus casei* glükózfermentációja stb.

1.15.9. Az energetikai anyagcsere kibontakozása

Mai elképzeléseink szerint a legősibb, legprimitívebb mikroorganizmusok több mint 3 és fél milliárd évvel ezelőtt anaerob, szaprofita, fermentáló szervezetek lehettek, melyek anyag- és energiaforrásai nem biológiai úton keletkezett, nagy szabadenergia-tartalmú vegyületek voltak. Az 1970-es évek derekára az összehasonlító biokémia bizonyítékaira támaszkodva, a prokarioták prekambriális evolúciójának főbb irányvonalai már feltárultak előttünk. A biológiai fejlődésnek ezt a számunkra még

nem is olyan régen teljesen ismeretlen, de rendkívül hosszú időt igénybe vett szakaszát az alábbiak szerint foglalhatjuk össze (*lásd a 4. táblázat*ot is):

1. *Ősi anaerob heterotrófok* megjelenése. Ezek ATP-t vagy kizárólag, vagy elsősorban is szubsztrátszintű foszforilációval állíthattak elő. Az abiotikus úton szintetizált szerves vegyületeket fermentálták. E mikrobákból közvetlenül fejlődhettek ki a mai modern *Clostridium*ok egykori ősei. Ebben az időben az anaerob heterotrófok már számos energiagazdag vegyület fermentációjára specializálódhattak. E vegyületek között a cukrok tölthettek be fontos szerepet, melyek különben a Föld primitív atmoszférájának redukáló gázaiból abiotikus úton keletkezhettek. E primitív szervezetek fermentációs folyamatainak végtermékeit, így a szerves savakat (piroszőlősav, tejsav, borostyánkősav, almasav, hangyasav, ecetsav, propionsav stb.) a hidrogént és a szén-dioxidot más hasonló fejlettségű szervezetek ATP előállítására szubsztrátszintű foszforiláció révén már nem tudták felhasználni. A fermentálható vegyületek mennyisége lassan csökkent és a szelekció folytán olyan szervezetek kerültek előtérbe, melyek képesnek bizonyultak a fermentáció végtermékeiből nagy energiájú foszfátkötéseket valamilyen más úton előállítani.

2. Az evolúció során létrejött ilyen más, új, hatékony út az *elektrontranszporttal összekötött foszforiláció* volt. A ma érvényes modellek szerint az elektrontranszport-foszforiláció keretében az energiagazdag szerves tápszubsztrátokról származó hidrogének, ill. elektronok a citoplazmamembránba épült elektronszállítókra, mint amilyenek pl. a citokrómok is, kerülnek. A továbbiakban ezek során áthaladva, végül is valamilyen anorganikus terminális elektronakceptort redukálnak, miközben egyre alacsonyabb szintű energetikai állapotra süllyednek és fokozatosan szabaddá vált energiájuk a protonkoncentráció-gradiensben raktározódik, ami viszont ATP szintézisét teszi lehetővé (részleteket *lásd* 490. old.).

Valójában az őskörnyezet bizonyos vegyületei redukálódhattak az oxidálandó szubsztrát rovására. A reduktív légkör idején elektronakceptornak alkalmas, oxidált vegyületek a mikrobáknak nem valami nagy számban állhattak rendelkezésére, mégis valószínűnek tartják, hogy egy bizonyos mennyiségű szén-dioxid, szulfát és nitrát feltétlenül jelen kellett, hogy legyen. Az adaptív differenciálódás ebben az időben a mikroorganizmusoknak három csoportját teremtette meg, melyek e vegyületeket terminális elektronakceptorként hasznosították:

a) A szén-dioxid-redukálók (metántermelők) csoportja: ezek ősi típusú, szigorúan anaerob szervezetek, melyek metánt nagyon különböző utakon állítanak elő. Ezen utak között a legegyszerűbb és valószínűen kvantitatíve a legfontosabb a hidrogéngáz oxidációja (amit az anaerob,

kemolitotróf *Methanobacterium* valósít meg). Ezenkívül hangyasavat, ecetsavat, propionsavat is lehet metánképződéssel oxidálni. Bár a ma élő ilyen típusú szervezetek (*lásd* 335. old.) már rendelkeznek elektrontranszport-mechanizmussal, sejtjeikben az elektrontranszport legjellegzetesebb szállítóit, a citokrómokat még nem sikerült kimutatni.

b) Szulfátredukálók (kén-hidrogén-termelők): az anaerob, kemoorganotróf *Desulfovibrio* és *Desulfotomaculum* fajok sejtjei néhány szubsztrátnak, így a tejsavnak, piroszőlősavnak és az almasavnak az oxidációjához SO_4^{2-}-ot használnak terminális elektronakceptor minőségében (anaerob respiráció). Az oxidáció csak ecetsavig megy előre, mivel ezekben a szervezetekben citrát-ciklus, mely az acetát további oxidálását biztosítaná, nincsen, bár ún. reduktív TCA-ciklust feltételeznek (*lásd* később). Mindemellett a szulfátredukálók az evolúció során igen nagy haladást tettek meg, mivel már citokrómokkal rendelkeznek. A citokrómok fontossága előtűnik abból a szerepükből, amit az oxidatív elektrontranszport-foszforiláció során játszanak. A citokrómok különböző proteinekhez kapcsolódva igen különböző potenciálú elektronokat foghatnak fel. Midőn az elektronok az eltérő potenciálú citrokrómok során átáramlanak, az egyes lépésenként előálló energetikai differenciák elegendőek lehetnek ahhoz, hogy a folyamat, ugyancsak lépésenként a „protonmozgató-erő" kialakítása révén, áttétellel foszforilációhoz kapcsolódjék. A *Desulfovibrio* talán a legprimitívebb citokrómmal rendelkező mikroorganizmus.

c) Nitrátredukálók: ma már nem tudjuk megmondani, hogy az egykori primitív időkben nitrátokkal milyen szubsztrátok oxidálása mehetett végbe és ugyanekkor milyen redukált termékek keletkezhettek. A jelenben ugyanis a nitrátok nitritekké, ill. nitrogéngázzá történő redukálása révén csaknem minden redukált szénvegyületet el lehet oxidálni (nitrátrespiráció). A ma élő, aerob baktériumok nagyon sok faja a szénvegyületek normális oxidációjához alternatív elektronakceptorként az oxigén mellett nitrátokat használ. Ezek az aerobok már egy sor citokrómmal rendelkeznek és számos szerző felfogása szerint az első nitrátlégzőkben fejlődhettek ki az első összetett citokrómrendszerek is. Minthogy az ősi primitív atmoszférában oxigén még nem volt jelen, ezért ez akkor az elektronakceptor szerepét sem tölthette be, s így azok a szervezetek, melyek elektronakceptorként a nitrátokat használták, feltehetően a későbbi aerobok előfutárai voltak.

Minthogy nem ismeretes, hogy azokban a régi időkben mennyi szén-dioxid, szulfát vagy nitrát állt a mikrobák rendelkezésére, így ma azt sem tudhatjuk, hogy e három mikrobacsoport külön-külön milyen mértékben járulhatott hozzá az ősi bioszféra szerves anyagainak oxidációjához, vagyis az ősi anyagkörforgalomhoz. Valószínű, hogy a szerves anyagok

mennyisége sem lehetett sok, és azt tömegében főleg szerves savak alkothatták. Az organikus anyagokon kívül mint legfontosabb vegyületek a hidrogén, metán, kén-hidrogén, nitrogéngáz és redukált nitrogénvegyületek lehettek még jelen. A további oxidációs folyamatok elé, minthogy a rendelkezésre álló oxidánsok mennyisége csekély vagy gyakorlatilag zéró volt, nagy akadályok gördülhettek és ennek folytán már csak kevés ATP-t lehetett szintetizálni. A természetes szelekció ekkor ismét olyan újabb fajok megjelenésének kedvezhetett, melyek számára az ATP előállításának más, „modernebb" mechanizmusai álltak rendelkezésre. Ez vezetett el a fotoszintetizálók megjelenéséhez.

3. *Autotrófok* azok a szervezetek, melyek növekedésükhöz és szaporodásukhoz mint egyedüli szénforrást, szén-dioxidot igényelnek. A prokariota autotrófoknak három osztályát különíthetjük el: **A)** Anaerob fotoszintetizálók (anaerob fotolitotrófok). **B)** Aerob fotoszintetizálók (aerob fotolitotrófok), és **C)** Kemolitotrófok (litotróf vagy kemoautotróf baktériumok), melyek szervetlen vegyületeket oxidálnak. Egyesek feltételezik, hogy az evolúció során ebben a sorrendben jelentek meg. Ez a feltételezés valószínűen csak a kemolitotrófok többségére helytálló, mivel egy kis csoportjuk, a legprimitívebbek (pl. a *Methanobacterium*ok) éppen a legelső, legősibb autotrófok lehettek.

Miután az őskörnyezetben a szulfát, a nitrát stb. mennyisége fokozatosan csökkent, megjelentek az első anaerob, fényenergia-hasznosító baktériumok és velük a ciklikus fotofoszforiláció is, továbbá a szerves szénvegyületek fotoasszimilációjának (*lásd* 351. old.) lehetőségei. Az ATP előállításához szükséges energiát már ezeknél is főleg a fotonok szolgáltatták. Az ilyen típusú mikrobákból később a valódi, ún. fotolitotróf autotrófok jöhettek létre, melyek fényenergiával fejlesztett protonmozgató erővel ATP-t szintetizáltak, ezzel a redukálóképességet (NADH; elektronforrása elsősorban is kén-hidrogén volt) biztosították és mindkettővel az ugyancsak kifejlesztett CALVIN-ciklusban szén-dioxidot fixáltak és redukáltak. Feltehetően azonban az ilyen mikrobák szaporodását, a redukált kénvegyületeknek mint a redukálóképesség előállításához szükséges elektrondonoroknak a korlátozott jelenléte szabhatta nagyon szűkre. Ez az újabb környezeti stressz viszont még sokkal közönségesebb előfordulású elektronforrások hasznosítása irányába terelhette az evolúciót.

4. A cianobaktériumok további szelekciója a víz mint a legközönségesebb elektrondonor fotolízisére képes, oxigént termelő, fakultatív aerob fotoszintetizálókat hozott létre, melyek a légköri szén-dioxidot a vízből származó elektronokkal redukálták, miközben évmilliók alatt kialakították az oxidatív légkört.

5. Ezt követően az *aerob heterotrófok széles körű kibontakozása* indult

meg, melyek a szerves vegyületek elégetéséhez a korábban már megszerzett elektrontranszport-rendszereket oxigénnel mint terminális elektronakceptorral kombinálták, ami az ősi protonhajtó-erőre alapuló ATP-szintetáz-rendszerrel még hatékonyabb energiakihasználást tett lehetővé.

6. A *légköri oxigén megjelenése* az aerob kemolitotróf autotrófok evolúciója előtt is szélesre tárta a kaput. Ezek a redukált szervetlen vegyületeket (kén-hidrogén, dihidrogén, ferro-vas, nitrit, ammónia, tioszulfát, kén stb.) oxigénnel mint elektronakceptorral oxidálták, és az így nyert energiával ATP-t szintetizáltak. Egyidejűleg ugyanazt az elektrondonort használva, fordított elektrontranszporttal a redukálóképesség kialakulását biztosították, amivel a CALVIN-ciklusban szén-dioxidból energiagazdag redukált szerves anyagokat termeltek. Az ilyen mikrobák tehát időben a cianobaktériumokat feltétlenül csak követték és nem előzték meg.

1.15.10. Citokróm típusú elektronszállítók szerepe az energiaszerzés evolúciójában

Az előbbiekben felvázolt és nagy vonalakban ma is érvényesnek tekintett prekambriális fejlődésmenetet a citokróm-c evolúciójának tanulmányozása (DICKERSON, 1980) teljesen új megvilágításba helyezte. A DICKERSON-i fejlődésmenet (*lásd* 275. old.) ismertetése előtt azonban a jobb megértés kedvéért itt előbb általánosságban a citokrómokkal, majd közelebbről a citokróm-c-vel foglalkozunk.

A citokrómok univerzális elektronszállítók és az élők világában csaknem mindenütt megtalálhatók, prokariotáknál és eukariotáknál egyaránt, akár a respiráció, akár a fotoszintézis elektrontranszport-rendszereiről legyen is szó. A citokróm-c hem-protein, melyben a vastartalmú hemcsoportot egy 82–134 aminosav alkotta fehérje veszi körül. A fotoszintézis vagy a légzés elektrontranszportláncának alacsony szabadenergiájú végéhez közel az elektronvetélő szerepét tölti be. Ez az eukarioták légzési láncában elektronokat, néhány más citokrómot, vas-kén proteineket és lipideket tartalmazó citokróm-reduktáz komplextől fogad el, és a citokróm-oxidáz-komplexnek adja tovább, mely az elektronokkal az oxigént vízzé redukálja. Ezek az elektronok végső soron a NADH-ról jönnek, mely a glikolízis és a citromsavciklus során termelődik. Annak az 53 kcal-nak (221 kJ) a segítségével, mely NADH-molonként a

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$$

reakcióban felszabadul, a légzési elektrontranszport-foszforiláció során

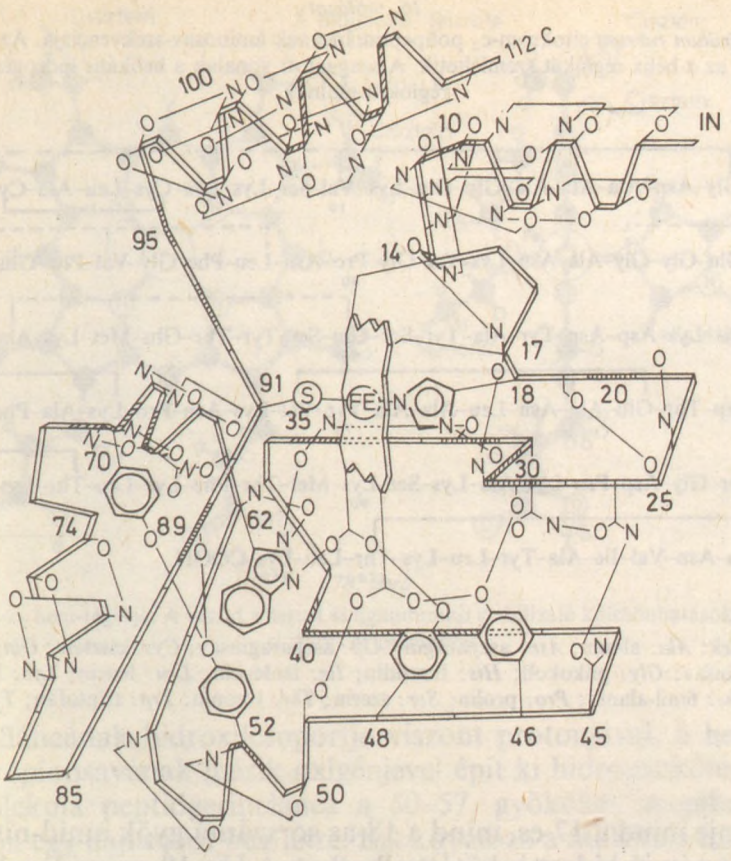
ADP-ből és Pi-ből 3 ATP szintézise megy végbe (*lásd* 273. old.). A citokróm-c megtalálható mind az oxigénnel, nitráttal vagy szulfáttal légző baktériumokban, és kimutatható a pro- és eukarioták fotoszintetikus elektrontranszportláncában is. A fotoszintetizáló prokariotáknál tekintet nélkül arra, hogy ezek egyetlen fotorendszerrel rendelkeznek-e vagy kettővel, mint a cianobaktériumok, mindenütt előfordul. Röntgensugár-struktúranalízis segítségével derítették fel, hogy a baktériumok különböző csoportjaiból származó citokróm-c típusú molekulák fehérjefrakciója lényegében azonos módon hajtogatott, és legfeljebb a molekula felszínén észlelhető, pluszként megjelenő peptidlánckacsok vagy ezeknek éppen a hiánya az, ami közöttük a szerkezetben némi különbséget okoz. Ezek az azonos módon gyűrt citokróm-c molekulák, rokon proteinek szorosan összetartozó csoportját alkotják tekintet nélkül arra, hogy az az elektrontranszportlánc, melyből származnak, fotoszintézis, légzés, esetleg mindkettő kivitelezésében működött-e közre.

A citokróm-c struktúrája és működése szoros kapcsolatának illusztrálására a *Rhodospirillum rubrum* elektrontranszport-rendszerének citokróm-c_2 komponensét mutatjuk be.

1.15.11. A *Rhodospirillum rubrum* citokróm-c_2 komponensének szerkezete

A *Rhodospirillum rubrum* citokróm-c_2 komponense volt az első, prokariota szervezetből izolált és leírt c-típusú citokróm. A *R. rubrum* a fotoszintetizáló, nem kén bíborbaktériumok közé tartozik, mely anaerob körülmények között, ciklikus fotofoszforilációs elektrontranszportlánc működésére alapított fotoheterotróf életmódot folytat, míg sötétben, oxigén és redukált szerves anyagok jelenlétében, ATP előállítására oxidatív elektrontranszport-foszforilációt használ. Ez a szervezet mindkét esetben nagy mennyiségű citokróm-c_2-t állít elő, melynek megközelítően 70%-át a sejt citoplazmafrakciójából mutatták ki. A fennmaradó rész a membránfrakcióhoz kötődik, ahol mind az oxidatív, mind a fotoszintetikus elektrontranszportban szerepet játszhat. A fotoszintetikus elektrontranszportláncban mint a bakterioklorofill elsődleges elektrondonora ismert.

A citokróm-c_2-t egyetlen, 112 aminosavból felépített polipeptidlánc és egy ehhez kovalensen kötött protohem IX alkotja *(77. ábra)*. A polipeptidlánc aminosav-szekvenciáját a *16. táblázat*on mutatjuk be. Molekulasúlya 12 480. E protein $E_{m,7}$-értéke + 320 mV. Minthogy az eukarioták citokróm-c komponensével alapvető strukturális és szekvenciahomológiát mutat, a citokróm-c_2 háromdimenziós felépítésének a c-típusú citokrómok evolúciója szempontjából megkülönböztetett jelentőséget tulajdonítunk (Salemme és munkatársai, 1973).



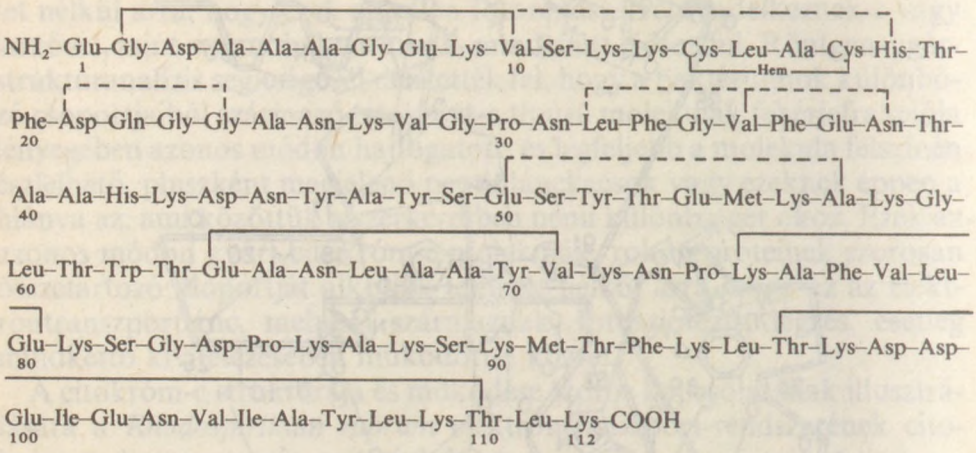
77. ábra

A citokróm-c_2 molekula sematikus vázlata, mely a hidrogénkötések révén kialakult kölcsönhatásokat is szemlélteti. A „hem-hasadék"-ot határoló gyökök árnyékolva (SALEMME és munkatársai, 1973)

A citokróm-c_2 molekulája megközelítően ellipszoid alakú, $25 \times 33 \times 40$ Å mérettel. Sematikus vázlatát, különös tekintettel a kovalens és a hidrogénkötések kialakította kölcsönhatásokra, a *77. ábra* mutatja be. A *78. ábra* a hem-régiót szemlélteti. A polipeptidlánc a molekula felső, jobb oldalán kezdődik és a 10. gyökig bezáróan, szabályos α-hélixszel indul. Ezután egy, még a 14. gyököt is magába foglaló hajtűkanyart ír le, miáltal a lánc az α-hélix struktúrából egy sokkal kiterjedtebb konformációba megy át. A 14-es és 17-es sorszámú ciszteinek a hemhez kovalensen kötődnek. Ezek tioéter-kötések (R_1–S–R_2), melyek az oldalláncok tiolcsoportjai és a hem vinilcsoportjai (CH_2═CH—) között kondenzációval jönnek létre. Az itt elhelyezkedő gyökök rövid hajlatot alakítanak ki. Ennek keretében a Cys 14. karbo-

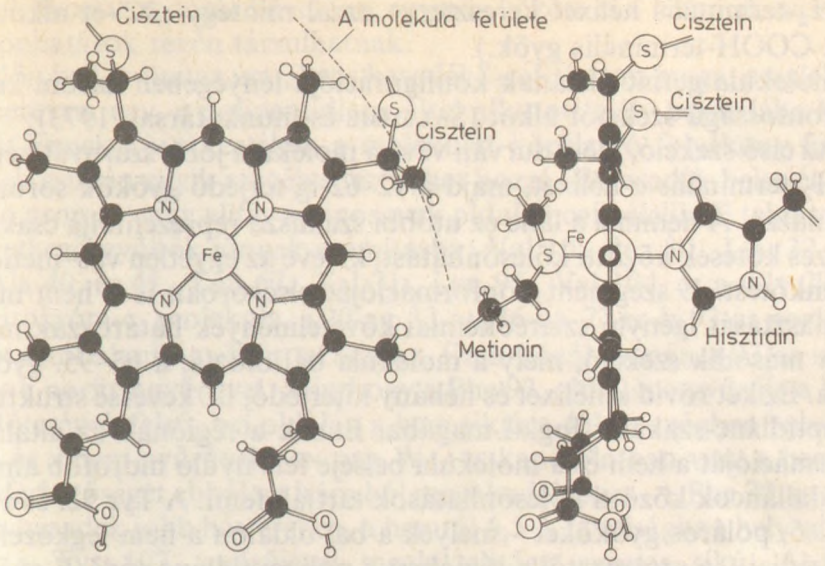
16. táblázat

A *Rhodospirillum rubrum* citokróm-c_2 polipeptidláncának aminosav-szekvenciája. Az összefüggő vonalak az α-hélix régiókat szemléltetik. A szaggatott vonalak a helikális hidrogénkötéses régiókra utalnak



Rövidítések: *Ala:* alanin; *Asn:* aszparagin; *Asp:* aszparaginsav; *Cys:* cisztein; *Gln:* glutamin; *Glu:* glutaminsav; *Gly:* glikokoll; *His:* hisztidin; *Ile:* izoleucin; *Leu:* leucin; *Lys:* lizin; *Met:* metionin; *Phe:* fenil-alanin; *Pro:* prolin; *Ser:* szerin; *Thr:* treonin; *Trp:* triptofán; *Tyr:* tirozin; *Val:* valin.

nil-oxigénje mind a 17-es, mind a 18-as sorszámú gyök amid-nitrogénjével egyformán jó hidrogénkötést alkothat. A His 18-as imidazol-N ε 2-je a hem vasatomjával az ötödik koordinatív kötést (komplex kötés, a komplex vegyületek központi ionja és a ligandumok, vagyis az ion által koordinált molekulák vagy ionok között) hozza létre. A soron következő 18–49. sorszámú gyökök kanyarulatok sorát képezik és együttesen a molekula jobb alsó oldalát alakítják ki. Ennek a szakasznak nincs szabályos kiterjedésű hidrogénkötésű struktúrája. E régióban a Gly 24. és Asp 21., a Val 35. és Leu 32., továbbá az Asn 38. és Val 35. között van hidrogénkötés. Ezenkívül a Gly 29. amidjától a Cys 17. karbonilja felé, a Thr 19. oldalláncának hidroxilcsoportjától az Ala 25. karbonil-oxigénje felé és a 31-es, 26-os és 45-ös sorszámú aszparaginok oldalláncainak amidjai között „lánc közötti" hidrogénkötések alakulnak ki. Ez a szakasz több gyököt is tartalmaz, melyek a hemhez hidrogénkötéssel kapcsolódnak. A Tyr 46. hidroxil-oxigénje vagy a Val 28. karbonil-oxigénjével, vagy a hem frontális része propionsavcsoportja egy oxigénjével képezhet hidrogénkötést. A Tyr 48. hidroxilcsoportja a hem hátulsó propionsav-csoportjával hidrogénkötés révén tart összeköttetést. A Ser



78. ábra

A citokróm-c_2 hem-régiója. A vázlat a hemet és ligandumait stabilizáló kölcsönhatásokat szemlélteti. Elöl- és oldalnézet

49. oldalláncának hidroxilcsoportja viszont protonjával, a hem elülső oldali propionsavának másik oxigénjével épít ki hidrogénkötést.

A molekula peptidgerinclánca a 50–57. gyököket magába foglaló szakaszon egy hajlatpárt hoz létre. Ezt követően a molekula hátoldalán, egészen a Trp 62-ig, egy felszálló ág alakul ki. A Trp 62. indol-nitrogénje a hátsó propionsavcsoport egy oxigénatomjával hidrogénkötést épít ki.

Így tehát a 14–62-es sorszámú gyökök alkotta polipeptidlánc-szakaszt a kötések közötti kölcsönhatások kiterjedt hálózata tartja össze és ez a szakasz egyúttal mintegy templátul szolgál a hem alátámasztására. Ennek a régiónak, az elektronsűrűségi térképek adatai alapján, bizonyos fokú „merevséget" tulajdoníthatunk.

A 64–71. gyökök újra szabályos α-hélixet formálnak, mely a hemet magába fogadó „hasadékhoz" balközépen csatlakozik. A Pro 74-nél a polipeptidlánc éles fordulatot vesz közvetlenül azt megelőzően, hogy a 75–80. gyökökből egy újabb rövid α-hélix alakul ki. Ezután a lánc a Pro 85-ig kanyargó lefutású. Itt ismét irányt változtat, felfelé emelkedik, szétterjedő konformációjúvá válik és a hem-hasadék bal oldalán, a 95. gyöknél, a molekula legkiemelkedőbb pontját éri el. A Met 91. kénatomja a hem vasatomjával a hatodik koordinációs kötést alakítja ki (a vasion maximális koordinációs száma: 6). A 96–110. jelzésű gyökök szakasza ismét szabályos α-hélix, mely már a molekula hátterébe kerül, miközben

az NH_2-terminális hélixet keresztezve azzal mintegy „X"-et alkot. (A 112. a COOH-terminális gyök.)

A molekula gerinclláncának konfigurációja lényegében három kardinális fontosságú szekciót alkot (SALEMME és munkatársai, 1973):

1. Az első szekció, mely durván véve a molekula jobb szárnyát képezi, az NH_2-terminális α-hélixet, majd a 12–62-ig terjedő gyökök sorozatát tartalmazza. A hemmel a lánc ez utóbbi szakasza reprezentálja csaknem az összes kötések közötti kölcsönhatást, kivéve az egyetlen vas–metionin 91. kénkötést. E szegment konformációját elsősorban is a hem merev alátámasztását igénylő sztereokémiai követelmények határozzák meg.

2. A második szekció, mely a molekula bal oldala, a 63–95. gyökök régiója. Ez két rövid α-hélixet és néhány kiterjedő, ill. kevéssé strukturált polipeptidlánc-szakaszt foglal magába. Ennek a régiónak az általános konformációját a hem és a molekula belseje felé nyúló hidrofób aminosav-oldalláncok közötti kölcsönhatások tartják fenn. A Tyr 52. és a Tyr 70. belső, poláros gyököket – melyek a bal oldalon a hem legközelebbi szomszédjai – a szolvenstől e régióban a polipeptidlánc védi. E gyökök fontosságát különösen hangsúlyozza közelségük a hemhez, a Met 91-gyel való kölcsönhatásuk és a citokrómban végbemenő elektrontranszport mechanizmusában játszott szerepük (*lásd* később).

3. A lánc harmadik szekciója a COOH-terminális α-hélix, mely a molekula legfelső részét balról jobbfelé haladva keresztezi és amelynek a 64–71. α-hélixszel, a hemmel és az NH_2-terminális hélixszel kialakított kölcsönhatása hidrofób természetűnek látszik.

Összefoglalóan tehát megállapítható, hogy bár a molekulában számos, lokális hidrogénkötésű struktúra van jelen, mégis az általános konformációt meghatározó leglényegesebb tényezők a hemmel kialakított kötések és hidrofób kölcsönhatások.

Feltételezhető, hogy a citokróm-c_2 molekulája sajátosan gyűrődött (a fent leírt módon redőzött) struktúrájának kialakulási folyamatában a legkorábbi történések közé a lánc helikális régióinak spontán kondenzációja tartozik. Ugyanebben a stádiumban alakulhat ki a 11–18. gyökök elrendeződése is. A következő lépés már a hem csatlakozása (a protohem IX vinilcsoportjainak kondenzációja a ciszteinoldalláncokkal), továbbá a hisztidin koordinációja lehet a hem vasatomjával (a hem ötödik koordinációs pozíciójának ligációja a hisztidinoldallánc imidazol–Nε2 nitrogénatomja révén). Ezután kialakulnak a hem propionsav-oldalláncaihoz fűződő hidrogénkötések a Tyr 46., Tyr 48., Ser 49., és talán még a Trp 62. gyűrű nitrogénatomja és a His 42-nél egy főlánc amid részvételével. Ezt követően a molekula jobb oldali, terjengős láncának szerkezetképzésére és annak stabilizálására kerülhet sor. A lánc négy α-helikális szakasza – melyek a molekula felső részét és bal felső oldalát alkotják – a lánc

megfelelő csavarodását követően, egymás között és a hemmel, hidrofób kölcsönhatások révén társulhatnak.

Külön kell szólni az ún. „hem-hasadék"-ról. A hem maga, meglehetősen mereven, egy, a polipeptidlánc által alkotott mély barázdába kényszerül. Ennek következtében a molekulát körülzáró folyékony fázis a hemnek csupán egyik szegélyéhez férhet hozzá. E hasadék belsejét elsősorban aromás vagy alifás aminosavak oldalláncai bélelik. E tekintetben a következő gyökök jönnek számításba: Val 10., Pro 30., Leu 32., Val 35., Ala 40. és 41., Leu 67., Val 71., Leu 95., Val 104. és a Gly 29.

A citokróm-c_2 molekula, a 20-as, 33-as, 36-os, 77-es és 93-as pozíciókban öt fenil-alanin-gyököt tartalmaz. Ezek közül csupán a 93-as szomszédos a porfiringyűrűvel. Minthogy a Phe 93. oldallánc-gyűrűje a hasadék előterének felső, bal oldalán a hem síkjára 45°-os szögben helyezkedik el és a hem-gyűrűvel VAN DER WAALS-kapcsolatban van, a hem-vas hozzáférhetőségét ebből az irányból megakadályozza. A Phe 20. gyűrűje a hem-hasadék jobb hátterében, a hemtől 6,5 Å távolságban helyezkedik el és a Tyr 107. gyűrűjével megközelítően azonos síkú. A fenil-alanin 77.10 Å távolságra fekszik a hem síkjától és a Trp 62. gyűrűjével megközelítően azonos síkú. E gyökök gyűrűinek kontaktusa VAN DER WAALS típusú.

A hem vasatomja a jobb oldalon a His 18-as imidazol-N ε2 nitrogénatomjával koordinálódik. Az imidazolgyűrű a hemre merőleges síkban orientált és azt egy a vasatom által meghatározott vonalon keresztezi. A metilén szénatomja a pirrolgyűrűket áthidalva, a polipeptidgerinchez a Cys 14-es és 17-es gyökeinél kapcsolódik. A His 18. gyűrűjét ebben az orientációban többek között az N δ1-ről a prolin 30. karbonil-oxigénjéhez fűződő hidrogénkötés rögzíti.

A vas hatodik koordinációs pozícióját a Met 91. kénatomja tölti be. A kénatomnak feltételezhetően tetraéderes kötéskonfigurációja van. Különösen fontosnak látszik megemlíteni, hogy a vas–kén koordinációs kötés nem pontosan merőleges a hem síkjára, hanem attól mintegy 0,5 Å-mel a hem-hasadék hátoldala felé hajlik el.

1.15.12. Az elektronátvétel és -átadás feltételezett mechanizmusa a citokróm-c_2-nél

Vonzó feltételezésnek látszik, hogy a tirozin 70-es gyöknek egy parciális negatív töltéssel rendelkező hidroxil-oxigénje és a metionin 91. kénatomja között, mely utóbbinak, a ferrivasatomnak tulajdoníthatóan, egy parciális pozitív töltése van, kölcsönhatás áll fenn. A vas három pozitív töltése közül kettőt a porfirin-dianion, mellyel társul, neutralizál és

emiatt a hem-vasnak nettó csupán egy pozitív töltése marad. Ez az egyetlen pozitív töltés az, mely a Met 91. kénatomjához parciálisan delokalizálódhat, és ezt követően a Tyr 70. hidroxil-oxigénje parciálisan negatív töltésével stabilizálódhat.

A citokróm-c_2 legfontosabb funkciója, hogy redukált alakjában a gerjesztett, membránkötődésű, pozitív töltésű bakterioklorofill-molekulának egy elektront ad át. Ez az elektron azután a fotoszintézis ciklikus elektrontranszportjában, az elsődleges fotoaktus során, magasabb energetikai állapotba jut. E téren mindjárt az első felmerülő kérdés, hogy vajon hol lehet a citokróm-c_2 molekula felületén az a hely, ahol a gerjesztett bakterioklorofill$^+$-molekulával kölcsönhatásba, érintkezésbe lép.

A citokróm-c_2 molekula strukturális sajátosságainak egyik legfeltűnőbbike a polipeptidgerinc és a hem közötti kötéses kölcsönhatások túlsúlya. Ezek a hemet helyzetében mereven rögzítik. Ami pedig az első pillanatban természetellenes konfigurációnak látszik, az hogy a gyűrű éppen hidrofób szegélyével néz a molekulát körülvevő oldat felé, míg a hidrofil propionsavláncok, a molekula számos belső poláros csoportjához hidrogénkötésekkel kapcsolódnak. Ebben a molekulatípusban a hem helyzete alapvetően különbözik attól, melyet az oxigénkötő hemproteinekben foglal el. Ezekben ugyanis a nem kovalensen kötött protohem IX propionsavcsoportjaival kinyúlik a külső térbe.

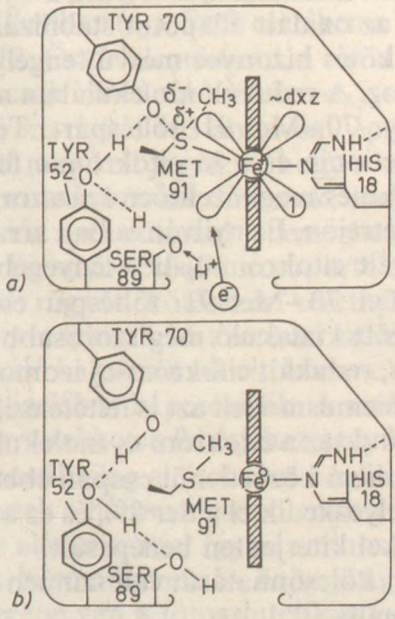
Az a tény, hogy a hem hidrofób szegélye a molekula felszínére kerül, arra utal, hogy az érintkezés helye a membránkötődésű klorofillmolekulával itt kell, hogy legyen. Feltehetően ez az érintkezés a klorofill feofitin- és a citokróm porfiringyűrűinek részleges egymásba ékelődésével mehet végbe. Ezt a feltevést támasztja alá a hem-hasadék kerületén elhelyezkedő külső aminosav-oldalláncok vizsgálatának eredménye is. Ezek a kifelé nyúló oldalláncok a hem-hasadék kerülete mentén úgy helyezkednek el, hogy velük egy megszakítatlan pozitív töltésmegoszlási övezet jön létre; e tekintetben a 98-as és 99-es aszparaginsavgyökök feltehetően mégis kivételt képeznek, ezek ugyanis a hem-hasadék külső csúcsánál egymás közelében lokalizáltak.

A lizinoldalláncok ilyen értelmű csoportosulása igen célszerűnek tekinthető, ha feltételezzük, hogy a bakterioklorofill-molekula a foszfolipidmembránban úgy foglal helyet, hogy fitololdalláncával a membrán hidrofób belsejébe ékelődik, míg magnézium-feofitingyűrűjével, legalábbis részben, exponálva van, továbbá, hogy a membrán felületét a membrán foszfolipid-komponenseinek negatívan töltött foszfátcsoportjai népesítik be. Vagyis a hem és a klorofillgyűrűk egymás mellé helyezkedését egy olyan orientációban, mely közöttük az elektrontranszportot is lehetővé teszi, a pozitívan töltött lizin ε-aminocsoportok és a negatívan

töltött membránkötődésű foszfátcsoportok közötti ionos kölcsönhatások stabilizálhatják.

Jóllehet még keveset tudunk a citokróm-c_2 *in vivo* redukciójáról, mégis jelen adataink alapján arra következtethetünk, hogy esetében mint fiziológiai reduktáns, mind a membránkötődésű citokróm-b, mind az ubikinon 50 egyaránt szerepelhet. A citokróm-c_2 kötődési helye, mind az oxidáció, mind a redukció során a molekula elején van.

A citokróm-c_2 molekula feltételezett általános oxidációs és redukciós mechanizmusa sémáját a *79. ábra* mutatja be. A *79. ábra: a* az oxidált állapotú citokróm-molekula központját szemlélteti a ferrihemmel. A Met 91. kénatomjának parciálisan pozitív töltése a Tyr 70. oxigénatomjának parciálisan negatív töltésével lép kölcsönhatásba, aminek az a következménye, hogy a kén lokalizációja nem esik egybe a tengellyel. A Tyr 70. oxigén a Tyr 52. hidroxil-oxigénjétől fogad hidrogénkötést, míg ez utóbbi viszont a hem-hasadék alsó, bal külső részén elhelyezkedő



79. ábra

A citokróm-c_2 oxidoredukciójának feltételezett mechanizmusa. *a)* A ferrihem régiója, melynek páratlan spinje az xz-síkban helyezkedik el. A vas töltésének stabilitását a Met 91. kén- és a Tyr 70. oxigénatom közötti töltéskölcsönhatás teszi lehetővé. Az oxidált állapot destabilizálása a Ser 89. protonációjától várható. *b)* A redukált molekulában feltételezett kölcsönhatások. A hem-vas töltésének elvesztése a Met 91. kén- és a Tyr 70. oxigénatomja közötti kölcsönhatás megszűnéséhez vezet. A Tyr 70. a Ser 89. protonációja révén hidrogénkötés-donorrá válik. A Met 91. kénatomja a redukált vassal a korábbinál erősebb kölcsönhatást alakít ki, aminek következtében a kén–vaskötés sokkal inkább axiális konfigurációt vesz fel (SALEMME és munkatársai, 1973)

Ser 89-től is fogad hidrogénkötést. A hem redukciója a citokróm-hem frontális, exponált szegélyéhez közeledő és azzal kölcsönhatásba lépő, pl. fémporfirinből elektrontranszferrel mehet végbe. A redukciós folyamatot egy a Ser 89. protonációjára képes kémiai csoport egyidejű közeledése segítheti elő. Ez a Ser 89, Tyr 52. és a Tyr 70. fent leírt hidrogénkötési módozatot a redukált állapotra jellemzőre tolná el, miáltal az oxidált hem destabilizálódhat és a redukció lehetőségei megnőnek.

A *79. ábra: b* a hemet már redukált állapotban szemlélteti. A vas nettó töltése most nulla. Ezáltal a Met 91. és a Tyr 70. közötti töltéspár-kölcsönhatás megszűnik, viszont a vas- és a Met 91. kénatom között sokkal erősebb kötés jön létre. A szerin 89. protonálódik a Tyr 52-től, ez viszont a Tyr 70-től fogad hidrogénkötést. A redukált hem újraoxidálása lényegében a redukciós folyamat megfordításával megy végbe. Ebben az esetben egy protonfelvevő csoport közeledése a Ser 89-hez elősegítheti az oxidációt, aminek révén a Tyr 70. oxigénje, az oxidált állapotot stabilizáló, parciálisan negatív töltést nyer.

Eszerint a feltételezett mechanizmus szerint, a Tyr 70. oxigén- és a Met 91. kénatom közötti, az oxidált állapotot stabilizáló töltéskölcsönhatás hozzájárul a kén-vas kötés bizonyos mérvű tengelyfeloldó (a tengelytől elhajló) orientációjához. A redukált molekulában a nettó vastöltés zéró, ami megszünteti a Tyr 70.–Met 91. töltéspárt. Ténylegesen sikerült is kimutatni, hogy a metionin és a ló citokróm-c ferrohem-oktapeptidje közötti koordinációs kötés megközelítően százszor erősebb, mint amely a ferrihem-peptiddel létrejön. Ez nyilvánvalóan arra utal, hogy a Met 91. kén-vaskötés a redukált citokróm-c_2-ben lényegében axiális kell, hogy legyen, mégpedig a Tyr 70.–Met 91. töltéspár elvesztése és a kén ↔ redukált hem-vas között kialakuló még szorosabb kölcsönhatás következtében. A kristályos, redukált citokróm-c_2 izomorf az oxidált alakkal.

E működési mechanizmusmodell azt is feltételezi, hogy mind a fiziológiás oxidáz, mind a reduktáz a citokróm-c_2 molekulának csakis az elülső részén hathat, mivel a hem közvetlenül csupán ebben a régióban hozzáférhető, továbbá itt helyezkedik el a Ser 89., és ez a régió a vonzó hatást gyakorló lizingyökökkel kiterjedten benépesült.

A citokróm és a P_{870} kölcsönhatását valószínűen a lizincsoport pozitív töltésmintázata dominálja.

1.15.13. A c-típusú citokrómok előfordulása és molekulaszerkezeti rokonsága

A citokróm-c háromdimenziós struktúráját már több, nagyon különböző rendszertani pozíciójú szervezet esetében is felderítették. Így lóból, halakból mint tonhalból és bonitóból, *Pseudomonas*ból, *Paracoccus*ból,

*Chlorobium*ból és *Rhodospirillum*ból. Közülük a *Pseudomonas*ban és a tonhalban a citokróm-c szigorúan respirációs, a *Cholorobium*ban szigorúan fotoszintetikus elektronszállító, míg a nem kén bíborbaktériumokban ugyanaz az elektrontranszportlánc és benne a citokróm-c_2, mind a fotoszintézisben, mind a légzésben egyaránt részt vesz. Mindezekben a citokróm-c-molekulákban a polipeptidlánc nagyon hasonló hajtogatottságú és bennük a hem körül az oldalláncoknak hasonló elrendeződése ismerhető fel, jóllehet a lánc felszíni görbületeinek kiterjedése részleteiben eltéréseket mutat. Valójában a citokróm-c molekulákat három természetes szerkezeti alcsoportba sorolhatjuk (DICKERSON, 1980):

1. *Rövid típusú,* kevesebb aminosavból felépült citokróm-c-k. Előfordulnak a *Pseudomonas*nál és a *Chlorobium*nál. Esetükben a láncnak egy bizonyos bazális hajlata hiányzik.

2. *Közepes típusú* citokróm-c-k. Ezt a típust megtalálhatjuk valamennyi eukariota sejt mitokondriumában.

3. *Hosszú típusú* citokróm-c-kben a peptidláncnak egy további kiegészítő hajlata ismerhető fel. Ilyen típus mutatható ki a *Paracoccus*ban (c_{550}) és a *Rhodospirillum*ban (c_2). Ezek esetében a láncba épült aminosavak száma 134, ill. 112. Összehasonlításul, a rövid típusú *Pseudomonas*-c_{551}-be 82, az ugyancsak rövid *Chlorobium*-c_{555}-be 86, végül a tonhal közepes típusú citokróm-c-jébe 103 aminosav épül be.

E helyen feltétlenül meg kell jegyezni, hogy a citokróm-c megjelölést csak azokra a hem-proteinekre alkalmazzuk, melyek redukált állapotban sajátos abszorpciós spektrummal jellemezhetőek. Ez a spektrum a hemen helyet foglaló bizonyos oldalláncccsoportokra és a hemet a proteinlánchoz kovalensen rögzítő kötésekre vezethető vissza. Nem valamennyi ilyen citokróm-c tekinthető azonban szükségszerűen rokonnak. Pl. egyes fotoszintetizáló baktériumok citokróm-c'-jében a hem a protein COOH-terminálisa közelében kapcsolódik. A szulfátlégző baktériumok citokróm-c_3-jában ugyanahhoz a fehérjéhez négy hemcsoport is kapcsolódik stb. Ezek filogenetikailag a citokróm-c-k fenti három alcsoportjával nem rokonok. Ennek a három alcsoportnak a közös eredetét viszont többféle bizonyíték is alátámasztja. Így az aminosav-szekvenciájuk nagy hasonlósága, sajátos háromdimenziós hajtogatottságuk és hogy valamennyinek közös szerepe van a fotoszintetikus vagy a légzési elektrontranszportlánc alacsony szabadenergiájú vége közelében.

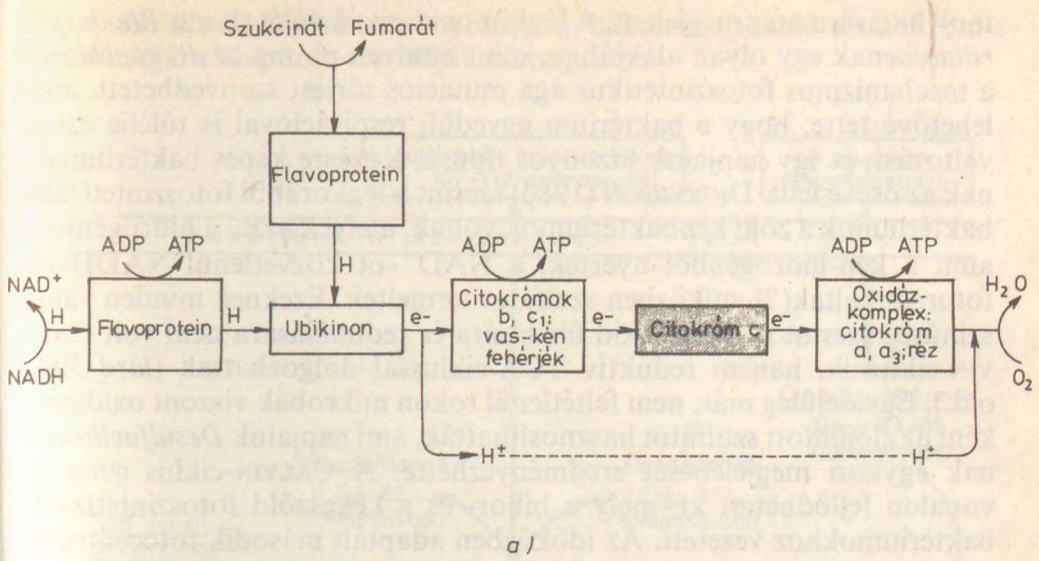
Nagyszámú szervezet (*Paracoccus, Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium, Rhodospirillum, Azotobacter, Anacystis, Euglena, Pseudomonas, Desulfovibrio* stb.) c-típusú citokrómjainak aminosav-szekvenciáit összehasonlítva (DICKERSON, 1980) arra a következtetésre jutottak, hogy a vizsgált molekulák sajátos háromdimenziós struktúrájának összehasonlítása inkább nyújt betekintést ezen különböző mértékben rokon protei-

nek hasonlósági viszonyaiba, mint az aminosav-szekvenciák analízise. Mindemellett, az utóbbiakból is érdekes következtetéseket lehetett levonni. Így pl. a *Pseudomonas aeruginosa* a c_{551} mellett még egy citokróm-c_4-et is tartalmaz, mely az elsőnél kétszer hosszabb és hozzá két molekula hem csatlakozik. A c_4 szekvenciájának mindkét fele más c-citokrómokhoz hasonló, ami arra utal, hogy e fehérjéhez vezető út először génduplikáció lehetett, majd ezt egy mutáció követte, mely a két gén közötti „stop"-jelzést törölte, aminek következtében a két szekvencia ezután már mint egyetlen folyamatos egység íródott át. A duplikáció nagyon régi lehet, minthogy a *Pseudomonas*nál a c_4 első fele sokkal inkább hasonlít a *Micrococcus*-c_{554}-énak szekvenciájához, mint ahogy saját másik feléhez.

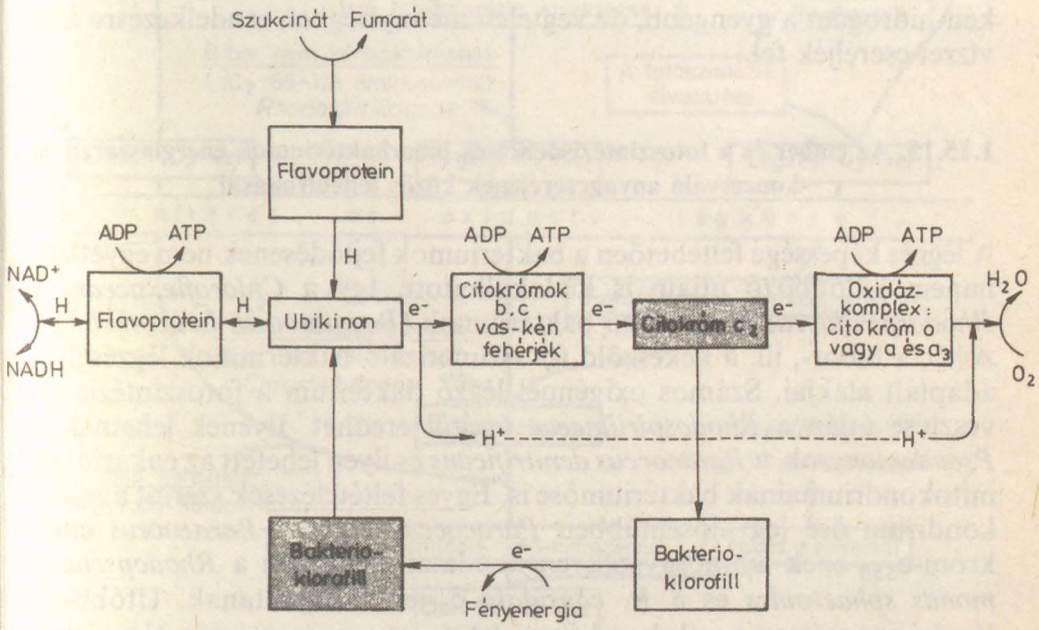
1.15.14. A bakteriális fotoszintézis és respiráció törzsfája

Az aminosavszekvencia-analízis eredményeire alapított hasonlósági mátrixot is figyelembe véve kétségtelen, hogy az 1–3 kategóriába sorolt citokróm-c-k, tekintet nélkül eredetükre és anyagcsere-funkciójukra, egyetlen, evolucionálisan rokon protein-molekulacsaládot alkotnak. Az a tény, hogy az elektrontranszportláncban ezeket a flavoproteinek, a kinonok, a vas-kén proteinek és a citokróm-b mindig megelőzik, másrészt utánuk következetesen citokróm-oxidáz vagy bakterioklorofill következik, azt is elárulja, hogy nemcsak ezek a citokrómok, hanem maguk az elektrontranszportláncok is, melyekbe be vannak épülve, ugyancsak rokonok, és végül, hogy a fotoszintézis és a légzés elektronláncai közös eredetűek. A *Rhodopseudomonas capsulata* elektrontranszportláncának egy része, beleértve a citokróm-c_2-t is, mind a légzésben, mind a fotoszintézisben részt vesz. A lánc alacsony szabadenergiájú végén a citokróm-c_2 elektronokat adhat át, akár a citokróm-oxidáz komplexnek, akár a bakterioklorofillnak *(80. ábra)*.

Valójában úgy néz ki, hogy ha a bakterioklorofillra haladó elektronáram–útszakaszt „töröljük", úgy egy olyan elektrontranszportlánccal állunk szemben, mely a mitokondrium légzési láncával azonos. Valószínű, hogy elsőnek bizonyos bíborkénbaktériumok *(Chromatiaceae)* őseiben fejlődhetett ki a redukáló ekvivalensek előállításának képessége szerves anyagokból. Ez őket a szulfidokhoz kötöttségtől szabadította fel, és így alakulhattak ki belőlük a nem kén bíborbaktériumok *(Rhodospirillaceae)*. Ez utóbbiak ősei közül egyesek a „légzést" valósították meg, amennyiben egy hem-proteint adaptáltak, mely az elektronok szállításában a fotoszintetizáló ágtól az oxigén felé hídként szerepelt. Ez kb. akkor történhetett meg, amikor a légkörben a szabad oxigén a cianobaktériu-



a)



b)

80. ábra

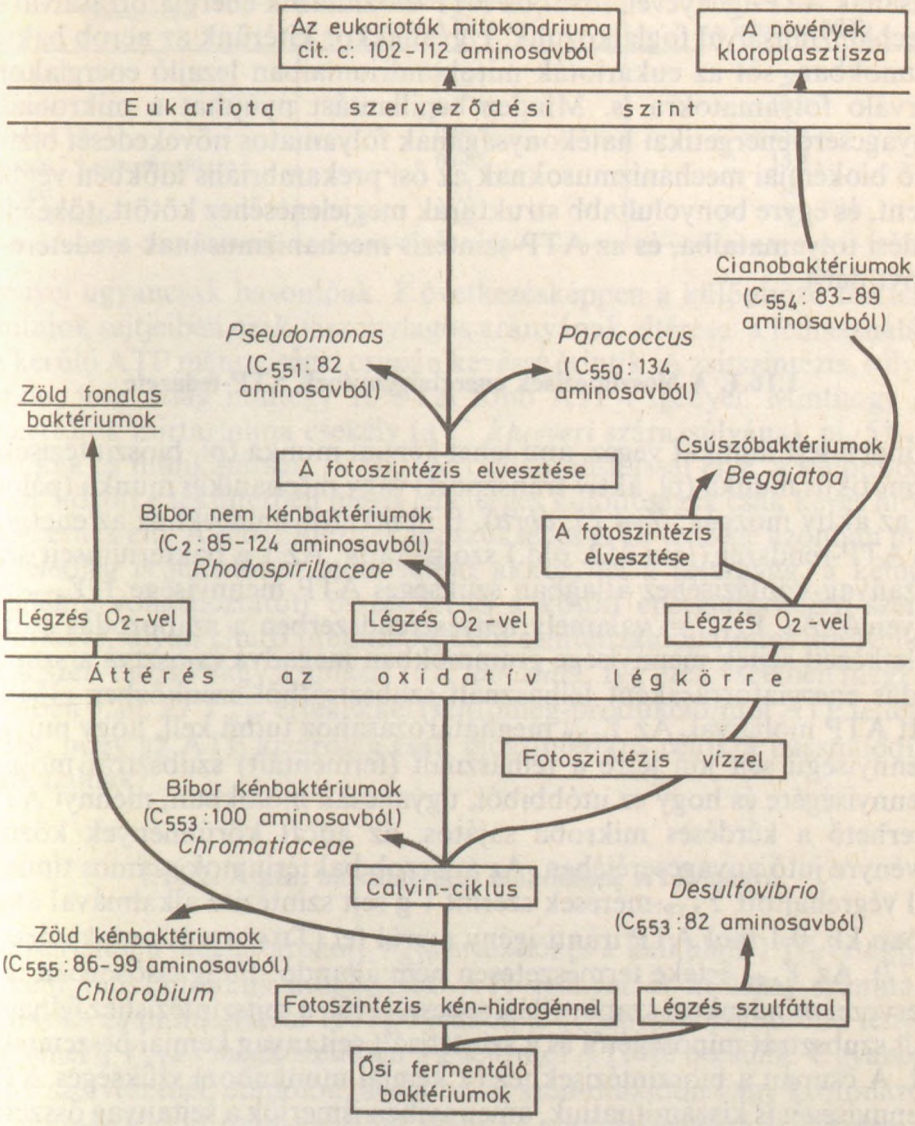
a) A mitokondrium légzési elektrontranszportlánca. Az energia kinyerése három lépésben történik. *b)* A *Rhodopseudomonas capsulata* (nem kén bíborbaktérium) egymásba épített fotoszintetikus és respirációs elektrontranszport-rendszere. Az elektronok a citokróm-c-ről (a körülményektől függően) mind a bakterioklorofillre, mind az oxigén felé a citokróm-oxidáz-rendszerre egyaránt juthatnak (DICKERSON, 1980)

mok hatására már megjelent. A légkör oxidatívvá válásakor a *Rhodospirillaceae*nak egy olyan alakjában, mint amilyen pl. ma az *R. capsulata*, a mechanizmus fotoszintetikus ága mutációs törlést szenvedhetett, ami lehetővé tette, hogy e baktérium egyedül, respirációval is túlélje ezt a változást, és így napjaink bizonyos típusú, légzésre képes baktériumainak az ősévé vált. DICKERSON (1980) szerint a legkorábbi fotoszintetizáló baktériumok a zöld kénbaktériumok voltak, melyek azzal a hidrogénnel, amit a kén-hidrogénből nyertek, a NAD^+-ot közvetlenül NADH-vá fotoredukálták(?), miközben szulfátot termeltek. Ezeknek minden valószínűség szerint a szén-dioxid fixálására és redukálására nem volt CALVIN-ciklusuk, hanem reduktív TCA-ciklussal dolgozhattak (*lásd* 399. old.). Egyidejűleg más, nem feltétlenül rokon mikrobák viszont oxidánsként az előállított szulfátot hasznosíthatták, ami napjaink *Desulfovibrio*inak egykori megjelenését eredményezhette. A CALVIN-ciklus azon a vonalon fejlődhetett ki, mely a bíbor- és a kékeszöld fotoszintetizáló baktériumokhoz vezetett. Az időközben adaptált második fotocentrum energiaellátása tette viszont lehetővé, hogy a cianobaktériumok ősei a kén-hidrogént a gyengébb, de végtelen mennyiségben rendelkezésre álló vízzel cseréljék fel.

1.15.15. Az ember és a fotoszintézisdeficiens bíborbaktériumok energiaszerző és -konzerváló anyagcseréjének közös jellemvonásai

A légzés képessége feltehetően a baktériumok fejlődésének nem egyetlen, hanem különböző útjain is kialakulhatott. Így a *Chloroflexaceae*, a *Rhodospirillaceae* és a csúszó baktériumok (*Beggiatoa* és *Leucothrix*), a zöld-, a bíbor-, ill. a kékeszöld fotoszintetizáló baktériumok légzéséhez adaptált alakjai. Számos oxigénnel légző baktérium a fotoszintézis elvesztése útján a *Rhodospirillaceae* őseitől eredhet. Ilyenek lehetnek a *Pseudomonas*ok, a *Paracoccus denitrificans* és ilyen lehetett az eukarioták mitokondriumainak baktériumőse is. Egyes feltételezések szerint a mitokondrium őse legvalószínűbben *Paracoccus* volt. A *Paracoccus* citokróm-c_{550}-ének aminosavszekvencia-adatai legjobban a *Rhodopseudomonas sphaeroides* és a *R. capsulata* c_2-jére hasonlítanak. Utóbbiak légzési apparátusa a mitokondriuméval mutat szoros relációt. Nem lehetetlen, hogy e két faj őseiben kereshetjük saját anyagcserénk őseit is. Ha ez igaz, akkor azt mondhatjuk, hogy az emberi anyagcsere a fotoszintézisdeficiens baktériumok leszármazottja! Arra a kérdésre, hogy a három citokróm-c alcsoport közül melyiket tekinthetjük a legősibbnek, azt mondhatjuk, hogy feltehetően a rövid típusúak lehetnek a citokróm-c-k közös ősei.

A *81. ábrán* DICKERSON nyomán a baktériumoknak a citokróm-c evolúciójára alapított törzsfáját mutatjuk be.



81. ábra

A bakteriális fotoszintézis és respiráció „nyomaira" alapított filogenetikai törzsfa. Eszerint a szulfátlégzés már nagyon korán a szulfáttermelő fotoszintézis hatására alakult ki. Az oxigénnel való légzés az oxigéntermelő fotoszintézis kibontakozása után jelent meg. Az oxigénes légzés a fotoszintetizáló baktériumok számos fejlődési vonalán egymástól függetlenül megjelent. Ezeknél egy hem-protein fejlődött ki, mely az elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszportlánctól a bakterioklorofill helyett az oxigén felé terelte

1.16. ATP-igény és ATP-szintézis. Evolúciós funkciócsere

Ebben a fejezetben a ma élő, elsősorban is anaerob szervezetek szaporodásának ATP-igényével, továbbá ATP-előállításuk energiaforrásaival és mechanizmusaival foglalkozunk. Ugyanakkor kitérünk az aerob baktériumokban, sőt az eukarioták mitokondriumaiban lezajló energiakonzerváló folyamatokra is. Mindez bepillantást nyújthat a mikrobiális anyagcsere energetikai hatékonyságának folyamatos növekedését biztosító biokémiai mechanizmusoknak az ősi prekambriális időkben végbement, és egyre bonyolultabb struktúrák megjelenéséhez kötött, tökéletesedési folyamataiba, és az ATP-szintézis mechanizmusának eredetére is fényt derít.

1.16.1. A bioszintézisek energiaigényének ATP-fedezete

Minden sejt munkát végez, ami lehet kémiai munka (pl. bioszintézisek), ozmotikus munka (pl. aktív transzport) vagy mechanikai munka (például az aktív mozgás; *lásd 75. ábra*). E munkafolyamatokhoz az energiát az ATP-rendszer (*lásd* 252. old.) szolgáltatja. Az 1 g baktériumsejt szárazanyag-szintéziséhez átlagban szükséges ATP mennyisége $1/Y_{ATP}$-vel egyenlő. Az Y_{ATP} = valamely tenyészrendszerben a szaporodás során keletkezett sejtek mennyisége grammokban megadva és osztva a szaporodás energiaforrásaként felhasznált szubsztrátból ezenközben előállított ATP moljaival. Az Y_{ATP} meghatározásához tudni kell, hogy milyen mennyiségű sejt jön létre a felhasznált (fermentált) szubsztrát molnyi mennyiségére és hogy ez utóbbiból, ugyancsak molokban, mennyi ATP nyerhető a kérdéses mikroba sajátos, az adott körülmények között érvényre jutó anyagcseréjében. Az anaerob baktériumok számos típusával végrehajtott Y_{ATP}-mérések szerint 1 g sejt szintézise alkalmával általában kb. 0,1 mol ATP iránti igény merül fel (THAUER és munkatársai, 1977). Az Y_{ATP} értéke természetesen nem állandó. Függ elsősorban is a szervezet mindenkori szaporodási sebességétől, a sejtszintézishez felhasznált szubsztrát minőségétől és a szintetizált sejtanyag kémiai összetételétől. A csupán a bioszintézisekhez (a kémiai munkához) szükséges ATP mennyiségét is kiszámíthatjuk, amennyiben ismerjük a sejtanyag összetételét és a sejtkomponensek előállításához vezető bioszintetikus utakat. Baktériumok szaporodó tenyészetei esetében (az aktív szaporodási fázis során) a sejtanyag turnoverétől eltekinthetünk, mivel ez az előállított ATP-nek csak igen kis frakcióját fogyasztja el. Ami a sejtanyag felépítésében részt vevő alkotóelemeket illeti, ezek a legtöbb mikrobában hasonlóak. Ezenkívül a fehérje-, az RNS- és a DNS-szintézis *de novo* ATP-

17. táblázat

A baktériumok szaporodása alkalmával végbemenő bioszintézisek ATP-igénye (THAUER és munkatársai, 1977)

Szénforrás	ATP-igény (mol ATP/g sejt)	Y_{ATP}^{max} (g sejt/mol ATP)
Glükóz	0,037	27
Laktát$^-$	0,075	13,4
Malát^{2-}	0,065	15,4
Acetát$^-$ + szén-dioxid	0,065	15,4
Acetát$^-$	0,1	10
Szén-dioxid	0,2	5

igényei ugyancsak hasonlóak. Következésképpen a különböző baktériumfajok sejtjeiben ezek viszonylagos arányának eltérései a felhasználásra kerülő ATP mennyiségét csupán kevéssé érintik. A zsírszintézis, súlyalapon, már átlag mintegy 10%-kal több ATP-t igényel. Minthogy az anaerobok zsírtartalma csekély (a *C. kluyveri* szárazsúlyának pl. 5%-a: DECKER és munkatársai, 1970), ezért általánosítással élve, a különböző fajok között e tekintetben mégis lehetséges különbségek csak kevés hibát idézhetnek elő. A bioszintézisekhez szükséges ATP összege azonban már elméletileg is jelentősen módosulhat akkor, ha a sejtanyag, a kémiai elemekre vonatkoztatott összetétel és a kötött energiatartalom szempontjából, olyan eltérő prekurzorokból szintetizálódik, mint amilyenek pl. a szén-dioxid vagy a glükóz *(17. táblázat)*. Így ezek esetében megközelítően 5, ill. 27 Y_{ATP}^{max} értékekkel (sejttömeg-produkció/mol ATP feltételezve, hogy az ATP kizárólag csak bioszintetikus célokra használódik) kalkulálnak.

1.16.2. A nem bioszintetikus működések ATP-igénye

A kísérletesen meghatározott Y_{ATP} értékből és a kalkulált Y_{ATP}^{max} értékből a nem bioszintetikus működések ATP-igényét is ki lehet számítani (THAUER és munkatársai 1977). Például, a *C. kluyveri* szaporodó tenyészeteinél a Y_{ATP}-t megközelítően 9 g sejt/mol ATP-re becsülik. Ugyanennél a szervezetnél, etanolon, acetáton és szén-dioxidon vagy krotonáton + szén-dioxidon mint egyedüli szén- és energiaforráson tenyésztve, a Y_{ATP}^{max} értéket 15,4-re kalkulálták. Így ennek a szigorúan anaerob baktériumnak a katabolizmusa során előállított ATP-ből megközelítően 50% másra, mint kémiai munkára használódott el. Az ATP-turnovernek ezt a frakcióját gyakran „fenntartási energiá"-nak *(maintenance energy)* nevezik. Ez a terminus azonban feltétlenül félrevezető, mivel ennek a

szabadenergia-kiadásnak a keretében nem csupán a sejtanyag turnoverének kompenzációja szerepel, hanem az aktív mozgás, továbbá az aktív szubsztrát- és iontranszport stb. energiaszükségletének fedezete is. A legtöbb, nem bioszintetikus célokra fordított ATP feltehetően a transzportfunkciókhoz, pl. ozmotikus munka végzéséhez szükséges. Az energiahordozó szubsztrátok felvétele a sejtnek valószínűen aktív munkát jelent, mikor is a transzport maga a felvett vegyület katabolizmusa alkalmával nyert szabadenergiának egy sztöchiometriásan arányos frakcióját igényli.

1.16.3. Elektrondonor és -akceptor reakciók

Az ADP-ből és a Pi-ből végbemenő ATP-szintézis energiaigényét általában – kevés kivétellel – redox folyamatok fedezik. Az ATP-képzéshez energiaszolgáltató folyamatokat mind a kemotróf, mind a fototróf szervezetekben mint elektrondonor és -akceptor reakciókat vagy elektronszállítókhoz kapcsolódó reakcióláncok exergonikus rendszerét tekinthetjük. E folyamatok donor része az elektronáramnak a donor szubsztráttól az első elektronszállítóig (a kemotrófoknál általában NAD) haladó útját tartalmazza. Az akceptor rész az áramnak az első elektronszállítótól a végső akceptorig vezető útja. A részreakciók mindkét csoportja ADP foszforilációjával kapcsolódhat. Az energiakonzerválás mechanizmusa azonban az elektrondonor és az elektronakceptor részfolyamatokban eltérő. ATP az elsőben szubsztrátszintű foszforiláció a másodikban elektrontranszport-foszforiláció révén képződik.

A tejsavas fermentáció során az elektrondonor részfolyamat a glükóz oxidálása két piruváttá, miközben – szubsztrátszintű foszforilációval előállított ATP-n kívül – négy hidrogén termelődik, mely azután az elektronakceptor részfolyamatok rendelkezésére áll, mikor is a két piruvátból két laktát lesz. A glükóz respirációs hasznosításakor az elektrondonor részfolyamatokban szubsztrátszintű foszforiláció megy végbe és egy glükózra számítva 24 hidrogén is termelődik. Az elektronakceptor részfolyamatokban a $24\,H + 6\,O_2 \rightarrow 12\,H_2O$-t eredményez, miközben elektrontranszport-foszforiláció útján ugyancsak ATP termelődik. A növényi fotoszintézis nem ciklikus folyamataiban az elektronszolgáltató részfolyamat: $2\,H_2O \xrightarrow{h\nu} O_2 + 4\,H^+ + 4e^-$. ATP itt az elektronakceptor részfolyamatban elektrontranszport-foszforilációval termelődik: $4e^- + 4\,H^+ \rightarrow 4H$ stb.

1.16.4. Az elektrondonorok és -akceptorok sokfélesége

A katabolikus redoxifolyamatokat tárgyalva hangsúlyozni kell, hogy a természetben előforduló kemotróf redoxifolyamatok az energiatermeléshez felhasználható szubsztrátok rendkívüli sokféleségével jellemezhetők. Ez különösen érvényes az elektrondonorokra, de jelentős mértékben az -akceptorokra is. Amint azt a *14. táblázat*on már láthattuk, mindkettő lehet szerves és szervetlen. A kemotróf szervezetek energetikai anyagcseréjét formálisan hidrogénképző és -fogyasztó részreakciókra bonthatjuk fel (THAUER és munkatársai, 1977). Ez a felosztás, viszonylag kis számú dehidrogenációs és hidrogenációs részreakció kombinációja révén, számtalan anyagcseretípus összevonását teszi lehetővé és áttekintésüket nagyon megkönnyíti. A *18. a.* és *b. táblázat*ok e részreakciókat példázzák. A részreakciókkal végbemenő szabadenergia-változások kiszámításához hipotetikus elektronakceptor, ill. -donor minőségében a hidrogéniont (pH 7) és a hidrogéngázt használták. E célra, más referenciarendszerekkel szemben, a H^+/H_2-párt azért választották, mivel, mint kimutatták, a szerves anyagok anaerob degradációja, a H_2-termelő és a H_2-hasznosító anaerob baktériumok révén közvetített, H_2-termelő és H_2-fogyasztó folyamatok szériáján át halad. Így a részreakciókat hidrogénionnal mint elektronakceptorral és hidrogéngázzal mint -donorral formulázva, a kemotróf anaerob baktériumok viszonylatában közvetlen biológiai jelentőségű reakciókat és szabadenergia-változásokat mutathatunk be.

1.16.5. Az elektrondonorok és -akceptorok kombinációs lehetőségei

A *18. a.* és *b. táblázatok* dehidrogénezéses és hidrogénezéses reakciói egyáltalán nem kombinálhatók minden variációban. Az egymáshoz kapcsolódó redoxifolyamatoknak ugyanis elegendően exergonikusaknak kell lenniök ahhoz, hogy 1 mol ATP szintézisét lehetővé tegyék. Következésképpen nem minden dehidrogénezéses reakciót lehet a hidrogénionnak hidrogéngázzá való redukálásával összekapcsolni (anaerob viszonyok között a hidrogénion az univerzális elektronakceptor). Pl. a glükóz dehidrogénezése protonokkal csupán acetát + szén-dioxid keletkezéséig halad, miközben 206 kJ/mol glükóz értékű energia termelődik, míg acetáton túlra már nem, minthogy az acetát szén-dioxidig menő dehidrogénezését kivitelező citrát-kör endergonikus és 100 kJ/mol energiát igényel! Hidrogénképzést, mint egyedüli elektronakceptor-reakciót, még az acetát-oxidációs állapotig is csupán akkor lehet megfigyelni, ha a hidrogéngáz koncentrációja a hidrogénfogyasztó szervezetek tevékenysége

18.a. táblázat

Dehidrogénezések: az energetikai anyagcsere elektront szolgáltató, formálisan hidrogénképző reakciói (példák THAUER és munkatársai, 1977. anyagából válogatva)

Szubsztrátok	Termékek	$\Delta G^{0\prime}$ (kJ/reakció)	Út
A) karboxilsavak:			
formiát$^-$ + H_2O	HCO_3^- + H_2	+1,3	
acetát$^-$ + 4 H_2O	2 HCO_3^- + 4 H_2 + H^+	+104,6	CC
2 acetát$^-$ + 2 H_2O	1 HCO_3^- + piruvát$^-$ + 3 H_2	+151,7	GC
propionát$^-$ + 3 H_2O	1 HCO_3^- + acetát$^-$ + H^+ + 3 H_2	+76,1	
B) α-ketosavak:			
piruvát$^-$ + 2 H_2O	acetát$^-$ + HCO_3^- + H^+ + H_2	−47,3	OD
α-ketobutirát$^-$ + 2 H_2O	propionát$^-$ + HCO_3^- + H^+ + H_2	−47,3	OD
oxálacetát^{2-} + 3 H_2O	acetát$^-$ + 2 HCO_3^- + H^+ + H_2	−74,5	OD
C) α, β telítetlen savak, hidroxisavak:			
laktát$^-$ + 2 H_2O	acetát$^-$ + HCO_3^- + H^+ + 2 H_2	−4,2	OD
citrát^{3-} + 3 H_2O	szukcinát^{2-} + 2 HCO_3^- + H^+ + 2 H_2	−23,8	CC
krotonát$^-$ + 2 H_2O	2 acetát$^-$ + H^+ + H_2	−26,9	BO
D) Aldehidek (aldózok, ketózok):			
ribóz	acetát$^-$ + piruvát$^-$ + 2 H^+ + H_2	−166,5	PK
formaldehid + H_2O	formiát$^-$ + H^+ + H_2	−23,4	
3 heptóz	7 piruvát$^-$ + 7 H^+ + 7 H_2	−370,7	TT/EM
glükóz	2 piruvát$^-$ + 2 H^+ + 2 H_2	−112,1	EM
glükonát$^-$	2 piruvát$^-$ + H^+ + H_2 + H_2O	−100,8	ED

18.a. táblázat folytatása

Szubsztrátok	Termékek	$\Delta G^{0\prime}$ (kJ/reakció)	Út
E) Alkoholok:			
metanol + H_2O	formiát$^-$ + H^+ + 2 H_2	+ 21,8	
glicerin	piruvát$^-$ + H^+ + 2 H_2	− 25,9	EM
F) Aminosavak:			
2 glicin + 4 H_2O	acetát$^-$ + 2 HCO_3^- + H^+ + 2 NH_4^+ + 2 H_2	− 51,5	OD
alanin + 3 H_2O	acetát$^-$ + HCO_3^- + H^+ + NH_4^+ + 2 H_2	+ 7,5	ST
G) Anorganikus elektrondonorok			
2 NH_4^+	N_2 + 2 H^+ + 3 H_2	+ 78,7	
NO_2^- + H_2O	NO_3^- + H_2	+ 163,2	
HS^- + H^+	S + H_2	+ 28,8	
S + 4 H_2O	SO_4^{2-} + 2 H^+ + 3 H_2	+ 124,3	
2 Fe^{2+} + 2 H^+	2 Fe^{3+} + H_2	+ 228,5	

Rövidítések: CC: citromsav-ciklus; GC: glioxalát-ciklus; OD: oxidatív dekarboxiláció; EM: EMBDEN–MEYERHOF-út; ST: STICKLAND-reakció; ED: ENTNER–DOUDOROFF-út; BO: zsírsavak β-oxidációja; PK: foszfoketoláz-út: TT: transzaldoláz–transzketoláz-út

18.b. táblázat

Hidrogénezések: Az energetikai anyagcsere elektronfelvevő, formálisan hidrogénfogyasztó reakciói (példák THAUER és munkatársai, 1977. anyagából válogatva)

Szubsztrát	Termékek	$\Delta G^{0'}$ (kJ/reakció)
A) Karboxilsavak:		
$formiát^- + H^+ + H_2$	$formaldehid + H_2O$	+23,4
$formiát^- + H^+ + 3\,H_2$	$metán + 2\,H_2O$	−134,3
$2\,acetát^- + H^+$	$aceton + HCO_3^-$	+31,0
B) α-ketosavak:		
$piruvát^- + H_2$	$laktát^-$	−43,1
$piruvát^- + H_2O + H_2$	$etanol + HCO_3^-$	−56,9
$2\,piruvát^- + H_2O + 2\,H_2$	$butanol + 2\,HCO_3^-$	−159,0
$piruvát + HCO_3^- + 2\,H_2$	$szukcinát^{2-} + 2\,H_2O$	−102,9
$malát^{2-} + H_2$	$szukcinát^{2-} + H_2O$	−82,4
aldehidek		
$formaldehid + H_2$	metanol	−44,8
$aceton + H_2$	izopropanol	−24,7
C) Alkoholok:		
$metanol + H_2$	$metán + H_2O$	−112,5
$etanol + H_2$	$etán + H_2O$	−88,3
D) Aminosav:		
$glicin + H_2$	$acetát^- + NH_4^+$	−77,8
E) Anorganikus elektronakceptorok:		
$HCO_3^- + H_2$	$formiát^- + H_2O$	−1,3
$HCO_3^- + 4\,H_2 + H^+$	$metán + 3\,H_2O$	−135,6
$S + H_2$	$HS^- + H^+$	−28,0
$SO_3^{2-} + 2\,H^+ + 2\,H_2$	$S + 3\,H_2O$	−145,2
$SO_4^{2-} + H_2$	$SO_3^{2-} + H_2O$	+20,9
$SO_4^{2-} + 2\,H^+ + 3\,H_2$	$S + 4\,H_2O$	−124,3
$S_2O_3^{2-} + 2\,H^+ + 2\,H_2$	$2\,S + 3\,H_2O$	−118,4
$S_4O_6^{2-} + H_2$	$2\,S_2O_3^{2-} + 2\,H^+$	−84,5
$N_2 + 2\,H^+ + 3\,H_2$	$2\,NH_4^+$	−80,0
$NO_2^- + 2\,H^+ + 3\,H_2$	$NH_4^+ + 2\,H_2O$	−436,4
$NO_3^- + H_2$	$NO_2^- + H_2O$	−163,2
$N_2O + H_2$	$N_2 + H_2O$	−341,4
$2\,O_2 + H_2$	$2\,O_2^- + 2\,H^+$	−21,9
$O_2 + H_2$	H_2O_2	−134,3
$O_2 + 2\,H_2$	$2\,H_2O$	−474,5

révén alacsony szinten marad. A telített karboxilsavaknak mint energiaszubsztrátoknak a lehetőségét a termodinamikai megfontolások is kizárják, minthogy dehidrogénezésük hidrogénionnal mint elektronakceptorral, termodinamikailag annyira kedvezőtlen, hogy csak nagyon alacsony hidrogéngáznyomásnál és ATP szintézise nélkül valósulhat meg.

Megjegyzések a 18. *a.* és *b.* táblázatokhoz: A *18. a.* táblázat példákat közöl az energiaszerző anyagcsereutak „dehidrogenációs", formailag hidrogéntermelő reakcióira, míg a *18. b.* táblázat a „hidrogenációs", vagyis a formálisan hidrogénfogyasztó reakciókat példázza. E két táblázaton minden energiaértéket termokémiai joule-okban tüntettünk fel.

Az energiaszerző anyagcsere-folyamatok egyes részreakcióival társuló és a táblázatokban megadott standard szabadenergia-változások értékei becsült adatok. A ΔG^0 a standard körülmények között 25 °C-on és 1 atm. nyomáson végbemenő reakció szabadenergia-hozama.

Fiziológiai körülmények között a pH közel 7,0. Ezt veszik figyelembe a $\Delta G^{0\prime}$ értékekben. A $\Delta G^{0\prime}$ azonos a ΔG^0-vel, azzal az eltéréssel, hogy ez esetben a hidrogénion standard állapota pH 7-ének felel meg, ami kiszámítható a következő egyenlettel: $\Delta G^{0\prime} = \Delta G^0 + m\Delta Gf'\,(H^+)$, ahol m a reakcióban részt vevő protonok nettó száma (m negatív, ha több proton fogy el, mint amennyi termelődik), míg $\Delta Gf'\,(H^+)$ egy proton képződésének szabadenergiája pH 7-nél. Ez egyenlő $2{,}3 \times RT \log 10^{-7} = -9{,}534$ kcal/mol, ahol R a gázkonstans (1, 98717 cal, ill. 8,27 J mol^{-1} T^{-1}) és T az abszolút hőmérséklet (298 K = 25 °C).

Élettani viszonyok között a szubsztrátok és a termékek koncentrációi nem 1 mol/kg-nak felelnek meg. Ez jut kifejezésre a $\Delta G'$ értékekben, melyeket a következő egyenlettel számítanak ki:

$$\Delta G' = \Delta G^{0\prime} + RT \ln \frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]} = \Delta G^{0\prime} + 1{,}36 \log \frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}$$

ahol $[A]$ és $[B]$ a szubsztrátok, $[C]$ és $[D]$ pedig a termékek fiziológiai koncentrációi.

A nem hidrogéntermelő baktériumok tenyészeteiben a termékeknek az exogén szubsztrátokhoz viszonyított koncentrációs aránya a szaporodási fázis kezdetén általában $\geqq 10^{-2}$, míg a vége felé 10^2. Valamely anyagcsere-folyamat ténylegesen hasznosítható energiája ($\Delta G'$), ennek folytán csaknem 2,8 kcal/mollal (11,7 kJ/mol) eltér a folyamat standard szabadenergiájától ($\Delta G^{0\prime}$). Következésképp a folyamat egésze termodinamikájának megítélésére a $\Delta G^{0\prime}$-nek mint a $\Delta G'_{\text{kezdeti}}$ és $\Delta G'_{\text{végső}}$ középértékének megengedhető a használata.

A hidrogéntermelő baktériumok tenyészeteiben a hasznosítható $\Delta G'$ szabadenergia azonban jelentősen különbözik a $\Delta G^{0\prime}$-től. Ez annak a ténynek az eredménye, hogy a természetben a hidrogéngáz parciális nyomása a hidrogénhasznosító mikrobák miatt általában nagyon alacsony marad ($< 10^{-3}$ atm). Így mind a $\Delta G'_{\text{kezdeti}}$, mind a $\Delta G'_{\text{végső}}$ sokkal negatívabbak, mint a $\Delta G^{0\prime}$.

1.16.6. Inter- és intramolekuláris redoxifolyamatok

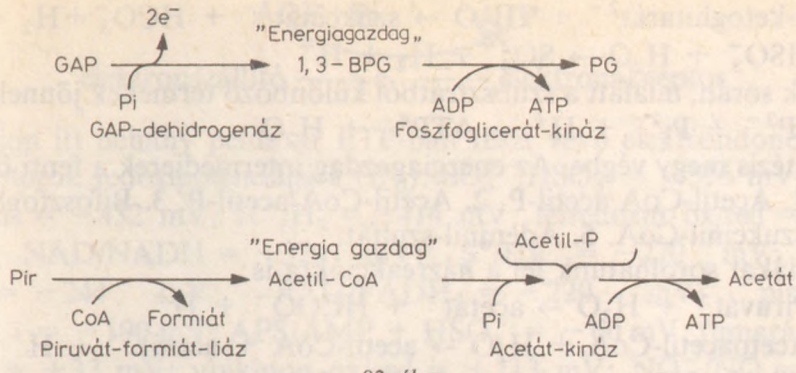
Az aerob katabolikus redoxifolyamatok a szubsztrát és az akceptor O_2 között, melyek csupán az elektronszállítók útján tartanak összeköttetést, mindig intermolekulárisak. Az anaerob energiaszerző anyagcsere ezzel szemben gyakran intramolekuláris; az elektrondonor és -akceptor lépéseket nem csupán elektronszállító kötheti össze, hanem maga az elektronakceptor is, melynek a szubsztrátból köztestermékként kell létrejönnie *(76. ábra)*. Az intramolekuláris redoxifolyamatok esetében a donor szubsztrát lehetséges dehidrogénezésének mértékét, a hidrogénegyensúly kompenzációjának szükségessége a donorból előállított intermedieren át *(indermediate product coupling)* korlátozza. Anaerob körülmények között szénhidrátokat, aminosavakat, karboxilsavakat, alkoholokat, purinokat és pirimidineket lehet energia-szubsztrátként használni. Az anaerobokban a szubsztrát átalakításának útjai gyakran nagyon eltérnek az aerob szervezetekben talált utaktól. Jó példák erre a glutamát, a glicin, a lizin, az ornitin és a purinok anaerob katabolizmusa. Ezek az eltérések egyrészt az anaerob anyagcsere termodinamikai követelményeiből, másrészt a köztitermék-összeköttetés révén a hidrogénegyensúly kompenzációjának igényéből szükségszerűen következnek.

1.16.7. Energiaszerzés nem redoxifolyamatok révén

Csak kevés kivételt ismerünk az alól a szabály alól, hogy a biológiai energia redoxifolyamatok révén termelődik. Néhány anaerobról kimutatták pl., hogy szubsztrátokat inkább lízissel, mintsem dehidrogénező + hidrogénező reakciókkal metabolizálnak. Ezek a folyamatok csupán szubsztrátszintű foszforilációval társulnak. Ilyen a *S. faecalis*ban az arginin és az agmatin fermentációja, a *Clostridium cylindrosporum*ban a xantin fermentációja és a *P. rettgeriben* a piruvát fermentációja acetáttá és formiáttá. Végül az aerob *Halobacterium halobium* fotofoszforilációja egyedülálló példa a fényenergia átalakítására elektrontranszportlánc részvétele nélkül (*lásd* a 392. oldalon).

1.16.8. A szubsztrátszintű foszforiláció enzimigénye

A dehidrogenációs részreakciók és az említett nem redoxifolyamatok szubsztrátszintű foszforilációval összekötött ATP-szintézissel társulhatnak. Az e folyamatokban felszabaduló energia egy része kezdetben energiagazdag vegyületekben konzerválódik. Utóbbiak vagy a dehidro-



82. ábra

A szubsztrátszintű foszforiláció különböző típusai

génezés során, vagy a nem redoxifolyamatok esetében a liázreakciók révén képződnek. Az így konzervált energia ezután kinázreakciók útján az ATP-rendszerbe kerül. A szubsztrátszintű foszforilációhoz tehát vagy egy dehidrogenáz és egy kináz, vagy egy „liáz" és egy kináz kombinációja szükséges (*lásd* pl. *82. ábra,* ahol GAP: glicerinaldehid-foszfát; 1,3-BPG: 1,3-bifoszfoglicerát; PG: foszfoglicerát; Pir: piruvát, és acetil-P: acetil-foszfát).

1.16.9. Energiagazdag vegyületek

„Energiagazdag" vegyületek azok, melyek hidrolízisének szabadenergiája („csoportátviteli potenciál"; $\Delta G^{0'}$), a $-20{,}9$ és $-62{,}8$ kJ/mol (-5 -15 kcal/mol) közötti tartományban van és amelyek az ATP-rendszerrel enzimatikus egyensúlyban vannak. Ezek az energiagazdag vegyületek savanyú anhidridek vagy tioészterek, vagyis a karboxilsavaknak – melyeknél a szénatom szerves vegyületekben a legmagasabb oxidációs szintet képviseli – a származékai. Az acetálok, a tioacetálok, az éterek és a tioéterek nem energiagazdag vegyületek. Ennek folytán „energiagazdag" vegyületeket csupán a karbonilcsoportok dehidrogénezése vagy a karboxil funkciós csoportok lízise révén lehet előállítani, melyek különben már a legmagasabb oxidációs szinten vannak. Következésképpen, a szubsztrátszintű foszforiláció csupán a katabolikus redoxifolyamatok elektrondonor vagy a katabolikus, nem redoxifolyamatok lítikus részfolyamatához kapcsolódhat.

Álljon itt néhány példa a dehidrogénezéssel összekötött szubsztrátszintű foszforilációra:

1. $\text{Piruvát}^- + 2\,H_2O \rightarrow \text{acetát}^- + HCO_3^- + H_2 + H^+$
2. $\text{Acetaldehid} + H_2O \rightarrow \text{acetát}^- + H_2 + H^+$
3. $\text{Glicerinaldehid-foszfát} + H_2O \rightarrow PG^- + H_2 + H^+$

4. α-ketoglutarát^{2-} + $2H_2O$ → szukcinát^{2-} + HCO_3^- + H_2 + H^+

5. HSO_3^- + H_2O → SO_4^{2-} + H_2 + H^+

Ezek során, mialatt a szubsztrátból különböző termékek jönnek létre,

ADP^{3-} + Pi^{2-} + H^+ → ATP^{4-} + H_2O

szintézis megy végbe. Az energiagazdag intermedierek a fenti öt esetben: **1.** Acetil-CoA/acetil-P. **2.** Acetil-CoA/acetil-P. **3.** Bifoszfoglicerát. **4.** Szukcinil-CoA. **5.** Adeninil-szulfát.

Példákat sorolhatunk fel a liázreakciókra is:

6. Piruvát$^-$ + H_2O → acetát$^-$ + $HCOO^-$ + H^+

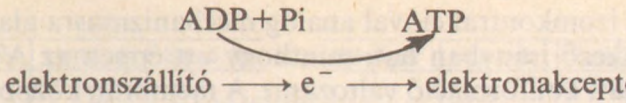
7. Acetoacetil-CoA + H_2O → acetil-CoA + acetát$^-$ + H^+

8. Xilulóz-5-P → acetát$^-$ + GAP + H^+

Ezek esetében az energiagazdag intermedierek: **6.** Acetil-CoA/acetil-P. **7.** ua. **8.** Acetil-P. E különböző reakciók abban közösek, hogy minden előállított mol ATP-re 1 mol proton képződik. Ez annak a ténynek a következménye, hogy az energiagazdag vegyületek, lévén savszármazékok, töltés nélküli karbonil funkciós csoportokból dehidrogénezéssel, vagy lízissel jönnek létre. Így az anaerob körülmények között szaporodó szervezeteknél a szubsztrátszintű foszforiláció révén előállított ATP mennyiségét a termelt protonok mennyiségének egyszerű mérésével könnyen meghatározhatjuk, feltéve, ha közben ATP elektrontranszport útján nem szintetizálódott. Csupán azok a baktériumok, melyek a glükózt az ENTNER–DOUDOROFF-úton fermentálják (pl. *Zymomonas mobilis* = *Pseudomonas lindneri* stb.), és a hexózon szaporodó heterofermentatív tejsavas baktériumok képeznek e szabály alól kivételt. Ezekben a szervezetekben ugyanis az előállított ATP moljára számítva 2 mol hidrogénion képződik, minthogy a fermentáció során a dehidrogenációs reakciók egyike (glükóz-6-P dehidrogenáz-reakció), mely ugyancsak egy protont termel, ATP-szintézishez nem kapcsolódik.

1.16.10. ATP-előállítás elektrontranszport-foszforiláció útján

Az elektronoknak az első elektronszállítótól a végső elektronakceptorig haladó áramlásával párhuzamosan, vagyis a katabolikus redoxifolyamatok hidrogénező részfolyamata alkalmával, az elektrontranszport-foszforilációnak (ETP) megjelölt mechanizmus keretében, ATP szintetizálódhat. Ebben a mechanizmusban az ADP foszforilációját végső soron a különböző redoxipotenciálú redoxipartnerek közötti elektrokémiai potenciál biztosítja. Két elektron továbbításának mechanizmusát feltételezve (n = 2), 1 mol ATP szintéziséhez ADP-ből és Pi-ből megközelítően 250 mV potenciálkülönbség ($\Delta E'$) szükséges ($\Delta G' = -nF\,\Delta E' = 2 \times 23{,}06 \times 0{,}25$ kcal/mol $= -11{,}5$ kcal/mol $= -48$ kJ/mol):



Álljon itt néhány példa az ETP-ban részt vevő elektrondonorok és -akceptorok redoxipotenciáljára (E'_0): SO_4^{2-}/HSO_3^- = −516 mV; CO_2/formiát = −432 mV; H^+/H_2 = −414 mV; ferredoxin ox/red = −398 mV; NAD/NADH = −320 mV; S^0/HS^- = −270 mV; CO_2/CH_4 = −244 mV; FAD/$FADH_2$ = −220 mV; piruvát$^-$/laktát$^-$ = −190 mV; APS/AMP + HSO_3^- = −60 mV; fumarát/szukcinát = +33 mV; ubikinon ox/red = +113 mV; NO_2^-/NO = +350 mV; NO_3^-/NO_2^- = +433 mV; Fe^{3+}/Fe^{2+} = +772 mV; O_2/H_2O = +818 mV; N_2O/N_2 = +1355 mV (*lásd* még a 74. ábrát).

Az aerobok légzési láncában az oxigén vízzé történő redukálása hatékonyan kapcsolódik ATP képzéséhez. Az anaerobokban a szén-dioxidnak metánná, a nitrátnak nitritté vagy dinitrogénné, a szulfátnak kénhidrogénné és a fumarátnak szukcináttá redukálása bizonyítottan foszforilációval társul, míg a hidrogénionnak hidrogénné, a piruvátnak laktáttá, a krotonil-CoA-nak butiril-CoA-vá, vagy az acetaldehidnek etanollá redukálása nem.

1.16.11. Elképzelések az elektrontranszport-foszforiláció mechanizmusáról

Az elektrontranszport-foszforiláció mechanizmusa ma már kevéssé vitatott. Korábban az érdeklődés előterébe három elképzelés is került. Ezeket itt röviden ismertetjük:

1. A *kémiai hipotézis* (SLATER, 1953), mely feltételezi, hogy az elektrontranszport redoxireakció alkalmával először egy nagy hidrolízispotenciállal rendelkező „energiagazdag" „X ~ I" intermedier jön létre, majd az ebben konzervált energia kerül az ATP-rendszerhez. Analóg lenne ez a szubsztrátszintű foszforiláció jól ismert mechanizmusával. E kémiai hipotézis a foszforilációban a membránnak nem tulajdonít különösebb jelentőséget, bár e szerint is szerepe lehet az elektrontranszportlánc komponenseinek organizációjában és a metastabil X~I-molekula standard hidrofób környezetét is alkothatja. Ez utóbbi magyarázhatná meg azt is, hogy X~I-típusú „energiagazdag" intermediereket miért nem sikerült még máig sem izolálni.

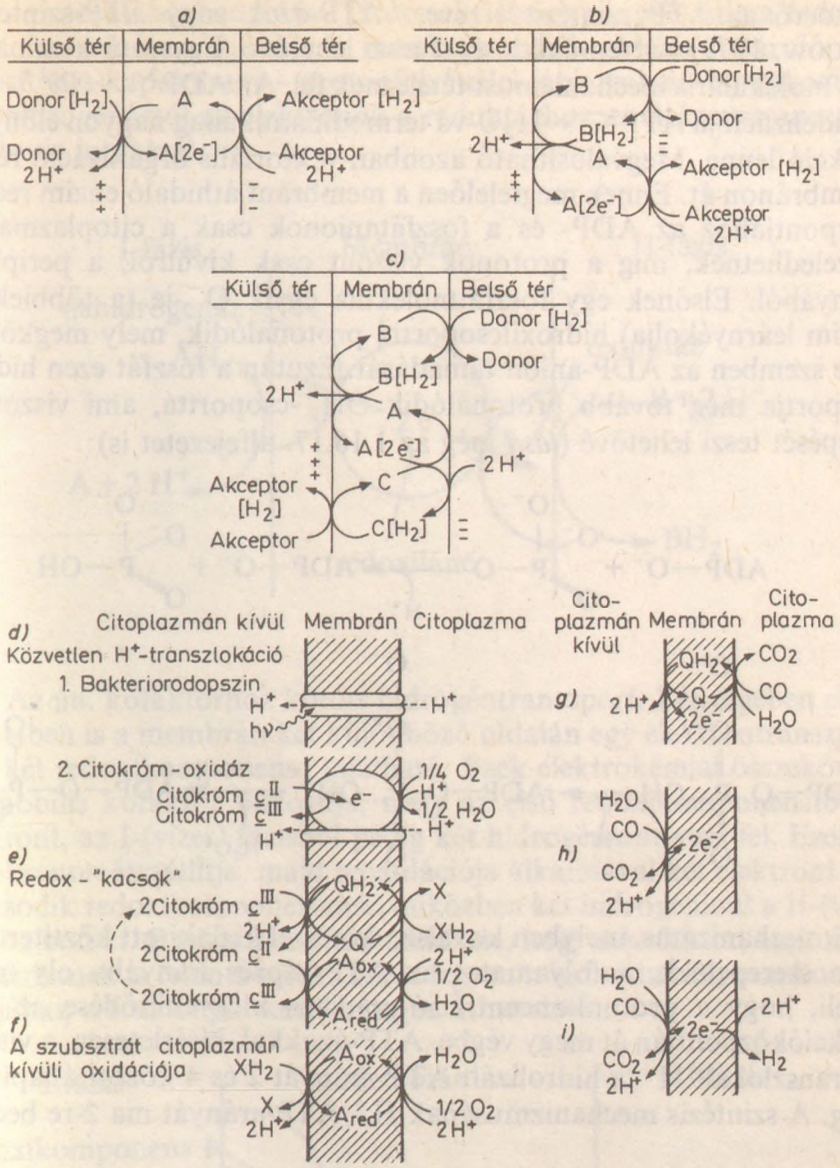
2. Az ún. *konformációs elmélet* (BOYER, 1965) szerint az elektrontranszport redoxireakciói egy proteinkomponens energiagazdag („feszülő") konformációját alakíthatják ki, ami csupán ADP és Pi közreműködésével egybekötött ATP-szintézis esetén „ernyed" el. Ez az elképzelés

lényegében az izomkontrakcióval analóg mechanizmusra alapít. Utóbbi azonban ellenkező irányban hat, minthogy ott éppen az ATP bontása az, ami kiváltja a konformáció változását. A membrán központi szerepével ez esetben sem számítanak, bár mint a metastabilisan feszült, energiagazdag, molekuláris konformáció nélkülözhetetlen környezete még fontos lehet. A mitokondriumok elektrontranszportlánca számos komponensével kapcsolatban figyeltek már meg konformációs változásokat, mindazonáltal nincs még bizonyítékunk arra, hogy az elektrontranszport és a foszforiláció között ezek lennének az obligát összekötő kapcsok.

3. A *kemiozmotikus hipotézis* (MITCHELL, 1961) feltételezte, hogy az elektrontranszport redoxireakciói pH-gradienst (ΔpH) és elektromos potenciálkülönbséget ($\Delta\Psi$) magába foglaló protonmozgató-erőt *(protonmotive force)* létesítenek, és hogy ez az, ami az ATP szintézisét hajtja. Ez az elgondolás a magasabb rendű szervezetekben észlelt és az ATP energiáját igénybe vevő membrán-transzportfolyamatok analógiájára született. Utóbbiak azonban fordított irányban működnek, amennyiben ott a Na^+/K^+–ATPáz, az oldott anyagok nátriumhoz kapcsolódó transzportját hajtó nátriummozgató-erőt épít ki. A kemiozmotikus hipotézis a membránnak már döntő funkcionális fontosságot tulajdonít. A protonmozgató-erő előállításához nem csupán intakt membrán, hanem egyenesen topológiailag zárt membránképletek szükségesek. A kulcskérdés, mely a kémiai és a konformációs hipotéziseket a kemiozmotikustól alapvetően megkülönbözteti, az, hogy vajon az elektrontranszportlánc tagjainak lokalizációjára a membránban csupán az együtt-tartás és a hatékonyság némi fokozása céljából van-e szükség, vagy az elektrontranszport-foszforiláció folyamata elválaszthatatlanul összefügg a membrán azon képességével, hogy rajta keresztül elektromos potenciál és koncentrációgradiens építhető ki.

1.16.12. A kemiozmotikus hipotézis sarkalatos tételei

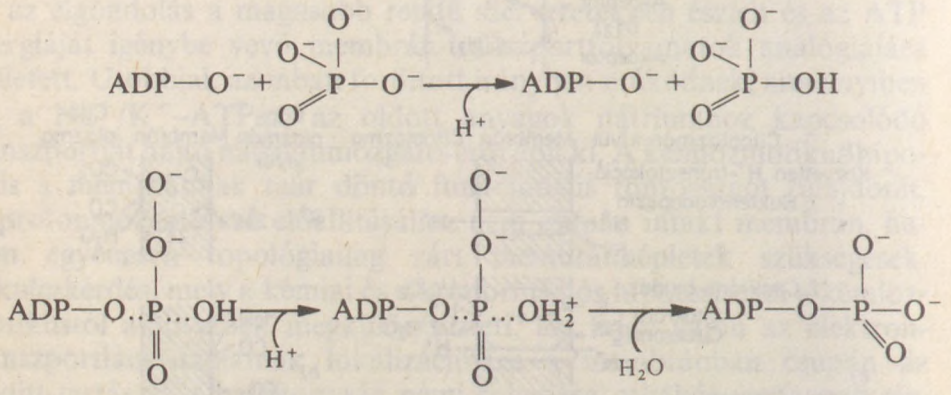
A kemiozmotikus hipotézis, mely ma már általánosan elfogadottnak tekinthető – három, lényegében később bizonyított feltételezésen alapult: *a)* Az a membrán, amelyben az elektrontranszport a foszforilációhoz kapcsolódik, áthatolhatatlan a protonok és a hidroxilionok számára. *b)* A membránban az elektrontranszportlánc komponenseinek elhelyezkedése olyan orientációban történik, hogy a közöttük végbemenő redoxifolyamatok eredményeként, két komponensből összetevődő, protonhajtóerő jöhessen létre. Az egyik a pH-gradiens (belül alkalikus), a másik az elektromos potenciál *(belül negatív) (83. ábra). c)* A proton-



83. ábra

A két komponenst (pH-gradienst és elektromos potenciált) tartalmazó protonhajtóerő előállításához vezető vektoriális redoxifolyamatok három példája. *a)* A donor kívül, az akceptor belül. *b)* A donor belül, az akceptor belül, *c)* A donor belül, az akceptor kívül. Jelzések: A: elektronszállító. B és C: hidrogénszállítók (THAUER és munkatársai, 1977). A protongradiens előállításának általános stratégiái a mikroorganizmusok világában HOOPER és DISPIRITO (1985) után: *d)* A protonok közvetlen transzlokációjával, mégpedig 1. a bakteriorodopszin segítségével. 2. citokróm-oxidáz útján. *e)* Redox-láncok működtetésével, és végül *f)* A szubsztrát citoplazmán kívüli oxidációjával. *g–i)* A szén-monoxid bakteriális oxidációjának vázlata: *g)* Citoplazmán belül. *h)* Citoplazmán kívül. *i)* Az *R. gelatinosa*ban kimutatott mechanizmus szerint

hajtóerő az ATP szintézisét reverz ATP-ázok vagy ATP-szintetázok (JAGOW, 1979) közreműködésével teszi lehetővé. Egyszerű kemiozmotikus molekuláris mechanizmust tételeznek fel. Az $ADP^{3-} + Pi^{2+} + H^+$ kondenzációja $ATP^{4-} + H_2O$-vá termodinamikailag nagyon előnytelen reakció lenne. Megvalósítható azonban vektoriális organizáció révén a membránon át. Ennek megfelelően a membránt áthidaló enzim reakcióközpontjához az ADP- és a foszfátanionok csak a citoplazma felől közeledhetnek, míg a protonok viszont csak kívülről, a periplazma irányából. Elsőnek egy foszfátmolekula egyik O^--je (a többieket az enzim leárnyékolja) hidroxilcsoporttá protonálódik, mely megkönnyíti vele szemben az ADP-anion támadását. Ezután a foszfát ezen hidroxilcsoportja még tovább protonálódik OH_2^+-csoporttá, ami viszont víz kilépését teszi lehetővé (*lásd* még az 1.16.17. alfejezetet is):



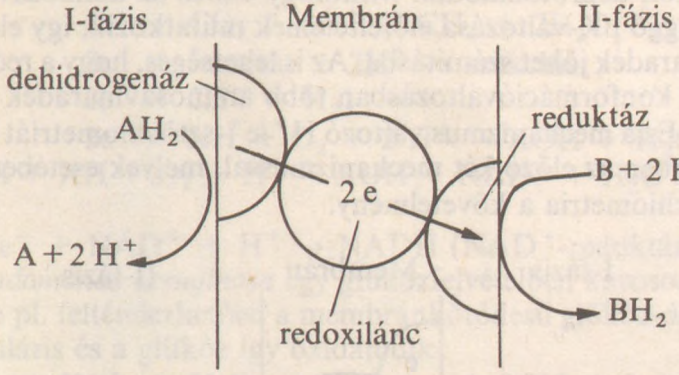
E mechanizmus, melyben kovalens kötéssel kialakított köztitermékek nem szerepelnek, a folyamatot az ATP-képzés irányába oly módon tereli, hogy a protonkoncentráció-gradiens kiegyenlítődése az enzim reakcióközpontján át megy végbe. ATP-ázokkal, kísérletesen, a visszafelé transzlokált H^+/a hidrolizált ATP arányát 2 és 4 között állapították meg. A szintézis mechanizmusának H^+/ATP arányát ma 2-re becsülik.

1.16.13. A protonkoncentráció-gradiens képzésének mechanizmusai

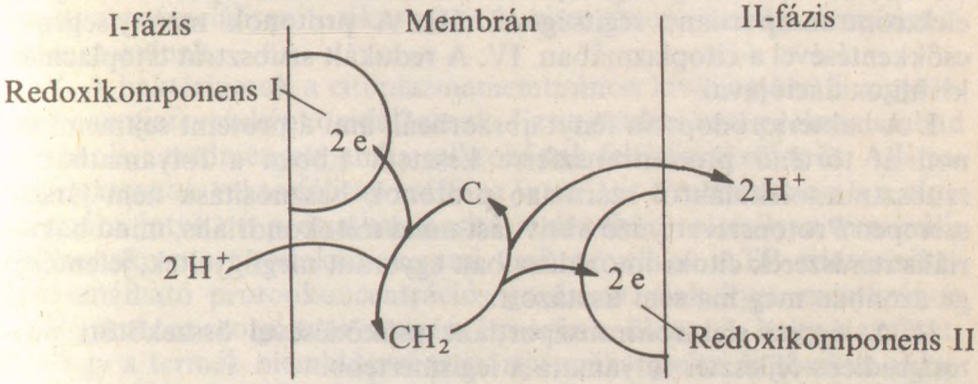
JAGOW (1979) szerint a protonkoncentráció-gradiens kialakításához háromféle mechanizmus járulhat hozzá (*lásd* a *83. a, b, c. ábrák*at is):

1. A legegyszerűbb esetben a dehidrogenáz és a reduktáz a membrán ellentétes oldalain helyezkednek el. A dehidrogenáz aktív centrumán – mely a membrán egyik oldalával érintkező vizes fázis felől közelíthető

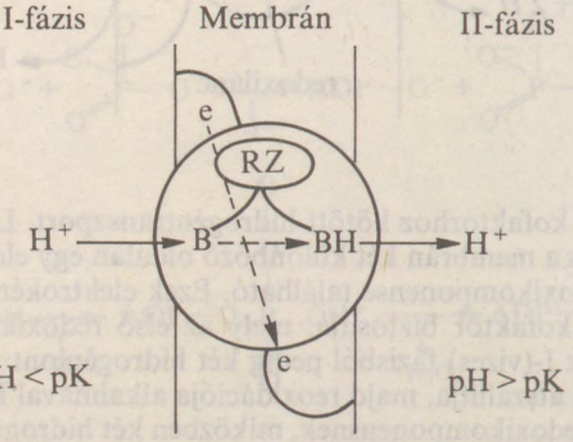
meg – protonfelszabadulással járó reakció megy végbe, míg a reduktáz aktív centrumában –, mely a membrán másik oldalát határoló vizes fázissal tart kapcsolatot – protonfelvétellel járó reakció bontakozik ki. A dehidrogenáztól az elektronok a reduktázhoz az elektrontranszport-láncon át jutnak el:



2. Az ún. kofaktorhoz kötött hidrogéntranszport. Lényegében ebben az esetben is a membrán két különböző oldalán egy elektrontranszport-lánc két redoxikomponense található. Ezek elektrokémiai összeköttetését mobilis kofaktor biztosítja, mely az első redoxikomponenstől két elektront, az I-(vizes) fázisból pedig két hidrogéniont vesz fel. Ezeket a membránon átszállítja, majd reoxidációja alkalmával két elektront átad a második redoxikomponensnek, miközben két hidrogéniont a II-(vizes) fázisba bocsát. E reakciociklus előfeltétele, hogy a kofaktor, amit mobilis karriernek is tekinthetünk, képes legyen mind redukált, mind oxidált alakjában a foszfolipid-kettősrétegén áthatolni:



3. A harmadik mechanizmus esetében, amit fehérjéhez kötött protontranszportnak nevezhetünk, a membránt egy vagy több protein hidalja át. Az elektronátvitelnél az aktív centrumnál végbemenő redoxiváltozás az apoprotein konformációs változását idézi elő. Ez a folyamat egy bizonyos aminosavmaradék mozgását váltja ki, mely protontranszporthoz vezet. A B-aminosavmaradék a membrán egyik oldalán protonálódik, a másikon deprotonálódik. Minthogy ehhez az aminosavmaradék helyzettől függő pK-változása előfeltételnek mutatkozik, így elsősorban is hisztidilmaradék jöhet számításba. Az is lehetséges, hogy a redoxireakciótól függő konformációváltozásban több aminosavmaradék mozgása is részt vesz. Ez a mechanizmus változó H^+/e^--sztöchiometriát is lehetővé tesz, szemben az előző két mechanizmussal, melyek esetében stabil 1 H^+/e^- sztöchiometria a követelmény.



Hooper és DiSpirito (1985) a protonkoncentrációs gradiens előállításának lehetséges stratégiáit az alábbiak szerint kategorizálták *(83. d–i ábra)*: I. Protonok direkt transzlokációja a membránon kifelé. I.a. Bakteriorodopszin segítségével. I.b. Citokróm-oxidáz útján. II. A légzési elektrontranszportlánc segítségével. III. A protonok mennyiségének csökkentésével a citoplazmában. IV. A redukált szubsztrát citoplazmán kívüli oxidációjával.

I. A bakteriorodopszin fényt abszorbeál, ami a proteint sejtmembránon át történő protontranszferre készteti. Ebben a folyamatban a szubsztrátmolekulákról származó protonok hasznosítása nem játszik szerepet. Protonszivattyúzó aktivitást mind mitokondriális, mind bakteriális rendszerek citokrómoxidázaiban egyaránt megfigyeltek, jelentősége azonban még ma sem tisztázott.

II. A légzési elektrontranszportlánc működésével összekötött protongradiens-fejlesztés folyamata a legismertebb.

III. Protongradiens előállítását az is lehetővé teszi, ha a membrán citoplazma felőli oldalán protonokat felhasználó reakciók zajlanak le. Így pl.:

$$2e^- + \tfrac{1}{2}O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O;$$
$$8e^- + SO_4^{2-} + 8H^+ \rightarrow S^{2-} + 4H_2O;$$
$$2e^- + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow NO_2^- + H_2O;$$
$$8e^- + CO_2 + 8H^+ \rightarrow CH_4 + 2H_2O;$$
$$2e^- + \text{fumarát} + 2H^+ \rightarrow \text{szukcinát};$$
$$2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2;$$
$$2e^- + XH + O_2 + 2H^+ \rightarrow XOH + H_2O;$$
$$NADH + XH + O_2 + H^+ \rightarrow XOH + NAD^+ + H_2O$$ (monooxigenáz);
$$2e^- + NAD^+ + H^+ \rightarrow NADH$$ (NAD^+-reduktáz).

A *Pseudomonas aeruginosa* egy glükózfelvételben károsodott mutáns törzsében pl. feltételezhetően a membránkötődésű glükóz-dehidrogenáz extracelluláris és a glükóz így oxidálódik:

$$\text{glükóz} + H_2O \rightarrow \text{glukonsav} + 2H^+ + 2e^-.$$

Másrészről az is tény, hogy a membránon kívüli hidrogénion-koncentrációt protonelnyelő reakciók csökkenthetik is. Így pl.:

$$6e^- + 7H^+ + NO_2^- \rightarrow NH_3 + 2H_2O;$$
$$6e^- + 8H^+ + 2NO_2^- \rightarrow N_2O + 4H_2O;$$
$$5e^- + 4H^+ + NO_2^- \rightarrow \tfrac{1}{2}N_2 + 2H_2O.$$

A protonoknak molekuláris hidrogénné való redukálása a legegyszerűbb protonhasznosító terminális elektronakceptor. Ez a folyamat az anaerob fermentatív baktériumokban protongradiens előállítását célozza. A nitrit redukciója a gradiens létrehozása szempontjából első pillanatban előnytelennek tűnik, amennyiben a protonokat éppen a periplazmában fogyasztja. Annak a ténynek azonban, hogy a nitrit-reduktáz a periplazmában helyezkedik el, jelentős pozitív következménye, hogy emiatt a potenciálisan toxikus nitrit és nitrogén-monoxid a citoplazmából kiszorulnak.

IV. A baktériumok a citoplazmamembránon kívül egyszerű vegyületeket energiaforrásként oxidálhatnak. Ez az oxidáció ott gyakran szabad protonokat eredményez, ami a mikrobának feltétlenül előnyös. A létrejött elektronok vektoriálisan szállítva jutnak át a membránon, s a citoplazmába jutva ott protonhasznosító reakcióban valamilyen terminális elektronakceptort redukálnak, ami csak növeli az ATP szintéziséhez felhasználható protonkoncentrációs gradienst. Sok ilyen membránon kívüli, protont szolgáltató reakciót ismerünk. Előnyük, hogy a szubsztrát vagy a termék membrántranszportja szükségtelen és toxikus akkumulációjuk is elkerülhető. E periplazmatikus térben lezajló reakciókat így kategorizálhatjuk:

1. A proton a szubsztrátból származik:

$$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$$

$$H_2O \xrightarrow{h\nu} 2H^+ + \tfrac{1}{2}\, O_2 + 2e^-$$

$$H_2S \xrightarrow{h\nu} 2H^+ + S^0 + 2e^-$$

$$H_2 \xrightarrow{h\nu} 2H^+ + 2e^-$$

$$\text{szerves} \xrightarrow{h\nu} 2H^+ + \text{szerves}_{ox} + 2e^-$$

$$HCOOH \rightarrow 2H^+ + CO_2 + 2e^-$$

$$NH_2OH \rightarrow 2H^+ + HNO + 2e^-$$

$$CH_3OH \rightarrow 2H^+ + HCHO + 2e^-$$

2. A proton a vízből származik:

$$H_2O + NO_2^- \rightarrow 2H^+ + NO_3^- + 2e^-$$

$$5H_2O + S_2O_3^{2-} \rightarrow 10\, H^+ + 2SO_4^{2-} + 8e^-$$

$$3H_2O + S^0 \rightarrow 5H^+ + HSO_3^{2-} + 4e^-$$

$$H_2O + SO_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^-$$

3. A proton mind a szubsztrátból, mind a vízből származik:

$$H_2O + CH_3NH_2 \rightarrow 2\, H^+ + HCHO + NH_3 + 2e^-$$

$$H_2O + \text{glükóz} \rightarrow 2H^+ + \text{glukonsav} + 2e^-$$

4. A proton a szubsztrátból nem jön létre:

$$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-$$

$$Sn^{2+} \rightarrow Sn^{4+} + 2e^-$$

$$Cu^+ \rightarrow Cu^{++} + e^-$$

$$Mn^{2+} \rightarrow Mn^{4+} + 2e^-$$

$$U^{4+} \rightarrow U^{6+} + 2e^-$$

$$M^{2+} + 2H_2O \rightarrow M(OH)_2 + 2H^+$$

$$\text{citokróm-c}^{++} \rightarrow \text{citokróm-c}^{+++} + e^-$$

1.16.14. A kemiozmotikus hipotézis bizonyítékai

A kemiozmotikus hipotézist a többivel szemben jelenleg a következő bizonyítékokra hivatkozva részesítik előnyben:

a) Elektrontranszporthoz kapcsolódó ATP-képzést, meggyőzően, csak topológiailag intakt membránstruktúrákkal lehet igazolni.

b) Az elektrontranszportlánc komponenseinek térbeli elrendeződése az őket összekötő membránban már önmagában is e hipotézist támasztja alá.

c) A protonmozgató-erő létrejöttét mitokondriumokban, kloroplasztiszokban, baktériumokban, továbbá citokróm-oxidázt vagy bakteriorodopszint, ill. H^+/ATP-ázt tartalmazó mesterséges foszfolipidmembránokban mérni is lehet.

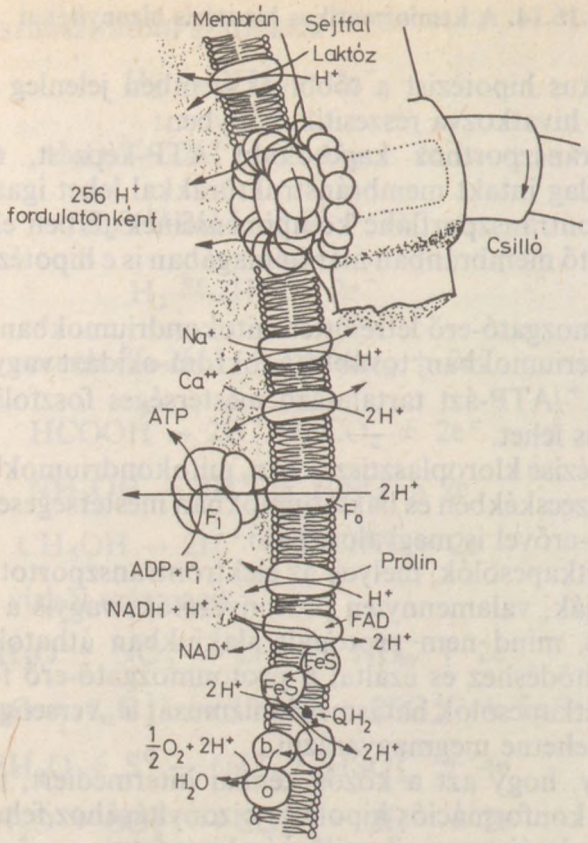
d) ATP szintézise kloroplasztiszokban, mitokondriumokban, szubmitokondriális részecskékben és baktériumokban mesterségesen kialakított protonmozgató-erővel is megvalósítható.

e) Az ún. szétkapcsolók, melyek az elektrontranszportot a foszforilációtól elválasztják, valamennyien protonvezetők, vagyis a membránon mind protonált, mind nem protonált alakjukban áthatolhatnak, ami protonkiegyenlítődéshez és ezáltal a protonmozgató-erő felszámolásához vezet. A szétkapcsolók hatásmechanizmusát a „versengés" hipotéziseivel nehezen lehetne megmagyarázni.

f) Végül tény, hogy azt a közös kémiai intermediert, mely mind a kémiai, mind a konformációs hipotézis bizonyításához feltétlenül szükséges lenne, mindmáig nem sikerült még kimutatni.

1.16.15. Az elektrontranszportlánc komponenseinek térbeli elrendeződése

Az *E. coli*ban a respirációs lánc – mely egyszerűbb, mint a mitokondriumé – hidrogéntranszportjának bevezető lépése, hogy az elektronok és protonok a NADH-ról FAD-ra jutnak, mely az átvett két hidrogénatomot a membrán külső oldalára szállítja, ahol a protonok szabaddá válnak. Az elektronok viszont vas-kén proteinekre kerülnek, melyek révén újra a membrán belső oldalára jutnak. A két elektron itt egy kinonnak adódik át, mely a sejt belső teréből még két protont is felvesz, és mint hidrokinon ez is áthatol a membránon, majd a két protont kifelé leadja, míg a két elektront két citokróm-b molekulára juttatja. Az elektronok ezeken át a membrán belső oldalán lokalizált citokróm-o-hoz folynak vissza, mely viszont molekuláris oxigén segítségével oxidálódik. Az elektronpárok tehát a membránon kétszer hatoltak át, miközben a sejt belső teréből összesen négy proton transzlokálódott kifelé *(84.*



84. ábra

Az *E. coli* elektrontranszportlánca (lásd még a 138. *ábrát* is)

ábra). Az *E. coli* légzési láncával részletesen még a 1.31.6. alfejezetben foglalkozunk.

A külső térbe, a periplazmába került protonok végül a membránkötődésű ATP-szintetázon (JAGOW, 1979) át áramolnak vissza.

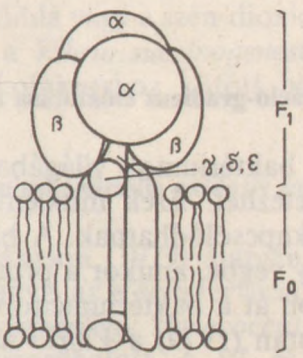
1.16.16. Az ATP-szintetáz-rendszer

Az ATP-szintetáz multiproteinkomplex, mely két alkomplexből, az ún. F_0-ból és F_1-ből áll *(85. ábra)*. Az F_0 három, magába a membránba beágyazódott polipeptidből épül fel. Az F_1-et öt különböző polipeptid alkotja, melyek az F_0-hoz kapcsolódva a membrán felületén lokalizáltak (JAGOW, 1979). Az F_1-komponens elektronmikroszkópos felvételeken a membránhoz tapadó göbnek, bunkónak tűnik. Az F_1 öt komponensét

α, β, γ, δ és ε megjelölésekkel illetik. Valamennyi natív alakjában izolálható (KAGAWA, 1978). Az ATP-szintetáz F_0-komplexe lényegében, egy belül üreges ún. protoncsatornát alakít ki. A γ-, δ- és az ε-polipeptidek e csatorna kapuját formálják, mely zárulni és nyílni képes. Amennyiben kísérleti körülmények között a membránba csupán az F_0-t építik be, úgy ezen mint nyitott csatornán át a protonok ellenállás nélkül passzívan áthatolhatnak. A γ-, δ- és ε-komponensek további beépítése a csatorna zárását okozza, mely csak meghatározott membránpotenciál esetén nyílik majd ki. Ha ezek után még az α- és a β-komponenseket is beépítik, úgy e rendszerben már az ATP szintézise is lehetővé válik. A teljes F_1 feltehetően 2 α-, 2 β-, továbbá 1–1 γ- δ- és ε-alegységet tartalmaz.

A baktériumokban és a mitokondriumokban az F_1–F_0-komplex membránlokalizációja úgy történik, hogy az F_1 alkotta „göb" a belső oldalon helyezkedik el *(lásd 85. ábra)*. Minden két protonra számítva, melyek a csatornán át kívülről befelé haladnak, ADP-ből és Pi-ből egy molekula ATP termelődik. Ez a reakció reverzíbilis (HINKLE és MCCARTY, 1978): megfelelő körülmények között az F_1–F_0-komplex ATP-t hasít és az így felszabaduló energia segítségével a baktériumsejtből vagy a mitokondriumból protonokat lehet kiszorítani. Más enzimekhez hasonlóan, az F_1–F_0-komplex, a reakció sebességét szabályozza ugyan, azonban a reakció irányát a szabadenergia-egyensúly határozza meg.

Az F_1 ötféle fehérjealegysége közül az ATP-szintézis aktivitásának kifejtéséhez csupán a két legnagyobb szükséges. A legkisebb alegység a katalitikus aktivitás gátlója, mely feltehetően ellenőrző szelepként szerepel. Ez mindenekelőtt akkor állítja le a reakciót, ha a protongradiens alacsony, minthogy ilyen körülmények között a folyamat éppen a fordított, vagyis ATP-fogyasztói irányban haladna.

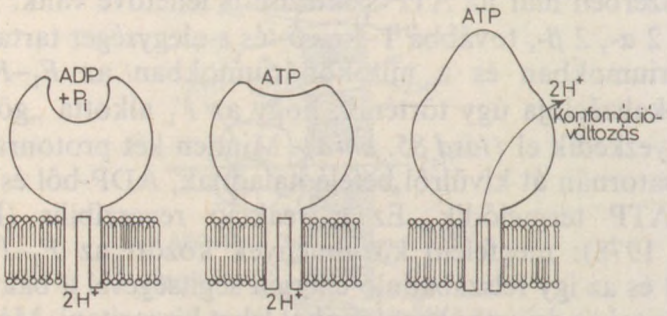


85. ábra
Az ATP-szintetáz szerkezete

1.16.17. Az ATP-szintézis lehetséges mechanizmusai

HINKLE és MCCARTY szerint (1979) az F_1–F_0-komplexben az ATP-szintézis több mechanizmusa is elképzelhető:

1. Az ún. *direkt mechanizmus* keretében az első történés, az F_1-részhez egy foszfátion és egy ADP kötődése lehet. Ezután a csatornán át belépő protonok a foszfát oxigénjeinek egyikét, egy molekula víz képzése közben elvonják. Végül a foszforatom az ADP egy oxigénjéhez kötődik, miközben ATP jön létre. Utóbbi azután az enzimről disszociál.

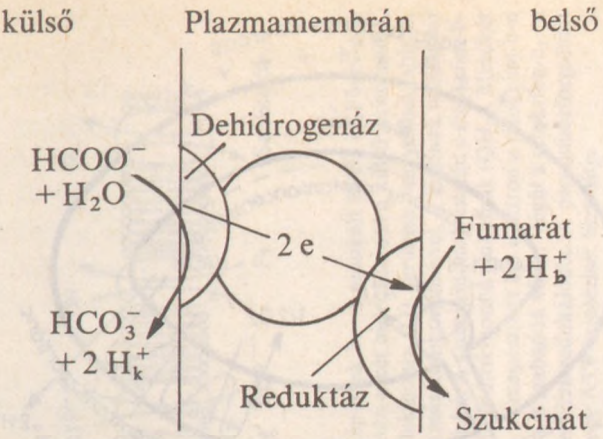


86. ábra
Az ATP-szintézis konformációs elméletének vázlata

2. Több ún. *indirekt módszer* is lehetséges. Így pl. az enzim aktív helyén az ADP és a Pi spontán kapcsolódhatnak, mégpedig szabadenergia-bevitel nélkül. A létrejött ATP azonban nagyon szorosan kötődik az enzimhez, és ahhoz, hogy szabaddá váljon, energia szükséges *(86. ábra)*. Ezt az energiát azok a protonok szolgáltathatják, melyek valahol az aktív szituszon kívül kötődnek meg és ezáltal az enzim konformációját megváltoztatják. A protonok ezt követően a membrán F_1-oldalán szabaddá válnak.

1.16.18. Protonkoncentráció-gradiens előállítása a *Vibro succinogenes*nél

Az anaerob és az aerob baktériumok világában rendkívül nagyszámú elektrontranszportlánc létezhet. Ezek mindenütt protonkoncentráció-gradiensek kiépítéséhez kapcsolódhatnak. A baktériumoknál az ATP-szintézis akkor mehet így végbe, amikor a protonok a periplazmatikus térből az ATP-szintetázon át a baktériumcitoplazmába visszafelé folynak. Példaként JAGOW után (1979) a *Vibrio succinogenes* redoxiláncát mutatjuk be. Ez esetben a plazmamembrán külső oldalán molibdéntartalmú formiát-dehidrogenáz-komplex,



továbbá vas-kén protein és citokróm-b mint redoxicentrum helyezkedik el. Ezen megy végbe a formiát oxidációja szén-dioxiddá két proton felszabadulása közben, melyek a periplazmatikus térbe jutnak. Az elektronok viszont egy menakinon-pool-on át a membrán belső oldalára fumarát-reduktáz-komplexbe kerülnek. Ez utóbbi, redoxicentrum minőségében FAD-ot, vas-kén proteint és citokróm-b-t tartalmaz (UNDEN és KRÖGER, 1979). Itt megy végbe a fumarát szukcináttá redukálása a citoszolból származó két hidrogénion felhasználásával. Tehát reakciociklusról van itt szó, amelyben az energiaátalakítás lépései a következők:

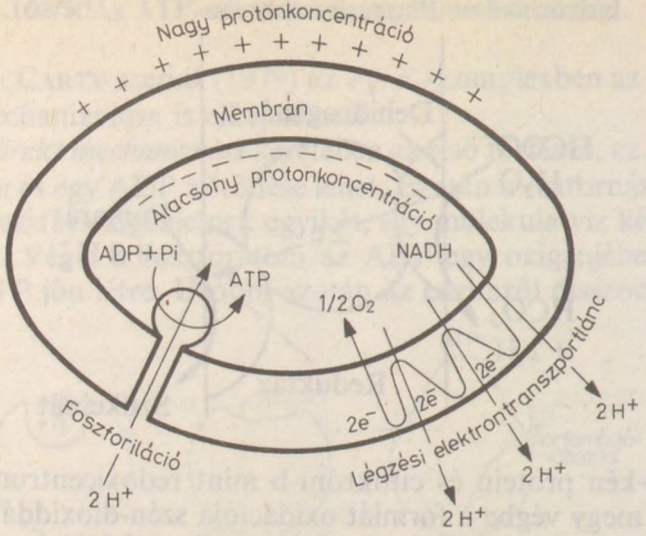
$$AH_{2(\text{külső})} + B_{(\text{belső})} + 2\,H^+_{(\text{belső})} \rightleftharpoons A_{(\text{külső})} + BH_{2(\text{belső})} + 2\,H^+_{(\text{külső})}$$

$$\text{formiát} + H_2O + \text{fumarát} + 2\,H^+_{(\text{belső})} \rightleftharpoons HCO_3^- + \text{szukcinát} + 2\,H^+_{(\text{külső})}$$

Feltételezik, hogy hasonló ciklus működhet azoknál a baktériumoknál is, melyek a szulfátot szulfiddá vagy a szén-dioxidot metánná redukálják. Figyelemre méltó, hogy a *Vibrio succinogenes*nél, bár itt menakinon-„pool" van jelen, nem kofaktorhoz kötött hidrogéntranszport megy végbe.

1.16.19. A mitokondriális oxidatív foszforiláció

Mint arra korábban Dickerson (1979) alapján utaltunk, az eukariota sejtek mitokondriuma, vagyis az a sejtszervecske, melyben az elektrontranszport-foszforiláció végbemegy *Paracoccus*-szerű baktérium sejten belüli szimbiózisából származhatott. A *87.* és *88. ábrák* sematikusan szemléltetik, hogy miként kapcsolódik a mitokondrium membránjában



87. ábra

A mitokondriális elektrontranszport-foszforiláció során a szerves vegyületekről származó hidrogének molekuláris oxigénre mennek át, miközben a felszabaduló energia ATP szintézisére használódik el. A redukált NAD-ról származó elektronpárok a membránon háromszor hatolnak keresztül, és minden alkalommal belülről két protont ragadnak magukkal, amit a külső térbe adnak le. Ennek eredményeként protonkoncentráció-gradiens és elektromos potenciál jön létre, mely a protonokat a membránon át visszafelé vonzza. E gradiens energiája az, ami az ATP-szintézist hajtja. Minden két protonra számítva, mely az F_1–F_0-komplexen át visszaáramlik, egy molekula ATP szintetizálódik

az elektrontranszport a protonátvitellel és a foszforilációval (*lásd* még a 80. ábrát is).

A mitokondrium esetében akkor, amikor a szubsztrátról származó két elektron a redoxiláncon át a molekuláris oxigénre jut, a mátrixtérből az elektrontranszport összesen három régiójában $3 \times 2\ H^+$ távozik a citoszolba. Ezek a protonok azután az ATP-szintetázon (mely olyan, mint a baktériumoké) keresztül visszafelé folynak. Ezt az energiakonzerválást a következő két egyenlettel írhatjuk le (JAGOW, 1979):

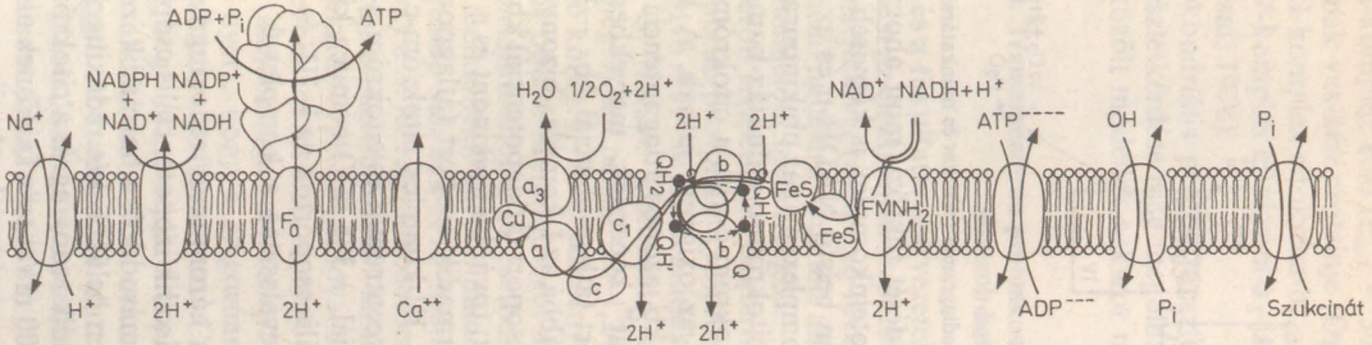
1. Az első energiaátalakítási lépés:

$$AH_2 + \tfrac{1}{2}\ O_2 + 6\ H^+_{(belső)} \rightleftharpoons A + H_2O + 6\ H^+_{(külső)}$$

2. A második energiaátalakítási lépés:

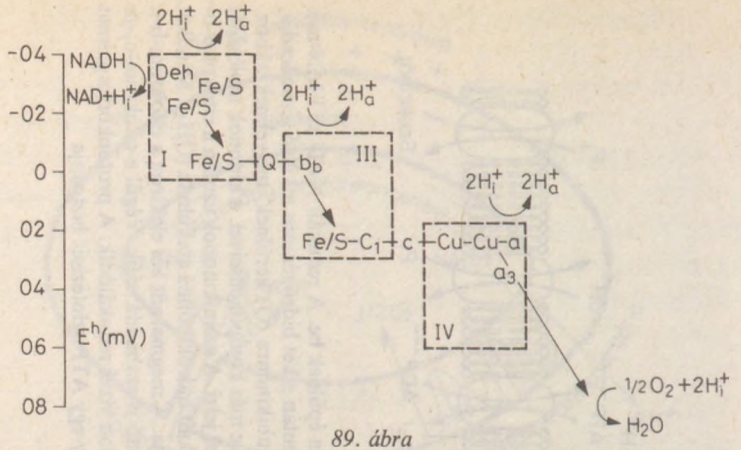
$$ADP + P_{(belső)} + 2\ H^+_{(külső)} \rightleftharpoons ATP + H_2O + 2\ H^+_{(belső)}$$

A *89. ábra* WILSON és munkatársai nyomán (1973), e respirációs lánc energiadiagramját mutatja be. Ez a diagram a respirációs lánc kompo-



88. ábra

A légzési lánc enzimei és más alkotóelemei a mitokondrium membránjába meghatározott orientációban épülnek be. A redukált NAD az FMN-nek két elektront és egy protont ad át, mely a belső térből még egy további protont is felvesz ($FMNH_2$). Ezután a két hidrogéniont a külső térbe leadja, míg az elektronok vas–kén-proteinen át a membrán belső oldalára térnek vissza, ahol két molekula ubikinonra (Q) kerülnek, melyeknek ahhoz, hogy szemikononná (QH) alakuljanak, még egy-egy protont is fel kell venniük. Ellentétben a légzési lánc más komponenseivel, a kinonok molekulái a membránon feltehetően szabad mozgással hatolhatnak keresztül. Ezt az utat az ábrán szaggatott vonal jelzi. A szemikinonok ezután a citokróm-b-től még két elektront, továbbá a mitokondrium belső teréből még két protont vesznek át és teljesen redukált hidrokinonná alakulnak (QH_2). Mindkét hidrokinon citokróm-c-nek ad át egy-egy elektront, miközben a megfelelő protont a külső térbe bocsátja. A megmaradt két elektron a citokróm-b-n át visszatér a ciklusba, míg a kifelé összesen leadásra kerülő hat proton közül ekkor már az utolsó kettő is szabaddá válik. Végül a citokróm-c_1-re került két elektron a citokróm-c-n, a citokróm-a-n és a citokróm-a_3-on át az oxigénre jut, ami ily módon vízzé redukálódik. A protonkörforgalmat az F_1–F_0-komplex teszi teljessé, melyben két-két átáramló (ill. visszaáramló) proton egy-egy ATP szintézisét biztosítja



89. ábra

A mitokondriális elektrontranszport energiadiagramja (WILSON és munkatársai, 1973)

nenseinek sajátos hármas elrendeződését tükrözi, mint ahogy ezeket a membránba beépült három multiproteinkomplex is képviseli. Az elektronok a mátrixtérből (mitokondrium belső) NADH-n és az I-komplexen, a NADH-ubikinon-reduktáz-komplexen át az ubikinonra kerülnek. Innen ezeket, az ubihidrokinon-citokróm-c-reduktáz-komplex (III-komplex) veszi át, majd végül a citokróm-c-n és a citokróm-c-oxidáz-komplexen (IV komplex) keresztül az oxigénre jutnak. A különböző komplexek redoxicentrumai három kb. azonos átlagpotenciálú csoportot, ún. „izopotenciális csoportokat" képeznek, melyekben reakcióegyensúly uralkodik. Az első csoport (átlagpotenciál kb. −300 mV) a NADH-dehidrogenáz FMN-jét, továbbá az I-komplex bizonyos vas-kén proteinjeit tartalmazza. A második csoport (átlagpotenciál kb. 0 mV) az I-komplexnek egy vas-kén proteinjét, továbbá ubikinont és a III-komplex b-típusú citokrómját, míg a harmadik csoport (átlagpotenciál kb. +250 mV) egy vas-kén proteint, a III-komplex citokróm-c_1-jét, citokróm-c-t, továbbá a IV-komplex rézcentrumát és citokróm-a-ját tartalmazza. A citokróm-a_3 (átlagpotenciál +385 mV) némileg kívül esik a harmadik csoporton. Az izopotenciális csoportok az I- III- és IV-komplexeket össze is kötik. Az energialeválasztás a komplexek belsejében következik be.

Ezen az elektrontranszportláncon három nagy redoxiugrás (ΔE^h) ismerhető fel. Az első, az első és a második izopotenciális csoport között az I-komplexen belül. A második, a második és a harmadik izopotenciális csoportok között a III-komplexen belül. E két redoxiugrás szabadenergiája mintegy 300 mV. A harmadik redoxiugrás a citokróm-a_3 és az oxigén között megy végbe. Ez kb. 400 mV-t tesz ki. Ennek az ugrásnak a körletében bizonyítottan protontranszport jelentkezik.

Protonpumpának tekinthető (JAGOW, 1979):

a) Az I-komplex első (E_{m7} = 305 mV) és második (E_{m7} = 245 mV) centrumának vas-kén proteinje (OHNISHI, 1973).

b) A III-komplex citokróm-b_{565}-je (E_{m7} = −30 mV).

c) A IV-komplex citokróm-a_3-ja (E_{m7} = +385 mV) (WILKSTRÖM és munkatársai, 1976).

A mitokondriális protontranszfer, elektrontranszport és energetika számos részletkérdése még megoldatlan (*lásd* pl. HINKLE és MCCARTY, 1978), a közölt modellek sokszor nehezen áttekinthetőek.

1.16.20. Transzmembrán protonkoncentráció-gradiens előállítása obligát anaerob baktériumoknál

Az aerob és a fakultatív szervezetek a transzmembrán protokoncentráció-gradienst az elektrontranszport-lánc redox reakciói révén állítják elő. Baktériumsejtekben respiráció révén fiziológiai úton előállított elektromos potenciál hatására neutrális aminosavak vagy cukrok citoplazmatikus akkumulációja mehet végbe.

Az anaerob fermentatív baktériumok (és a fakultatív szervezetek) a transzmembrán protonkoncentráció-gradienst oxigén hiányában hidrogénion-átvivő ATP-áz révén állítják elő. A transzmembrán pH-gradienst először a *S. faecalis* glikolizáló, de nem szaporodó szuszpenzióiban figyelték meg. A sejt belseje 0,5–1,2 pH-egységgel alkalikusabb volt, mint a környező közeg. Ilyen körülmények között −155 és −195 mV közötti elektromos potenciálkülönbséget mértek. A pH-gradiens és az elektromos potenciálkülönbség ez esetben szenzitívnek bizonyult az ATP-áz-inhibitor diciklohexil-karbodiimiddel szemben, ami arra utal, hogy a protonhajtóerő valóban ATP-hasítással állt elő.

Minthogy a *S. faecalis* feltehetően atípusos anaerob, mely fejlődéstörténete során az aerobiózisból térhetett vissza, felmerül a kérdés, hogy vajon a nála, az ATP-áz-akcióval előállított protonhajtóerő az aerobiozisból az evolúciós visszaúton csak reliktumként maradt-e meg, vagy ősi, eredendő tulajdonsága valamennyi prokariotának? A válasz, igen. Megállapítást nyert, hogy a szigorúan és történetük során változatlanul anaerobnak maradt, fermentatív *Clostridium*okban is előfordul. Sikerült kimutatni, hogy az intracelluláris pH a szaporodó *Clostridium pasteurianum*ban is alkalikusabb volt, mint az extracelluláris, mégpedig 0,4–0,8 pH-egységgel. A szaporodás alatt az extracelluláris pH 7,1-ről 5,1-re csökkent. Hasonlóan az intracelluláris pH 7,5-ről 5,9-re csökkent. Ezt a pH-gradienst (belül alkalikus) protonvezető anyag, továbbá ATP-áz-inhibitor megszüntette. Azokkal a sejtekkel, melyekből az energiahordo-

zó szubsztrát kimerült, mindezt nem lehetett demonstrálni. Ennek folytán a pH-gradienst ATP-ázzal hajtott, a sejtből kifelé irányuló protonkiválasztás, és nem a DONNAN-potenciál hozhatta létre.

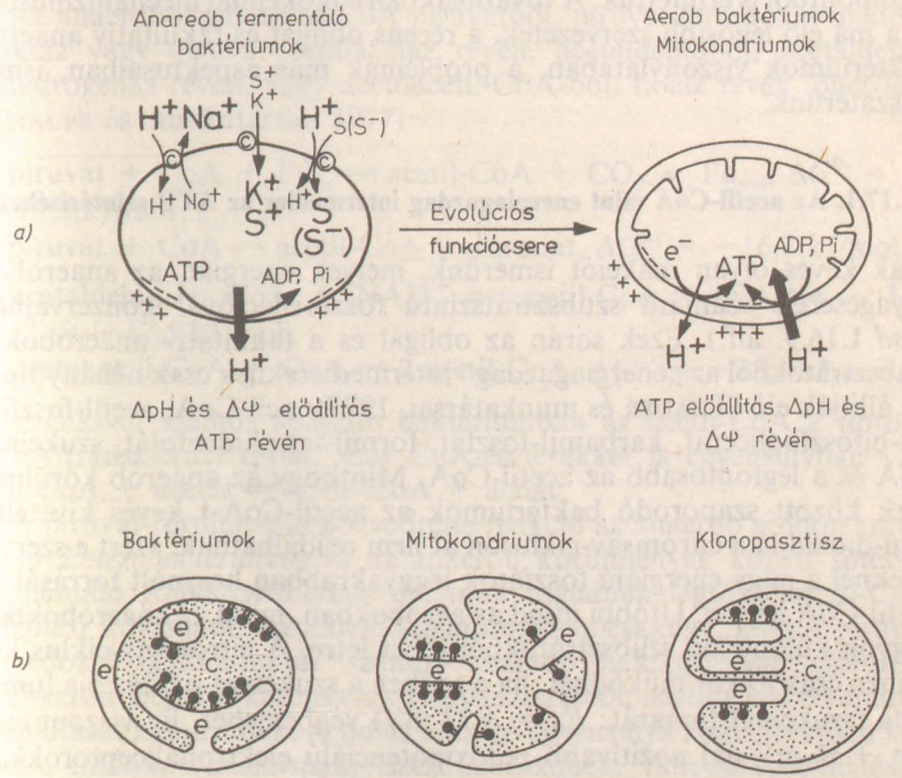
Látható tehát, hogy az ATP-áz-dependens pH-gadiens (belül alkalikus) és a vele járó elektromos potenciálkülönbség (belül negatív), a prokariota sejtek alapvető tulajdonságai és mint ilyenek filogenetikailag rendkívül régiek. A *C. pasteurianum* szuszpenzióiban a galaktóz és a glükonát felvételét, indukálható transzportrendszerek révén, protonhajtóerő energizálja. Ezt az „erőt" fiziológiai körülmények között ATP-ázakció, míg mesterségesen a közeg pH 7,1-ről 6,2-re történt megsavanyítása (Δ pH-komponens), vagy valinomicin indukálta K^+-kiáramlás ($\Delta\Psi$-komponens) válthatja ki. Galaktózakkumuláció csupán a pH-gradiens részvételével, H^+-szimport révén is észlelhető. A galaktóz és a glükonát transzlokációját a protonvezetők és az ATP-áz-inhibitorok gátolják, szemben a glükóz és a fruktóz transzportjával, melynél foszfotranszferáz-rendszer működik közre. A protonátvivő ATP-ázt a kemiozmotikus transzportmechanizmus működésében kulcskomponensnek tekinthetjük. Ezt az enzimet már számos aerob és fakultatív baktériumból kimutatták, melyeknél az elektrontranszport foszforilációhoz kapcsolódhat. Újabban a szigorúan anaerob *Clostridium pasteurianum*ban is felfedezték. Az ATP-fogyasztó protontranszlokáció az anaerob fermentatív baktériumban a szubsztrátok és ionok transzmembrán mozgásának és ennek révén a mikroba egész létének általános előfeltétele lehet.

1.16.21. Membránkötődésű ATP-áz – ATP-szintetáz: evolúciós funkciócsere

Ez a filogenetikailag ősi „ATP-felhasználás a pH-gradiens és az elektromos potenciálkülönbség létrehozására" mechanizmus, mely már a szigorúan anaerob fermentatív baktériumokban is megvalósult, később az evolúció során valósággal visszafordult a filogenetikailag fiatalabb „ATP-szintézis, pH-gradiens és elektromos potenciálkülönbség hasznosítása révén"-mechanizmusra, melyet ma nemcsak az anaerob respirációs, az anaerob fototróf és az aerob baktériumok használnak, hanem ez működik a mitokondriumokban és a kloroplasztiszokban is (THAUER és munkatársai, 1977). Amint az a fermentatív anaerob prokariotákban ma is megtalálható, a protonhajtóerő eredeti funkciója az anyagcsere és a transzportfolyamatok összekapcsolása volt. Az eukariotákban ezt az általános transzportfunkciót részben a nátrium-hajtóerő vette át, míg az eredeti protonhajtóerő ATP előállítására specializálódott és elhelyezését tekintve a mitokondriumokra, továbbá a kloroplasztiszokra korlátozódott.

A funkcióváltásnak ezt az evolúciós folyamatát a *90. a, b. ábra* tárja elénk.

A baktériumsejt, a mitokondrium és a kloroplasztisz funkcionális analógiáit és evolúciós kapcsolatait (*90.b. ábra*) az ATP szintézist eredményező protonkoncentrációs gradiens hasznosítása szempontjából még inkább megérthetjük, ha a mitokondrium esetében azokat az enzimeket, melyek az intermembrán-térben, a kriszták üregeiben vagy a kriszták membránjának külső felületén helyezkednek el, extracitoplazmatikus lokalizációjúnak tekintjük. Hasonlóan a kloroplasztiszban az intermembrán-tér, a tilakoidok ciszternái vagy a tilakoidok belső felszíne



90. ábra

a) A szubsztrátakkumuláció és iontranszport, mint H^+-átvivő ATPáz-tól függő folyamatok az anaerob fermentatív baktériumoknál. A H^+-átvivő ATPáz feltételezett átalakulása H^+-visszavivő ATP-szintetázzá az evolúció során. ΔpH: pH-gradiens (belül alkalikus); Δ Ψ: elektromos potenciálkülönbség (belül negatív); S: neutrális szubsztrát; S^-: anionos szubsztrát; S^+: pozitív töltésű szubsztrát; $e^- \rightarrow$:a légzési láncban Δ pH-t és ΔΨ-t előállító elektrontranszport; *c:* szállító (THAUER és munkatársai, 1977). *b)* A baktériumsejt, a mitokondrium és a kloroplasztisz membrán-rendszereinek és az ATP szintéziséért felelős membránhoz kötődő proteinkomplexek térbeli elhelyezkedésének vázlatos összehasonlítása HOOPER és DISPIRITO (1985) után. c= citoplazmatikus, e= citoplazmán kívüliként tekinthető tér

extracitoplazmatikusnak fogható fel. Ezzel szemben a sztrómában vagy a tilakoidok membránjának külső felszínén levő enzimek citoplazmatikus lokalizációjúként kezelhetők.

1.17. A szubsztrátszintű és az elektrontranszport-foszforiláció változatai az anaeroboknál

A fentiekben a szubsztrátszintű- és az elektrontranszport-foszforiláció energianyerő és -konzerváló mechanizmusait, melyek már nagyon korán, az élet hajnalán, a középső prekambriumban kialakulhattak, több szempontból is érintettük. A továbbiakban e biokémiai mechanizmusokra a ma élő legősibb szervezetek, a recens obligát és fakultatív anaerob baktériumok viszonylatában, a problémák más aspektusaiban, ismét visszatérünk.

1.17.1. Az acetil-CoA mint energiagazdag intermedier az ATP szintéziséhez

Csak kevés olyan reakciót ismerünk, melyek energiát, az anaerobok anyagcseréje számára szubsztrátszintű foszforilációval konzerválnak (*lásd* 1.16.9. alf.). Ezek során az obligát és a fakultatív anaerobok a szubsztrátokból az „energiagazdag" intermediereknek csak néhány típusát állítják elő (THAUER és munkatársai, 1977): acil-CoA, acetil-foszfát, 1,3-bifoszfoglicerát, karbamil-foszfát, formil-tetrahidrofolát, szukcinil-CoA és a legfontosabb az acetil-CoA. Minthogy az anaerob körülmények között szaporodó baktériumok az acetil-CoA-t kevés kivétellel szén-dioxiddá a citromsav-cikluson át nem oxidálhatnak, ezért e szervezeteknél a nagy energiájú foszfátok leggyakrabban használt forrását az acetil-CoA képezi. Utóbbi mind az aerobokban, mind az anaerobokban nagyon különböző szubsztrátokból jöhet létre. A citromsav-ciklus különben csak akkor működhet, ha a sejtben a szukcinát oxidációja fumaráttá (szukcinát/fumarát: $E_0 = +33$ mV) végbemehet. Ez viszont csupán +33 mV-nál pozitívabb redoxipotenciálú elektronakceptorokkal, mint például oxigénnel, nitráttal, nitrittel, Fe^{3+}-el, tritionáttal és tetrationáttal lehetséges. Az acetil-CoA ennek folytán az anaerobokban részben vagy egészben, az ATP-szintézis rendelkezésére áll, ami a foszfotranszacetiláz és az acetát-kináz reakciók révén valósul meg:

$$\text{acetil-CoA} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{acetil-P} + \text{CoA} \quad \Delta G'^{0}_{obs} = +9{,}0 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{acetil-P} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{acetát} + \text{ATP} \quad \Delta G'^{0}_{obs} = -13{,}0 \text{ kJ/mol}$$

A foszfotranszacetiláz és az acetát-kináz minden anaerob baktériumban, mely energetikai anyagcseréje keretében acetil-CoA-t állít elő és ezt ATP szintézisére használja, megtalálható. Ez a két enzim néhány aerob baktériumban *(Acetobacter xylinum* és *Azotobacter vinelandii)* is kimutatható. Eukariotákban azonban még nem észlelték. Anaerob protozoonokban, melyek acetil-CoA-ból acetátot állítanak elő, ezt a lépést egy, az evolúció során újonnan szerzett acetát-tiokináz katalizálja, mely egyrészt a CoA-t regenerálja, másrészt a tioészterkötés energiáját az ADP vagy GDP foszforilálásával konzerválja (MÜLLER, 1975):

$$\text{acetil-CoA} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{acetát} + \text{CoA} + \text{ATP} \quad \Delta G^{0'}_{obs} = 4{,}0 \text{ kJ/mol}$$

Az anaeroboknál acetil-CoA piruvátból, piruvát-ferredoxin-oxidoreduktáz vagy piruvát-formiát-liáz révén, acetaldehidből, acetaldehid-dehidrogenáz révén, vagy acetoacetil-CoA-ból, tioláz révén jöhet létre (THAUER és munkatársai, 1977):

$$\text{piruvát} + \text{CoA} + Fd_{ox} \rightleftharpoons \text{acetil-CoA} + CO_2 + Fd_{red}, \quad \Delta G^{0'} = 19{,}2 \text{ kJ/mol};$$

$$\text{piruvát} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{acetil-CoA} + \text{formiát}, \quad \Delta G^{0'} = -16{,}3 \text{ kJ/mol};$$

$$\text{acetaldehid} + \text{CoA} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{acetil-CoA} + \text{NADH} + H^+, \quad \Delta G^{0'} = -17{,}5 \text{ kJ/mol};$$

$$\text{acetoacetil-CoA} + \text{CoA} \rightleftharpoons 2 \text{ acetil-CoA}, \quad \Delta G^{0'} = -25{,}1 \text{ kJ/mol}.$$

Ezenkívül számos anaerob baktériumban az acetil-CoA a tioforáz (CoA-transzferáz) révén, más CoA-észterekkel is egyensúlyban van: acil-CoA + acetát $\rightleftharpoons$ acetil-CoA + acilát.

A piruvát-formiát-liáz közvetítette reakció az anaerob módon szaporodó *Enterobacteriaceae* és az anaerob körülmények között sötétben fermentáló *Rhodospirillaceae* családok tagjainak legfőbb acetil-CoA-előállító folyamata. Az aldehid-dehidrogenáz csakúgy, mint a piruvát-ferredoxin-oxidoreduktáz számos anaerob baktériumban előfordul. A β-ketotiolázok β-ketonsavak CoA-észtereiből, acetil-CoA reverzíbilis előállítását katalizálják. A tioláz reakció egyensúlya nagyon erősen kedvez a tiolitikus hasításnak. Ezek az enzimek, változó specificitással, aerob és anaerob szervezetekben egyaránt előfordulnak. Az aerobokban a zsírsavhasításban, a β-hidroxi-β-metil-glutaril-CoA szintézisében, továbbá a poli-β-hidroxi-butirilsav szintézisében és újrahasznosításában vesznek részt. Számos anaerob baktériumban fő funkciójuk, hogy acetil-CoA-ból az acetoacetil-CoA előállítását katalizálják. Ez a reakció a vajsavas fermentációkban a vajsav szintézisének kiinduló lépése.

Az aerob körülmények között szaporodó mikrobákban az acetil-CoA piruvátból vagy β-ketonsavak CoA-észtereiből jön létre.

1.17.2. Az anaerobok egyéb más energiagazdag intermedierjei

Az acetil-CoA-n kívül elsődleges „energiagazdag" intermedierek minőségében más tioészterek is szerepelhetnek. Acil-CoA-észterek (propionil-CoA, butiril-CoA, p-hidroxi-fenil-acetil-CoA) aminosavaknak (treonin, leucin és tirozin) anaerob oxidációi során is létrejönnek. Valószínű, hogy az ATP-szintézishez a megfelelő acil-foszfát útján ezeknek az energiagazdag vegyületeknek mindegyikét fel lehet használni.

Acetil-foszfát elsődleges energiagazdag intermedierként szerepelhet. Az acetil-foszfát a legtöbb baktériumban acetil-CoA-ból foszfotranszacetiláz révén képződik. Néhány anaerob baktériumban azonban acetil-foszfát más prekurzorokból is eredhet. A *Lactobacillus delbrückii*ben a piruvát dehidrogénezése alkalmával acetil-foszfát és nem acetil-CoA keletkezik (SANADI, 1963). E reakciót egy piruvát-dehidrogenáz katalizálja, mely elektronakceptorként flavin-adenin-dinukleotidot (FAD-ot) használ. A *Micrococcus lactilyticus*ban egy enzim piruvátból formiátot és acetil-foszfátot állít elő. E reakcióhoz CoA nem szükséges.

Az 1,3-bifoszfoglicerát (1,3-BPG) a baktériumokban fontos energiagazdag intermedierként szerepel. A glicerinaldehid-foszfát (GAP) oxidációja 3-foszfogliceráttá (PG) fontos köztilépése valamennyi anaerob és aerob szervezet energiaszerző anyagcseréjének, melyek energiaforrásként szénhidrátokat vagy glicerint használnak. A reakció 1,3-bifoszfoglicerátón (1,3-BPG) mint energiagazdag vegyületen át halad és két enzim katalizálja, a glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz és a foszfoglicerát-kináz. Az oxidált glicerinaldehid-foszfát moljaira számítva, egy mol ATP szintetizálódik (*lásd* az 1.14.6. és 1.16.9. alfejezet).

Energiagazdag intermedierként a karbamil-foszfát (KAP) is számításba jöhet (BAUCHOP és ELSDEN, 1960; SCHINKE és munkatársai, 1966, stb.). Néhány baktériumban, melyek argininen *(S. faecalis)*, agmatinon *(S. faecalis)* vagy allantoinon *(Streptococcus allantoicus)* mint energiaforráson szaporodnak, ureidovegyületek (R–NH–CO–NH_2) mint köztitermékek jönnek létre. Az ureidovegyületek foszforolitikus hasítással karbamil-foszfátra (KAP) és a megfelelő aminokra (amidok) degradálódnak. Az előállított karbamil-foszfátot karbamát-kináz segítségével ATP szintéziséhez használják. Az arginin hidrolízise arginin-deimidáz révén citrullint eredményez, mely azután az ornitin-karbamoil-transzferáz közreműködésével foszforoklaszt hasítással ornitinre és KAP-ra bomlik. Az ily módon előállított ATP hatékonyan növeli a *S. faecalis* szaporodásának intenzitását, amennyiben más létfontosságú tápforrások ugyancsak jelen vannak:

$$\text{arginin} + H_2O \rightarrow \text{citrullin} + NH_3 \quad \Delta G^{0'} = -37{,}7 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{citrullin} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{KAP} + \text{ornitin} \quad \Delta G^{0'} = +28{,}5 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{KAP} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{karbamát} \quad \Delta G^{0'}_{obs} = -7{,}5 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{karbamát} + H_2O \rightleftharpoons \text{bikarbonát} + NH_3 \quad \Delta G^{0'} = -3{,}3 \text{ kJ/mol}$$

A KAP előállítása ornitinből termodinamikailag meglehetősen kedvezőtlen. A citrullin előállítása argininből azonban irreverzíbilis reakció. Így a folyamat egésze eléggé exergonikussá válik ahhoz, hogy 1 mol ATP szintézisét ADP-ből és Pi-ből lehetővé tegye.

Energiagazdag intermedierként a formil-tetrahidrofolát is számításba jöhet (JOYCE és HIMES, 1966; RABINOWITZ, 1960, stb.). A formil-tetrahidrofolát-szintetáz, formil-FH_4-ből a formiát és a tetrahidrofolát (FH_4) reverzíbilis létrejöttét katalizálja. Egyidejűleg ADP ATP-vé foszforilálódik:

$$\text{formil-}FH_4 + \text{ADP} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{formiát} + FH_4 + \text{ATP}$$

$$\Delta G^{0'}_{obs} = +8{,}4 \text{ kJ/mol}$$

Az ATP előállítása e reakció révén rendkívül specializált folyamat. Csupán egyetlen purinfermentáló *Clostridium*, a *C. cylindrosporum* használja ezt a mechanizmust, mely nála az ATP-előállítás fő útja.

Végül, mint energiagazdag intermedier a szukcinil-CoA is fontos szerepet játszik. Ez a vegyület a citromsav-körben α-ketoglutarátból jön létre, majd belőle szukcinátot a tiokináz hasít le. Ez utóbbi reakció a GDP vagy ADP foszforilációjával kapcsolódik. Az, hogy e folyamat az anaerobokban is végbemegy-e, egy-két kivételtől eltekintve (KRÖGER és munkatársai, 1974) nem valószínű.

1.17.3. Az elektrontranszport-foszforiláció változatai az anaerob baktériumoknál

Ezek után foglalkozzunk az elektrontranszport-foszforilációk különböző változataival, különös tekintettel az anaerob szervezetekre, melyek őseinél az energiaszerzés és -konzerválás ilyen típusú mechanizmusai elsőnek alakulhattak ki.

Az ATP szintéziséről a kemotróf anaerobokban gyakran feltételezik, hogy kizárólag csak elektronadó, formailag hidrogénképző reakciókkal társul és hogy ennek folytán ezekben csupán szubsztrátszintű foszforiláció útján halad. A valóságban azonban, amint az a legutóbbi években kiderült, az ATP-előállítás mind a fakultatív, mind az obligát anaerobokban az energetikai anyagcsere elektronakceptor, formailag hidrogénfogyasztó reakcióihoz is kapcsolódhat. Számos szigorúan anaerob bak-

térium hidrogénnel mint elektrondonorral és fumaráttal, szulfáttal, nitráttal vagy szén-dioxiddal mint elektronakceptorral „vegyes-fermentációkat" valósít meg, miközben szaporodásához az intermolekuláris redoxifolyamatokból hasznos energiát (ATP) merít. Minthogy a hidrogén oxidációjához kapcsolt szubsztrátszintű foszforiláció nem ismeretes, az ATP feltehetően elektrontranszport-foszforiláció útján jön létre. E helyen kell azonban rámutatnunk, hogy ha egy anaerob szervezetben egy bizonyos „hidrogénező"-reakcióhoz ATP-szintézis kapcsolódik, az még nem szükségszerűen jelenti azt, hogy ez a reakció minden anaerob szervezetben mindig foszforilációval társul. A hidrogénezés reakciója számos anaerob baktériumban csupán az elektronsüllyesztő szerepét tölti be, ami viszont a szubsztrátszintű foszforiláció folytonosságát biztosíthatja.

E problémakört a továbbiakban a következő rendszerben (THAUER és munkatársai, 1977) tárgyaljuk:

1. Bizonyítottan foszforilációval kapcsolódó hidrogénező reakciók:

a) A szén-dioxid redukciója metánná.
b) A szulfát redukciója szulfiddá.
c) A fumarát redukciója szukcináttá.
d) A nitrát redukciója nitritté.
e) A nitrit redukciója dinitrogénné.

2. Feltehetően, ill. esetenként csak a legutóbbi időben bizonyítottan foszforilációval kapcsolódó hidrogénező reakciók:

a) A szén-dioxid redukciója acetáttá.
b) Az elemi kén redukciója szulfiddá.
c) A glicin redukciója acetáttá.
d) Az akrilil-CoA redukciója propionil-CoA-vá.
e) A tetrationát redukciója tioszulfáttá.
f) A ferrivas redukciója ferrovassá.

A bizonyítottan foszforilációhoz kapcsolódó reakciókat a hidrogénről a megfelelő elektronakceptorra haladó, elektrontranszferrel társuló, növekvő szabadenergia-változások sorrendjében tárgyaljuk.

Valamennyi metanogén és szulfátredukáló baktérium, továbbá számos fumarátredukáló baktérium szigorúan anaerob. A nitrátredukáló baktériumok csoportjában a fakultatív anaerob szervezetek százaléka nagyobb, mint a fumarátredukáló baktériumok között, és csaknem 100% a denitrifikálók esetében. A metánbaktériumok csupán a szén-dioxidot redukálják. Ezzel szemben a szulfátredukáló baktériumok gyakran fumarátot is, a fumarátredukáló baktériumok szulfátot vagy nitrátot is, míg a nitrátredukálók fumarátot vagy nitritet is használnak.

1.17.4. A szén-dioxid redukciója metánná

Hidrogénen és szén-dioxidon mint egyedüli energiaforráson valamennyi metánbaktérium szaporodik:

$$CO_2 + 4\,H_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O,\ \Delta G^{0'} = -131\ \text{kJ/mol}$$

Ezenkívül, a *Methanobacterium* sp. MOH-törzs kivételével, a *M. thermoautotrophicum* és más *Methanobacterium*-fajok, továbbá a *Methanosarcina barkeri* szaporodásukhoz és a metán előállításához még a formiát oxidációjából nyert elektronokat is felhasználják. A *M. barkeri* még metanolon is tenyészik, míg a *M. thermoautotrophicum*, ha szén-dioxid és hidrogén jelenlétében szaporodik, acetátot is képes metabolizálni. THAUER és munkatársai szerint (1977) az a tény, hogy a *M. thermoautotrophicum* ásványi közegben, szerves vegyületek nélkül is szaporodik, kizárja annak lehetőségét, hogy nála az ATP-szintézis szubsztrátszintű foszforilációval történjen. A szén-dioxidon és hidrogénen szaporodó metánbaktériumok moláris szaporulathozama *(molar growth yield)* igen alacsony, a szén-dioxidból és a hidrogénből előállított metán moljaira számítva csupán 1–3 g sejt (száraz súly) termelődik. Azt a biokémiai mechanizmust, melynek során a molekuláris hidrogénből és szén-dioxidból metán keletkezik, részleteiben az 1.19.4. alfejezetben tárgyaljuk.

1.17.5. A szulfát redukciója szulfiddá

$$SO_4^{2-} + 4\,H_2 + H^+ \rightarrow HS^- + 4\,H_2O \quad \Delta G^{0'} = -152{,}2\ \text{kJ/mol}$$

E folyamat biokémiáját részleteiben az 5.6.19.–5.6.24. alfejezetekben ismertetjük.

1.17.6. A fumarát redukciója szukcináttá

$$\text{Fumarát}^{2-} + 2H_2 \rightarrow \text{szukcinát}^{2-} \quad \Delta G^{0'} = -86{,}0\ \text{kJ/mol}$$

Számos baktérium a katabolikus redoxi folyamatokban elektronakceptorként fumarátot használ. Közülük a *Vibrio succinogenes* az egyik legismertebb, mely hidrogénen és fumaráton (lásd 1.18.2. alf.) mint egyedüli energiaforráson képes szaporodni (WOLIN és munkatársai, 1961). Vannak közöttük szigorúan anaerobok, mint pl. a *Desulfovibrio gigas* és a *Clostridium formicoaceticum*, vagy fakultatív anaerobok, mint az *E. coli* stb. Sok anaerob baktériumban a fumarát szukcináttá redukálása inkább anabolikus, semmint katabolikus jellegű, ugyanis ez látja el a szervezetet szukcináttal a tetrapirollok szintéziséhez.

A fumarát mint elektronakceptor könnyen rendelkezésre áll. Könnyen előállítható nagyon közönséges szénvegyületekből, mint pl. malátból, aszpartátból, piruvát + bikarbonátból és glükóz + 2 bikarbonátból. A fumarát/szukcinát pár viszonylag magas redoxipotenciál értéke (E_0 = + 33 mV) a fumaráttal különböző hidrogéndonorok (pl. NADH, laktát, formiát) oxidációját teszi lehetővé. E reakciók szabadenergia-produkciója ADP-ből és anorganikus foszfátból egy ATP szintéziséhez elegendő. A disszimilációs fumarátredukció specifikus dehidrogenázokat, elektronszállítókat és fumarát-reduktázt magába foglaló elektron-transzport-rendszer révén megy végbe.

Ami az ezekben a redoxifolyamatokban részt vevő dehidrogenázokat illeti, a szervezetektől maguktól és a tenyészkörülményektől függően, a membránfrakció egy hidrogenázt, egy NADH-dehidrogenázt, egy formiát-dehidrogenázt, egy NAD-független laktát-dehidrogenázt vagy egy NAD-független glicerin-foszfát-dehidrogenázt tartalmazhat. A disszimilációs fumarátredukcióban mint elektrondonorok hidrogén, NADH, formiát, laktát és glicerinfoszfát vehetnek részt. A fumarát-reduktáz vas-kén flavoprotein, mely prosztetikus csoportként kovalensen kötött FAD-ot tartalmaz. A FAD 8α helyzetben hisztidinhez kapcsolódik. Ily módon a disszimilációs fumarát-reduktáz az élesztők asszimilációs fumarát-reduktázához és a mitokondriumok katabolikus szukcinát-dehidrogenázához mutat hasonlóságot.

Valamennyi, az energiaszerző anyagcsere útjain elektronakceptorként fumarátot használó baktérium membránfrakciója naftokinont és általában menakinont tartalmaz. A menakinon a baktériumok disszimilációs fumarátredukciójához szükséges redoxiközvetítőnek tűnik, amit már magának a kinonnak a jelenléte is bizonyít, továbbá az is, hogy a menakinon redukciója specifikus elektrondonorokkal, míg reoxidációja fumaráttal nem ütközik akadályba. A fumarát-reduktáz-aktivitást elárúló membránfrakciókban, általában b-típusú citokrómok is jelen vannak.

Igazolt tény, hogy az *E. coli*ban mind a NADH-, mind a formiátdependens fumarátredukció transzmembrán pH-gradiens előállításával társul. Eszerint a fumarát redukciójához kapcsolódó pH-gradiens kialakítása általános jelenségnek tekinthető. A *V. succinogenes* és az *E. coli* hidrogénen és fumaráton mint egyedüli energiaforráson kimutathatóan szaporodnak. Ez esetben az egyetlen előállított végtermékük a szukcinát. A szaporodás mértékéből arra lehet következtetni, hogy ezekben a szervezetekben a fumarát redukciója foszforilációval kapcsolódhat. A *V. succinogenes* szferoplasztjaiban az ADP foszforilációja a fumarát szukcináttá redukálásától függött. A foszforiláció mértéke megközelítően azonos volt a fumarát redukciójáéval.

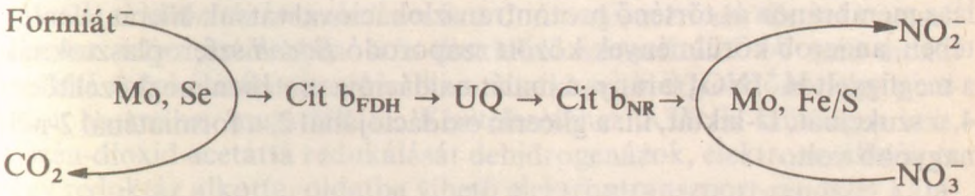
Az *E. coli* fumarátredukciójával kapcsolatban *lásd* még az 1.31.6. alfejezetet és a 138. ábrát.

1.17.7. A nitrát redukciója nitritig

$$NO_3^- + H_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -39 \text{ kcal/mol}$$

A nitrátlégzés a fakultatív anaerob baktériumok szélesen elterjedt tulajdonsága és még az olyan szigorúan anaerob baktériumokban is, mint a *Veillonella alcalescens*, a *Clostridium perfringens* stb. a nitrát az energiaszerző anyagcserében valamilyen módon terminális elektronakceptor minőségében szolgálhat. A legtöbb mikrobában a nitrát nitriten túl már nem, másokban azonban nitrogén-oxidokig, dinitrogénig vagy ammóniáig redukálódik (*lásd* 4.21.1–4.21.20.).

A nitritig haladó disszimilációs nitrátredukciót membránkötődésű elektrontranszport-rendszer katalizálja, mely dehidrogenázokat, elektronszállítókat és nitrátreduktázt tartalmaz. Az *E. coli*ban az elektronoknak a formiáttól a nitrátig tartó áramát ENOCH és LESTER után (1974) így vázolhatjuk (*lásd* még 1.31.6.).



(UQ = ubikinon; Mo, Se = molibdo-szeleno-protein; Mo, Fe/S = molibdo-vas-kén-protein; Cit b_{FDH} = a formiát dehidrogenáz citokróm-b-je; Cit b_{NR} = a nitrátreduktáz citokróm-b-je.)

A nitrátot a NADH, a szukcinát, a laktát, a formiát, a glicerin-foszfát és a hidrogén membránkötődésű dehidrogenázok révén, melyeket a disszimilációs nitrát-reduktázzal elektronszállítók (egy kinon és egy citokróm) kötnek össze, nitritig redukálják. A szénhidrátokon szaporodó bélbaktériumokban általában a NADH és a formiát az előnyben részesített reduktánsok. Amikor az *E. coli* glicerinen, szukcináton vagy laktáton + nitráton szaporodik, akkor viszont a membránfrakció már aktív szukcinát-dehidrogenázt vagy glicerin-foszfát-dehidrogenázt, ill. laktát-dehidrogenázt tartalmaz. Az elektrontranszportot a szukcináttól, a glicerin-foszfáttól, ill. a laktáttól a nitrát felé ezek közvetítik.

„Nitrát-reduktáz A": A részecskéhez kötődő nitrátreduktáz minden baktériumban, mely előállítja, légzési funkciót tölt be. Nitráthoz hason-

lóan klorátot és bromátot is redukál és azidgátlásra nagyon érzékeny. Ezt az enzimet általában mint „nitrát-reduktáz A"-t jelölik meg. Ily módon különböztetik meg az ún. asszimilációs nitrát-reduktáztól, mely nem a membránban, hanem a szolubilis sejtfrakcióban található és „enzim B"-nek keresztelték. Ez utóbbi a klorátot nem redukálja és sokkal kevéssé érzékeny az azidok gátlására (*lásd* 4.22. alf.).

A GRAM-negatív baktériumok nitrátlégzésében ubikinon is részt vesz. Ezenkívül valamennyi baktérium, mely ún. részecskéhez kötődő aktív nitrát-reduktázt tartalmaz, legalább egy b-típusú citokrómmal is rendelkezik.

A nitrát maga a citoplazmamembrán külső oldalán redukálódik. Ezt az állítást arra a megfigyelésre alapozzák, hogy a sejtbe a nitrátbelépés mértéke 30 °C-nál kb. 0,1%-a csak annak, ami a kimutatott nitrátredukció intenzitásának megfelelne. A nitrát-reduktáz nitrátredukáló helyének (aktív központjának) külső oldali jelenléte azidgátlásos kísérletek eredményeiből és a nitrátnak az intra- és az extracelluláris terekben észlelt megoszlásából is következtethető. Úgy tűnik, hogy a nitrát-reduktáz a citoplazmamembránt teljes mélységében áthidalja, és annak csakis a külső oldalán, a belülről származó redukáló ekvivalensekkel, a nitrát vektoriális redukcióját katalizálja. Az *E. coli*ban a nitrát nitritté redukálása membránon át történő protontranszlokációval társul. Nitrát jelenlétében, anaerob körülmények között szaporodó *E. coli* szferoplasztoknál a megfigyelt H^+/NO_3^- arány, a malát oxidációja esetében megközelítően 4, a szukcinát, D-laktát, ill. a glicerin oxidációjánál 2, a formiáténá 2-nél nagyobb volt.

1.17.8. A nitrit redukciója dinitrogénné

$$2\,NO_2^- + 3\,[H_2] + 2\,H^+ \rightarrow N_2 + 4\,H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -795\ \text{kJ/mol}$$

Viszonylag kevés baktérium képes a nitrátot egészen elemi nitrogénig redukálni, vagyis denitrifikálni. Ezeknél nitrit, nitrogén-oxid és dinitrogén-oxid lehetnek a szabad köztitermékek. A legtöbb denitrifikáló fermentációra nem képes fakultatív anaerob baktérium anaerob körülmények között csak akkor szaporodik, ha oxigén helyett más anorganikus terminális elektronakceptorral látják el. Az egyetlen valódi obligát anaerob, melynél ez idáig denitrifikációt mutathattak ki, a *Propionibacterium pentosaceum*. A denitrifikálókban a nitrát ⟶ nitrit redukció, miként a nitrit ⟶ dinitrogén redukció is foszforilációhoz kötött.

A denitrifikáció biokémiájával, részleteiben, a 4.21. alfejezetben foglalkozunk.

A feltevések szerint foszforilációhoz számos további redukciós folyamat kapcsolódhat. Közvetlen bizonyítékaink gyakran nincsenek. Ilyen reduktív folyamatokat az alábbiakban sorolunk fel.

A szén-dioxid redukcióját acetáttá, a kénét kén-hidrogénné, a glicinét acetáttá és az akrilil-CoA-ét propionil-CoA-vá szigorúan anaerob baktériumok, míg a tetrationát redukcióját tioszulfáttá, továbbá a vas(III) redukcióját vas (II)-vé fakultatív anaerob szervezetek katalizálják.

1.17.9. A szén-dioxid redukciója acetáttá

$$2\,CO_2 + 4\,H_2 \rightarrow \text{acetát}^- + H^+ + 2H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -95\ \text{kJ/mol}$$

A *Clostridium aceticum* egy törzse hidrogén és szén-dioxid jelenlétében, ezeken mint energiaforráson szaporodik, miközben végtermékként acetátot és nem metánt termel (KARLSSON és munkatársai, 1948). Ez a törzs azonban elveszett és még nem sikerült hasonlót izolálni. Más, igaz nem spóraképző anaerob baktériumtörzseket viszont, melyek szén-dioxidból és hidrogénből csak acetátot szintetizálnak, már kitenyésztettek.

A *Clostridium thermoaceticum* és a *C. formicoaceticum* törzsei képesek acetátot teljes mértékben szén-dioxidból szintetizálni. A szén-dioxid acetáttá redukálását sejtmentes kivonataikban, elektrondonorként piruvátot használva mutatták ki. Kivitelezéséhez ATP is szükséges volt. A szén-dioxid acetáttá redukálását dehidrogenázok, elektronszállítók és négy reduktáz alkotta, oldatba vihető elektrontranszport-rendszer katalizálja. A glükóz az elektront szolgáltató részreakciókban két molekula acetáttá és két molekula szén-dioxiddá oxidálódik, miközben redukált NAD és ferredoxin jönnek létre. Mindkét faj törzseinek sejtmentes kivonatai NAD-specifikus glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenázt és ferredoxinspecifikus piruvát-dehidrogenázt tartalmaznak. A szén-dioxid redukciója acetáttá feltehetően szabad formiáton, formil-tetrahidrofoláton, metenil-tetrahidrofoláton, metilén-tetrahidrofoláton és metil-tetrahidrofoláton át halad. E reakciósorozathoz szükséges valamennyi enzimet, továbbá ferredoxint, flavodoxint, citokrómokat és menakinonokat a *C. thermoaceticum* és a *C. formicoaceticum* kivonataiból kimutatták. A *C. thermoaceticum*ban a szén-dioxid redukciója metilén-FH_4 oxidációs szintre, két mol NADPH-t (!) igényel.

1.17.10. Az elemi kén redukciója szulfiddá

$$S^0 + [H_2] \rightarrow HS^- + H^+ \qquad \Delta G^{0'} = -27{,}9 \text{ kJ/mol}$$

A *Desulfuromonas acetoxidans* (lásd 5.8. alfejezet) szaporodásának energiaszükségletét az acetátnak vagy az etanolnak szén-dioxiddá való oxidálásával fedezi, amihez elektronakceptor minőségében elemi ként használ. Az elemi ként mint elektronakceptort nála szerves szulfidok, cisztein és oxidált glutátion is helyettesítheti.

1.17.11. A glicin redukciója acetáttá

$$\text{glicin} + [H_2] \rightarrow \text{acetát}^- + NH_4^+ \qquad \Delta G^{0'} = -77{,}8 \text{ kJ/mol}$$

A *Clostridium sticklandii* és sok más *Clostridium* faj egy alanint + két glicint három acetáttá, egy szén-dioxiddá és három ammóniává fermentál ($\Delta G^{0'} = -153{,}1$ kJ/mol). Az alanin piruváton át acetáttá és szén-dioxiddá oxidálódik, mialatt szubsztrát szintű foszforilációval egy mol ATP szintetizálódik. E reakcióban felszabaduló elektronok (NADH-n és redukált ferredoxinon át) két mol glicinnek acetáttá és ammóniává történő redukálásához használódnak el. Feltételezik, hogy ezek során elektrontranszport–foszforiláció útján is képződik ATP (*lásd* még az 1.14.9. alfejezetet).

1.17.12. Az akrilil-CoA redukciója propionil-CoA-vá

$$\text{akrilil CoA} + [H_2] \rightarrow \text{propionil-CoA} \qquad \Delta G^{0'} = -77{,}4 \text{ kJ/mol}$$

Számos anaerob baktériumban a fermentáció végproduktuma propionát. A legtöbb esetben pl. a propionsavas baktériumokban, a *V. alcalescens*ben és a *S. ruminantium*ban a propionát a laktátból piruváton, oxálecetsavon, maláton, fumaráton, szukcináton, szukcinil-CoA-n, metil-malonil-CoA-n és propionil-CoA-n át (fumarát-út) jön létre (*lásd* az 1.14.7. alfejezetet). A *Clostridium propionicum*ban, a *Peptostreptococcus elsdenii*ben és a *Bacteroides ruminicolá*ban a propionát laktátból laktil-CoA-n, akrilil-CoA-n és propionil-CoA-n (akrilát-út) át szintetizálódik (Johns, 1952; Lewis és Elsden, 1955; Wallnöfer és Baldwin, 1967). A laktil-CoA → akrilil-CoA átalakulás útja ismeretlen. Az, hogy ebben a mechanizmusban a foszfolaktil-CoA köztitermék lenne, ma még határozottan nem állítható.

A *Peptostreptococcus elsdenii* obligát anaerob baktérium, mely a DL-laktátot acetáttá, propionáttá, butiráttá és valeráttá fermentálja. Citokrómokkal nem, de menakinonnal rendelkezik. Oldódó sejtfrakciója ferredoxint, flavodoxint, rubredoxint, elektronszállító flavoproteineket, továbbá mindazokat az enzimeket tartalmazza, melyek laktátból propionátképzéshez szükségesek: NAD-független D-laktát-dehidrogenáz, piruvát-ferredoxin-oxidoreduktáz és butiril-CoA-dehidrogenáz. Az elektrontranszfer a laktáttól az akrilil-CoA-hoz laktát-dehidrogenáz, egy szokatlan flavint tartalmazó elektronszállító flavoprotein (ETF-laktát) és butiril-CoA-dehidrogenáz részvételével halad.

1.17.13. Tetrationát redukciója tioszulfáttá

$$S_4O_6^{2-} + [H_2] \rightarrow 2\ S_2O_3^{2-} + 2\ H^+ \qquad \Delta G^{0'} = -84{,}5\ \text{kJ/mol}$$

Néhány fakultatív anaerob baktérium a tetrationátot tioszulfáttá redukálja. Ez az aktivitás, analóg módon a nitrát nitritig menő redukciójával, az anaerob respirációnak lehet egy különleges alakja. A tetrationát redukcióját membránkötődésű elektrontranszport-rendszer katalizálja, mely dehidrogenázokat, elektronszállítókat és tetrationát-reduktázt tartalmaz. Utóbbi indukálható enzim, melynek szintézisét és aktivitását az oxigén gátolja (*lásd* még az 5.10.9. alfejezetet).

1.17.14. A ferrivas redukciója ferrovassá

$$2\ Fe^{3+} + [H_2] \rightarrow 2\ Fe^{2+} + 2\ H^+ \qquad \Delta G^{0'} = -228{,}3\ \text{kJ/mol}$$

A ferrivas oldható ferrovassá redukálásának képességét már sok baktériumnál megfigyelték (*Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Pseudomonadaceae*). Érdekes, hogy e jelenséget napjainkig alig méltatták figyelemre, jóllehet a természet vaskörforgalmában kiemelkedő ökológiai fontossága lehet. Azt a feltételezést, hogy a ferrivas redukciójáért a nitrát-reduktáz A (disszimilációs nitrát-reduktáz, mely klorátot redukál) lehet a felelős, ma már egyre többen fogadják el (Ottow, 1970). Ezt támasztják alá azok a leletek is, miszerint a ferrivas redukálásának képessége számos baktériumban együtt jár a nitrát-reduktáz jelenlétével. Sok vasredukáló baktérium nitrátreduktáz-vesztes mutánsai csak nagyon kevés vasat redukálnak, és megfigyelték, hogy a környezetben a nitrát és a ferrivas egyidejű jelenléte, feltehetően kompetícióval, csökkentette a létrejövő redukált vas mennyiségét. Úgy látszik tehát, hogy a ferrivas a disszimilá-

ciós nitrát-reduktáz alternatív szubsztrátja (THAUER és munkatársai, 1977). Amint a nitrát nitritig haladó disszimilációs redukciójához foszforiláció kapcsolódik, ugyanúgy a ferrivas ferróvá redukálásához is kapcsolódhat. A Fe^{3+}/Fe^{2+} pár redoxipotenciálja ($E'_0 = +772$ mV) az elektrontranszport-foszforilációt, termodinamikailag valamennyi ismert fiziológiai elektrondonorral, kivitelezhetővé teszi.

1.18. A termodinamikai hatékonyság szabályozása az anaeroboknál

Számos anaerob baktérium katabolikus redoxifolyamatai elágazóak, következésképpen ezeknél aszerint, hogy éppen milyen anyagcsereutakat használnak, mind az ATP-nyereség mértéke, mind az ATP-szintézis termodinamikai hatékonysága változó mérvű *(lásd 76. ábra)*. A különböző „ágakra" szétkülönülő energiaáram szabályozása, kanalizálása oly módon történik, hogy mind a sejt ATP-nyeresége, mind az előállítás termodinamikai hatékonysága a mindenkori szaporodási körülmények között optimális legyen (THAUER és munkatársai, 1977). A szacharolitikus *Clostridium* fajok glükózfermentációja butiráttá, acetáttá, szén-dioxiddá és hidrogénné, továbbá a *Ruminococcus albus* glükózfermentációja etanollá, acetáttá, szén-dioxiddá és hidrogénné az ATP/entrópiakvóciens (= termodinamikai hatékonyság) szabályozásának jó példái.

1.18.1. A glükózfermentáció szabályozása a *Clostridium pasteurianum*nál

Lássuk először is a *Clostridium pasteurianum* glükózfermentációjának szabályozását *(91. ábra)*. E faj tenyészeteiben észlelhető fermentációs anyag- és energiamérleget sztöchiometriás alapon nem egykönnyen mutathatjuk be. Ezt inkább két résztörténés-sorozat összesített eredményeként szemléltethetjük *(lásd 91. ábra)*:

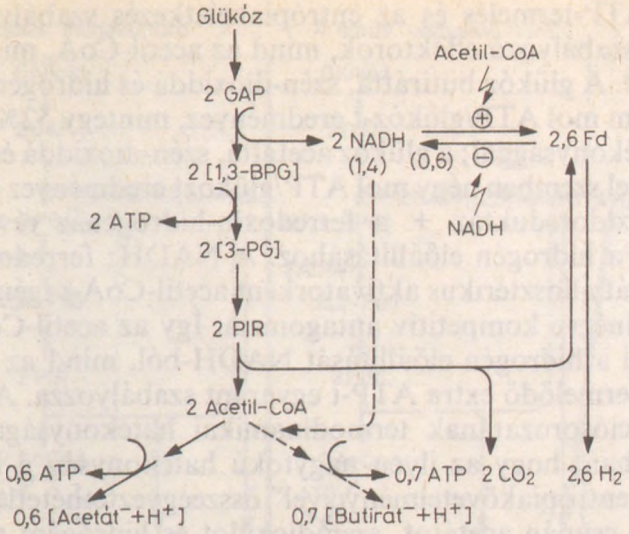
$$\text{glükóz} + 2H_2O \rightarrow 1 \text{ butirát} + 2\,HCO_3^- + 3\,H^+ + 2\,H_2$$

$$\Delta G^{0'} = -254{,}8 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{glükóz} + 4\,H_2O \rightarrow 2 \text{ acetát}^- + 2\,HCO_3^- + 4\,H^+ + 4\,H_2$$

$$\Delta G^{0'} = -206{,}3 \text{ kJ/mol}$$

Ebben a sajátos fermentációs folyamatban az acetil-CoA elágazási pontot jelent, mely sztöchiometriásan kapcsolódik egy másik, mégpedig a NADH-elágazási ponthoz *(lásd* a 75.és 76. ábrát is). Az acetil-CoA



91. ábra

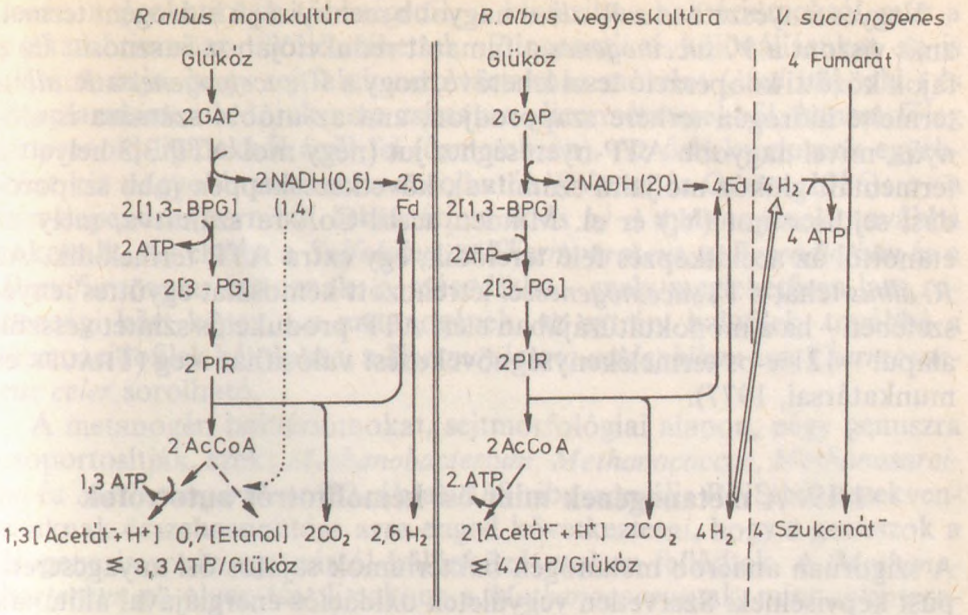
A *Clostridium pasteurianum* elágazó glikolitikus fermentációjának változó termodinamikai hatékonysága. Az ATP-nyereség a glükóz katabolizmusához sztöchiometrikusan nem kapcsolódik. Váltakozhat 3 ATP/glükóz (amikor a glükóz csupán butiráttá fermentálódik; a NADH: ferredoxin-oxidoreduktáz inaktív) és 4 ATP/glükóz (amikor a glükóz csupán acetáttá katabolizálódik; NADH: ferredoxin-oxidoreduktáz teljesen aktív) között. A ténylegesen megfigyelt ATP nyereség 3,3 ATP/glükóz. Rövidítések: GAP: glicerinaldehid-foszfát; 1,3-BPG: 1,3-bifoszfoglicerát; 3-PG: 3-foszfoglicerát; PIR: piruvát; Fd: ferredoxin

vagy a foszfotranszacetiláz révén acetil-foszfáttá, majd az acetil-kinázzal acetáttá és CoA-vá alakul, miközben egy mol ATP/acetil-CoA termelődik; vagy két acetil-CoA acetoacetil-CoA-vá kondenzálódik, ezt követve butiril-CoA-vá redukálódik, majd a foszfotranszbutiriláz és a butirátkináz vagy a tioforáz révén butirát jön létre, ami csupán 0,5 mol ATP/acetil-CoA-t eredményez. A *C. pasteurianum*ban NADH kizárólag NAD-specifikus glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz révén jön létre, míg a piruvátnak acetil-CoA-vá és szén-dioxiddá való dehidrogénezése alkalmával az elektronok ferredoxinra mennek. A butirátig haladó reakciósorozatban az előállított NADH a butirát képzéséhez kvantitatíve elhasználódik, és valamennyi, a hidrogén előállításához szükséges redukáló ekvivalens létrejötte, a piruvát dehirogénezésének tudható be. Az acetáthoz vezető úton viszont több hidrogén fejlődik, mint piruvát oxidálódik. Ezen az úton a triózfoszfát dehidrogénezése révén létrejött NADH a ferredoxint redukálhatja és így molekuláris hidrogén fejlesztését biztosíthatja. A hidrogén-előállítás e termodinamikailag igen kedvezőtlen mechanizmusa különböző *Clostridium*ok sejtmentes lizátumaiban határozottan kimutatható volt (JUNGERMANN és munkatársai, 1973; PETITDEMANGE és munkatársai, 1976; JONES és WOODS, 1986).

Ami az ATP-termelés és az entrópiakeletkezés szabályozását illeti, ebben mint szabályozó effektorok, mind az acetil-CoA, mind a NADH részt vesznek. A glükóz butiráttá, szén-dioxiddá és hidrogénné alakítása csupán három mol ATP/glükóz-t eredményez, mintegy 52%-os termodinamikai hatékonysággal; a glükóz acetáttá, szén-dioxiddá és hidrogénné alakítása ezzel szemben négy mol ATP/glükózt eredményez és a NADH: ferredoxin-oxidoreduktáz + a ferredoxin-hidrogenáz révén szorosan kapcsolódik a hidrogén előállításához. A NADH: ferredoxin-oxidoreduktáz obligát allosztérikus aktivátorként acetil-CoA-t igényel, míg maga a CoA ránézve kompetitív antagonista. Így az acetil-CoA/CoA hányados mind a hidrogén előállítását NADH-ból, mind az acetát-kináz reakcióban termelődő extra ATP-t egyaránt szabályozza. Az ATP-szintézis e reakciósorozatának termodinamikai hatékonysága 85%. Úgy látszik azonban, hogy az ilyen nagyfokú hatékonyság a klosztridiális anyagcsere „entrópiakövetelményeivel" összeegyeztethetetlen, minthogy a glükóznak csupán acetátot, szén-dioxidot és hidrogént eredményező fermentációját ezekben az anaerob baktériumokban még sohasem figyelték meg. Következésképpen butirát mindig termelődik. Az acetil-CoA/CoA arány szabályozza, hogy az acetil-CoA-nak mekkora frakciója alakuljon át főleg ATP-előállítással acetáttá és mekkora, főleg entropiafejlesztéssel butiráttá, mégpedig úgy, hogy megközelítően 62%-os termodinamikai hatékonysággal 3,3 mol ATP termelődjön (THAUER és munkatársai, 1977).

1.18.2. A glükózfermentáció szabályozása a *Ruminococcus albus*nál

Végül tekintsük át a *Ruminococcus albus* glükózfermentációját *(92. ábra)*. Jóllehet monokultúrában számos bendőmikroba termel hidrogént, mégis magában a bendőben, továbbá a nem szelektív módon izolált bendőbaktériumok kevert tenyészeteiben csak nagyon kevés hidrogéngáz képződik. A bendőben a hidrogén parciális nyomása 3×10^{-4} atm nagyságrendű (HUNGATE, 1967). Ez azt mutatja, hogy a hidrogénfejlesztő sejtek által leadott, csaknem valamennyi hidrogént más mikrobák hasznosítják. A hidrogénfogyasztók között mennyiségileg a metanogének a legfontosabbak. Minthogy a hidrogéngáz koncentrációját a fajok közötti hidrogéntranszfer hatékonyan csökkenti és ugyanakkor növeli a H^+/H_2 pár redoxipotenciálját, azért a szacharolitikus anaerobok nem kényszerülnek a glikolízisük során előállított elektronok visszaszármaztatására szerves akceptorokhoz, hanem NADH-ból hidrogéngázt állítanak elő, és ennek révén a fermentált szubsztrát mol-jára számítva több ATP-t produkálhatnak.



92. ábra

A *Ruminococcus albus* elágazó glükózfermentációja ATP-hozamának változtatása a *Vibrio succinogenes*hez haladó fajok közötti hidrogénátvitel révén. Rövidítések: GAP: glicerinaldehid-foszfát; 1,3-BPG: 1,3-bifoszfoglicerát; 3-PG: 3 foszfoglicerát; PIR: piruvát; AcCoA: acetil-CoA; Fd: ferredoxin

E kooperáció jó példája a *R. albus* és a *Vibrio succinogenes* vegyes kultúrája (IANNOTTI, 1973). Kemosztát monokultúrában a *R. albus* a glükózt etanollá, acetáttá, szén-dioxiddá és hidrogénné fermentálja.

$$10 \text{ glükóz} + 10\ H_2O \rightarrow 7 \text{ etanol} + 13 \text{ acetát} + 20\ CO_2 + 20\ H_2$$

Ilyen körülmények között az etanolképzés a glükóz → acetil-CoA átalakítás alkalmával produkált elektronok jelentős részét fogja fel és egyidejűleg megakadályozza az ATP-előállítást acetil-CoA-ból *(92. ábra)*. A *Vibrio succinogenes* glükózt, etanolt vagy acetátot energetikai anyagcseréjéhez szubsztrátként nem hasznosít, azonban szaporodásához energiát állít elő egy citokrómdependens reakció során, a fumarátnak hidrogénnel szukcináttá való redukálásával; a *R. albus* a fumarátot nem redukálja. A *R. albus* és a *V. succinogenes* kemosztát együttes tenyészetében mindkét szervezet jól szaporodik, ugyanakkor a fermentációnak már más szénhidráttermékeit állítják elő: etanol többet nem képződik, helyette több acetát halmozódik fel és a megfelelő elektron ekvivalens szukcinát alakjában található.

Vegyes tenyészetben a *R. albus* nagyobb mennyiségű hidrogént termel, amit viszont a *V. succinogenes* a fumarát redukciójához hasznosít. Ez a fajok közötti kooperáció teszi lehetővé, hogy a *V. succinogenes* a *R. albus* termelte hidrogén terhére szaporodjon, ami az utóbbi számára is előnyös, mivel nagyobb ATP-nyereséghez jut (négy mol ATP 3,3 helyett a fermentált glükóz moljaira számítva), következésképpen jobb szaporodási sejthozamot (Y_s) ér el. Minden acetil-CoA-ra számítva, mely az etanoltól az acetátképzés felé terelődik, egy extra ATP termelődik. Az *R. albus* tehát a *V. succinogenes*sel létrehozott kemosztát együttes tenyészetében – ha a monokultúrájában elért ATP-produkciós szintet vesszük alapul – 121%-os termelékenységnövekedést valósíthat meg (THAUER és munkatársai, 1977).

1.19. A metanogének mint ősi kemolitotróf autotrófok

A szigorúan anaerob metanogén baktériumok sajátos ősi anyagcseretípust képviselnek. Szervetlen vegyületek oxidációs energiájával állítanak elő ATP-t, és mint szénautotrófok szén-dioxidon szaporodnak. Feltehetően a Föld történetében az első kemoautotrófok között voltak. Ma mindenütt előfordulnak, ahol oxigénmentes körülmények uralkodnak, így mocsarakban (metán = mocsárgáz), iszapokban, állatok belében stb. (THAUER és FUCHS, 1979). A szén-dioxidot és a hidrogént metánná alakítják:

$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -31{,}3 \text{ kcal/mol}$$

Olyan fontos folyamatokban vesznek részt, mint pl. a kérődzők emésztése vagy a derítőkben végbemenő szennyvíztisztítás. Feltehetően a földgáz-előfordulások egy része is ezeknek a baktériumoknak az aktivitására vezethető vissza és felelősek lehetnek a bányák sújtólégrobbanása előfeltételeinek megteremtésében.

1.19.1. A metanogének és más ősbaktériumok rokonsága

Különböző baktériumok 16S rRNS szekvenciáinak összehasonlítása alapján (lásd még 658. old. is) kiderült, hogy a prokarioták többségének csak nagyon távoli rokonai. Hasonlóak azonban a *Halobacterium*okhoz, a *Sulfolobus*hoz és a *Thermoplasma*hoz is *(lásd* 33. ábra). Ezeket ma a metanogénekkel mint ősbaktériumokkal együvé csoportosítják (MAGRUM és munkatársai, 1978; WOESE és munkatársai, 1978). Az evolúció

során a prokarioták többségétől, a klasszikus baktériumoktól már a prekambriumban elkülönülhettek. Filogenetikai különállásukat az is alátámasztja, hogy sejtfaluk nem tartalmaz mureint (*lásd* 144. old.) és citoplazmamembránjuk nem zsírsavas glicerinészterekből, hanem főleg izoprenoid-lipidekből épül fel (ősmembrán). Az ősbaktériumok egyébként két nagyobb csoportba sorolhatók (WOESE és OLSEN, 1986): *a)* a kén-dependens termofil ősbaktériumok és *b)* a metanogének, továbbá rokonaik. Az elsőbe a *Sulfolobus*, a *Thermoproteus*, a *Pycrodictium* és a *Desulfurococcus* tartoznak. A másodikba – mely meglehetősen laza rokonsági kört képez – a metanogének, az extrém halofilek, továbbá a termoacidofilek két típusa, a *Thermoplasma acidophilum* és a *Thermococcus celer* sorolható.

A metanogén baktériumokat, sejtmorfológiai alapon, négy genuszra csoportosítják, ezek: *Methanobacterium, Methanococcus, Methanosarcina* és *Methanospirillum* (33. ábra). 16S riboszomális RNS bázisszekvenciáiknak összehasonlítása arra enged következtetni, hogy e genuszok a filogenezis során egymástól különböző utakon fejlődtek. A *Methanobacterium* pl. olyan távoli rokona a *Methanococcus*nak, mint az enterobaktériumok a cianobaktériumoknak (!). Ezt az állítást a DNS-ük GC- tartalmának jelentős eltérése, a sejtfaluk felépítésében jelentkező különbségek és eltérő bioszintetikus útjaik is megerősítik. Így tehát az egyes metanogén genuszokra vonatkozó vizsgálati eredményeket nem lehet minden további nélkül valamennyire értelmezni.

1.19.2. A metanogének megkülönböztető jellemvonásai

A metanogének tipikus prokarioták, de azok többségétől lényeges vonásokban térnek el. E tény már külsőleg is szembetűnik. Sejtjeik UV-megvilágításban például zöldesen fluoreszkálnak, aminek révén számtalan más baktériumtól könnyen megkülönböztethetők (THAUER és FUCHS, 1979).

WOLFE (1979) sajátosságaikat 10 pontban foglalta össze:

1. Anyagcseretermékeik: metán és szén-dioxid.

2. Metántermelésükhöz csak kevés kiinduló szubsztrátot használnak fel: hidrogént, formiátot, metanolt, acetátot és metil-amint.

3. Metántermelésükhöz a hidrogénelektródáéhoz közel eső redukciós potenciál szükséges, O/R: −330 mV.

4. Jelenleg a metanogéneknek már hét új koenzimét, ill. faktorát ismerjük: CoM; F_{420}; F_{342}; B; CDR; M.-mobile faktor; F_{430}.

5. A metanogének 16 S és 23 S riboszomális RNS-szekvenciái a prokarioták tipikus 16 S és 23 S rRNS-ének felelnek meg.

6. A metanogének tRNS-e különbözik a tipikus prokariotákétól, mivel GT ψ CG-karszekvenciát nem tartalmaz.

7. A sejtfalukban nincsenek D-aminosavak, sem muraminsav.

8. Lipidjeik nagyon eltérnek a tipikus baktériumokétól. Többnyire nem szappanosíthatók. Neutrális lipidjeik legjelentősebb komponense a szkvalén. Az apoláros frakció legfontosabb alkotóelemei a C_{20}-fitanil és a C_{40}-bifitanil-glicerin-éterek. Ma a geokémikusok azt tartják, hogy az üledékekben és a kőolajokban található szénhidrogének részben a metanogénektől származhatnak.

9. A metanogének genommérete egyharmada lehet az *E. coli*énak.

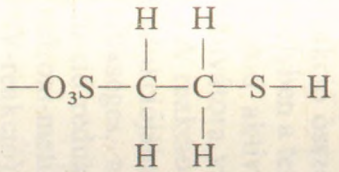
10. Citokrómjaik és kinonjaik nincsenek.

A *Methanobacterium*, a *Methanospirillum* és a *Methanosarcina* fajok sejtjeinek sejtfala elegendően stabil ahhoz, hogy morfológiai alakzatukat determinálja és egyúttal ozmorezisztenciájukat is biztosítsa. A *Methanobacterium* fajok sejtjeit három L-aminosavból (pl. L-lizin, L-alanin és L-glutaminsav), egy *N*-acetilaminocukorból (*N*-acetil-glükóz-amin) és egy meghatározatlan *X*-komponensből felépített pszeudomureinfal zárja körül. Ez a valódi mureinre emlékeztet, de mégsem az, minthogy *N*-acetil-muraminsavat és D-aminosavakat nem tartalmaz (32. ábra).

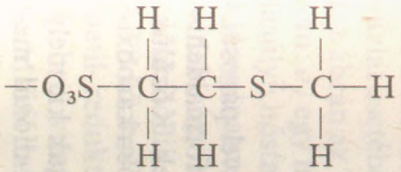
A *Methanosarcina* sejtfala aminocukrokból, neutrális cukrokból és uronsavakból épül fel. A *Methanospirillum* sejtjeit rezisztens proteinekből összetett közös „kültakaró" veszi körül. A *Methanococcus*-sejteket csak térhálózattá nem rendeződött proteinek nagyon laza szférája övezi. Sejtfalukban tehát valódi murein nincs (KANDLER, 1979). Következésképpen e szervezetekre a mureinszintézis gátlói, így a penicillin és a cikloszerin is hatástalanok (*lásd* még a 30., 31. ábrákat).

1.19.3. A metanogének néhány élettani jellemvonása

A metanogének riboszómái 30 S és 50 S alegységekből összetettek, melyek 16 S, 23 S és 5 S RNS-t tartalmaznak. A 16 S RNS és a tRNS, módosult bázisokat az átlagosnál magasabb százalékban tartalmaznak. Növekedésüket egyes antibiotikumok (pl. sztreptomicin), melyeket a prokarioták proteinszintézisének tipikus gátlóiként ismernek, nem befolyásolják. Olyan koenzimeket tartalmaznak (CoM, F_{420} stb.), melyek még egyetlen más élőlényből sem kerültek elő. A CoM 2-merkapto-etánszulfonsav (TAYLOR, 1976) struktúrájú:

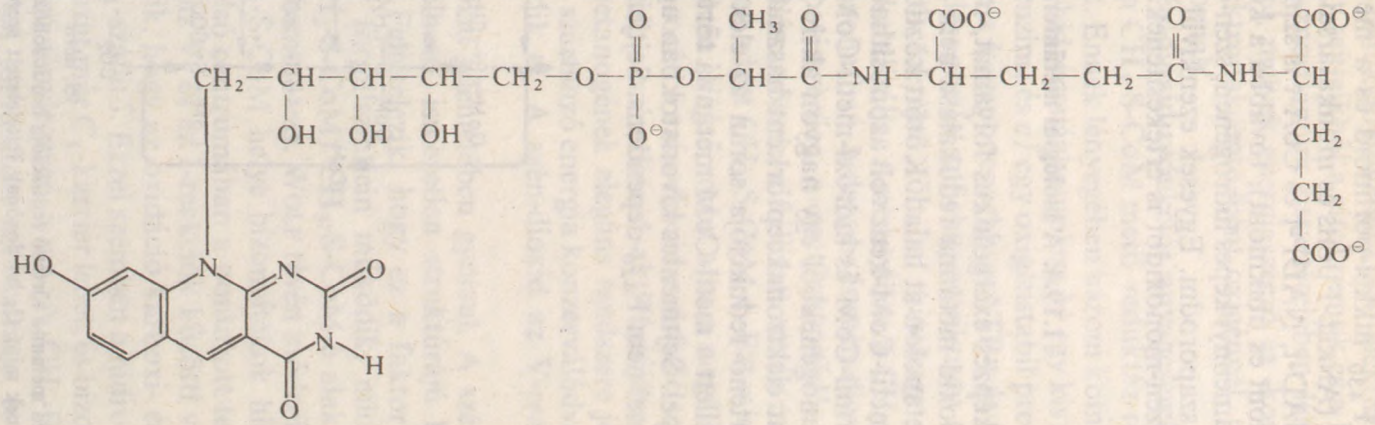


Koenzim–M



Metil-koenzim–M

Ez a koenzim a metánképzés mechanizmusában vesz részt, melynek során a metil-CoM intermedierként jelenik meg. Az F_{420} erősen fluoreszkáló sárga vegyület: abszorpciós maximuma 420 nm-nél van. Szerkezetét, amit itt mutatunk be, nemrég tisztázták:



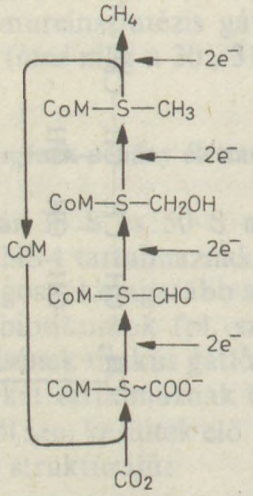
Kromoforcsoportja 5-deazaflavin. Az F_{420} mind az energiaszerző, mind a bioszintetikus anyagcserében mint két elektronátvivő szerepel. Redoxipotenciálja ($E^{0'}$) kb. -360 mV (THAUER és FUCHS, 1979).

A CoM és az F_{420} mellett a sejtek még F_{342}-t és F_{430}-at is tartalmaznak. Az F_{430} nikkel-porfinoid és a metil-CoM-reduktáz prosztetikus csoportja (ANKEL-FUCHS és munkatársai, 1986). A metanobaktériumok ATP-t, NAD-t, NADP-t és CoA-t is szintetizálnak, citokrómot, kinont (menakinont és ubikinont), továbbá a közönséges ferredoxint azonban nem. Valamennyi képes hidrogénen, szén-dioxidon mint egyedüli energiaforráson szaporodni. Egyesek ezenkívül még formiátot, metanolt, acetátot és szén-monoxidot is értékesítenek.

1.19.4. A biológiai metántermelés biokémiája

A metánképzés exergonikus folyamat, mely ATP szintézisével párosul. A szén-dioxid metánná redukálása nem szabad formiáton, formaldehiden és metanolon át halad. Kötött köztitermékek szerepelnek. Közülük az egyik metil-CoM-ként volt azonosítható. A többi feltehetően karboxi-CoM, formil-CoM és hidroxi-metil-CoM *(93. ábra)*.

A metanogénekből egy nagyon aktív hidrogenázt mutattak ki, mely az F_{420}-at elektronakceptorként használja. Az F_{420} a szén-dioxid metánná történő redukciója során az elektrontranszportban vehet részt. Mindemellett a metil-CoM metánná történő redukciójánál nem feltétlenül szerepel. Sejtmentes kivonatokban ugyanis a metil-CoM redukciója hidrogénnel nem F_{420}-dependens. Sejtjeik nagy számú vas-kén-proteint



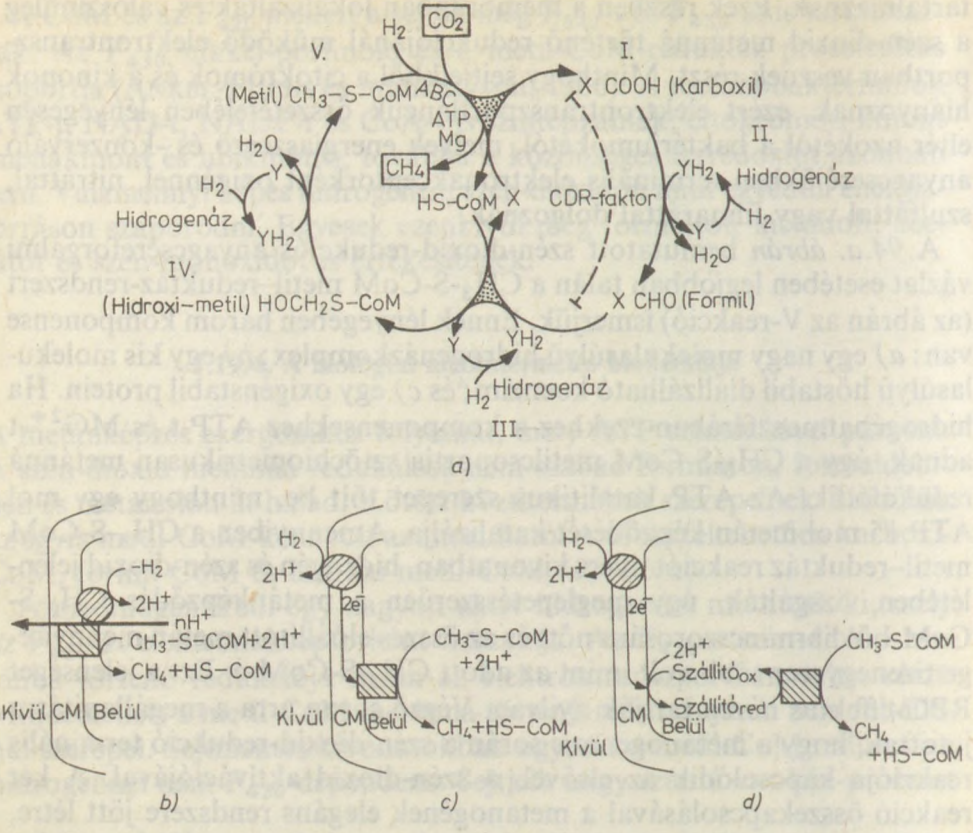
93. ábra

A szén-dioxid metánná történő redukciója hordozóhoz kötött köztes fokozatokon át. Az ábra a koenzim-M-nek mint C_1 hordozónak feltételezett szerepét mutatja be. ~ : energiagazdag kötés (THAUER és FUCHS, 1979)

tartalmaznak. Ezek részben a membránban lokalizáltak és valószínűleg a szén-dioxid metánná történő redukciójánál működő elektrontranszportban vesznek részt. Minthogy sejtjeikből a citokrómok és a kinonok hiányoznak, ezért elektrontranszportláncuk összetételében lényegesen eltér azokétól a baktériumokétól, melyek energiaszerző és -konzerváló anyagcseréjükben terminális elektronakceptorként oxigénnel, nitráttal, szulfáttal vagy fumaráttal dolgoznak.

A *94.a. ábrán* bemutatott szén-dioxid-redukciós anyagcsereforgalmi vázlat esetében legjobban talán a CH_3-S-CoM metil–reduktáz-rendszert (az ábrán az V-reakció) ismerjük. Ennek lényegében három komponense van: *a)* egy nagy molekulasúlyú hidrogenázkomplex; *b)* egy kis molekulasúlyú hőstabil dializálható koenzim; és *c)* egy oxigénstabil protein. Ha hidrogénatmoszférában ezekhez a komponensekhez ATP-t és MG^{2+}-t adnak, úgy a CH_3-S-CoM metilcsoportja sztöchiometrikusan metánná redukálódik. Az ATP katalitikus szerepet tölt be, minthogy egy mol ATP 15 mol metán képződését katalizálja. Amennyiben a CH_3-S-CoM metil–reduktáz reakciót nyers kivonatban, hidrogén és szén-dioxid jelenlétében vizsgálták, úgy meglepetésszerűen a metánképződés CH_3-S-CoM-ből harmincszorosára nőtt és az összes előállított metán mennyisége tizenegyszer több volt, mint az adott CH_3-S-CoM-é. Ezt a jelenséget RPG-effektus néven tartják nyilván. Végső soron arra a megállapításra jutottak, hogy a metanogenezis során a szén-dioxid-redukció terminális reakciója kapcsolódik az elsővel, a szén-dioxid aktivációjával. A két reakció összekapcsolásával a metanogének elegáns rendszere jött létre, melyben a terminális reakcióból származó energia konzerválódva a szén-dioxid aktiválásához használódik el. A szén-dioxid az V-reakciónak aktivátora vagy effektora.

A reakció sebessége szén-dioxid jelenlétében gyorsul. A szén-dioxid redukciójához hőstabil, dializálható, ismeretlen struktúrájú kofaktor szükséges, neve: CDR-faktor. Feltételezik, hogy ez a faktor a szén-dioxid-redukció karboxi- vagy formilszintjein működik, minthogy a hidroxi-metil-CoM-nek ($HOCH_2$-S-CoM) CH_3-S-CoM-é alakításához (IV-reakció) nem szükséges. A bemutatott, Wolf révén módosított Romesser-féle vázlaton a $HOCH_2$-S-CoM helye bizonyítékok hiányában csupán feltételezett. A vázlat felső centrumában a pontozott terület, az RPG-effektusnak megfelelően, az V- és az I-reakciók közötti viszonyra utal. Egyes szerzőknek úgy tűnik, hogy az oxidáció karboxi- és formilszintjein nem a koenzim-M a C_1-szállító. Ezzel szemben a hidroxi-metilszinten minden valószínűség szerint már C_1-karrier lehet, és bizonyítékaink vannak, hogy a metilszinten ténylegesen is az. A CH_3-S-CoM a metil-reduktáznak eddig egyetlen kimutatott szubsztrátja és minden metanogén számára abszolút szükségességű. A másik, ma még csak



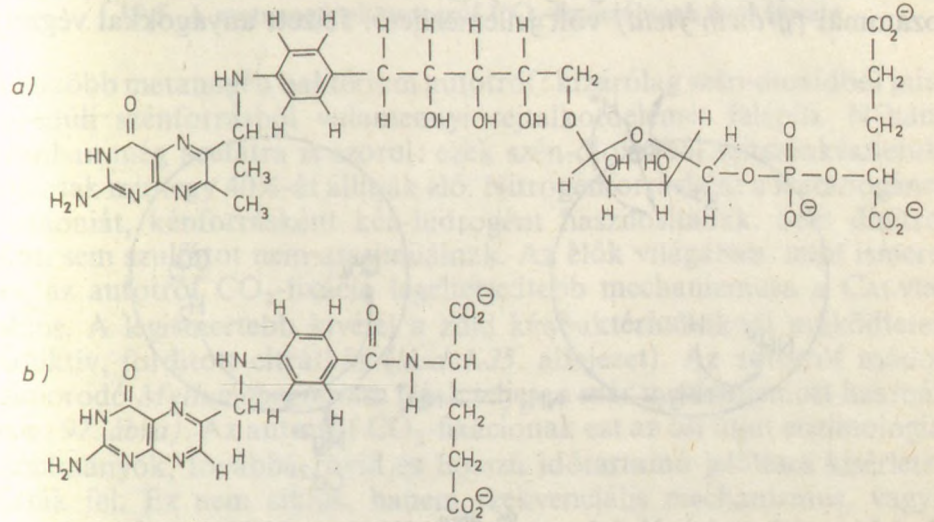
94. ábra

a) A szén-dioxid metánná történő redukciójának részletes mechanizmusa. X: ismeretlen C_1-szállító; CDR: szén-dioxid-redukciós kofaktor; Y: elektronszállító (Romesser, 1978; Wolfe, 1979). *b)*, *c)* és *d)* A *Methanosarcina barkeri*ben feltételezett és a metánképzéssel párhuzamosan kialakulható elektrokémiai transzmembrán proton-gradiens három javasolt modellje (Blaut és munkatársai, 1986). Az első esetben (*b*) a protonok a membránon redox-energiával hajtott protonpumpa révén jutnak át, mely a H_2-ről metilkoenzim-M-re haladó elektrontranszferhez kapcsolódik. A második esetben (*c*) a H_2-ről származó elektronok membránkötődésű hidrogenázon át az ugyancsak membránkötődésű elektronszállítóra transzferrel kerülnek, ugyanakkor az előállított protonok a membrán külső oldalára jutnak. Végül (*d*) az elektronok, a citoplazmában, oldódó elktronszállítónak adódnak át és erről kerülnek az ugyancsak oldódó metilreduktázra

X-nek megjelölt faktor az oxidáció karboxi- és formilszintjein kezelhet C_1-részeket. Nem tudni még, hogy vajon a CDR-faktor szerepel-e C_1-szállítóként. Az ábrán az alsó és a felső pontozott területek a CoM-et, továbbá az *X*-et felhasználó enzimek közötti feltételezett kölcsönhatásokat szemléltetik. A CoM fontossága a metanogenezisben betöltött speci-

fikus szerepében rejlik. Édesvízi környezetekben, ahol anaerob biodegradáció megy végbe, a metanogenezis a savanyú karboxilcsoportok kiépülése megakadályozásának természetes útja. Fontossága nyilvánvaló, mivel enélkül az elsavanyodó környezetben, utólag lelassulna a biodegradáció. A mikrobiális lebontás végtermékei a metanogének aktivitása folytán inkább metán és szén-dioxid, mintsem zsírsavak. A metanogének egy másik egyedülálló koenzime az F_{420}. Ez kételektron-transzfer reakciókban vesz részt. Az F_{420} az V-metil-reduktáz-reakcióban valószínűleg nem játszik szerepet. Ezzel szemben (*94.a. ábra*) az F_{420}, mely feltehetően az *Y*-nal egyenlő, a hidrogenáz felől a primer elektronakceptor. Az *Y* elektrondonorként, közvetlenül az ábrán feltüntetett reakciókban játszhat szerepet, továbbá transzhidrogenáz típusú reakciókban is közreműködhet, miközben NAD-t, NADP-t vagy más elektronkarriereket redukál.

Jelenleg nem ismeretes, hogy a szén-dioxid metánná történő redukciója során mennyi ATP termelődik, továbbá, hogy e két folyamat miként kapcsolódik össze. A metanogén baktériumok a természetben a hidrogén nagyon alacsony parciális nyomásánál (általában 10^{-3} atm alatt) szaporodnak. Ilyen körülmények között a szén-dioxid metánná történő redukálásánál felszabaduló energia kb. −62,79 kJ/mol-t (−15



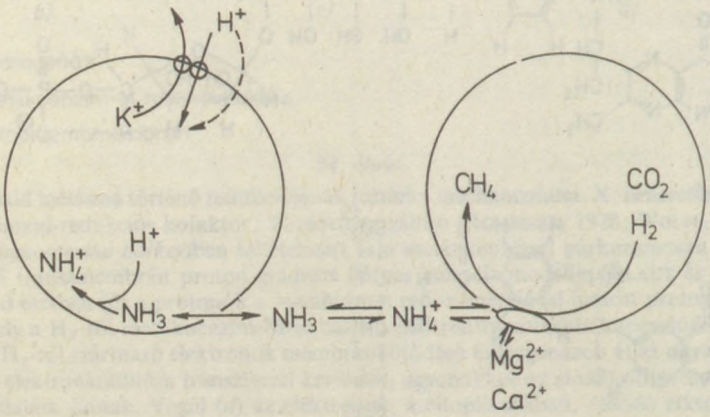
95. ábra

A metanopterin (*a*) és a folsav (*b*) szerkezete. A szén-dioxidnak metánná redukciójánál a köztes lépések egy-szén-szállítója KELTJENS szerint az 5,6,7,8-tetrahidro-metanopterin (H_4MPT). Ez szállítja az egy szénatomot a redukció formiát, formaldehid és metanol állapotain át. E tekintetben a H_4MPT működésében a szélesen elterjedt 5,6,7,8-tetrahidro-folsav koenzimhez hasonlít. E két szerkezet viszonylatában számos fiziológiai és kémiai hasonlóságot észleltek már, ami talán közös ősi eredetüket is tükrözi (KELTJENS és munkatársai, 1986)

Kcal/mol-t) tesz ki. Ez megközelítően azzal az energiamennyiséggel azonos, mely a növekedő baktériumokban ADP-ből és anorganikus foszfátból egy mol ATP előállításához szükséges. Ezért ma azt tartjuk, hogy a szén-dioxidnak metánná történő redukálásával legfeljebb 1 mol ATP szintézise kapcsolódik *(94.b–d. ábra)*. A szén-dioxid redukciója és az ATP szintézise kemiozmotikus mechanizmus révén kapcsolódik (BLAUT és munkatársai, 1986). Ez a mechanizmus feltételezi, hogy a hidrogéngáz hidrogénionná való oxidálása és a szén-dioxid metánná való redukálása a citoplazmamembránnak nem azonos, hanem ellenkező oldalain, egymástól elválasztva mennek végbe, miközben az elektronok elektronhordozó segítségével a membránon áthatolhatnak, a protonok azonban nem. Ezzel a két redoxipartner elektrokémiai potenciálkülönbsége pH-gradiens (ΔpH) és elektromos membránpotenciál ($\Delta\Psi$) alakjában konzerválódik. A protonhajtóerő ($\Delta pH + \Delta\Psi$) ezután membránkötődésű ATP-ázon át, ADP-ből és anorganikus foszfátból, ATP szintézisét szolgálja (BLAUT azonban még más modelleket is kifejlesztett: *94.b.–d. ábrák*).

A metanogén baktériumokban membránkötődésű ATPázt ténylegesen ki is mutattak.

A 227-es számjelzésű *Methanosarcina sp.* törzs hidrogénen és szén-dioxidon tenyésztve 8,4 mg sejtanyag/mmol termelt metán szaporodási hozammal *(growth yield)* volt jellemezhető. Jelzett anyagokkal végzett



96. ábra

Az ammónia és a *Methanospirillum hungatei* sejtje között végbemenő kétféle kölcsönhatás együttes modellje (SPROTT és PATEL, 1986). Az ammónia beáramlás során a citoplazmában végbemenő pH-zavarokra válaszként, a feltételezett K^+/H^+ antiporter aktivitás serkentésével, ammónia/K^+ kicserélődés (az ábra bal oldalán) jelentkezik. A szaggatott vonal a protonok passzív belépésének lehetőségére utal. A metánszintézis egy lényeges komponensét, a jobb oldali ábra, mint a citoplazmamembránt átfogó képletet mutatja be. Az NH_4^+ kölcsönhatását a közeg határán a Ca^{2+} és Mg^{2+} ionokkal az ábrán ugyancsak feltüntették

vizsgálatok szerint hidrogén jelenlétében a szén-dioxid gyorsan metánná redukálódik és mindaddig, amíg a hidrogéntartalék ki nem merül, a metanogenezishez csak nagyon kevés acetát használódik el (FERGUSON és MAH, 1983).

KELTJENS és munkatársai (1986) megállapításai szerint a szén-dioxidnak metánná történő redukciója intermedier lépéseiben a központi C_1-szállítószerepét az 5,6,7,8-tetrahidro-metanopterin (H_4MPT) tölti be. Ez szállítja az egyszénatomos vegyületeket a redukció formiát-, formaldehid- és metanol-állapotaiban (*lásd 95. ábra*).

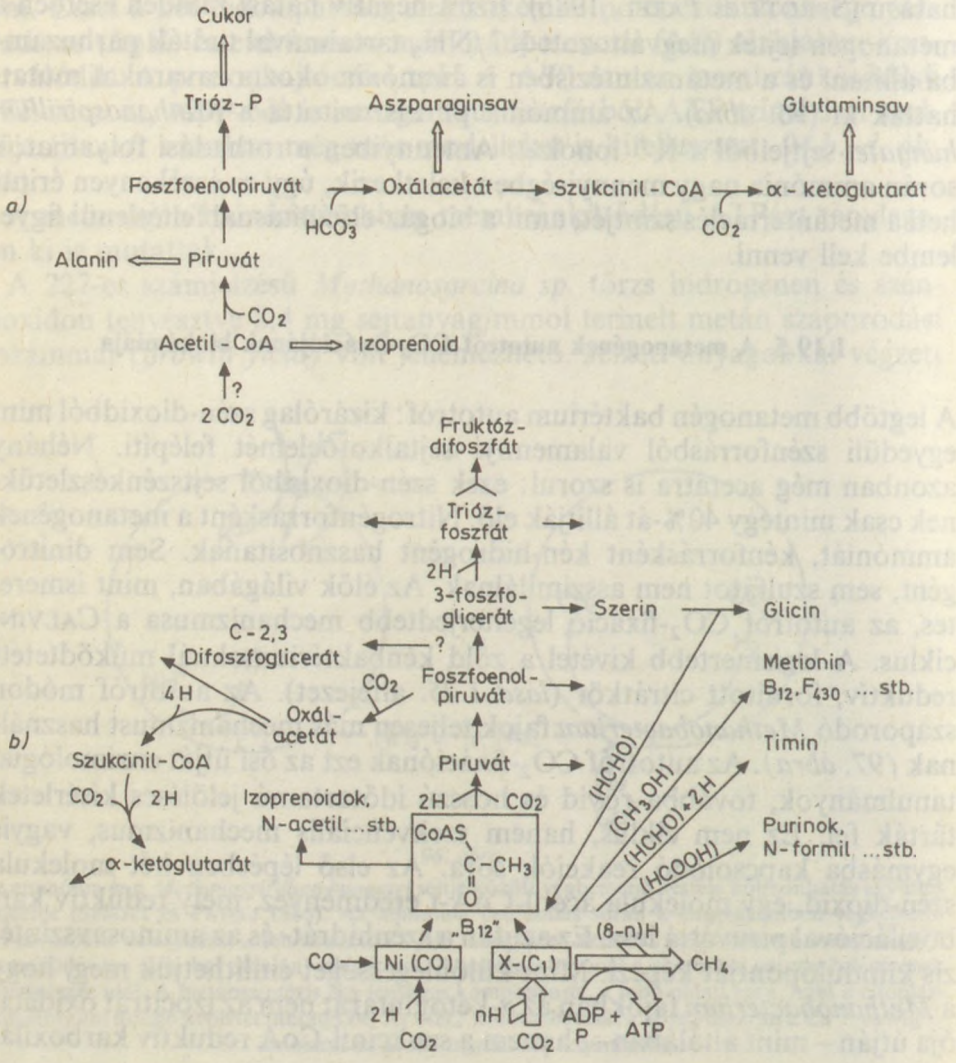
Itt kell megjegyezni, hogy az ammónia gyakran gátolja a metántermelést. Kiderült, hogy az ammónia számos metanogén baktériumra toxikus hatású (SPROTT és PATEL, 1986). Ezt a negatív hatást minden esetben a metanogén sejtek megváltozott K^+/NH_3 tartalmával tudták párhuzamba állítani és a metánszintézisben is ammónia okozta zavarokat mutathattak ki (*96. ábra*). Az ammónia pl. kiszorította a *Methanospirillum hungatei* sejtjeiből a K^+ ionokat. Amennyiben a rothadási folyamatok során ammónia nagy mennyiségben keletkezik, úgy ez érzékenyen érintheti a metántermelés szintjét, amit a biogáz-előállításnál feltétlenül figyelembe kell venni.

1.19.5. A metanogének autotróf CO_2-fixációjának biokémiája

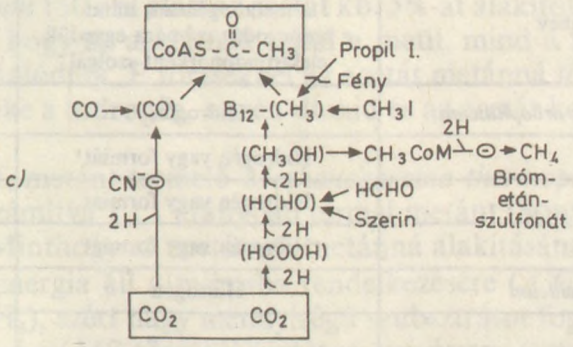
A legtöbb metanogén baktérium autotróf: kizárólag szén-dioxidból mint egyedüli szénforrásból valamennyi sejtalkotóelemét felépíti. Néhány azonban még acetátra is szorul: ezek szén-dioxidból sejtszénkészletüknek csak mintegy 40%-át állítják elő. Nitrogénforrásként a metanogének ammóniát, kénforrásként kén-hidrogént hasznosítanak. Sem dinitrogént, sem szulfátot nem asszimilálnak. Az élők világában, mint ismeretes, az autotróf CO_2-fixáció legelterjedtebb mechanizmusa a CALVIN-ciklus. A legismertebb kivétel a zöld kénbaktériumoknál működtetett reduktív, fordított citrátkör (*lásd 1.25.* alfejezet). Az autotróf módon szaporodó *Methanobacterium* fajok teljesen más mechanizmust használnak *(97. ábra)*. Az autotróf CO_2-fixációnak ezt az ősi útját enzimológiai tanulmányok, továbbá rövid és hosszú időtartamú jelöléses kísérletek tárták fel. Ez nem ciklus, hanem szekvenciális mechanizmus, vagyis egymásba kapcsolódó reakciók sora. Az első lépésben két molekula szén-dioxid, egy molekula acetil-CoA-t eredményez, mely reduktív karboxilációval piruváttá lesz. Ez azután a szénhidrát- és az aminosavszintézis kiindulópontját képezi. Mint különlegességet említhetjük meg, hogy a *Methanobacterium* fajokban az α-ketoglutarát nem az izocitrát oxidációja útján – mint általában –, hanem a szukcinil-CoA reduktív karboxilá-

lásával jön létre. Ezzel szemben a *Methanosarcina*k a szokásos izocitrát-dehidrogenáz-utat használják.

Újabban kimutatták (HOLDER és munkatársai, 1985 és mások), hogy a *Methanobacterium thermoautotrophicum*ban a szén-dioxid-fixáció során keletkező acetil-CoA acetátja két különböző szén-dioxid -fixációs reakcióban jön létre. A karboxil szintézisében egy nikkeltartalmú enzim, a szénmonoxid-dehidrogenáz vesz részt, mely a szén-dioxidot kötött szénmonoxiddá redukálja. A metil szintézisében ettől eltérő szén-dioxid-redukciós út szerepel, mely részben közös a szén-dioxid metánná redukálásának útjával. Kérdéses maradt, hogy létezik-e valamiféle közös egyszén prekurzor raktár, melyből a szervezet mind a metán, mind a bioszin-



tézisek számára szükséges egyszénatom-tartalmú vegyületeket meríti. Ezenkívül az aktivált ecetsav bioszintézisében a B_{12} szerepe is tisztázatlan maradt. Ma (1987) a *97.b.* ábra vázlatát tekinthetjük a szén-dioxidon és hidrogénen szaporodó *Methanobacterium* szénanyagcseréje általános sémájának. Időközben bizonyítást nyert, hogy a metanogenezis és az aktivált ecetsavnak szén-dioxidból végbemenő autotróf szintézise egymáshoz szorosan kapcsolódó folyamatok. A *Methanobacterium* anyagcseréjében a szerin glicinné és aktivált formaldehiddé (N 5, N 10-metilén tetrahidrometanopterin) alakul. Utóbbi a szén-dioxidból kiinduló bioszintézisben is és a metanogenezisben is intermedierként szerepel. Úgy tűnik, hogy az acetát metilje és a metán közös egyszén-prekurzorból vehetik eredetüket és ez a metilén-tetrahidrometanopterin, mely formaldehidből tisztán kémiai úton, míg a szerin C-3-jából enzimatikusan jöhet létre. Sötétben a propil- és a metil-jodid a szaporodást teljesen felfüggeszti, amit viszont a fény elhárít. A metánképződés nehezen volt befolyásolható. Arra következtetnek, hogy az acetát szintézisében korrinoid vesz részt, de a szén-dioxidból kiinduló metanogenezisben valószínűen nem. A fém fény-reverzíbilitással alkileződik és részt vesz az acetát-metilt eredményező metil-transzferben (*97.c. ábra*).



◄ *97. ábra*

a) Az autotróf CO_2-fixálás egy különleges útja és a rendkívül ősi primitív anyagcsere központi magva a *Methanobacterium*okban (THAUER és FUCHS, 1979). *b)* Az „egy-szén-egységek" feltételezett szerepe a *Methanobacterium thermoautotrophicum* energia-anyagcseréjében (⇒ metanogenezis) és autotróf sejtjeinek CO_2-ből kiinduló szénasszimilációjában (→), HOLDER és munkatársai (1985) után. Az ábra a korrinoidnak a [CO]-ból és X-[C_1]-ből végbemenő acetátszintézisben betöltött valószínű funkcióját is bemutatja. A nyilak vastagsága a 2,5 órás megkettőződési idővel exponenciálisan szaporodó sejtekben észlelhető metánképződés egyoldalúan nagy arányaira utal (percenként ~ 5 µmol CH_4 képződik, mg sejtproteinre számítva) összehasonlítva a sejtszén-fixáció szerényebb mértékével (percenként ~ 0,1 µmol acetát előállítása, mg sejtproteinre számítva). *c)* A *Methanobacteriumban* két szén-dioxidból végbemenő aktivált ecetsav autotróf szintézisében részt vevő „egy-szén-anyagcsere" vázlatos ábrázolása. E vázlat révén válik érthetővé a szén-monoxidból, a szerin C-3-jából, formaldehidből és metiljodidból származó jelzettség specifikus acetátba épülése, csakúgy, mint ennek cianiddal, ill. propiljodiddal kiváltható gátlása továbbá a kimutatható fényhatás (HOLDER és munkatársai, 1985)

1.20. A metanogének élettani differenciálódása és tevékenységük a modern bioszférában

A mai metanogének természetesen nem azonosak a 3 milliárd évvel ezelőtt élt őseikkel. Minden valószínűség szerint némileg modernizálódtak. Anyagcseretípusaik tanulmányozása és összehasonlítása nagy segítséget jelent azonban az ősi anyagcsereutak differenciálódásának megértésében. A *19. táblázat*ban azokat a metanogén fajokat hasonlítjuk össze, melyeket ma különböző laboratóriumokban autentikus tenyészetek alakjában tartanak fenn. A *Methanococcus mazei, Methanobacterium soehngenii* és a *Methanosarcina methanica* ismert fajok tiszta tenyészetei jórészt már kivesztek. Hidrogént valamennyi metanogén baktérium képes a metanogenezis egyedüli elektronforrásaként és a sejt szénvegyületeinek szintéziséhez energiaforrásként hasznosítani. Sok faj formiátot és egy, a *Methanosarcina barkeri,* metanolt hasznosít. A fajok többségének

19. táblázat

Különböző metanogén fajok tiszta tenyészeteinek néhány fontos tulajdonsága (ZEIKUS, 1977)

Fajnév	A szubsztrát, mely mind a metanogenezis, mind a szaporodás számára egyedüli elektrondonorként szolgál	Autotróf szaporodás
Methanobacterium arbophilicum	Hidrogén	igen
M. formicicum	Hidrogén vagy formiát	igen
M. ruminantium	Hidrogén vagy formiát	nem
M. mobile	Hidrogén vagy formiát	nem
M. thermoautotrophicum	Hidrogén	igen
Methanococcus vannieli	Hidrogén vagy formiát	nem határozták meg
Methanosarcina barkeri	Hidrogén vagy metanol	igen
Methanospirillum hungatei	Hidrogén vagy formiát	nem határozták meg

közös anyagcserebélyege, hogy képesek sejtszenüket kizárólag szén-dioxidból szintetizálni, miközben a hidrogénoxidáció energiabevételének költségére szaporodnak. Ezzel szemben egyes fajokban az autotrófia csak nehezen dokumentálható, minthogy ezek bizonyos szerves vegyületek hiányában csak nagyon lassan szaporodnak.

1.20.1. Az acetát mint a metanogének egyedüli szén- és energiaforrása

Egyes anaerob ökoszisztémákban az acetát a legfontosabb metanogén prekurzor. Ezzel szemben mindmáig sem sikerült még kimutatni, hogy tiszta tenyészetekben az acetát a szaporodás és a metanogenezis egyedüli szén- és energiaforrásaként szerepelhetne (ZEIKUS, 1977). Izotópokkal kivitelezett tanulmányok szerint a *M. barkeri* és a *Methanococcus* fajok „nagymértékben" tisztított tenyészetei nagyon lassú (15 hét) acetátfermentációt valósítanak meg. Ezek a tenyészetek azonban egynél több morfológiai típust tartalmaztak! A *Methanosarcina* fajokat nemcsak izolálni, de fenntartani is nagyon nehéz. Egyes kísérletekben nyers gazdagított kultúráik az acetát intakt metilcsoportját metánná fermentálták. A metilalegységben visszamaradt protonok tényéből arra következtettek, hogy az acetátból a metánt egyetlen szervezet, mégpedig egyetlen reduktív lépéssel termelhette. Adataink vannak (ZEIKUS, 1977), miszerint tiszta tenyészetek esetében az acetát metánná metabolizálásához hidrogén szükséges, és hogy a *Methanosarcina barkeri* és a *Methanobacterium thermoautotrophicum* egy-egy törzse, acetátot egyedüli szénforrásként 1% végkoncentrációban tartalmazó, ásványi só közegben, H_2-N_2 gázfázis jelenlétében, metánt állít elő. Ilyen körülmények között a *M. thermoautotrophicum* 150 óra alatt az acetát kb. 5%-át alakította át metánná, és úgy látszik, hogy az acetátnak mind a metil, mind a karboxil részei egyaránt redukálódtak. E törzseknél az acetát metánná történő konverziójának mértéke a hidrogén, a szén-dioxid és az acetát koncentrációitól függött.

Az acetotróf, metánt termelő *Methanosarcina thermophila* a fogyasztott acetátra számítva 1 : 1 arányban termel metánt (SOWERS és munkatársai, 1984). Minthogy az acetátnak metánná alakításánál csak nagyon kevés szabad energia áll a mikroba rendelkezésére ($\Delta G^{0'} = -31{,}0$ kJ/mol termelt CH_4), ezért nagy mennyiségű szubsztrátot fogyaszt. A *Methanosarcina barkeri* MS-törzsnél acetáton tenyésztve a moláris szaporodáshozam 1,2 g száraz sejttömegsúly per mol acetátnak bizonyult.

1.20.2. A különböző metanogén szubsztrátok hasznosításának energetikai hatékonysága

A *20. táblázat* a különböző metanogén szubsztrátok anyagcseréjénél a mikroba rendelkezésére álló szabadenergiákat hasonlítja össze. A hidrogén **(1.)** és a formiát **(2.)** a metanogenezis számára megközelítően ekvivalens energiaforrások. Kevesebb energia származik a metanol **(3.)** és csak korlátozott mennyiségű energia az acetát **(4.)** hasznosításából. Az e

reakciók révén előállított metán moljára számított energiamennyiségek összehasonlítása arra utal, hogy a hidrogén respirációjából kb. négyszer olyan sok energia származik, mint az acetát fermentációjából. Ezek a termodinamikai kalkulációk azonban az acetátfermentáló metanogének létezését még teljesen nem zárják ki, minthogy a **4.** egyenlet exergonikus. Igaz, az acetátfermentáló metanogének már eleve rendkívül lassan szaporodó szervezetek lehetnek, és egyáltalán kérdéses, hogy az acetát fermentációja önmagában fedezheti-e a szaporodás energetikai szükségleteit. Feltételezik, hogy az energiaprodukció számára valamely szubsztrát acetáton túlmenő degradációja csak akkor megy végbe, ha a redukált koenzimek oxidációja elektrontranszport-foszforilációhoz kapcsolódhat. Az ATP-hidrolízis szabadenergia-értékeit fiziológiai körülmények között $-34{,}325$ kJ/mol és $-52{,}325$ kJ/mol közötti értékekre becsülik. A baktériumokban az energiatranszfer normál hatékonysága 30–50%. Így azok a reakciók (pl. **4.** egyenlet), melyek standard körülmények között kevesebb, mint $-48{,}976$ kJ/mol-t szolgáltatnak, nem valószínű, hogy energiagazdag vegyületek előállítását szubsztrátszintű foszforiláció útján lehetővé teszik, és feltehetően a sejt növekedéséhez elégtelenek. Megjegyzendő, hogy a **4.** egyenlet intramolekuláris redoxifolyamatot ír le és így e reakció révén elektrontranszport-foszforilációból energia nem nyerhető (ZEIKUS, 1977). Mechanizmusát tekintve nem ismeretes, hogy a metanogének az acetátanyagcseréből miként nyernek energiát.

20. táblázat

A metanogén baktériumok lehetséges energiaszerző anyagcsere-útjai (KANDLER, 1979)

Egyenlet	$\Delta G^{0\prime}$ kJ/mol* (kcal/mol)
1. $4\,H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	$-136{,}9$ ($-32{,}7$)
2. $4\,HCO_2^- + 4\,H^+ \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2\,H_2O$	$-145{,}3$ ($-34{,}7$)
3. $4\,CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2\,H_2O$	$-319{,}9$ ($-76{,}4$)
4. $CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$	$-36{,}0$ ($-8{,}6$)

* Standard körülményekre vonatkoztatva: 25 °C; 1 atm.

Metanogének szubsztrátként szén-monoxidot is használhatnak. A *M.barkeri* és a *Methanobacterium formicicum* szén-monoxidot szén-dioxiddá és metánná alakítják át (KLUYVER és SCHNELLEN, 1947). Amíg azonban egyes metanogéneknél a szén-monoxidból metán előállítását már bizonyítottnak tekinthetjük, addig a szén-monoxidnak energiaforrásként való felhasználásáról nincsenek adataink.

A 70-es években három metanogén baktériumot írtak le: *M. thermoautotrophicum, M. arbophilicum* és *Methanospirillum hungatei.* Az első

típus törzsének hőmérsékleti optimuma 65 °C és 70 °C között van. Hasonló törzseket trágyából, hőforrásokból és ezek elfolyóinak bomló algatömegeiből izoláltak.

1.20.3. *Methanobacterium thermoautotrophicum*

A *Methanobacterium thermoautotrophicum* kemolitotróf autotróf. Redukáló ekvivalensek előállításához molekuláris hidrogént használ és szaporodásához szén-dioxidot obligát módon igényel. Szerves anyagok szaporodását nem stimulálják. Acetátot szén-dioxid és hidrogén jelenlétében lassan metabolizál és ez mégis ellene szól annak, hogy „obligát autotróf"-nak tartsuk (RITTENBERG, 1972). Feltételezik, hogy sejtjeiben a sejtszén szintézisének több anyagcsereútja is létezhet. Sejtmentes kivonataiban ribulóz-1,5-difoszfát-karboxiláz-aktivitást nem találtak, foszfoenol-piruvát-karboxiláz-aktivitást viszont igen. Az ép sejtekben, H_2- és CO_2-gáz jelenlétében, a $^{14}CO_2$-fixációs termékek analízise szerint aminosavak (főleg aszpartát, glutamát és alanin), továbbá nem foszforilált vegyületek képezték a legkorábban jelzett, nem metanogén prekurzorok túlnyomó többségét. Jelzett glicerinsav-3-foszfátot 2, ill. 60 másodperc után nem észleltek. Ennek a fajnak a sejtjeiből a metanol-dehidrogenáz és a formiát-dehidrogenáz, melyeket más metanogénekben megtaláltak, hiányzik. Az összes, napjainkig leírt metanogén közül a leggyorsabban szaporodik: 12 literes fermentortenyészetben, teljesen anorganikus ásványi só tápközegben megkettőződési ideje kevesebb, mint 3 óra.

A *M. thermoautotrophicum* sejtfrakcióiban, ^{14}C-vegyületek hosszabb időtartamú beépítése után a jelzésmegoszlást különösen behatóan tanulmányozták (TAYLOR és munkatársai, 1976). Az amino- és a nukleinsavakban talált értékeket párhuzamba állítva azzal a ténnyel, hogy a ribulóz-1,5-difoszfát-karboxiláz, hexulóz-foszfát-szintetáz és a hidroxipiruvát-reduktáz kimutathatatlanok voltak, kétséges, hogy e faj sejtjeiben akár a CALVIN-ciklus, a szerin- vagy a hexulóz-út jelen lenne. A *M. thermoautotrophicum* autotróf anyagcsereútjainak dokumentálása azért ütközik különösen nagy nehézségekbe, mivel a fixált szén-dioxid túlnyomó többsége (több mint 90%-a) a metánképződés felé vezető intermedierekben jelenik meg. Amint az *1.19.5. alfejezet*ben láthattuk, a CO_2-fixáció útját e fajnál HOLDER és munkatársai (1985) tárták fel.

1.20.4. *Methanobacterium arbophilicum*

A *M. arbophilicum* törzseit élő fák halódó szöveteiből, édesvízi üledékekből és talajból izolálták. Obligát kemolitotróf, bár szaporodását bizonyos szerves vegyületek jelentősen meggyorsítják. Vitaminokat tartal-

mazó ásványi só közegben, 12 literes fermentorban, H_2- és CO_2-gáz jelenlétében, megkettőződési ideje 10 óra.

A *M. hungatei* a metanogenezis elektrondonorjaiként hidrogént vagy formiátot hasznosít. Szaporodását szerves vegyületek stimulálják. Átlagos osztódási ideje 17 óra. Acetát-anyagcseréjét kimutatták ugyan, de azt, hogy ez mennyiben járul hozzá a sejtszén szintéziséhez és a metánképzéshez, még nem sikerült megállapítani.

1.20.5. A metanogének elem- és energiaforrás-igényei

A *21. táblázat* a legjobban ismert metanogének néhány fontos táplálkozásbiológiai sajátosságát foglalja össze. Ezek a szervezetek energianyerésre és sejtszintézisekhez hidrogént és szén-dioxidot valamennyien hasznosítanak. Aminosavakat vagy dinitrogént viszont nitrogénforrásként nem értékesítenek. Ezenkívül más nitrogénvegyületek sem helyettesíthetik a szaporodásuk számára egyetlen obligát nitrogénforrást, az ammóniát. A *M. ruminantium* PS-törzs, a *M. thermoautotrophicum* ΔH-törzs és a *M. arbophilicum* DH1-törzs kénforrásként szulfidot igényel. A *Methanobacterium* MOH-törzs kén-hidrogént vagy ciszteint hasznosít. A legtöbb törzs specifikus vitaminigénye nem ismeretes. Csupán azt tudjuk, hogy szaporodásukat vitaminkeverékek sok esetben erősen stimulálják. A *M. thermoautotrophicum* ΔH-törzse és a *M. hungatei* IF1-törzse vitamint egyáltalán nem igényelnek, jóllehet az utóbbi törzs szaporodását azért stimulálja. A *M. ruminantium* M1-törzse (bendőizolátum) komplex közegben mindaddig nem szaporodik, míg tenyészetéhez bendőfolyadékot vagy koenzim-M-et nem adnak.

A metanogének jelentősen különböznek specifikus szénigényeiket és azt illetően, hogy a különböző szerves vegyületek szaporodásuk intenzitását miként változtatják meg. A *M. ruminantium* M1-törzs acetátot, 2-metil-butirátot és aminosavakat igényel. Izotópbeépítési tanulmányok igazolták, hogy az M1-törzs komplex közegen, $H_2 + CO_2$-vel szaporodva, sejtszenének mintegy 60%-át acetátból szintetizálta. Az acetát szenét fehérjékbe, nukleinsavba és a lipidfrakciókba építette be. Az izoleucin bioszintéziséhez 2-metil-vajsav szükséges. Más, nem a bendőben élő, *M. ruminantium*mal nem azonosítható, metanogén fajoknak, a *M. mobile* kivételével nincs speciális szerves anyagok iránti igényük. Ezek illékony zsír- és aminosavak keveréke nélkül is szaporodnak. Az *M. thermoautotrophicum* viszont az egyetlen faj, melynek szaporodását a kiegészítésül adott szerves vegyületek alig fokozzák. E fajtól eltérően a többi metanogén legnagyobb sejtsűrűségét ásványi sókat, vitaminokat, élesztőkivonatot, acetátot, triptikázt, továbbá hidrogént és szén-dioxidot tartalmazó komplex közegekben éri el *(lásd 22. táblázat)*.

21. táblázat

Különböző metanogén baktériumok táplálékigénye (ZEIKUS, 1977)

Táplálkozási jellegek	Fajnév és törzsmegjelölés					
	Methanobacterium ruminantium M1-törzs	*M. ruminantium* PS-törzs	*Methanobacterium* sp. MOH-törzs	*M. thermoautotrophicum* ΔH-törzs	*M. arbophilicum* DH1-törzs	*Methanospirillum hungatei* IF1-törzs
Nitrogénforrás	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+	NH_4^+
Vitaminok	Keveréket igényel vagy az stimuláló hatású; 2-merkapto-etánszulfonsav	Keveréket igényel vagy ez legalábbis serkentő hatású	Keveréket igényel vagy ez legalábbis serkentő hatású	Keverék nem szükséges és nem is serkent	Keverék szükséges	Keverék nem szükséges de serkentő
A szaporodáshoz szükséges plusz szén	Acetát, 2-metil-butirát, aminosavak	Acetát	Nincs	Nincs	Nincs	Nincs
Kénforrás	Még meghatározatlan	H_2S	H_2S vagy cisztein	H_2S	H_2S	Még meghatározatlan
A szaporodás serkentése acetáttal	Igen	Igen	Igen	Nem	Gyengén	Nem
A szaporodás serkentése aminosavakkal	Igen	Igen	Igen	Nem	Még meghatározatlan	Igen

1.20.6. A metanogének rendszertani differenciálódása

A metántermelő baktériumok genuszokra differenciálásánál elsődleges taxonómiai kulcsbélyegként, a sejtek alakját jelölik meg. A fajok elkülönítésénél élettani és táplálkozásbiológiai bélyegekre vannak tekintettel. DNS-ükben a G + C mol%-a nagyon variál, mégpedig a *M. thermoautotrophicum* 52%-ától a *M. arbophilicum* 27,5%-áig.

Nyilvánvaló, hogy a fajdifferenciálásukhoz kizárólag morfológiai alapon és a szaporodásukhoz szükséges energiaforrásokra hivatkozva nem kezdhetünk hozzá. Másrészt, ha a *Methanosarcina*, a *Methanobacterium*

22. táblázat

Egyes metanogén fajok szelektív gazdagításához és tenyésztéséhez használt LPBM-alaptápközeg összetétele* (ZEIKUS, 1977).

Alkotóelemek	Mennyiség
KH_2PO_4	0,75 g
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	1,45 g
NH_4Cl	0,9 g
$MgCl_2 \times H_2O$	0,2 g
$Na_2S \times 9\ H_2O$**	0,5 g
Nyomelemoldat***	9 ml
Vitaminoldat****	5 ml
Reszazurin-oldat (0,2%)*****	1 ml
Desztillált víz	1000 ml

* Anaerob körülmények között, 95% dinitrogént és 5% szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában készítendő. A közeg pH-értékét autoklávozás előtt pH 7,4-re állítják be. Az alaptápközeghez a metanogének szaporodása biztosítására még elektrondonor (H_2-gáz, formiát vagy metanol) is szükséges.

** A szulfidoldat a sterilezés után adagolandó.

*** A desztillált víz (pH 7,0, KOH-val) 1 literére számítva tartalmaz: nitrilo-triecetsav, 4,5 g; $FeCl_2 \times 4\ H_2O$, 0,4 g; $MnCl_2 \times 4\ H_2O$, 0,1 g; $CoCl_2 \times 6\ H_2O$, 0,17 g; $ZnCl_2$, 0,1 g; $CaCl_2$, 0,02 g; H_3BO_3, 0,019 g és nátrium-molibdát, 0,01 g.

**** Néhány metanogénnek vitaminkeverékre van szüksége.

***** Redoxiindikátor.

és a *Methanospirillum* fajok DNS-e G + C tartalmainak hasonlóságait is szemügyre vesszük, úgy könnyen belátható, hogy a genuszdifferenciálásra ez a bélyeg önmagában ugyancsak alkalmatlan (ZEIKUS, 1977). A morfológiai eltérések, a heterogén ultrastrukturális organizáció, a táplálkozási tulajdonságokban rejlő differenciák és a DNS G+C-értékeinek széles skálája mind azt bizonyítják, hogy a metanogének nagyon különböző eredetűek és csupán energiaszerző anyagcseréjük közös mechanizmusa az, ami egyesíti őket.

1.20.7. A metanogén baktériumok kitenyésztése

A metanogének valószínűen az eddig megismertek közül a legszigorúbban anaerob baktériumok. Tenyésztésük leggyakrabban gumidugóval szorosan zárt, anaerob tenyészcsövekben történik. Az utóbbiakba a kanülön át bevezetett, gyapoton átszűrt gázt (rutinszerűen 80% hidrogént és 20% szén-dioxidot tartalmazó gázkeveréket) az oxigén nyomainak eltávolítása céljából, előbb hevített rézreszeléken áramoltatják keresztül.

Egyes kutatók a $H_2 : CO_2 = 50:50$ arányú keverékét alkalmazzák, minthogy ez sokkal sűrűbb és a kultúrák felnyitásánál a levegő sem olyan könnyen szorítja ki. A táptalajok és a reagensek adagolása, az átoltások és beoltások mind aszeptikusan megoldott pipettázással történnek. Tenyésztésükhöz ún. „Hungate típusú" csavarkupakos és gumiperemmel záródó csövek is használatosak. E csövekbe az anyag be- és átvitele speciális fecskendőmódszerrel történik.

A metanogének izolálására és tenyésztésére anaerob, kesztyűs benyúlású, zárt szekrényeket használnak, melyekben még egy belső ultraalacsony oxigéntartalmú kamra van elhelyezve. A lemezöntéseket és terítéseket a külső anaerob, kesztyűn át hozzáférhető térben végzik, majd ezután az anyagot a belső kamrába helyezik, melynek a $H_2:CO_2$ (80:20) -ellátásáról folyamatosan gondoskodnak. A belső kamra atmoszférája teszi lehetővé, hogy hidrogénen szaporodhassanak, és hogy az ehhez szükséges redoxipotenciál is biztosítva legyen. A metanogének megközelítő azonosítása kolóniáik fluoreszkálásán alapul. E célból a fertőzött és inkubált lemezeket hosszú hullámhosszú UV-sugárzás hatásának teszik ki. A 0,5 mm-nél kisebb, parányi kolóniák nem fluoreszkálnak. Valamennyi eddig tanulmányozott metanogén egy sajátos pigmentet ($Faktor_{420}$) tartalmaz, melynek oxidált alakját hosszú hullámhosszú UV-sugarakkal gerjesztve fluoreszkál. Az aktív szaporodás időtartama alatt a sejtekben az F_{420} részben oxidált állapotban található. Ezenkívül a metanogén baktériumok akkor is fluoreszkálnak, ha azokat UV-mikroszkópban tanulmányozzák. Ez a fluoreszcencia azonban csak nagyon rövid időtartamú. Identifikálásukhoz az izolált tenyészetek metántermelését is vizsgálják.

1.20.8. A metanogének csíraszámának becslése

A metanogén genuszok és fajok izolálására és számlálására számos eljárást ismerünk. Így pl. a *22. táblázat*ban leírt LPBM-táptalaj 0,5–1,0% (végkoncentráció) nátrium-formiáttal vagy metanollal és gáz fázisként 80% hidrogén és 20% szén-dioxiddal kiegészítve alkalmas közeggé válik azoknak a metanogéneknek a gazdagítására és szaporítására, melyek különben minimális táplálkozási igényekkel rendelkeznek. A tisztítás anaerob kultúrcsövekben, 2% agart tartalmazó LPBM-tápközegen, megfelelő energiaforrás jelenlétében hígítási sorozatból inokulálva történik. A különálló kolóniákból folyadékkultúrákat létesítenek. E tápközegben a szulfát hiánya a szulfátredukálók szaporodását akadályozza meg, míg a szerves vegyületek (élesztőkivonat stb.) hiánya a heterotrófok okozta fertőzéseket küszöböli ki.

Sajnos a kevert metanogén populációk összes csíraszámának akárcsak megközelítő becslése is, különböző természeti közegekből, gyakran igen nagy nehézségekbe ütközik, minthogy számos fajuknak, ill. törzsüknek specifikus szerves növekedési faktorigénye is lehet, és ezek hiányában nem szaporodnak, kimutathatatlanok.

A *Methanobacterium* fajok leggyakrabban tavi üledékekben és szennyvíztisztító telepek rothasztó medencéiben fordulnak elő. Ha az üledékekkel vagy az iszappal, ill. ezek hígított szuszpenzióival, anaerob tenyészcsövekben, H_2- és CO_2-gázfázist tartalmazó LPBM-közegre oltanak és azt 25 °C-on inkubálják, úgy ezen a metanogének lassan szaporodásnak indulnak és tenyészetükből ugyanerre a közegre hetenként megismételt továbboltásokkal, metanogén pálcikák mezofil populációja állítható elő. A hidrogén elvonása, vagyis a molekuláris hidrogén aktív oxidálása különben a tenyésztérben igen erős negatív nyomást idéz elő. Amennyiben az iszappal oltott tápközeget 65 °C-on inkubálják, úgy abból ismételt transzferrel már termofil fajok szelektálhatók. Ilyen magas hőmérsékleten, 6–9 egymást követő transzfer már csak a termofil metanogén pálcikákat dúsítja. A formiátot degradálókat úgy tenyészthetjük ki, hogy ha az iszap- vagy az üledékszuszpenziót, anaerob tenyészcsövekben, 0,5–1,0% nátrium-formiátot tartalmazó LPBM-re oltjuk. Az inokulált tápközeg inkubálása ez esetben csakúgy, mint a folyamatos továbbtenyésztések, 44 °C-on történnek. A formiát fermentációja különben növeli a közeg pH-értékét. Amennyiben anaerob tenyészcsövekben, LPBM + 0,5–1,0% metanolt tartalmazó tápközeget iszappal vagy üledékkel oltanak, úgy abból *Methanosarcina* fajok szelektálhatók. Az inkubálás 30 °C–40 °C között történik. Az ilyen tenyészetek továbboltásánál nagy óvatossággal kell eljárnunk, minthogy a metanolhasznosítás a gáznyomás erőteljes növekedését eredményezi. A *Methanococcus*ok és a *Methanospirillum*ok szelekciója még nehezebb feladat. Az utóbbiak gyakran nagy számban szaporodnak sekély eutróf tavak felszíni iszapjaiban. Kitenyésztésüknél 32 °C inkubációs hőmérséklettel dolgoznak.

1.20.9. A metanogének előfordulása

A metanogéneket már számos, elsődlegesen organotróf, anaerob ökoszisztémából, így az állatok emésztőtraktusából és bendőjéből, iszapokból, üledékekből, tengeri és édesvízi környezetek elárasztott talajaiból, szennyvíztisztítók emésztőiből stb. ismerjük. Ezekben általában a hidrogénoxidáló metanogének dominálnak. A metán az élő fák törzseiből néha kimutatható, éghető gázok komponense is lehet. Szemmel láthatóan egészséges fákban, így szilfában, nyárfában, tölgyben stb. jelentős

metánnyomás alakulhat ki. E fákban a metánképzés mikrobiális eredetű és az elpusztult xilém szövetekben mehet végbe. Az ilyen szövetek különböznek a fa normál szöveteitől, minthogy anaerob baktériumokkal fertőzöttek, pH-juk alkalikus, oxigént nem tartalmaznak, magas nedvességtartalmúak és jellegzetes szaguk van. A metanogén *M. arbophilicum* faj is ilyen szövetekből került elő (ZEIKUS és HENNING, 1975). Az élő fák belsejében, a nem lignínesedett, elpusztult xilém szöveteknek vagy a fa könnyen értékesíthető tápanyagainak *in situ* anaerob lebontása a metanogének szaporodásához szükséges dihidrogént állítja elő. A baktériumnépesség betelepedése az élő fa törzsébe feltehetően gyökérsérülésekből indul ki. Ezek a bennszülött talajmikrobióta, többek között a metanogének inváziójához a növény föld feletti részei felé is megnyitják a kaput.

1.20.10. A metántermelés környezeti feltételei

A sekély tavak fenekéről felszálló metánbuborékok jelensége közismert. Ezzel szemben csak keveset tudunk e metanogenezis környezeti feltételeiről és e jelenségért felelős helyi mikrobiális aktivitásokról. A tengeri és édesvízi iszapok esetében a legtöbb vizsgálat elsősorban is a metánképzés minőségi és mennyiségi igazolására szorítkozott. A mélyebb vízi üledékekben termelt metán folyamatosan a felsőbb vízrétegekbe kerül, ahonnan vagy kidiffundál az atmoszférába, vagy ott a planktonikus mikrobák szén-dioxiddá metabolizálják. A Mendota-tó (USA) üledékeiben a metanogének tevékenységét, mint kiderült, a hőmérséklet döntően befolyásolja, következésképpen a metántermelés mértéke évszakosan erősen ingadozik (ZEIKUS és WINFREY, 1976). A fokozódó metánképzés a metanogének csíraszámának növekedésével egyenes összefüggést mutat, míg anyagcsere-aktivitásuk annál élénkebb, mennél közelebb van az üledék hőmérséklete a számukra optimálishoz. E tóból kimutatott metanogén populáció uralkodó típusainak aktivitását laboratóriumban igen széles skálán, 4–45 °C között észlelték. A maximális, *in situ*, üledékhőmérséklet 23 °C volt, ami messze alatta van e szervezetek tényleges hőmérsékleti optimumának (35–42 °C). A Mendota-tó üledékeiből egyébként valamennyi eddig ismert metanogén genuszt kitenyésztették. Közöttük *Methanobacterium* fajok voltak túlsúlyban. A Vechten-tóban 1974–75-ben a metanogének és a szulfátredukáló baktériumok tevékenységének összefüggéseit tanulmányozták (CAPPENBERG, 1975). Itt a felső, szulfáttartalmú üledékrétegek szulfátredukálóinak acetátot szolgáltató laktátanyagcseréje az, ami az acetátfermentáló metanogének működéséhez a legfontosabb energiaforrást nyújtja. Az ilyen metanogének, melyekre nézve a szulfidok jelenléte kedvezőtlen hatású, az üledékek mélyebben

fekvő rétegeiben találhatók. A felső üledékekben a laktát-turnover rátája átlag 28,9 μg laktát/g iszap/óra értéknek bizonyult. Az acetát eltűnésének sebessége (1,99 μg acetát/g iszap/óra) a megfigyelt metanogenezisnek kb. 70%-a volt. Metán tehát másból is származott. A tóból izolált szulfátredukálók és metanogének kevert tenyészeteivel megvalósított kemosztáttanulmányok igazolták, hogy a szulfátredukálók a metanogéneket acetáttal látják el, bár igaz, rájuk nézve toxikus kén-hidrogént is előállítottak. Feltételezik, hogy a két mikrobacsoport között kommenzalista kölcsönhatás állhat fenn. Viszonyuk azonban valószínűen sokkal bonyolultabb, és ebbe talán még más típusú baktériumok is beleszólnak.

1.20.11. A metanogenezis gátlása

Az akvatikus üledékekhez adott szulfátok, nitrátok, nitritek, acetilén stb. a metanogenezist kifejezetten gátolják. Ez a negatív hatás vagy közvetett és a nem metanogének idézik elő azáltal, hogy a metán szénprekurzorainak redukciójától az elektronáramot ezen alternatív elektronakceptorok felé eltérítik, de az is lehet, hogy e vegyületek, ill. származékaik a metanogéneket közvetlenül gátolják.

Tengerparti marsh-üledékekben csakúgy, mint a metanogéneknek tápfolyadékokban előállított sejtszuszpenzióiban a nitrát, a nitrit, a nitrogén-oxidok vagy a szulfit a metán hidrogéndependens előállítását erősen gátolják (BALDERSON és PAYNE, 1976). A metánképzésnek az ilyen vegyületek jelenlétére visszavezethető gátlása nem az üledékrendszer redoxipotenciáljában előidézett változásokra, és nem is a nem metanogéneknek a szubsztrátokért folytatott, eredményesebbé vált versengésére volt visszavezethető. Tény, hogy vannak vegyületek, melyek természetes környezetekben gátolják a metanogenezist, magukat a metanogén baktériumokat azonban nem. Például a metanogének tiszta tenyészetekben még nagy szulfátkoncentrációk jelenlétében is jól szaporodnak. Viszont tengeri üledékekben a metanogenezis mindaddig nem veszi kezdetét, amíg az átitató vizekből a szulfát el nem fogy. Hasonló megállapításra jutottak édesvizek esetében is. Itt a szulfát adagolásának (0,1%) a metanogenezisre gyakorolt gátló hatását egyesek a kén-hidrogén fokozott produkciójára vezetik vissza. Édesvizekben a szulfát a metanogenezist azáltal gátolhatja, hogy az anaerob mineralizáció során a normális szén- és elektronáramot megváltoztatja (WINFREY és ZEIKUS, 1976, cit. ZEIKUS 1977). A Mendota-tó üledékmintáiban a metanogenezis szulfát okozta gátlását hidrogéngáz vagy acetát adagolásával, vagy prolongált inkubációval megfordíthatták. Radioaktív nyomjelzési technikával demonstrálták, hogy szulfát hiányában a ^{14}C-jelzésű acetát $^{14}CH_4$-gyé és $^{14}CO_2$-vé

alakul, míg a szulfáttartalmú üledékben csupán $^{14}CO_2$-t találtak. Ha az üledékhez szulfátot adtak, úgy az átitató vízben szignifikáns mérvű kén-hidrogén-akkumulációt nem tapasztaltak. Feltételezik, hogy a szulfátredukáló szervezetek, a szulfáttartalmú üledékekben, a metanogén prekurzorok hasznosításával átveszik a metanogének szerepét. Ennek az egész problémakörnek a tisztázásához, acetáttal lélegző, szulfátredukáló baktériumok (!) dokumentálása tiszta tenyészetekben nagy fontosságú lenne. A *Desulfuromonos acetoxidans* fajról már tudjuk (*lásd* 5.8. alfejezet), hogy acetátot respirál.

Úgy tűnik, hogy a természetben a szulfátredukáló baktériumok és a metanogének kölcsönhatása nagymértékben a szulfát lokális koncentrációjától függ. Ennek nagy töménysége esetén, mint pl. tengeri környezetekben, versengő kölcsönhatásokról lehet szó. A szulfátban kimerült édesvízi üledékekben viszont a szulfátredukáló baktériumok vagy egyáltalán nem tevékenykednek, vagy ellenkezőleg, velük szinergista kölcsönhatás jelentkezik. Így már 1969-ben kimutatták (BRYANT, cit. ZEIKUS, 1977), hogy a szulfátredukálók és a metántermelők között szimbionta társulás is lehetséges. Kevert tenyészetben *Desulfovibriot* szulfát nélkül, *Methanobacterium* társaságában laktáton tenyésztettek. A metanogén (szulfát helyett) mint alternatív elektronsüllyesztő működött, és a szulfátredukálók laktátkatabolizmusát tette lehetővé. Ezzel szemben a fajok közötti hidrogéntranszfer lehetőségeinek behatóbb kutatási eredményei mégis inkább azt a benyomást keltik (*lásd* 1.20.14. alfejezet), hogy metanogén környezetben a laktát fontos metabolit semmi esetre sem lehet.

1.20.12. Mikrobiológiai metanogenezis különböző ökoszisztémákban

A metanogenezis legfőbb *in situ* szubsztrátjai az acetát, továbbá a hidrogén és a szén-dioxid. A metanol nemigen lehet az anaerob lebontás szignifikáns terméke. Formiátot számos fermentáció eredményez ugyan, mégsem tekinthető fontos szubsztrátnak, mivel könnyen hasítható hidrogénre és szén-dioxidra. A bendőben a formiátot főleg a nem metanogének hasznosítják. Az organotróf (szerves anyagban gazdag) ökoszisztémákban az acetátnak és a hidrogéngáz + szén-dioxid keveréknek mint metánprekurzoroknak a viszonylagos fontossága nagymértékben a környezeti körülményektől függ. A bendőben az előállított metán többsége a hidrogéngáz és a szén-dioxid terhére szintetizálódik. Másrészt acetátból a bendőmetánnak csupán mintegy 2–5,5%-a származik. A bendőökoszisztéma úgy működik, mint egy kemosztát, ahol az illékony zsírsavak koncentrációját a bendő falán át folyamatosan végbemenő abszorbciójuk tartja alacsony szinten.

Szovjet kutatók szerint a különböző tavak üledékében képződő metán 32–98%-a a szén-dioxidnak hidrogénnel történt mikrobiológiai redukciója révén áll elő (BALIAER és munkatársai, 1975).

Mikrobiológiai metanogenezist elsődlegesen kemolitotróf ökoszisztémákban (vagyis, ahol a környezetben levő hidrogéngáz geokémiai folyamatok eredménye) is kimutattak. A Kivu-tóban (Afrika) a szén-dioxid mikrobiális redukciója metánná vulkanikus eredetű hidrogénnel megy végbe (DEUSER és munkatársai, 1973). Geokémikusok a Yellowstone Park egyes hévizeiben elnyelt gázokban a metán (több mint 20%) és a hidrogén (több mint 6%) nagy koncentrációit mérték. Számos hőforrásból, melyekben geotermális hidrogén volt jelen, metanogéneket izoláltak. Szovjet kutatók feltételezik, hogy a geokémiai hidrogén mikrobiális oxidációja nagyrészt azonos lehet a kőolajban, a földgázban és a széntelepeken folyó metanogenezissel.

1.20.13. A metanogének mint az anaerob táplálkozási láncok végső láncszemei

Anaerob környezetekben, ahol szerves anyagok lebontása folyik, a metanogének a táplálkozási láncok terminális organizmusai. Ennek a lebontó folyamatnak döntő jellemvonása, hogy sikeres kimenetele nagyon különböző anyagcseréjű baktériumok együttműködésétől függ. A glikolízis során előállított redukált NAD-ról (NADH) az elektronok átadása a NAD regenerálása céljából oxidálható vegyületeknek, a fermentatív baktériumokban különböző redukált termékek (hidrogéngáz, etanol, laktát, formiát vagy propionát) produkcióját eredményezi. A metanogének jelenlétében, illetve távollétében szaporodó szénhidrát-degradáló anaerobok fermentációs végtermékeinek analízise elárulja, hogy pl. a bendőben a fermentáció alatt a metanogének miként változtatják meg az elektronáramot (*lásd* még az 1.20.14. és a 9.8.14. alfejezetet). A különböző szénhidrát-fermentálók szaporodása tiszta tenyészetben, metanogének nélkül többnyire hidrogén, szén-dioxid, formiát, acetát, szukcinát, laktát és etanol produkcióját eredményezi, míg a metanogének jelenlétében főleg metán, acetát és szén-dioxid termelése észlelhető. Metanogénekkel laktát és etanol nagyon kis mennyiségben termelődik, míg az acetát mennyisége nő. Hasonló eredményre jutottak, midőn a *Clostridium thermocellum*ot a *M. thermoautotrophicum*mal cellulózon tenyésztették együtt. A *C. thermocellum* fermentációs végproduktumai főleg hidrogén, szén-dioxid, etanol és acetát. Kevert tenyészetben metánt, szén-dioxidot és növekvő mennyiségű acetátot állítottak elő. Érdekes viszont, hogy ha e két szervezetet cellobiózon mint szubsztráton tenyésztették együtt, úgy a metanogén a *Clostridium* fermentációs anyagcsere-aktivitá-

sát csak csekély mértékben befolyásolta és ekkor szabad hidrogén is termelődött. A *Clostridium* és a metanogén közötti, fentebb bemutatott nagyon jellegzetes anyagcsere-kapcsolat tehát cellobiózon mint egyszerű vízoldékony szubsztráton szaporítva már nem volt megfigyelhető. lásának menete alapvetően meghatározza. A metanogének az organotróf (szerves anyagokban gazdag) ökoszisztémákban folyó szerves lebonlásának menete alapvetően meghatározza. A metanogének az organotróf (szerves anyagokban gazdag) ökoszisztémákban folyó szerves lebontási folyamatok során mint „elektronsüllyesztők" funkcionálhatnak, amennyiben az elektronáram útját megváltoztatják és azt mások részéről a hidrogénprodukció irányába terelik. Elméletileg a megváltoztatott elektronáram, vagy más szóval, a fajok közötti hidrogéntranszfer, mely a metanogének és a nem metanogének koordinált szaporodása alkalmával bontakozik ki, azt eredményezheti, hogy (WOLIN, 1975):

1. Megnövekedik a közösségben részt vevő baktériumok szubsztrát-hasznosításának mértéke.
2. A redukált végtermékek termelése megváltozott arányban folyik.
3. A nem metanogének több ATP-t állíthatnak elő.
4. Mindkét szervezetcsoport szaporodása fokozódik.
5. A közösségi anyagcsere kedvezőtlen reakcióútjai kiküszöbölődnek.

A metanogének szerepére a bioszférában még a Metánciklus (3.5.) alfejezetben visszatérünk.

1.20.14. A fajok közötti hidrogéntranszfer ökológiai jelentősége

A fajok között hidrogéntranszfer alakjában megnyilvánuló anyagcsere-kölcsönhatások anaerob környezetekben működnek és nagy ökológiai fontosságúak. A bendőben és az üledék-ökoszisztémákban, ahol ez az *„interspecies H_2-transfer"* típusosnak tekinthető, a hidrogén parciális nyomása rendkívül alacsony (10^{-6} M). Ezenkívül a molekuláris hidrogén számottevő mennyiségben még sok más organotróf, metanogénnek számító természetes környezetben sem észlelhető, ami feltehetően ugyancsak e szervezetek gyors hidrogénoxidációjának következménye, mégpedig részben interspecifikus hidrogéntranszfer reakciók révén. A „normál" fermentációknak már elektront elnyelt, az elektronsüllyesztő szerepét betöltött végtermékei, mint amilyen az etanol és a laktát is, az anaerob ökoszisztémák szénanyagcseréjére csak kismértékű további kihatással lehetnek. Emiatt a bendőben például az etanol és a laktát nem különösebben fontos mikrobiológiai lebontási intermedierek, minthogy az elektronok a közösségi anyagcsere során sokkal inkább a metántermelés felé térítődnek el.

A fajok közötti hidrogéntranszfer két általános kategóriáját ismerjük. Az elsőben a metanogének és a szénhidrátfermentáló baktériumok kölcsönviszonya szempontjából a hidrogénleadás az egyik oldalon és hasznosítás a másikon előnyös, bár nem esszenciális fontosságú. A második kategóriában viszont már igen.

1.21. A szulfátredukáló baktériumok ősiségének kérdése

A különböző, ismert korú geológiai rétegekből nyert kénizotópok frakcionálása alapján arra a következtetésre jutottak, hogy planétánkon a szulfátredukció már 2×10^9 évvel ezelőtt is, vagyis már akkor, amikor a légkörben oxigén jelentős mennyiségben még nem volt jelen, szélesen elterjedt biológiai folyamat lehetett (AULT és KULP, 1959; RUTTEN, 1972). A Földön előforduló kénfelhalmozódások legnagyobb többsége tömeges mikrobiális szulfátredukció eredményének tekinthető és igen valószínű, hogy a bioszféra történetében korábban lehettek olyan periódusok is, amikor a szulfátredukció nemcsak fontos, hanem domináns vitális folyamat volt. Számos szerző a biológiai szulfátredukció evolúciós jelentőségét tárgyalva arra a következtetésre jutott, hogy napjaink szulfátredukáló baktériumai, bár ezek egymás között is rendkívül különbözőek, sok olyan biokémiai tulajdonsággal rendelkeznek, melyeket vitathatatlanul primitíveknek, ősieknek lehet tekintenünk.

POSTGATE (1979) ezeket a primitív bélyegeket az alábbiakban foglalta össze:

1. A szulfátredukálók rendelkeznek olyan dehidrogenázrendszerrel, amely a piruvátnak szén-dioxid és hidrogéngáz felszabadítása mellett végbemenő acetil-foszfáttá alakításában, ezen a nagyon ősi típusú anyagcsereúton, működik közre.
2. Elektrontranszportjukhoz ferredoxint és rubredoxint használnak.
3. Rendkívül primitív CO_2-asszimilációs folyamatot valósítanak meg: az acetát reduktív karboxilezésével piruvátot állítanak elő.
4. Mixotróf típusú szénasszimilációs képességeik evolúciós összekötő kapcsot sejtetnek a heterotrófok és a valódi autotrófok között. Az ún. SOROKIN-reakciójuk, mely lényegében hidrogéntartalmú atmoszférában a szén-dioxid és az acetát mixotróf asszimilációját jelenti, bizonyos primitív, szén-dioxid helyett az acetát fotoasszimilálására képes, fotoszintetizáló baktériumok anyagcseréje felé mutat.
5. Minthogy citokrómokat és ferredoxinokat tartalmaznak, evolúciós pozíciójuk átmenetet képez az aerobok és a valódi obligát anaerobok között.

6. Egyes törzseikben a citrátszintézis útja, a nagyon primitív baktériumokéra jellemző, minthogy ez az út a piruvát acetil-foszfáttá alakításának reakcióiból (*lásd* 4.11.8. alf.) ágazik le, melynek során kis mennyiségű metán is keletkezik.

7. A *Desulfovibrió*k szénhidrogénjei az egyébként kifejezetten ősi típusú mikrobákéra jellemzőek.

8. A sejtjeikben előforduló deszulfoviridin szirohemje más porfirinmolekulákkal összehasonlítva igen primitívnek tekinthető (SIEGEL, 1978).

9. A citokróm-C_{553} DICKERSON és munkatársai szerint (1976) a c-típusú citokrómok evolúciójának egy nagyon korai stádiumát képviseli.

10. Vastartalmú szuperoxid-dizmutázzal rendelkeznek, ami nagyon kezdetleges tulajdonság, mivel ezek az enzimek a legtöbb, már fejlettebb baktériumban réz- vagy mangántartalmúak.

Mindezek alapján sokan arra a következtetésre jutottak, hogy a szulfátredukáló baktériumok napjaink egyik legősibb, primitív mikrobacsoportját képezik. Tipikus tagjai az ún. „szulfurétum"-oknak, melyek (*lásd* 5.6.6. alf.) ma primitív, de valamikor, amikor az oxidatív légkör még csak nem is létezett, talán igen fontos, mindenütt előforduló és uralkodó anyagforgalmi rendszerként szerepeltek. Elsődleges produktivitással is jellemezhető, az energiaszerző folyamatokban a kén központi szerepére támaszkodó anyagcserével rendelkező mikrobák részvételével szerveződött ökoszisztémák lehettek. Az ellenvélemény szerint azonban a reduktív atmoszféra körülményei között akár vizekben, akár iszapokban, szulfátok gazdag akkumulációja még aligha fordulhatott elő és valószínűbb, hogy a fotoszintetizáló szulfidoxidáló baktériumokat a szulfátredukálóknál sokkal régebbieknek kell tekintenünk. Ezt az érvelést is támadni lehet, ha feltételezzük, hogy a primitív atmoszférában fotokémiai reakciók során szabad oxigén már a legkorábbi időkben, vagyis még nem biológiailag, hanem tisztán kémiai reakciók útján is keletkezhetett, melynek során a szabad szulfidok már akkor folyamatosan szulfáttá oxidálódhattak. Mindenképpen valószínűnek látszik, hogy bolygónkon a szabad szulfát megjelenése a biológiai úton felszabadított oxigén akkumulációját megelőzhette.

Tény, hogy a szulfátredukálók anyagcseréje ősi, „maradvány" jellegű. Ezenkívül ezt az anyagcserét tanulmányozva bizonyos fokú ellentmondásokra is bukkanhatunk. Így elektrontranszport-komponenseik közül az oxigénnel több is spontán reagálni képes, aminek folytán ezek a szervezetek bizonyos aerob anyagcserére is képesek lehetnének. Ennek ellenére obligát anaerobok. Pillanatnyilag érthetetlennek látszik, hogy ilyen szervezetek miért nem szaporodnak aerob módon, pl. piruvát terhére ATP-t csupán szubsztrátszinten előállítva. Még peroxid-hatásra

sem hivatkozhatunk, mivel sejtjeikben kataláz és a szuperoxid-dizmutáz van jelen. Valójában nemcsak aerob, de még fakultatív szulfátredukáló baktériumokat sem ismerünk.

Jelenleg a szulfátredukáló baktériumok evolúciós státusát tekintve az előtérben elsősorban is elképzelések és spekulációk állnak. Számos kérdés megválaszolásához még több biokémiai konkrétumra lenne szükségünk. Mindenesetre az a tény, hogy a *Desulfovibrio* genusz tagjainak peptidoglikán sejtfala és unit membrán típusú citoplazmamembránja van, határozottan arra utal, hogy ezek a szervezetek már inkább a modernebb klasszikus baktériumok, mintsem az ősbaktériumok soraiba tartoznak.

1.22. A modern anaerob fotoszintetizáló baktériumok

Napjainkban a fotoszintézissel oxigént termelő eukariota zöld növények (így az algák is) és a prokariota cianobaktériumok (kék-zöldalgák) termelik a Földön évenként előállított szerves anyagoknak csaknem a teljes tömegét. Az anaerob fotoszintetizáló baktériumok produkciója ebben a modern világversenyben ma már elenyészően csekély. Valamikor azonban kizárólag csak ők voltak a producensek. Természetesen a légköri oxigénkészletek utánpótlásához ma sem járulnak hozzá, és amíg a zöld növényeknek az oxigén nemcsak a légzéshez, hanem pl. a klorofill-a szintéziséhez is elengedhetetlen, addig az anaerob fotoszintetizálóknál a bakterioklorofill szintézisét az oxigén egyenesen gátolja.

1.22.1. A térért és élőhelyekért folytatott küzdelem egykor és ma a fotoautotrófok között

A baktériumok fotoszintézisének anaerob jellege mai szemmel nézve, már önmagába véve is paradoxon. A fotoszintetizáló szervezetek ugyanis a fényben gazdag helyek felé törekednek, ahol különben az oxigén általában magas koncentrációban van jelen, ami viszont gátolja a bakteriális fotoszintézist. Az ellentmondás feloldására eleve fel kell tételeznünk, hogy az anaerob fotoszintézis még a reduktív légkörben, a prekambrium primitív baktériumai között jött létre. Ezek az ősi fotoszintetizálók a sekély vizek parti régióiban, a felszínhez viszonylag közel, és relatíve még jól megvilágított helyeken, az alámerült köveken, sziklákon szövedéket, bevonatot alkotó közösségekben élhettek.

Ez a kedvező állapot számukra mindaddig tartott, míg a modern cianobaktériumok prekurzorai meg nem jelentek. Utóbbiak feltehetően

mutációk hosszú során át fejlődtek és oxigéntermelésükkel a vizekben egyre mélyebbre szorították a fényigényes anaerob fotoszintetizálókat. A napfényes, sziklákon élő bevonatközösségek felső régióit lassan teljesen az ősi cianobaktériumok foglalhatták el. Az anaerobok a bevonatok mélyebben fekvő belső régióihoz adaptáltak, ahol ugyan jóval kevesebb volt a fény, ugyanakkor a számukra mérgező hatású oxigén is. A legtöbb anaerob módon fotoszintetizáló baktérium ma is ilyen biotópokban él. Maguknak a fotoszintetizáló baktériumoknak a prekambriális megjelenési ideje és a fejlődésüket elősegítő ökológiai körülmények ma még nagyrészt ismeretlenek. Ősi anaerob fermentáló szaprofitáktól származhatnak. Általános anyagcseréjükben bizonyos mértékig a mai obligát anaerob klosztridiális és metanogén típusokra emlékeztetnek.

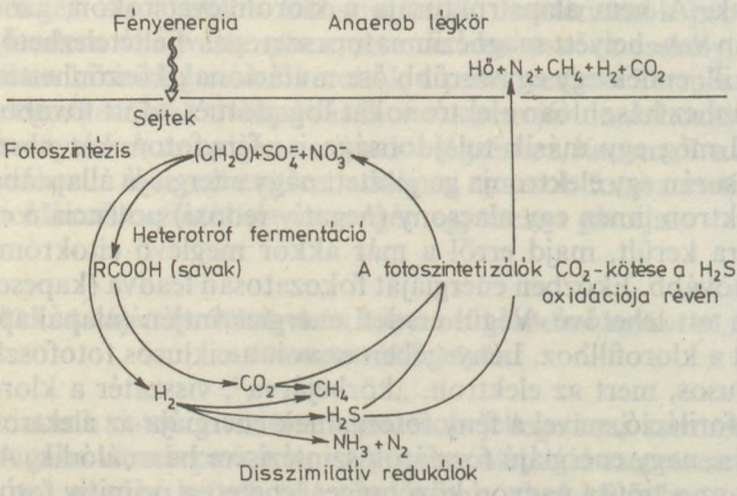
1.22.2. A fényenergia-hasznosítás egykori kialakulása a baktériumoknál

A modern anaerob fotoszintetizálók ősei feltehetően olyan mikroszervezetek lehettek, melyek hem-pigmenteket (mint a citokrómokban) tartalmazhattak. A hem alapstruktúrája a klorofillével rokon, azonban az utóbbiban vas- helyett magnéziumatom szerepel. Feltételezhető, hogy a klorofill, ill. ennek egy egyszerűbb őse mutációnak köszönhette létrejöttét. A hemhez hasonlóan elektronokat fogadott és adott tovább, de volt ezenkívül még egy másik tulajdonsága is: fényfotonokat abszorbeált, melynek során egy elektronja gerjesztett nagy energiájú állapotba került. Ez az elektron innen egy alacsony (negatív redoxi) potenciálú elektronakceptorra került, majd erről a már akkor meglévő citokrómláncnak adódott tovább. Eközben energiáját fokozatosan leadva (kapcsolt) foszforilációt tett lehetővé. Végül eredeti energiaszintjén (alapállapotában) visszatért a klorofillhoz. Lényegében ez volt a ciklusos fotofoszforiláció őse. Ciklusos, mert az elektron, „körbejárva", visszatér a klorofillhoz. Fotofoszforiláció, mivel a fény fotonjainak energiája az elektrontranszport során, nagy energiájú foszfátok szintézisére használódik. A fotoreakciónak ez a típusa nagyon közönséges lehetett a primitív fotoszintetizáló szervezetek valamennyi csoportjában. Ez esetben tulajdonképpeni fotoautotrófiáról még nem is beszélhetünk, mivel az egyetlen termék az ATP. Ezek a baktériumok sejtalkotóelemeiket a környezetükben fellelt redukált szénvegyületekből szintetizálhatták, miközben a most már nagy mennyiségben rendelkezésükre álló ATP-t használták fel e prekurzorok aktiválására. Oxigén az atmoszférában ekkor még mindig nem volt jelen és az ózonréteg is hiányzott a felső légrétegekből. Ez utóbbi hiányában a nagy energiájú ultraibolya sugárzás még közvetlenül a Föld felszínét bombázta. Ennek destruktív hatása miatt – feltehetően – az ősi fotoszin-

tetizáló szervezetek, a vizek azon mélységeiben helyezkedhettek el, ahová ez a típusú sugárzás már nem hatolt le. Elképzelhető, hogy ezeken a helyeken a nitrátlégzésre képes mikrobák tevékenysége folytán csupán nagyon kevés redukált szénvegyület állt már rendelkezésre, viszont a szén-dioxid mennyisége jelentősen megnövekedett. Ennek folytán az ilyen speciális környezet erős szelekciós nyomást gyakorolhatott az itt élő ősi közösségek tagjaira, melyek között olyan mikrobák kerültek előtérbe, melyek képeseknek bizonyultak a sejtszintézisekhez szén-dioxidot hasznosítani.

1.22.3. Az ősi típusú elemkörforgalmak egyszerű modellezése

A vízi miliőkben az ősi reduktív atmoszféra létezése idején a szén, a kén és a nitrogén stabil lokális anaerob körforgalmi rendszerei bontakozhattak ki *(98. ábra)*. Hasonló rendszereket zárt üvegedényekben ma is előállíthatunk. Az ún. WINOGRADSKY-oszlopot fotoszintetizáló baktériu-



98. ábra

Anaerob szén-, kén- és nitrogénkörforgalom a prekambriális idők reduktív légkörének idején. A fotoszintetizálók szén-dioxidból és a heterotróf fermentációk során keletkezett szerves savakból, a napból jövő sugárzó energia segítségével, építették fel sejtalkotóelemeiket, miközben redukáló elektronforrásként a szulfátredukálók tevékenysége nyomán képződött, többnyire redukált kénvegyületeket értékesítették. Mások az elpusztult sejteket heterotróf úton szerves savakra, szén-dioxidra és hidrogénre fermentálták. Egy kevés metán is termelődött; közvetlenül a piruvátnak és néhány más szerves savnak az oxidációjakor szulfátok, míg számos szerves anyagnak szén-dioxidig történő oxidációja alkalmával a nitrátok redukálódtak. A metán, oldhatatlansága következtében némi hidrogéngáz, dinitrogén és szén-dioxid társaságában, az atmoszférába távozott. Végül is a rendszerbe eredetileg fotonok alakjában érkezett energia mint a biológiai folyamatok számára már felhasználhatatlan hő szóródott szét



99. ábra

Az ún. WINOGRADSKY-oszlop. Üveghengert talajjal töltenek meg, vízzel felöntik és lefedik. Az ezután végbemenő természetes szelekciós folyamatok a fotoszintetizáló mikroorganizmusok különböző mélységekben elhelyezkedő eltérő faji összetételű populációit alakítják ki annak megfelelően, hogy a részt vevő fajok az oxigén jelenlétére milyen mértékben érzékenyek

mok gazdagítására és kitenyésztésére használják *(99. ábra)*. A fent említett ősi anaerob körforgalomnak két hátránya volt: csak a víz felszíne alatt, egy bizonyos mélységben működhetett **(1)**, ezenkívül az optimális fotoszintetikus aktivitás számára az oldott kénvegyületek megfelelő mennyiségét nem biztosította **(2)**. Ennek folytán a fotoszintetizálók között a természetes szelekció más, könnyebben hozzáférhető elektrondonorok alkalmazása irányában hatott. A „választás" a vízre esett, azonban a víznek mint elektrondonornak az oxidálásakor az anaerobokra toxikus hatású oxigén termelődött.

1.22.4. A modern fotolitotrófok *Rhodospirillales* rendje

A mai modern fototróf (fotolitotróf, fotoautotróf), vagy fotoszintetizáló baktériumokat (a cianobaktériumok kivételével) ma egyetlen rendbe, a *Rhodospirillales* rendbe soroljuk (PFENNIG és TRÜPER, 1974).

Ezek a baktériumok elsősorban is vízi szervezetek. Egymástól sok szempontból lényegesen eltérő anyagcseretípusok együttesét alkotják, és ezért e rendet inkább egy nagy fiziológiai gyűjtőcsoportnak foghatjuk fel. Valamennyien GRAM-negatívak. Sejtszuszpenzióik színe vagy a bíborvörös árnyalataiban játszik, vagy zöld. Bakterioklorofill, továbbá karotinoid pigmentek előfordulása sejtjeikben általános. Fotoszintetikus anyagcseréjük különbözik a víz fotolízisére képes kék-zöldalgákétól (cianobakteriumok) és zöld növényekétől, minthogy a fototróf baktériumoknál a fényenergia hasznosítása csakis anaerob körülmények között megy végbe és eközben oxigén nem termelődik:

$$CO_2 + 2\,H_2X \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O + 2X$$

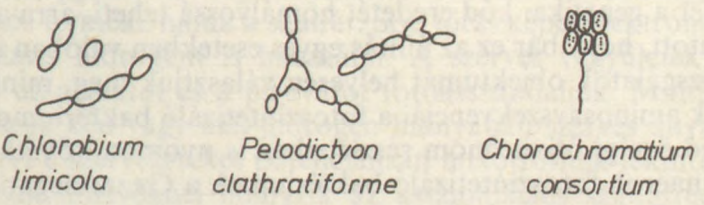
ahol H_2X a növényeknél vizet, míg a baktériumoknál pl. kén-hidrogén, hidrogén stb. elektrondonorokat jelenthet. A szén-dioxid redukciójához szükséges redukált NAD előállítása oxidálható külső elektrondonorok jelenlététől függ: ezt a szerepet redukált kénvegyületek, molekuláris hidrogén, vagy szerves vegyületek tölthetik be. A CO_2-fixáció és -redukció domináns mechanizmusa a reduktív pentóz-foszfát ciklus, de e mikrobák sejtjeiben az autotróf CO_2-asszimiláció más, egyéb útjai is működnek. Valamennyi fototróf baktérium tartalmaz citokrómokat, ubikinonokat és ferredoxin típusú nem hem karakterű vas-proteineket. A fotopigmentek vagy a citoplazmamembránnal összefüggő szerteágazó belső membránrendszerben helyezkednek el (*lásd 49.* és *50. ábrák*), vagy mint a *Chlorobiaceae* család tagjai esetében, nagyrészt közvetlenül a citoplazmamembrán alatt, specializált hólyagocskákban. Ezek a *„Chlorobium-vezikulumok"* a zöld kénbaktériumok sajátos fotopigmenthordozó elemei. Lényegében hosszúkás testek; szélességük 30–40 nm, hosszúságuk 100–150 nm. Vékony, mindössze 3 nm vastagságú, elektronsűrű, nem unit membrán veszi őket körül. Bár közvetlenül a sejtmembrán szomszédságában helyezkednek el, attól élesen megkülönböztethetők. A fotoszintetizáló baktériumok nagy mennyiségű karotinoidot tartalmaznak. Ezek feladata kettős: egyrészt védik a sejtet a fotooxidációs károsodások ellen, másrészt a fény abszorbeálásában működnek közre. A fotoszintetizáló baktériumokból szubcelluláris részecskék, ún. kromatofórák különíthetők el, melyek funkciójukat tekintve hasonlóak a magasabb rendű növények kloroplasztiszaihoz. Bár a kromatofórák mind klorofillt, mind karotinoidokat egyaránt tartalmaznak, strukturális organizációjuk korántsem éri el a kloroplasztiszokét. Újabban kimutatták, hogy laboratóriumi műtermékek: a fotoszintézis pigmentjeit és elektrontranszport-komponenseit hordozó intracitoplazmamembrán még funkcióképes törmelékei.

A *Rhodospirillales* rendnek két nagy csoportja van: **1.** A bíborbaktériumok és **2.** A zöld kénbaktériumok *(Chlorobiaceae)*. A bíborbaktériumok két életanni–rendszertani alcsoportra tagolhatók tovább: *a) Chromatiaceae* (korábban *Thiorhodaceae;* bíbor kénbaktériumok) és **2.** *Rhodospirillaceae* (korábban *Athiorhodaceae;* nem kén bíborbaktériumok).

1.22.5. Rokonsági kapcsolatok és fejlettségi szintkülönbségek a *Rhodospirillales* tagjai között

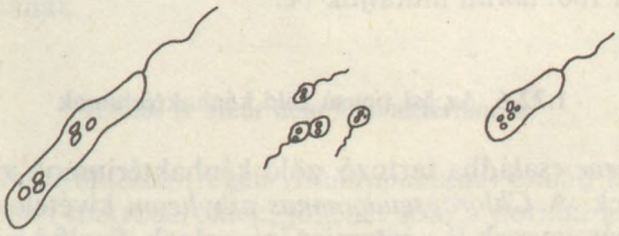
Dickerson (1980) szerint az anaerob zöld kénbaktériumok a legősibb típust képviselik és Calvin-ciklussal még nem is rendelkeznek. Ezekből

a respiráció megszerzésével a zöld fonalas baktériumok fejlődtek ki. Másrészt a zöld kénbaktériumokhoz hasonló ősöktől származhattak, a CALVIN-ciklus megszerzése után a bíbor kénbaktériumok is, melyek továbbra is anaerobok maradtak. Végül a nem kén bíborbaktériumok a legfejlettebbek: ezek mind CALVIN-ciklussal, mind az oxidatív és fotofoszforiláció képességével egyaránt rendelkeznek. A cianobaktériumok feltehetően már a bíbor kénbaktériumok leágazása idején önállósult fejlődési pályán haladhattak napjainkig (*lásd* 275. old.).



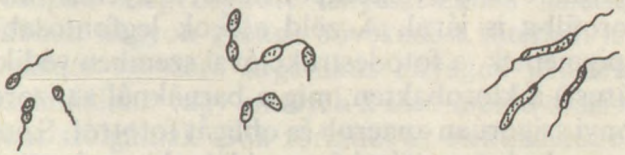
Chlorobium limicola — *Pelodictyon clathratiforme* — *Chlorochromatium consortium*

Zöld kénbaktériumok



Thiospirillum jenense — *Thiocystis violacea* — *Chromatium okenii*

Bíbor kénbaktériumok



Rhodopseudomonas sphaeroides — *Rhodomicrobium vanniellii* — *Rhodospirillum rubrum*

Bíbor nem kénbaktériumok

100. ábra

A legfontosabb fototróf baktériumfajok sejttípusainak sematikus ábrázolása. Az ábrán cianobaktériumok nem szerepelnek. A bíbor kénbaktériumok sejtjeiben megfigyelhető intracelluláris képződmények kéncseppecskéket jelölnek

Érdemes megjegyezni, hogy DICKERSON egyik tanulmányában (1980) a BERGEY'S MANUAL (1975) hiányosságaira éppen az anaerob fotoszintetizáló baktériumok evolúciójával foglalkozva mutatott rá. Ez a munka szerinte inkább „determinatív", semmint evolúciós bakteriológia. Annak a véleményének adott kifejezést, hogy a filogenetikai kapcsolatok molekuláris síkú megközelítése (riboszomális RNS-klasszifikáció, aminosavszekvencia-analízisek stb.) közelebb visz a leszármazás megértéséhez, mint a tulajdonságanalízis. Azokkal szemben, akik szerint a molekuláris információ csekély értékű lehet, mert az evolúció során a laterális géntranszfer a genetikai kód eredetét homályossá teheti, arra a következtetésre jutott, hogy bár ez az állítás egyes esetekben valóban igaz lehet, de ha a vizsgálatok objektumát helyesen választjuk meg, mint pl. a citokróm-c-k aminosavszekvenciái a fotoszintetizáló baktériumoknál, úgy az evolúció ősrégi útjait finom részleteiben is nyomon követhetjük.

Az anaerob fotoszintetizáló baktériumok a GRAM-negatív, polárosan flagellált *Pseudomonadales* rend kemoorganotróf képviselőivel tartanak rokonságot. Legfontosabb sejttípusaikat vázlatosan WEIDE és AURICH (1979) után a *100. ábrán* mutatjuk be.

1.22.6. Az ősi típusú zöld kénbaktériumok

A *Chlorobiaceae* családba tartozó, zöld kénbaktériumok viszonylag kicsiny méretűek. A *Chloropseudomonas ethylicum* kivételével szigorúan autotrófok, bár egyesek B_{12} vitamint igényelnek. Szulfid jelenlétében az elemi kéncseppek felhalmozódása a sejten kívül megy végbe és sohasem a sejtben. Az egyes sejtek és kultúráik zöldek vagy barnák. A fotopigmentek jellegzetesen ún. klorobiumvezikulumokban helyezkednek el, melyek nem a citoplazmamembrán betüremkedései. E szervezeteknél a bakterioklorofill-c és -d a fő komponensek, melyekhez kis mennyiségben bakterioklorofill-a is járul. A zöld alakok legfontosabb karotinoidja (járulékos pigmentek, a fotodestrukcióval szemben védik a fotoszintetikus apparátust) a klorobakten, míg a barnáknál az izorenieraten.

Valamennyi szigorúan anaerob és obligát fototróf. Szulfidok vagy kén jelenlétében (melyeket szulfáttá fotooxidálnak) a szén-dioxid fotolitotróf asszimilációjára képesek. Sok törzs növekedése számára elektrondonorként a molekuláris hidrogént is felhasználhatja, feltéve, ha kénszükségletének fedezésére kén-hidrogén ugyancsak jelen van. Szulfid és szén-dioxid jelenlétében számos egyszerű szerves szubsztrátot fotoasszimilálnak.

1.22.7. A bíbor kénbaktériumok

A *Chromatiaceae* (régebbi nevén *Thiorhodaceae)* család tagjai nagy sejtjeikkel tűnnek ki, melyekben kéncseppeket lehet megfigyelni. Bíbor színük járulékos pigmenteknek tulajdonítható és nem a klorofilltartalomnak. Poláros csillókkal mozognak. Bakterioklorofill-a-t és -b-t, továbbá karotinoidokat tartalmaznak. Szigorúan anaerobok. Szulfid vagy elemi kén jelenlétében fotolitotróf szén-dioxid-asszimilációra képesek. Az elemi kén, cseppekben, a sejtekben halmozódik fel. A kénvegyületek végső oxidációs terméke náluk a szulfát. Sok törzs képes elektrondonorként molekuláris hidrogént is használni. A szerves vegyületek közül elsősorban is az acetátot és a piruvátot fotoasszimilálják. Minthogy a törzsek többsége kén vagy kén-hidrogén hiányában szerves anyagokat hasznosít, ezért e szervezeteket potenciálisan mixotrófnak tekinthetjük. Azok a törzsek, melyeknél hiányzik az asszimilációs szulfátredukció képessége, szerves anyagokat csupán szulfidoknak vagy más redukált kénvegyületeknek mint a sejtszintézis egyedüli kénforrásának jelenlétében hasznosítanak.

1.22.8. A bíbor nem kénbaktériumok

Végül a *Rhodospirillaceae* (régen *Athiorhodaceae*) család képviselőinek leírása: általában mikroaerofilek, jóllehet sok, a normál atmoszferikus oxigéntenzió jelenlétében, fényben és sötétben egyaránt szaporodik. Azokban a törzsekben, melyek mikroaerofil vagy aerob körülmények között növekednek, a fotopigmenttartalom és az ezt hordozó belső membránrendszer a vízben oldott oxigén mennyiségének növekedésével arányosan redukálódik. Szigorúan anaerob körülmények között normális növekedés csupán megvilágított tenyészetekben lehetséges. Igaz ugyan, hogy újabban nagyon gyenge növekedést sötétben is észleltek. A fototróf növekedés egyszerű organikus anyagok jelenlététől függ, melyeket fotoasszimilálnak vagy amelyek a szén-dioxid-asszimilációhoz elektrondonorként szolgálnak. Sok törzsnél az elektrondonor szerepét a molekuláris hidrogén tölti be. Ha elektrondonorként szulfid vagy tioszulfát szerepel, úgy oxidációs köztitermékként elemi kén nem jelenik meg. Amennyiben szulfidból elemi kén képződik, úgy ez nem oxidálódik tovább szulfáttá. Egyetlen faj sem képes elemi ként elektrondonorként hasznosítani. A legtöbb törzs szaporodásához egy vagy több vitamint igényel. E szervezetekben bakterioklorofill-a és -b, továbbá karotinoidok fordulnak elő. Színük narancsbarna, vörös vagy bíbor. A ciklusos fotofoszforiláció révén nagy mennyiségű ATP-t állítanak elő. A felhasznált

szénforrásokból megvalósuló szintézisekhez kitűnő ATP-ellátásuk nyújt segítséget. Ezek során pl. az acetátot glükózzá vagy aminosavakká alakítják (fotometabolizmus). A fotoreakciók csak anaerob körülmények között, fény jelenlétében mennek végbe, sötétben viszont lélegeznek (respirálnak). Sötétben általában azokat a szerves vegyületeket használják fel a légzés során, melyeket a fényben fotometabolizáltak. Ilyenkor e vegyületeket oxigénnel oxidálják, miközben szén-dioxid és víz termelődik és elektrontranszport-foszforiláció révén ATP-t állítanak elő. Ezt a képességet nyilvánvalóan az evolúció során, csak jóval később szerezhették, mivel a korai időkben oxigén még nem állt rendelkezésükre. Jelenleg pedig már csaknem teljesen komplett elektrontranszport-rendszerük van.

1.22.9. A fotoszintetizáló baktériumok elkülönítése biokémiai sajátosságaik alapján

DICKERSON (1980) a ma élő fotoszintetizáló baktériumokat a következő fontosabb tulajdonságok alapján csoportosítja:

A) Zöld fotoszintetizáló baktériumok

a) Zöld kénbaktériumok *(Chlorobiaceae)*
Egy fotocentrum
Hidrogénforrás: kén-hidrogén, kén, tioszulfát és hidrogéngáz
Leadott anyagcseretermék: szulfát
Szigorúan anaerobok. Légzésre képtelenek.

b) Zöld fonalas baktériumok *(Chloroflexaceae)*
Egy fotocentrum
Hidrogénforrás: kén-hidrogén és szerves molekulák

B) Bíborbaktériumok

a) Bíbor kénbaktériumok *(Chromatiaceae)*
Egy fotocentrum
Hidrogénforrás: kén-hidrogén, kén, tioszulfát, hidrogéngáz és bizonyos esetekben szerves vegyületek is.
Anaerobok. Légzésre képtelenek.

b) Bíbor nem kénbaktériumok *(Rhodospirillaceae)*
Egy fotocentrum
Hidrogénforrás: többnyire szerves molekulák néha azonban kén-hidrogén is, kén azonban nem.

C) Cianobaktériumok (kék-zöldalgák)
Két fotocentrum
Hidrogénforrás: víz

23. táblázat

A fototróf baktériumcsaládok összehasonlítása

I. *Rhodospirillaceae*	II. *Chromatiaceae*	III. *Chlorobiaceae*
Általában mikroaerofilek. Sok teljes oxigéntenzióná l is szaporodik, fényben és sötétben. Szigorúan anaerob körülmények között csak megvilágítva szaporodnak (anaerob fototróf). A fototróf szaporodás egyszerű szerves szubsztrátok jelenlététől függ, melyeket fotoasszimilálnak vagy a CO_2-asszimilációhoz elektrondonorként használnak. Fotoorganotrófok. Sötétben, aerob vagy mikroaerofil körülmények között oxidatív anyagcserével élnek. Sok törzsben a dihidrogén az elektrondonor. Ha szulfidot vagy tioszulfátot használnak elektrondonorként, az elemi kén nem szerepel az oxidáció köztitermékeként. Elemi ként elektrondonorként egyetlen faj sem hasznosít. A legtöbb törzs vitaminokat igényel. Egyesek nitrogént kötnek meg. Bakterioklorofill-a-t vagy -b-t és karotinoidokat tartalmaznak. Bíborszínűek. *Rhodospirillum* *Rhodopseudomonas* *Rhodomicrobium*	A legtöbb szigorúan anaerob. Elemi kén vagy szulfid jelenlétében fotolitotróf CO_2-asszimilációval élnek. A sejtekben, esetleg azon kívül, elemi kén halmozódik fel. Szulfát a végső oxidációs termék. Sok törzs dihidrogént használ elektrondonorként. Különböző, egyszerű, szerves szubsztrátokat (leginkább acetátot és piruvátot) valamennyi fotoasszimilál. Valamennyi potenciálisan mixotróf. Több fajuk nitrogént is fixál. A sejtek bakterioklorofill-a-t vagy -b-t és karotinoidokat tartalmaznak. Bíborszínűek. *Chromatium* *Thiospirillum* *Thiocapsa* *Thiocystis*	Szigorúan anaerobok és obligát fototrófok. Szulfid vagy kén jelenlétében (melyeket szulfáttá fotooxidálnak) a szén-dioxid fotolitotróf asszimilációjára képesek. Dihidrogént is felhasználhatnak elektrondonorként. Néhány egyszerű szerves szubsztrátot mind szén-dioxid, mind szulfid jelenlétében fotoasszimilálnak. Potenciálisan mixotrófok. Több fajuk nitrogént is fixál. Szulfid jelenlétében sejtjeiken kívül elemi kéncseppeket választanak ki. A fotopigmentek kloróbiumvezikulumokban helyezkednek el. Bakterioklorofill-c-t vagy -d-t és egy kevés -a-t, továbbá karotinoidokat tartalmaznak. Sok törzs vitaminigényes. Színük: zöld. *Chlorobium* *Chloropseudomonas* *Pelodictyon*

Leadott anyagcseretermék: oxigén

Aerobok (vagy fakultatívak). Oxigénnel lélegzenek.

A *23. táblázat*on az anaerob fotoszintetizálók három nagy családját részletesebb összehasonlítás tárgyává tesszük.

1.22.10. A fotolitotróf baktériumok élőhelyigényei

A fototróf baktériumok vízi szervezetek. A tavak, mocsarak, tengerek anaerob régióiban szaporodnak. Gyakran rothadó iszaprétegek növényi maradványaira települnek. A bíbor kénbaktériumok iszapokon, víz alatti tárgyakon vörös színű bevonatot alakíthatnak ki, ami sejtjeik magas

24. táblázat

Példák a fototróf baktériumok előfordulására a természetben

Fajnév	Család	Előfordulás
Rhodospirillum rubrum	*Rhodospirillaceae*	Állóvizekben és fénynek kitett iszapokban
Rhodopseudomonas acidophila	*Rhodospirillaceae*	Főleg savanyú vizekben és lápokban
Rhodomicrobium vannielii	*Rhodospirillaceae*	Édes-, félsós- és tengervízben
Chromatium okenii	*Chromatiaceae*	Megvilágított, kén-hidrogéntartalmú állóvizekben
Thiospirillum sanguineum	*Chromatiaceae*	Főleg kén-hidrogén-tartalmú, fénynek kitett tengervizekben
Chlorobium phaeobacteroides	*Chlorobiaceae*	Gyakorta a meromiktikus tavak hipolimnionjában észlelhető

karotinoidtartalmára vezethető vissza. Máskor ugyanezek a szervezetek a vízben lokálisan, tömegesen szaporodva vöröses színű felhők alakjában lebegnek. A nem kén bíborbaktériumok tömeges „virágzását" csak ritkán lehet megfigyelni. A zöld kénbaktériumok *(Chlorobiaceae)* és a bíbor kénbaktériumok szaporodását a vizek oxigénmentes övezeteiben kén-hidrogén jelenlétében figyelhetjük meg. A kén-hidrogént a szulfátlégzők, továbbá a fehérjerothasztók temelik. Gyakori jelenség, hogy ezek a rájuk nézve kedvező feltételek már csak olyan vízmélységekben találhatók, ahová a napsugárzás infravörös spektrumrésze már nem hatolhat le. Emiatt itt a klorofillrendszer mint közvetlen fotoakceptor, hatástalanná válik. Minthogy a kék fény még ide is eljut, ezért ezt a vörös színű karotinoidok abszorbeálhatják. Ilyen pigmentek a bíbor kénbaktériumokban nagy mennyiségben találhatók. Ezek azután az abszorbeált fénykvantumokat a bakterioklorofill fotoaktív centrumához továbbítják. Ez teszi lehetővé, hogy az aktív fotoanyagcsere még ilyen mélységekben is megvalósulhat. Egyébként e vízmélységekben a zöld kénbaktériumok közül is csak a karotinoidokban gazdag, barna színű fajok fordulnak elő. A sejtek fotoaktív pigmenttartalma tehát döntő tényező a fototróf baktériumok elterjedésében. A *24. táblázat* a fototróf baktériumok elterjedéséről közöl adatokat.

1.22.11. A *Rhodospirillum rubrum*

A *Rhodospirillum rubrum* 0,8–1,0 μm széles, 1,5–10 μm hosszú vibrio vagy spirális alakú sejtjei sötétben heterotróf módon szaporodnak, és ilyen körülmények között pozitív aerotaxist mutatnak (az oxigén irányába

mozognak). Ha viszont fényben, anaerob viszonyok között, autotróf módon növekednek, úgy negatív aerotaxist tanúsítanak. Feltételezik, hogy a bakterioklorofill az oxigént (fényben) toxikus peroxiddá alakítja.

A *Rhodospirillum rubrum* anaerob körülmények között pozitív fototaxist árul el. Lehetséges, hogy ezzel kapcsolatban bizonyos pozitív kemotaxist kiváltó anyagok termelődnek. A baktériumok ugyanis fényre érzékeny detektorokat nem állítanak elő (LEVY és munkatársai, 1973).

1.22.12. A *Chloroflexus*

A *Chloroflexus*nak, ennek a sajátos fotoszintetizáló, fonalas, zöld baktériumnak a rendszertani helyzetével BROCK (1978) foglalkozott behatóbban. Ő mutatott rá, hogy a zöld kénbaktériumoknak *(Chlorobiaceae)* a rokona, azonban már aerob módon, sötétben is képes szaporodni. Bizonyos morfológiai hasonlósága a cianobaktériumokkal feltétlenül arra figyelmeztet, hogy a prekambriális üledékekben eddig cianobaktériumnak minősített fosszíliákat a jövőben nagyobb óvatossággal kell majd kezelnünk. Minthogy a *Chloroflexus*, ez a 0,45–1,0 μm széles és 100 μm-nél is hosszabb, szeptált fonalakat képező, fotoszintetikus vezikulumokat tartalmazó, fakultatív szervezet, mely aerob viszonyok között energiaforrásként nagyon különböző szerves vegyületeket értékesít, valójában primitív, ásatag, ősi típusú mikroba, melynek tanulmányozása a jövőben a baktériumok filogenezisének sok kérdésében segítheti majd megértésünket. A *Chloroflexus* különben magas hőmérsékletű forrásvizekben cianobaktériumokkal társul. Amennyiben az ilyen termálvizekben a szulfidtartalom igen magas, úgy a cianobaktériumok elmaradnak és a *Chloroflexus*nak már csaknem tiszta tenyészetei találhatók (CASTENHOLZ, 1973). A *Chloroflexus* a cianobaktériumokkal együttesen szaporodva, az utóbbiak anyagcseretermékeivel elsősorban is fotoheterotróf módon él. Csak ha egyedül marad, tér át a fotoautotróf szaporodásra (BROCK, 1978).

1.23. A fényenergia befogása és konzerválása a fotoszintetizáló baktériumoknál

A fényenergia hasznosítása energiagazdag szerves vegyületek felépítéséhez a bioszférában rendkívül ősi anyagcserefolyamat lehet, és előzményei feltehetően még az életet megelőző időszakra nyúlhatnak vissza. SMITH és munkatársai (1981), továbbá FOLSOME és BRITTAIN (1981) kétséget

kizárva bizonyították, hogy modell-protosejtek karbonátokat, ill. szén-dioxidot fotokémiailag szerves szénvegyületekké redukálnak. Újabban már annak a gyanúja is felmerült, hogy az anaerob fotoszintetizáló baktériumok az evolúció során még az obligát fermentáló heterotróf ősbaktériumokat is megelőzhették (Fox és munkatársai, 1980). Természetesen az evolúciónak nagyon hosszú utat kellett megtennie ahhoz, hogy az egyszerű autokatalitikus fotoredukciótól kiindulva, a fénybefogó és -konzerváló rendszereknek, a redukálóképesség előállítása mechanizmusainak, és a CALVIN-ciklus bonyolult anyagcsereútjainak szinkron egymáshoz kapcsolódó tökéletesedése a mai hatékony szintig juthasson. A CALVIN-ciklussal és lehetséges evolúciójával más helyen foglalkozunk (*lásd* 405. old.). A továbbiakban elsősorban is a fotoszintetizáló baktériumok fényhasznosítását, ennek keretében fotoszintetikus elektrontranszportját és protongradienshez kötött energiakonzerválását, végül e mikrobáknál a redukálóképesség előállításának energetikai problémáit, továbbá az energiaszerzés vegyes megoldásait érintjük.

1.23.1. A fényenergiát hasznosító baktériumok anyagcseretípusainak terminológiája

Mivel itt elsősorban is a fényenergiának kémiaivá alakításáról esik szó, bevezetőül néhány fogalmat szükséges tisztázni. *Fototróf*nak nevezzük mindazokat a szervezeteket, melyek fényenergiát képesek hasznosítani. Azok a fajok, melyek a bakteriális fotoszintézis során a redukálóképesség előállításához elektrondonorként szerves anyagokat használnak *(fotoheterotrófok)*, azok ezekkel az anyagokkal aerob körülmények között és sötétben általában szaporodni is képesek. Azok, melyek az elektronokat kén-hidrogénből nyerik, *fotolitoautotrófok*. Ezek bioszintézisükhöz CO_2-fixálással nyernek szenet. Egyes fajok mixotrófok. A fototróf baktériumok beosztását a korábbiakban már tárgyaltuk (*lásd* 353. old.). Hangsúlyozni szeretnénk itt, hogy a *Rhodospirillaceae* család tagjai elektrondonorként általában szerves vegyületeket hasznosítanak és szén-dioxidot gyakran nem fixálnak. A *Chromatiaceae* és a *Chlorobiaceae* családok tagjai általában kén-hidrogén elektrondonorral dolgoznak és szén-dioxidot mindig fixálnak. Ami a „fotoszintetizáló" jelzőt illeti, ezt nem mindig alkalmazzák következetesen. Gyakran e jelzővel a fotoautotrófokat jelölik meg, melyek lényegében fényenergia terhére szén-dioxidból energiagazdag szerves vegyületeket építenek fel. Szűkebb értelemben azonban fotoszintézis alatt csakis a fényenergia kémiai energiává alakítását értik, vagyis ATP vagy/és redukálóképesség (NAD/P/H) előállítá-

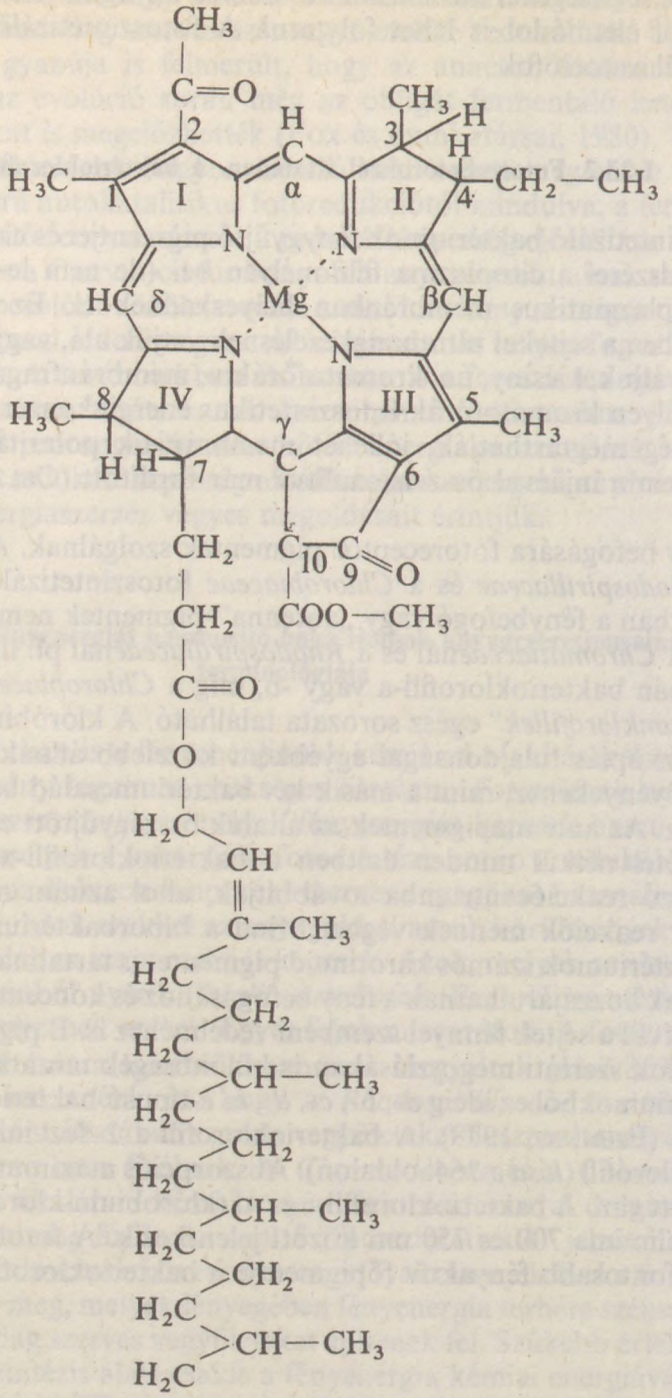
sát. Ezek segítségével hasznosítható szerves anyagok jelenlétében akár heterotróf életmódot is lehet folytatni. A fotoszintetizálók tehát nem feltétlenül autotrófok.

1.23.2. Fotoreceptorokról általában. A bakterioklorofillek

A fotoszintetizáló baktériumok fénygyűjtő pigmentjei és elektrontranszport-rendszerei a citoplazma felé mélyen be- (de nem le-) fűződő ún. intracitoplazmatikus membránban helyezkednek el. Ez a membrán, amennyiben a sejteket ultrahangkezelésnek vetjük alá, vagy más módon dezintegráljuk, kicsiny, ún. kromatofórákra, membránfragmentekre esik szét. Az ilyen kromatofórák fotoszintetikus energiakonzerváló képességüket még megtarthatják, jóllehet membránjaik polaritása az intakt sejtek membránjáéval összehasonlítva már fordított (OELZE és DREWS, 1972).

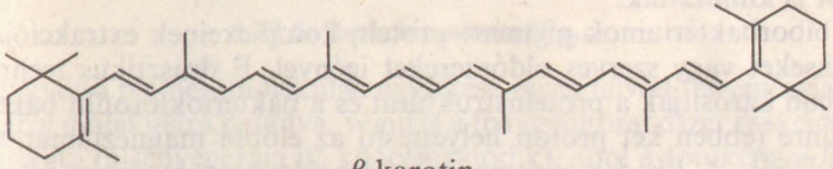
A fény befogására fotoreceptor pigmentek szolgálnak. A *Chromatiaceae, Rhodospirillaceae* és a *Chlorobiaceae* fotoszintetizáló baktériumcsaládokban a fénybefogó vagy „antenna"-pigmentek nem teljesen azonosak. A *Chromatiaceae*nál és a *Rhodospirillaceae*nál pl. ilyen minőségben csupán bakterioklorofill-a vagy -b, míg a *Chlorobiaceae*ban az ún. *„kloróbiumklorofillek"* egész sorozata található. A kloróbiumklorofillek spektroszkópiás tulajdonságai egyébként közelebb állnak a magasabb rendű növényekéhez, mint a másik két baktériumcsalád bakterioklorofilljeiéhez. Az antennapigmentek az általuk összegyűjtött energiát azonban kivétel nélkül minden esetben a bakterioklorofill-a-t, néha -b-t tartalmazó reakciócentrumba továbbítják, ahol azután már elektrontranszfer reakciók mennek végbe. Mind a bíborbaktériumok, mind a cianobaktériumok számos karotinoid pigmentet is tartalmaznak, melyek ugyancsak hozzájárulhatnak a fény befogásához és koncentrálásához, de ezeken kívül a sejtek fénnyel szembeni védelméhez is. E pigmentek fajok és családok szerinti megoszlásában is különbségek mutatkoznak.

Baktériumokból ez ideig *a-, b-, c-, d-,* és *e*-típusú bakterioklorofilleket izoláltak (PFENNIG, 1978). A bakterioklorofill-a 2-dezvinil-2-acetil-3,4-dihidroklorofill (*lásd* a 364. oldalon). Abszorpciós maximuma 800 és 900 nm között van. A bakterioklorofill-c és -d (klórobium-klorofill) abszorpciós maximuma 700 és 750 nm között jelentkezik. A fototróf baktériumok legfontosabb fényaktív főpigmentje a bakterioklorofill-a.



1.23.3. Karotinoidok

A bíborbaktériumok karotinoidjai a következő sorozatokba tartoznak: *a)* normál spirilloxantin-sorozat; *b)* a spirilloxantin-sorozat rodopinaeága; *c)* alternatív spirilloxantin-sorozat; *d–e)* okenon- és izorenieratén-sorozat. (NULTSCH és HÄDER, 1980). A cianobaktériumokból számos karotinoidot izoláltak. A β-karotin általános előfordulásúnak tűnik.



β-karotin

A karotinoidok abszorpciós maximuma 400–600 nm között van. Következésképpen fotoszintetikusan aktívak. Strukturális eltéréseik, továbbá az a tény, hogy mind egymás között, mind a bakterioklorofillekkel is nagyon különböző kombinációkban lépnek fel, lehetnek felelősek az egyes fototróf baktériumcsoportok fajainak, ezek sejtpopulációinak lényegesen eltérő abszorpciós görbéiért. Erre vezethető viszont vissza, ami különben ökológiai szempontból kiemelkedő fontosságú, hogy ezek a mikrobacsoportok fotoszintézisükhöz a fény eltérő spektrális tartományait képesek hasznosítani. E tulajdonságaikat többek között tenyészeteik izolálásánál is felhasználhatjuk (WEIDE és AURICH, 1979).

A *Rhodospirillaceae* számos tagja sötétben, aerob módon is képes szaporodni, mégpedig szerves anyagok oxigénnel megvalósuló oxidációjához kapcsolódó elektrontranszport- és protongradiens-dependens foszforiláció segítségével. Ezeknél aerob körülmények között a klorofill- és a karotinoidszintézis szupressziója figyelhető meg.

1.23.4. Bakterioklorofill–fehérje komplexek

A legtöbb, ha éppen nem valamennyi, fénybefogó pigment proteinekhez nem kovalensen kötődve fordul elő. A legjobban ismert bakterioklorofill–fehérje komplexeket a *Chlorobium limicola* és a *Ch. thiosulfatophilum* fajokból izolálták. Proteinkomponenseik vízoldékonyak, molekulasúlyuk 152 000 és detergensek nélkül tisztítva kristályosíthatóak. E fehérje négy alegységet tartalmaz, melyek mindegyikéhez öt bakterioklorofill-molekula kapcsolódik (PARSON, 1974). Utóbbiak az alegységekben szorosan együttműködnek, ami előfeltétele a fényenergia továbbadásának. A befogott energia mint fénykvantum (foton), alegységről alegységre,

majd komplexről komplexre vándorolva halad az aktív centrum felé. Ezen „induktív rezonancián" alapuló energiaátadások során a fénykvantum mindig a kisebb gerjesztési energiát igénylő molekula felé halad. Ezért hullámhossza egyre nagyobb lesz és fotononként mind kevesebb energiatartalmat képvisel. A *Chlorobiaceae* család más tagjaiban sokkal nagyobb bakterioklorofill–fehérje komplexeket is találtak. Ezekben a fénybefogó bakterioklorofilleken kívül magát a fotokémiai reakciócentrumot is kimutatták.

A bíborbaktériumok pigment–protein komplexeinek extrakciója detergenseket vagy szerves oldószereket igényel. E drasztikus technikák azonban károsítják a proteinstruktúrát és a bakterioklorofillt bakteriofeofitinre (ebben két proton helyettesíti az előbbi magnéziumatomját) degradálják. A *Rhodopseudomonas sphaeroides* kromatofóráit detergensekkel dezorganizálva a fénybefogó bakterioklorofill egy kb. 10 000 molekulasúlyú polipeptidhez kapcsolódva válik szabaddá. Ezt a hidrofób proteint izolálni is tudták. A kromatofórákban a bakterioklorofillnak legalább 60%-a ilyen kis molekulasúlyú proteinnel társul.

A *Chromatium vinosum*ból nagy, fénybefogó pigment–protein komplexeket izoláltak. A teljes komplex mintegy tíz bakterioklorofill- és még számos karotinoidmolekulát tartalmazott. Disszociációt biztosító körülmények között eszközölt SDS gélelektroforézis eredményei szerint a *C. vinosum*ban a legtöbb bakterioklorofill-molekula kb. 10 000 molekulasúlyú polipeptidekkel társul.

A *Rhodopseudomonas sphaeroides* és a *Rhodospirillum rubrum* kromatofóráiból, magas pH-értékeknél, kb.100 000 molekulasúlyú preparátumot állítottak elő, mely fénygyűjtő bakterioklorofill-molekulákon kívül magát a fotokémiai reakciócentrumot is tartalmazta. Úgy látszik, hogy a membránban az antennaegyüttes és a reakciócentrum komplett fotoreceptor-alegységeket alkotva foglalnak helyet. SDS jelenlétében eszközölt elektroforézis alapján ez a preparátum mintegy 10 000 molekulasúlyú pigment–protein komplexeket, reakciócentrum-polipeptideket és egyéb anyagokat tartalmazott. A fénygyűjtő bakterioklorofill-rendszer e preparátumban is hatékonyan vitte át az energiát a reakciócentrumba, ami arra utal, hogy a két komponens valamilyen módon szorosan társulhat egymással (PARSON, 1974).

A *Rhodospirillum rubrum* kromatofóráiból, SDS-sel, karotinoid–protein komplexeket állítottak elő. Ezek molekulasúlya kb. 12 000 volt, és egy polipeptidre számítva egy ekvivalens spirilloxantint tartalmaztak.

A karotinoidokról a bakterioklorofill–protein komplexekre irányuló hatékony energiaátvitel mechanizmusa még felderítésre vár. A gerjesztett karotinoidok, sugárzás nélkül, belső átalakulással, olyan gyorsan térnek vissza alapállapotukba, hogy lényegében nem fluoreszkálnak.

Végeredményben azt a következtetést szűrhetjük le, hogy a bíborbaktériumoknál a fénybefogó pigmentek 10 000 molekulasúly nagyságrendű hidrofób polipeptideken fordulnak elő, melyek egyenként csak kisszámú pigmentmolekulát kötnek meg. Ezek a komplexek egymással társulva nagyobb együtteseket alkotnak. Az utóbbiakban nagyszámú pigmentmolekula ma még kevéssé ismert mechanizmus alapján működik együtt.

1.23.5. Reakciócentrum (P_{870})

A fénygyűjtő pigmentmolekulák együttese révén felvett fényenergia molekuláról molekulára haladva, végül is a fénygyűjtőrendszer reakciócentrumába jut (a fényenergia itt koncentrálódik), ahol a fotokémiai folyamat kémiai lépése megy végbe. E lépés a primer fotokémiai oxidoredukció, melynek során a fényenergia kémiai energiává válik. A reakcióközpontban a fény gerjesztési energiája mintegy kioltódik, miközben egy alapállapotából kimozdított elektron energiatartalma és redukálóképessége rendkívül megnő és a következő lépésben máris redukcióra hasznosítódik. A reakciócentrum tehát elektrondonorrá válik, elektront veszít és oxidálódik. A baktériumoknál a primer elektrontranszfer reakció során az elektrondonor, vagyis maga a reakciócentrum, a P_{870}-nek nevezett komplex (P: pigment; a 870 arra a hullámhosszra (870 mμ) utal, melynél egy fő abszorpciós sáv reverzíbilis gyengülése következik be akkor, amikor a komplex egy elektront veszít). A P_{870} oxidációja más abszorpciós változásokban is megnyilvánul, így a spektrum UV-, látható és IR-régiójában. Jóllehet az abszorpciós spektrum maximumaiban és minimumaiban észlelt pozíciók a fotoszintetizáló baktériumok különböző fajainál némileg eltérők, mégis a reaktív komplex alapvető tulajdonságai feltehetően valamennyinél igen nagymértékben azonosan (Philipson és Sauer, 1973) és ezért a P_{870} megjelölés általános értelemben is elfogadhatónak látszik. A reakciócentrumhoz tartozó bakterioklorofill mennyisége az összesnek mintegy 2–5%-át teszi ki, míg a többi valószínűen a fényfelfogásban és továbbításban vesz részt (Jones, 1977). A baktériumok reakciócentrumának felépítésében és az elsődleges fotoaktusban mind vas, mind ubikinon egyaránt szerepel, mégpedig feltehetően vas–kinon komplex alakjában.

Lézerből kibocsátott rövid felvillanásos megvilágítást (fényimpulzust) követően a kromatofórákban a P_{870} oxidációja igen nagy sebességgel megy végbe, amit a bakteriális fotoszintézis primer elektrontranszfer reakciójának tekinthetünk. A reakciócentrum azonban nem marad eloxidálva. Egy c-típusú citokróm oxidációja, melynek során a P^{+}_{870}-re egy elektron jut, visszaredukálja. Ez lényegében a második reakció. E két

összekapcsoló oxidoredukciós folyamatot azoknak az abszorpciós változásoknak a mérésével mutatták ki, melyek a felvillanást követően a P^{+}_{870} redukcióját és a citokróm oxidációját kísérték. Érdemes megjegyezni, hogy amíg a baktériumoknál a P_{870} elvesztett, gerjesztett elektronját c-típusú citokrómokról nyeri vissza, addig a magasabb rendű növényeknél a I-es fotorendszerben a P_{700} közvetlen elektrondonorja a plasztocianin, vagyis egy rézprotein. Evolúciós szempontból nézve úgy tűnik, hogy az algák átmenetet képviselnek, minthogy elektront a P_{700}-nak ezekben is c-típusú citokróm ad át, ugyanakkor náluk már plasztocianin is jelen van (WOOD, 1976).

A *Rhodopseudomonas sphaeroides* R26 jelzésű karotinoidmentes mutáns reakciócentrum-részecskéinek előállítására a kromatofórákat lauril-dimetil-amin-oxiddal kezelték, szacharózgradiensben centrifugálták, ammónium-szulfáttal frakcionálták és agaróz oszlopon kromatografálták. Az így előállított készítmény mindazokkal a spektrális tulajdonságokkal jellemezhető volt, melyeket az érintetlen sejtek és a kromatofórok P_{870}-évei kapcsolatban megállapítottak. E készítményben megvilágítás hatására a P_{870} fotooxidálódott.

1% SDS-sel eszközölt poliakril-amid gélelektroforézis során a reakciócentrum-részecske három proteinre disszociált, melyek molekulasúlya megközelítően 21 000, 24 000 és 28 000 volt. Mindhárom proteinkomponens, számos membránproteinhez hasonlóan, aminosavösszetételéből kifolyóan igen hidrofóbnak bizonyult: az alkotó aminosavaknak megközelítően 70%-a nem volt poláris (PARSON, 1974).

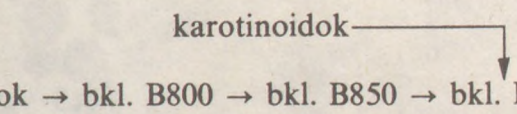
A különböző fotoszintetizáló baktériumokból nyert reakciócentrum-készítmények protein mellett általában még bakterioklorofillt, bakteriofeofitint, nem hem-vasat és ubikinont is tartalmaznak. Úgy látszik azonban, hogy magában a centrumban a bakteriofeofitin a tényleges alkotóelemek közé tartozik, vagyis nem degradációs termék és nem is szennyeződés.

A *Rhodopseudomonas sphaeroides*nél minden egyes funkcionális reakciócentrum négy molekula bakterioklorofillt és két bakteriofeofitint tartalmazhat. A reakcióközpont-részecskék CD-spektruma (CD: *cirkuláris dikroizmus*) arra utal, hogy a négy bakterioklorofill-molekula közül legalább három igen szoros kölcsönhatásban van egymással. Ami a két bakteriofeofitin-molekulát illeti, ezek kölcsönhatása a bakterioklorofillal kevéssé szoros, jóllehet a fotokémiai folyamatot hatékonyan szenzitizálják. Ha ez a komplex elektront veszít, úgy CD-spektruma alapvetően megváltozik, minthogy ekkor a bakteriokloforill-molekulák között a redukált komplexben még fennállt kölcsönhatások megszűnnek. Modelltanulmányok szerint a bakterioklorofill-molekulák közül kettőt egy vízmolekula tart össze, és ezek a fotooxidáció alkalmával egy elektront

elveszítve, a visszamaradt páratlan elektront megosztják. A két másik bakterioklorofill-molekula pedig – a centrális páron keresztül – nagyjából ellenkező oldalakról átellenesen működik együtt és ezek ilyen kölcsönhatását a centrális pár oxidációja megszünteti.

Az az állítás viszont, miszerint a fotoszintetizáló baktériumokban a P_{870}-en kívül más fotokémiai reakciócentrumok is előfordulnak, nem látszik valószínűnek (PARSON, 1974).

Amennyiben a reakcióközpontok az ún. excitonokat nem fogják fel, hanem azok számára mintegy zárva maradnak, úgy az energia, mint láthattuk, fluoereszcencia alakjában szóródik szét vagy más módon vész el. Az excitonok sorsa függ a reakcióközpontok turnover-sebességétől, a gerjesztés gyakoriságától, a reakciócentrumra eső antennamolekulák számától, a fotoszintetikus egységek topográfiájától stb. A *Rhodospirillales* tagjainál a fotoszintetikus membrán szerkezeti rendezettsége nagy valószínűséggel teszi lehetővé, hogy az excitonok a karotinoidokról a reakciócentrum felé az alábbi úton haladhassanak (DREWS, 1985):

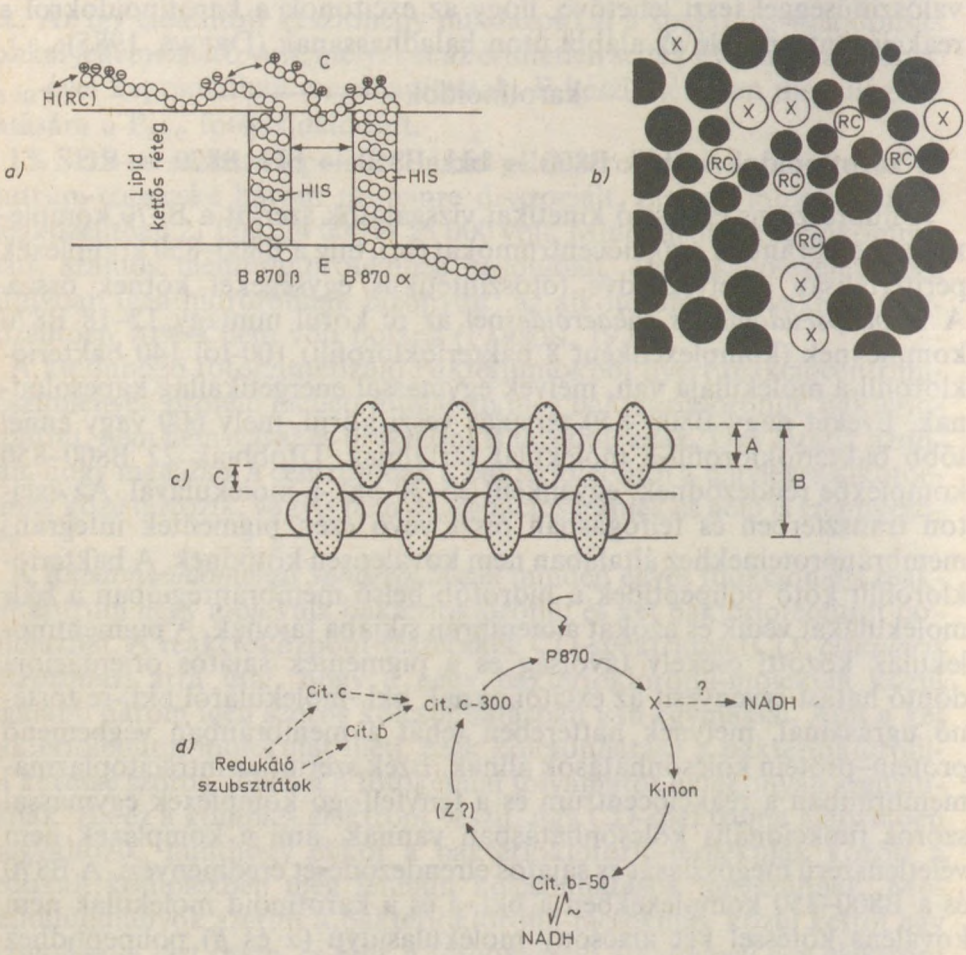


A fluoreszcens emisszió kinetikai vizsgálatok szerint a B870 komplexek a membránban reakciócentrumokat (rc), míg a B800–850 komplexek periferiálisan elhelyezkedve fotoszintetikus egységeket kötnek össze. A *Rhodopseudomonas sphaeroides*nél az rc körül mintegy 12–18 B870 komplexnek (komplexenként 8 bakterioklorofill) 100-tól 140 bakterioklorofill-a molekulája van, melyek egymással energetikailag kapcsolódnak. Ezeket nagy B800–850 társulás veszi körül, mely 600 vagy ennél több bakterioklorofill-a molekulát tartalmaz. Utóbbiak 22 B800–850 komplexbe rendeződnek, egyenként 25–30 bkl.-a molekulával. Az exciton transzferben és felfogásban részt vevő ezen pigmentek integráns membránproteinekhez általában nem kovalensen kötődnek. A bakterioklorofillt kötő polipeptidek a hidrofób belső membránrégióban a bkl-molekulákat védik és azokat a membrán síkjába tájolják. A pigmentmolekulák közötti csekély távolság és a pigmentek sajátos orientációja döntő hatást érvényesít az excitonoknak bkl.-molekuláról bkl.-re történő ugrásainál, melynek hátterében tehát a membránban végbemenő protein–protein kölcsönhatások állnak. Ezek szerint az intracitoplazmamembránban a reakciócentrum és a fényfelfogó komplexek egymással szoros funkcionális kölcsönhatásban vannak, ami e komplexek nem véletlenszerű megoszlását és sajátos elrendeződését eredményezi. A B870 és a B800–850 komplexekben a bkl.-a és a karotinoid molekulák nem kovalens kötéssel két alacsony molekulasúlyú (α és β) polipeptidhez

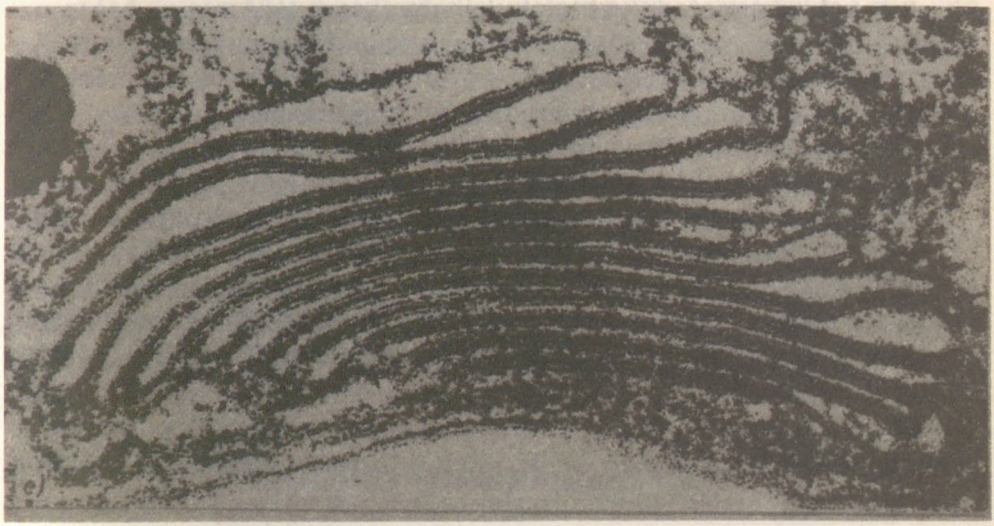
kapcsolódnak. E polipeptidek három régióval jellemezhetők: a N- és a C-terminális, továbbá a központi hidrofób régiók. Utóbbi mintegy 20 aminosavmaradékból épül fel, közöttük egy hisztidingyök van, mely bkl.-el feltehetően közvetlenül kapcsolódik. Mindkét polipeptid egy α-hélix régiót visel.

A *Rhodopseudomonas sphaeroides* reakciócentruma három polipeptidet tartalmaz, melyeket H, L és M alegységekként jelölnek. Az M és az L alegységek 4 molekula bkl.-t, 2 molekula bakteriofeofitint, 1 karotinoidot, 2 ubikinont és 1 vasat kötnek meg, melyek a fotokémiai aktivitáshoz kivétel nélkül szükségesek. A H funkciója nem ismeretes (DREWS, 1985).

Újabban a bakterioklorofill-b-t hordozó *Rhodopseudomonas viridis* L és M alegységei transzmembrán α-hélixeinek, továbbá pigmentmolekuláinak elrendeződését tanulmányozták. Az L és az M alegységek



mindegyikének, melyek az intracitoplazmatikus membránban a reakciócentrum központi részét képezik, öt transzmembrán hélixe van. A bkl. és a bakteriofitin gyűrűrendszerei a membrán síkjára merőleges tengely körül szimmetrikusan rendeződnek el. Ez a tengely keresztülhalad az ún. speciális bkl.-páron (bkl. dimerje, elsődleges donor a membrán plazmán kívüli hajlatában), továbbá a membrán citoplazmatikus oldalán, a nem



◄ *101. ábra*

a) A membránba beépült fényfelfogó komplex B870 alegységének modellje Drews (1985) után. C= citoplazma; E= citoplazmán kívüli tér; H(RC)= az RC nehéz alegysége; RC= reakciocentrum; a nyilak a polipeptid láncok közötti feltételezhető kölcsönhatásokra utalnak. A hisztidin (His) valószínűen a Mg-tetrapirollal áll kölcsönhatásban. Feltételezik, hogy a H(RC) a B870 α és β töltéssel rendelkező amino terminusaival reagál és a membránban hidrofób kölcsönhatások is lejátszódhatnak.

b) A *Rhodopseudomonas capsulata* fotoszintetikus készülékének elrendeződésében felismerhető szabályszerűség két dimenziós szerkezeti sémája. Az RC (reakciocentrum), a B870 (kicsiny fekete körök) és a B800–850 (nagy fekete körök) fényfelfogó komplexek, továbbá az X (transzmembrán polipeptid komplexek, mint pl. ATPáz és kinol–citokróm b–c oxidoreduktáz) térbeli megoszlása (Drews, 1985).

c) A *Rhodopseudomonas viridis* fotoszintetikus membránjának organizációja Miller és Jacob (1985) után. A reakciócentrumok mint árnyékolt ellipszisek szerepelnek. Mindegyiket a fényfelfogó pigmentek gyűrűje veszi körül. Az egységek ezen szoros kapcsolatának rendeltetését még nem ismerjük. Ezenkívül ez a szoros felépítés aligha teszi lehetővé, hogy abba még ATPáz is beépülhessen. Ilyen és hasonló problémákra vezethető vissza, hogy ismereteink a 80-as évek közepén, a fotoszintetikus membrán működéséről még meglehetősen hiányosak.

d) Az anaerob fotoszintetizáló baktériumok fotoszintetikus elektrontranszportja Jones (1977) szerint. A NADH előállítása valószínűleg energiaigényes fordított elektrontranszporttal történik. Az X feltehetően vasprotein vagy vas–kinon-komplex. A Z feltételezett intermedier.

e) A *Rhodopseudomonas viridis* citoplazmájában elhelyezkedő fotoszintetikus membránok egy nyalábjának vékony metszete Miller és Jacob (1985) után. E szerzők minden egyes membránt zárt zsáknak tekintenek. Az egymáshoz közel kerülő membránokat, a kontaktus-közeli helyeken nagy elektrondenzitású zóna választja el. 120 000-szeres nagyítás

hem vasatomon. A „speciális pár" két bkl.-b molekulájának tetrapirrol gyűrűi, melyek egy elektront gerjesztett állapotba hoznak, csaknem párhuzamosan orientáltak és az I pirrol gyűrűben átfedőek. Síkjaik a membránra merőlegesek. A pirrol gyűrűk közötti távolság kb. 0,3 nm. Az I pirrol gyűrű acetilcsoportjai mint ligandumok szerepelnek a speciális pár másik bkl.-b molekulája magnéziumatomjához. A speciális pár szoros szomszédságában a szimmetriatengely két oldalán két magános bkl.-b és két bakteriofeofitin molekula helyezkedik el. Az egyik bakteriofeofitin molekula szomszédságában egy menakinon molekula van. Az elektron feltehetően a speciális bkl. pártól mint elsődleges donortól egy bkl.-b molekula révén bakteriofeofitinhez, majd innen kinonhoz vándorol. A teljes reakciócentrum hossza a tengely mentén 13 nm. A kristályos reakciócentrum fotokémiailag aktív.

Ma bizonyítottnak tekinthetjük, hogy a reakciócentrumot a B870 bkl.-proteinalegységek oligomerjei veszik körül. A reakciócentrum H alegysége és a B870 fényfelfogókomplexek polipeptidjei közötti protein-protein kölcsönhatások felelősek a bkl.-molekuláknak az egyes reakciócentrumok körül észlelt célszerű elrendeződéséért *(101. a–c. ábrák)* (DREWS, 1985).

1.23.6. Fotoszintetikus elektrontranszport

A bakteriális fotoszintézis elektronáramának sematikus vázlatát a *101.d. ábrán* mutatjuk be. Mint látható, a folyamatban egyetlen fényreakció vesz részt. A gerjesztett elektron egyrészt visszatérhet a P_{870}-hez alapállapotába, vagy esetleg eltérülhet a ciklusból a NADH képzéshez. Az így a ciklusból elvesztett elektron pótlása a közegben előforduló redukált vegyületek valamilyen típusa segítségével megy végbe. Ez a ciklus számos tekintetben a magasabb rendű növények I-es fotorendszerével analóg.

A *102.* és *103. ábrák* a fotoszintézis elektronáramát más felfogásban szemléltetik.

1.23.7. A P_{870} oxidációja és ismételt redukciója

Röviddel azután, hogy a P_{870} eloxidálódik (P^{+}_{870}), vissza is redukálódik, elvesztett elektronját egy c-típusú citokrómról pótolva. Ami a fotoszintetizáló baktériumok citokrómjait illeti, ezek egész listáját tárták már fel. Diverzitásuk e tekintetben igen nagyfokú. Közös azonban náluk, hogy valamennyi fajuknál van egy c-típusú citokróm, melynek E_m („midpoint potential") értéke +0,3 V (a *Chlorobiaceae* családban valamivel alacsonyabb). Ez minden esetben közvetlenül reagál a P^{+}_{870}-nel. Néhány faj

b-típusú citokrómokat is tartalmaz. Nyilvánvalóan ez utóbbiak elektronokat a P^{+}_{870}-re közvetlenül már nem visznek át. Ezzel szemben reagálnak a pozitívabb redoxipotenciálú citokróm-c-vel.

1.23.8. A P_{870} redukciója a *Chromatium vinosum* fotorendszerében

A *Chromatium vinosum*ban minden egyes fotoszintetikus egység egy magasabb, viszonylag pozitívabb (c_{555}) és egy alacsonyabb (c_{552}) redoxipotenciál értékkel jellemezhető citokróm 2-2 példányát tartalmazza (Parson, 1974). Mindegyikük szorosan kötődik a kromatofóra membránjához. Ha a membránt SDS-sel dezintegrálják, úgy a tapasztalat szerint a P_{870}-et, néhány antenna-bakterioklorofillt és e kétféle citokrómot is magukba foglaló reakciócentrum-részecskéket kapnak. További dezintegráció, dezoxikolát segítségével eltávolítja ugyan a központból e két citokrómot, de ezek egymással továbbra is szorosan együtt maradnak. Természetesen e megfigyelés még mindig nyitva hagyja azt a kérdést, hogy a két hem egyugyanazon (néhány alegységet tartalmazható) proteinhez vagy különböző, legfeljebb nagyon hasonló és egymással összeköttetésben maradó proteinekhez kapcsolódik-e? Olyan redoxipotenciálnál, mely alacsonyabb a citokróm-c_{555} E_m-értékénél (+0,34 V), de még megfelelően magasabb a c_{552} E_m-értékénél (+0,01 V), csakis a c_{555} képes a P^{+}_{870}-re elektronokat juttatni, és ilyenkor a fényfelvillanás után ennek a citokrómnak a fotooxidációja következik be. Annál a redoxipotenciálnál viszont, mely eléggé alacsony ahhoz, hogy a c_{552} is redukálva legyen, már a citokróm-c_{552} fotooxidációja fogja a c_{555}-ét helyettesíteni. A P^{+}_{870} tehát mindkét citokrómot eloxidálhatja. A P_{870}-ről azonban az elektronokat, bármelyik citokróm volt is a donor, első lépésben csak egyugyanazon elektronakceptor vonhatja el.

Minthogy a citokróm-c_{555} fotooxidációja végbemehet olyan magas redoxipotenciálnál is, ahol a c_{552} már teljesen eloxidált állapotban van, ezért evidens, hogy az elektronoknak a c_{555}-ről a P^{+}_{870}-re közvetlenül kell átjutniok és nem a c_{552}-n át. Mindazonáltal a c_{552} is nagyon szoros kapcsolatban van a P_{870}-nel. Az a tény, hogy ha mindkét típusú citokróm redukált állapotban áll rendelkezésre, úgy a c_{552} fotooxidációjának mégis nagyobb a valószínűsége, lényegében a két lehetséges reakció különböző kinetikájára vezethető vissza. A P^{+}_{870} és a c_{552} között végbemenő reakció sebességi konstansa 298 °K-nál $8{,}6 \times 10^{5}$ sec^{-1}, ami egyúttal kétszerese a P^{+}_{870} és a c_{555} közötti reakcióénak. Ez arra is bizonyíték, hogy a reakció a P^{+}_{870} és a C_{552} között is közvetlen, és abban a c_{555} közvetítő szerepet nem játszik. Amint a reakció kezdetét veszi, az elektronáram a két különböző citokróm relációjában gyorsan egyensúly-

ba juthat, és ennek keretében az alacsony potenciálú citokróm eloxidálásának nagyfokú termodinamikai előnye teljes mértékben érvényesülhet.

A *Chromatium vinosum*ból még egy oldódó, kevéssé pozitív redoxipotenciálú citokróm a citokróm-c' –, továbbá egy ugyancsak oldékony, de pozitívabb redoxipotenciál-értékkel jellemezhető citokróm jelenlétét is kimutatták. Szerepük még ismeretlen.

A fotoszintetizáló baktériumok citokróm társulásaiban a diverzitás ellenére is felismerhető nagyfokú hasonlóság különösen akkor meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy ezek a fajok fiziológiailag és morfológiailag mennyire különböznek.

1.23.9. A P_{870} redukciója a *Rhodospirillum rubrum* fotorendszerében

A *Rhodospirillum rubrum*ban a fotooxidációnak alávetett két c-típusú citokróm közül a pozitívabb redoxipotenciál értékű ($E_m \approx +0{,}30$ V) azonos az oldódó citokróm-c_2-vel.

A második citokróm E_m-értéke megközelítően 0 V, vagyis hasonló azokhoz az alacsony redoxipotenciálú citokrómokhoz, melyeket fentebb tárgyaltunk. Bizonyos tulajdonságaiban azonban az oldódó citokróm-c'-hez áll nagyon közel. Feltételezhető, hogy ez a citokróm kötött citokróm-c' lehet, és hogy ezt a P_{870}^{+} ugyanúgy eloxidálja, mint a citokróm-c_2-t (Parson, 1974). A *R. rubrum* kromatofóráiból egy b-típusú abszorpciós spektrummal jellemezhető citokrómot is izoláltak, melynek E_m-értéke már lényegesen negatívabb (0,11 V, ill. $-0{,}16$ V). A P_{870}-nel a b-típusú citokrómok közvetlenül nem érintkeznek, ehelyett az elektronokat a citokróm-c_2-nek adják át.

1.23.10. Elektrontranszport a *R. sphaeroides* kromatofóráiban

A b-ről a c típusú citokrómokra haladó elektronáram a *Rhodopseudomonas sphaeroides*nél is kimutatható. E faj kromatofórái jelentős mennyiségben csak egy c-típusú citokrómot tartalmaznak. Ez a citokróm-c_2. E fajnál a membránkötődésű, alacsony redoxipotenciálú, c-típusú citokrómok helyett három b-típusú citokróm fordul elő. Ezek E_m-értékei megközelítően $-0{,}10$, $+0{,}05$ és $+0{,}17$ V. E citokrómok közötti kölcsönhatások megfejtése igen nagy feladatot jelentett, mivel kinetikájuk átfedő, abszorpciós spektrumuk viszont nem eléggé eltérő. Ehhez még hozzájárul, hogy valamennyi citokróm (beleértve a c_2-t is) a nem fotoszintetizálva, vagyis aerob körülmények között növekedő sejtek memb-

ránjában is előfordul. Mindezen nehézségek ellenére, a kinetikai analízis eredményei arra utalnak, hogy legalábbis az egyik b-citokróm ($E_{m7} = +0{,}17$ V) a c_2 után fotooxidálódik.

1.23.11. Hová kerül a P_{870}-ről a gerjesztett elektron?

Kérdéses még, hogy az az „*X*"-komponens (*lásd 101.d. ábra*), mely a P_{870}-től az elsődleges fotokémiai reakció során egy elektront vesz át, melyik vegyület lehet. Az „*X*" szerepére két vetélytárs is akad: a (ferredoxin típusú?) nem hem-vas és az ubikinon. A kromatofórákban mindkettő előfordul és a különböző reakciócentrum-készítmények rendszerint vagy az egyiket, vagy a másikat, vagy mindkettőt tartalmazzák. Az a megállapítás, hogy az ubikinont mind a reakciócentrum-készítményekből, mind a kromatofórákból egyaránt eltávolíthatjuk anélkül, hogy ezzel a P_{870} fotooxidációja észrevehetően csökkenne, amellett szól, hogy nem az ubikinon az „*X*"-komponens. Tény viszont, hogy ugyanezt a nem hem-vasra is elmondhatjuk. Reakciócentrum-készítmények vas nélkül is képesek a P_{870} fotooxidációjára. Az is lehetséges, hogy a P_{870} eléggé rugalmas ahhoz, hogy több reakciópartnere is legyen. Így, ha a natív elektronakceptor akcióképtelenné válik, úgy nála azt egy másik helyettesítheti.

A kromatofórákat ért fényimpulzus hatására a P_{870} eloxidálódik, majd néhány μsec-on belül redukált állapotba tér vissza. Jóllehet feltételezhető, hogy így most már ismét akcióra képes lehet, mégis egy újabb felvillanás már nem idéz elő újabb fotokémiai átalakulást. Minden valószínűség szerint ez azt jelenti, hogy az *X* a második felvillanáskor még mindig redukált állapotban van, és hogy a reakciócentrum mindaddig nem lesz újra működőképes, amíg az *X*-ről az elektron a másodlagos akceptorra, vagyis az *Y*-ra át nem jutott. Egymás után, eltérő időkülönbségekkel eszközölt felvillanásokat alkalmazva megállapították azt az időt, melynek elteltével a rendszer újra visszanyeri fotokémiai kapacitását. Ezek alapján az X^- és az *Y* közötti elektrontranszfer reakció sebessége pH 7,0-nél a *Chromatium vinosum* kromatoforáiban 60 μsec, míg a *Rhodopseudomonas viridis*ében 6 μsec. E reakció, bár függ a pH-tól független azonban attól, hogy a citokróm a P^+_{870}-et miként látja el elektronokkal.

1.23.12. A P_{870} redukciójának gátlása

A P^+_{870} citokrómok hatására bekövetkező gyors redukcióját sokféle módon akadályozhatjuk meg. Így pl., ha olyan preparátumokat állítunk elő, melyekből a citokrómok hiányoznak, egyes esetekben, ha csökkent-

jük a hőmérsékletet, vagy a redoxipotenciált annyira növeljük, hogy a citokrómok oxidálódnak. Ilyen körülmények között a P^{+}_{870} felvillanás hatására bekövetkező redukciójának sebessége elsősorban is attól függ, hogy az X^{-} és az Y között a másodlagos elektrontranszfer reakció végbemegy-e, vagy sem. Amennyiben ugyanis az elektron nem tud az X^{-}-tól elszabadulni és így az Y-t nem redukálja, úgy fordított reakcióval visszatérhet a P^{+}_{870}-re. Ennek a fordított reakciónak a sebessége a hőmérséklettől független. Ha viszont az elektrontranszfer az X^{-}-ről az Y-ra egyszer már végbement, úgy az elektron az Y-ról a P_{870}-re már csak igen bonyolult kerülővel juthat el, minthogy az Y-ról a visszatérés sokkal lassúbb és egyúttal hőmérséklet-érzékeny. A fordított reakciót a hőmérséklet csökkentésével, továbbá az „előrefelé haladó" elektrontranszport inhibitoraival serkenteni lehet. Döntő fontosságú, hogy alacsony hőmérsékleten, minthogy a transzfer az X^{-}-ról az Y-ra elmarad, a fotoszintetikus apparátus csupán egyetlen elektron továbbadására képes. Az ekkor észlelhető egyetlen elektron paramágneses rezonanciaszignál, mely egyetlen fotoredukált termék jelenlétére vezethető vissza, ezért sokkal inkább az elsődleges elektronakceptornak, semmint a másodlagosnak tulajdonítható. A redukált nem hem-vas g = 1,82 EPR-szignálja valójában ilyen körülmények között végrehajtott megvilágítás hatására jelenik meg, ami azt az elgondolást támasztja alá, hogy a nem hem-vas az X-el azonos. Ennek a nem hem-vas-központnak, mely a g = 1,82 EPR-szignált adja, a struktúráját még nem ismerjük.

1.23.13. A vas kötőhelyének megoldatlan kérdése a reakciócentrumban

A *R. sphaeroides* nem hem-vasat tartalmazó reakciócentrum-készítményeiben szervetlen kötésű kén jelenlétét nem sikerült kimutatni, és a három észlelt polipeptid egyikének sem volt háromnál több ciszteinje. Közülük a legkönnyebbnek és a legnehezebbnek 2, ill. 3 félcisztinjét észlelték, míg az átmeneti méretűnek egy sem volt. Mindebből arra következtettek, hogy a reakciócentrumban a vas kötőhelye nem hasonlíthat sem a rubredoxinéhoz (melyben négy cisztein van), sem a ferrodoxinéhoz, sőt még a *Chromatium*ok magas redoxipotenciál értékű vasproteinjeiéhez sem, mely utóbbiakban különben mind ciszteinek, mind pedig vasatomonként egy anorganikus kötésű kénatom is jelen van. Ezenkívül a reakciócentrumban a redukált vas EPR-spektruma is szignifikánsan különbözik az ismert nem hem-vas-proteinekétől, és arra is vannak bizonyítékaink, hogy ez a vas nagyon aszimmetrikus környezetben helyezkedik el, ami annak lehet az eredménye, hogy több eltérő típusú atomcsoporttal kapcsolódik (Parson, 1974).

1.23.14. Az ubikinon helye és szerepe a fotoszintetikus elektrontranszportban

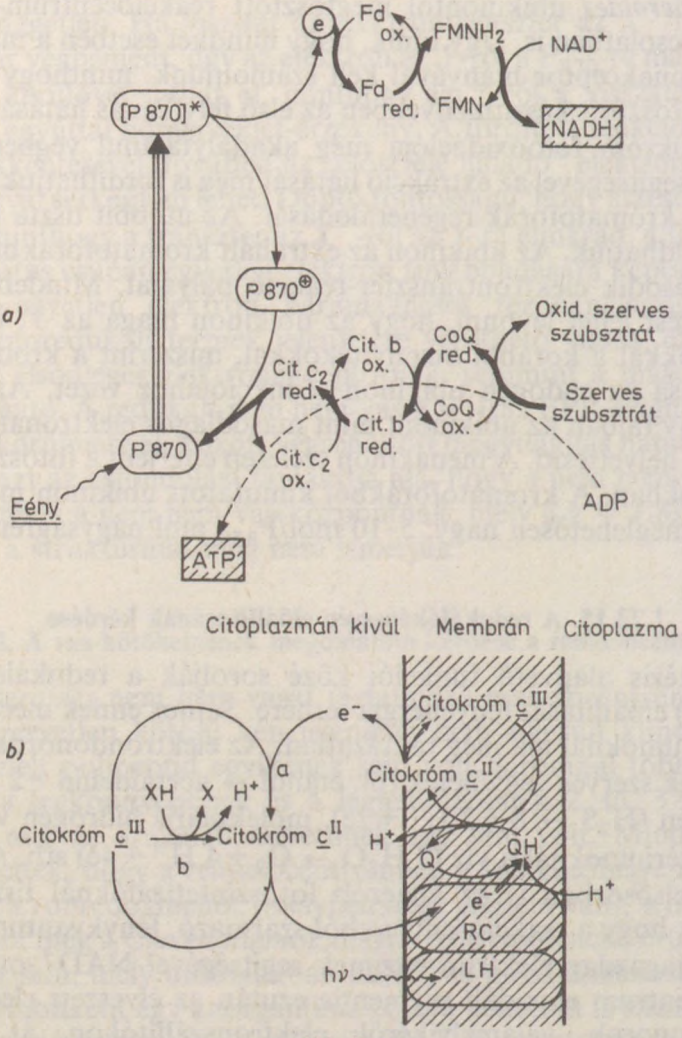
Amennyiben a *Chlorobium vinosum* liofilizált kromatoforáiból az ubikinont petroléteres extrakcióval eltávolítják, úgy az a képességük, hogy egy második felvillanásos megvilágításra fotokémiai reakciót hajtsanak végre, elvész. Az ilyen kromatoforákban az $X^- \rightarrow P^+_{870}$ fordított irányú reakció is kimutatható. Azonos megállapításra jutottak a *Rhodopseudomonas sphaeroides* ubikinontól megfosztott reakciócentrum-készítményeivel kapcsolatban is. Úgy tűnik, hogy mindkét esetben a másodlagos „*Y*" elektronakceptor hiányával kell számolnunk, minthogy az ubikinontól megfosztott készítményekben az első felvillanás hatására a P_{870}, vagy a citokróm fotooxidációja még akadálytalanul végbemegy. Az extraktum segítségével az extrakció hatását meg is fordíthatjuk és lehetővé tehetjük kromatoforák regenerálódását. Az utóbbit tiszta ubikinonnal is megoldhatjuk. Az ubikinon az extrahált kromatoforákban helyreállítja a második elektrontranszfer-reakció pályáját. Mindebből azt a következtetést lehet levonni, hogy az ubikinon maga az *Y*. Ez meg is egyezik azokkal a korábbi bizonyítékokkal, miszerint a kromatoforák megvilágítása az endogén ubikinon redukciójához vezet. Az is lehet, hogy néhány fajban az ubikinont mint másodlagos elektronakceptort a menakinon helyettesíti. A menakinon szélesen elterjedt a fotoszintetizáló baktériumokban. A kromatoforákból kimutatott ubikinon mennyisége egyébként meglehetősen nagy, 5–10 mol/P_{870} mol nagyságrendű.

1.23.15. A redukálóképesség előállításának kérdése

A fotoszintézis alapvető funkciói közé sorolják a redukálóképesség (NAD/P/H) előállítását fényenergia terhére. Sajnos ennek mechanizmusa a baktériumoknál ma még tisztázatlan. Az elektrondonorokat ismerjük: lehetnek szerves vegyületek (pl. etanol → acetaldehid + 2 H^+ + 2e), kén-hidrogén ($H_2S \rightarrow S + 2\ H^+ + 2e$), molekuláris hidrogén vagy mint a cianobaktériumoknál a víz ($2\ H_2O \rightarrow O_2 + 4\ H^+ + 4e$) stb. A NADH előállítása elsősorban is az anaerob fotoszintetizálóknál tisztázatlan. Feltételezik, hogy a reakciócentrumból származó, fénykvantum gerjesztette, energiagazdag elektron enzimek segítségével NAD^+-ot redukál. A reakciócentrum eloxidált pigmentje ezután az elveszett elektront az említett donorok valamelyikéről elektronszállítókon át pótolja. A NADH feltételezett előállítását a *Rhodospirillum*nál a *102.a. ábra* mutatja be. Ez esetben szerves anyag az elektrondonor. Erről az elektronok ubikinonon, citokróm-b-n és -c_2-n át a reakciócentrum-pigmentre (P_{870}) kerülnek. Innen végül is ferredoxin és FMN közvetítésével a

NAD-ra jutnak. Egyidejűleg ATP is keletkezhet (nem ciklusos fotofoszforiláció). Lényegében hasonlónak tételezik fel a redukált NAD előállítását ott is, ahol pl. kén-hidrogén az elektrondonor.

Fentebb, az elektrontranszport részletesebb ismertetésénél láthattuk, hogy a fény az elektronokat a citokrómok két vagy több típusáról a P_{870}-en és a nem hem-vason át az ubikinonhoz hajtja. A citokróm-kész-



102. ábra

a) Redukált NAD előállítása a *Rhodospirillum*nál. A gerjesztett elektron energiájának terhére végbemenő ATP-szintézis helye nincs bejelölve. Az ábra feltételezéseken alapul, még nem bizonyított. *b)* A bakteriális fotoszintézis során végbemehető ciklusos (a) és nem-ciklusos (b) fotofoszforiláció vázlata Hooper és DiSpirito (1985) szerint. Az egyszerűség kedvéért csupán egy elektron áramlását tüntették fel. XH = az elektron- és proton-donor szubsztrát; Q = kinon.

letek jelentik a P_{870} számára az elektronok egyik nagy tartalékát, míg a rendszer másik pólusán az ubikinon az elektronok raktározásának második rezervoárját képezi. Nincsenek bizonyítékaink arra vonatkozóan, hogy elnyelt fotonokkal energizált elektronok a NAD-ot közvetlenül redukálnák (erre a kérdésre még a 385. oldalon visszatérünk). A szakemberek többsége szerint a redukált piridinnukleotidok iránti igényeiket nemcsak a kemolitotróf autotrófok, de a fotoszintetizáló baktériumok is sokkal inkább energiadependens, visszafelé haladó elektronáram (*lásd* 526. old.) segítésével elégíthetik ki, mintsem valamely nagyon alacsony E_m-értékű elektronakceptor direkt fotoredukciójával. Ezt a feltevést támasztja alá az a tény is, hogy a szukcinát segítségével végbemenő NAD^+-redukció energiaigényét fény helyett ATP vagy pirofoszfát is fedezheti, és hogy a szétkapcsolók ezt a redukciót mindenképpen megakadályozzák, legyen ez akár fénnyel, ATP-vel vagy pirofoszfáttal energizálva.

A bakteriális fotoszintézis elsődleges elektronakceptorának $E^{0'}$-je jóval felette van a $NAD(P)^+$/NAD(P)H párénak, és ezért ez utóbbit nem redukálhatja. Más a helyzet azonban a *Chlorobiaceae* család tagjainál. Ezeknél a NAD redukciója az elsődleges elektronakceptorral már lehetségesnek tartható. A redukálóképesség, vagyis a redukált piridinnukleotidok előállítása mechanizmusának kérdése tehát a fotoszintetizáló baktériumok anyagcseréjének egy jelenleg nehezen áttekinthető fejezete. Vita tárgyát képezi, hogy vajon e célra valamennyi fotoszintetizáló baktérium reverz, ATP-igényes elektrontranszportot használ-e.

1.23.16. Energiakonzerválás

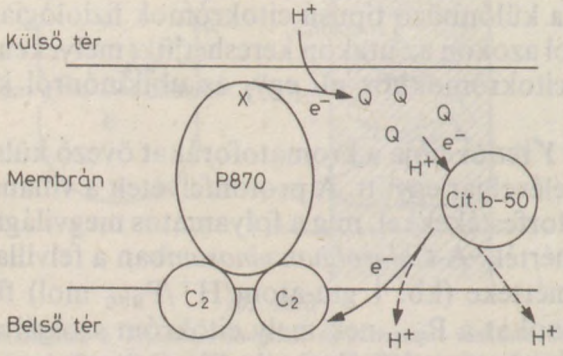
Vajon mi lehet a különböző típusú citokrómok fiziológiai rendeltetése? A választ valahol azokon az utakon kereshetjük, melyeken az elektronok visszatérnek a citokrómokhoz pl. egy, az ubikinonról kiinduló ciklus keretében.

Az *X* vagy az *Y* redukciója a kromatoforákat övező külső folyadékból protonok felvételével jár együtt. A protonfelvételt a villanásos gerjesztés után pH-indikátorfestékekkel, míg a folyamatos megvilágítás alatt üvegelektródákkal mérték. A *Chlorobium vinosum*ban a felvillanás kiváltotta protonfelvétel mértéke (kb. 1 gm-atom H^+/P_{870} mol) független attól, hogy az elektronokat a P_{870}-nek mely citokróm szolgáltatta. Az, hogy vajon maguk az elektronszállítók ténylegesen kötnek-e meg protonokat, nem világos: redukciójuk a rendszer más komponenseinek megváltoztatásával is kapcsolatos lehet.

A b és c típusú citokrómok közötti elektronáram foszforilációhoz kapcsolódik, ha ugyanis a *Rhodospirillum rubrum* kromatoforáihoz ATP-t vagy pirofoszfátot adnak, úgy ezek az elektronáramot megfordítják, aminek révén a citokróm-c_2 oxidálódik és a citokróm-b redukálódik. Szétkapcsolók ezt a hatást megakadályozzák.

HOOPER és DISPIRITO (1985) szerint az oxigéntermelő fotoszintézis protonfelszabadító, fényenergia-dependes víz-dehidrogenáz működésnek fogható fel. A víz oxidációja a cianobaktériumoknál és a kloroplasztiszokban a membránban megy végbe. Az anoxigén fotoszintézisnél a szubsztrát (H_2S, S°, $S_2O_3^{2-}$, H_2 vagy szerves vegyületek) oxidációja ugyancsak extracitoplazmatikus. A vizsgált ilyen baktériumoknál a reakciócentrum egy vagy több alegysége (H, M vagy L) a membrán periplazma felőli oldalán található. A bakteriális fotoszintézis során lezajló elektrontranszfert és protonkoncentrációs különbség előállítást a membrán két oldalán, e szerzők nyomán, a *102.b. ábra* mutatja be.

Az energiakonzerválás mechanizmusába további bepillantást nyerhetünk, ha figyelembe vesszük a bakteriális fotoszintetikus elektrontranszport-rendszer membránlokalizációjának PETTY és DUTTON (1976) által javasolt, továbbá JONES révén módosított (JONES, 1977; NULTSCH és HÄDER, 1980) sémáját *(103. ábra)*. Látható, hogy az elektronszállítók a kromatoforák membránjában sajátos cikcakk módon helyezkednek el. Ha a *Rhodospirillum rubrum* kromatoforáit megvilágítjuk, úgy a közegből megindul a hidrogénionok felvétele. A megvilágítás lényegében az elektronáramhoz kapcsolódóan transzmembrán protongradienst hoz létre. Más ionmozgások hiányában ez membránpotenciált alakít ki. A kromatoforák fény indukálta magas energetikai állapotának tehát két komponense van: a membránpotenciál és a pH-gradiens. Ha a kromatoforákhoz sötétben ATP-t vagy pirofoszfátot adnak, úgy ez esetben is



103. ábra

A bakteriális fotoszintetikus elektrontranszport-rendszer mint protonpumpa (PETTY és DUTTON, 1976; JONES, 1977) a kromatoforok membránjában

membránpotenciál és transzmembrán pH-gradiens alakul ki, mely ugyancsak szenzitív a szétkapcsolók és az oligomicin iránt. Ha a *R. sphaeroides* rövid időtartammal megvilágított kromatoforáihoz ADP-t és Pi-t adnak, úgy az elektromos membránpotenciál határozottan csökken, mégpedig az oligomicin iránt szenzitív módon (SAPHON és munkatársai, 1975). Az elektromos potenciálnak ez a csökkenése protonáthatolású ATP-ázon át végbement és ATP szintézisét eredményező hidrogénionáramra vezethető vissza.

Immunológiai bizonyítékok arra engednek következtetni, hogy a reakciócentrum (P_{870}) csaknem az egész membránt áthidalhatja *(lásd 103. ábra)*. Ez a centrum a membránkötődésű ATP-áz közelében helyezkedhet el. A citokróm-c_2 a kromatofora belső oldalán található, mégpedig ott, ahol a reakciócentrummal kölcsönhatása valósulhat meg. Minthogy a másodlagos elektronakceptor az ubikinon, a protonokat a környező közegből veszi fel, ezért a kromatofora külső oldalán lehet. Redukciója során protont vesz fel és mint hidrogénszállító működik. Az ubikinon redukciója a protonkötésért felelős ubiszemikinont eredményezi. A ciklusos elektronáramot (ciklusos fotofoszforiláció: az elektronok körbeáramlása annak az energiának a terhére, amit egy ponton a P_{870}-n befogott napenergia közöl velük, miközben leadott energiájuk protonkoncentráció-gradiens alakjában jelenik meg), az elektronoknak a citokróm-b-50-en át a citokróm-c_2-re való visszatérése teszi teljessé. Utóbbi már közvetlenül a P_{870} elektrondonorja. Jelenleg (1988) a reakciócentrum lokalizációjának és működésének a *102.b. ábrán* közölt sablonját tekinthetjük a legvalószínűbbnek.

1.23.17. Alternatív foto- és oxidatív elektrontranszport-foszforilációk

Szovjet és nyugatnémet kutatók közös kísérleteiket ebben a témakörben a *Rhodopseudomonas pallustris* egy törzsével végezték. Ez a szervezet pálcika alakú, fototróf baktérium, mely ATP-t, anaerob körülmények között megvilágítva fotofoszforilációval, míg molekuláris oxigén jelenlétében, sötétben respirációval állít elő. Fotoszintetikus apparátusa csakúgy, mint légzési enzimei az ún. „intracitoplazma-membránban" (ICM) helyezkednek el, mely a citoplazmamembránnal közvetlenül összefüggő, de a citoplazmában lokalizált sajátos membránalakzatokat, lemezeket, hártyákat stb. alkot. Az ICM a sejtben szerteágazó is lehet, mikor is a leágazások vagy magából a citoplazmamembránból, vagy már az ICM-ből invagináció útján jönnek létre. Az ICM-rendszer terjedelme és a benne szereplő fotoszintetikus és respiratorikus elektrontranszport-rendszerek mennyisége az uralkodó mindenkori környezeti, ill. tenyész-

körülményektől függ. Az oxigén parciális nyomásának és a fényintenzitásnak a fluktuációi a fakultatív kemoheterotróf *Rhodospirillaceae*k kultúráiban, a membránalkotóelemek szintézise tekintetében lényeges változásokat idéznek elő. Ilyenkor a specifikus összetételű ICM szintézise vagy meggyorsul, vagy gátlást szenved. A *Rhodopseudomonas capsulata*nál már korábban kimutatták, hogy ez a mikroba a pO_2 (az oxigén parciális nyomása) és a fényintenzitás változásaira a fotoszintetikus egységek méretének és az ICM terjedelmének változtatásával reagál (összehasonlításul l. még az *50. ábrát*).

A *Rhodopseudomonas pallustris* fotoszintetikus rendszere a reakciócentrum bakterioklorofillon (bkl.) kívül még a fénybefogó (LH: *light harvesting*) bakterioklorofillok két spektrális alakját is tartalmazza, éspedig az LH bkl. I-et, melynek infravörös abszorpciós maximuma 880 nm-nél (890 nm 77 K-nál) van, és az LH bkl. II-t, mely 805 és 855 nm-nél (805 és 870 nm 77 K-nál) abszorbeál.

Az LH bkl. I. egyetlen, 13 000 molekulasúlyú proteinnel, míg az LH bkl. II. két, egyenként 9000 és 11 000 molekulasúlyú proteinnel kapcsolódik. E faj sejtjei anaerob kultúrákban a fényintenzitás-változásokhoz három módon adaptálnak: **1.** A fotoszintetikus egység méretének változtatásával, vagyis az LH bkl. II. és a reakciócentrum bkl. moláris arányának eltolódásával. **2.** A membrán felületi egységére számított fotoszintetikus egységek számának változtatásával, és **3.** az intracitoplazmatikus membránrendszer teljes méretének szabályozásával.

Az oxigén parciális nyomásában bekövetkező változásokhoz adaptálva a sejtek reakciócentrum bkl.-t, LH bkl.-II-t és intracitoplazmatikus membránt eltérő intenzitással szintetizáltak. A reakciócentrum bkl. és az LH bkl. I. szintézise egymással koordinálva történik. Ezzel szemben az LH bkl. II. és a reakciócentrum bkl. szintéziséé egymástól függetlenül halad.

1.23.18. A foto- és elektrontranszport-foszforilációk eltérő hatékonysága a *Rhodopseudomonas pallustris*nál

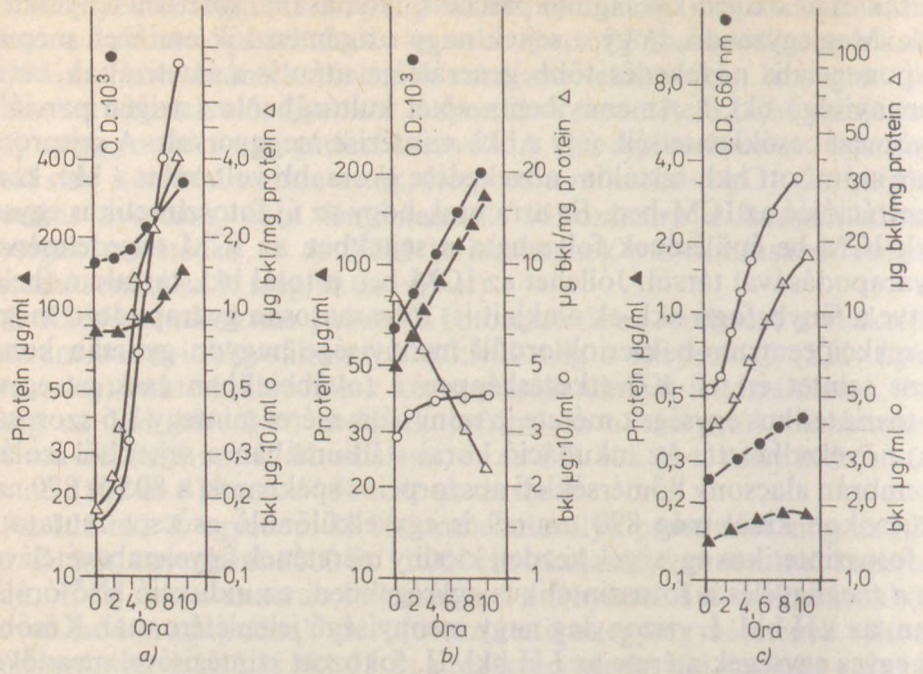
A *R. pallustris* „le5"-jelzésű tanulmányozott törzse maláttartalmú tápközegben viszonylag lassan szaporodik. Sejtjeiben a proteinek megkettőződési ideje aerob körülmények között, sötétben öt óra, míg megvilágítva, anaerob kultúrákban 4,3 óra. Magának a sejttömegnek a megkettőződési ideje, amit az optikai denzitás mérésével állapítanak meg, fototrofikusan 3,5 óra, míg aerob körülmények között 5,8 óra. Mindez világosan mutatja, hogy az inkubációs periódus alatt a sejtek mérete és denzitása változó. E vizsgálatok során az le5-törzs sejtjeit turbidosztátba inoku-

lálták és az oxigén 130 Hgmm parciális nyomásánál sötétben tenyésztették. Megjegyzendő, hogy a sejtek nagy oxigéntenziók esetében még az exponenciális növekedés több generációja után is szintetizáltak kevés mennyiségű bkl.-t. Amennyiben a sötét kultúrában az oxigén parciális nyomását csökkentették, úgy a bkl. szintézise meggyorsult. A sejtproteinre számított bkl.-tartalom növekedése gyorsabb volt, mint a bkl. koncentrációjáé az ICM-ben. Ez arra utal, hogy az új fotoszintetikus egységek ICM-be épülésének folyamata a sejtekben az ICM terjedelmének gyarapodásával társul. Jóllehet az ICM-ben a totál bkl.-tartalom (beleértve a fénybefogó bkl.-ek alakjait is) folyamatosan gyarapodott, mégis a reakciócentrum-bakterioklorofill mennyisége nagyon gyorsan konstans szintet ért el. Következésképpen a továbbiakban csak az egyes fotoszintetikus egységek mérete (a minimális méret mintegy 3,6-szorosára) növekedhetett. Az inkubáció korai stádiumában a sejtekből izolált membrán alacsony hőmérsékleti abszorpciós spektruma a 805 és 870 nm csúcsokon kívül még 890 nm-nél is egy elkülönülő csúcsot mutatott. A fotoszintetikus egységek kezdeti kicsiny méretének figyelembevételével ez a megfigyelés a fotoszintetikus egységekben, az indukció első órájában, az LH bkl. I. viszonylag nagy mennyiségű jelenlétére utal. Később az egyes egységek mérete az LH bkl. II. fokozott szintézisével megnövekedett. Az új fotoszintetikus egységek beépülése az ICM-be párhuzamos a respiratorikus enzimek aktivitásában végbemenő szimultán redukcióval, feltételezhetően ezen enzimproteinek szintézise sebességének csökkenése miatt.

1.23.19. Átmenet a fotoheterotróf szaporodásról a kemoheterotrófra

Az a viszonylag csekély számú fotoszintetikus egység, mely a sötétben, aerob körülmények között inkubált sejtek ICM-ében jelen volt, elégségesnek mutatkozott ahhoz, hogy a fotofoszforilációt akkor, amidőn a kultúrát megvilágított és anaerob körülmények közé vitték át, olyan szinten tartsa, melyet az újabb fotoszintetikus egységek folyamatos szintézisének kezdeti gyorsan növekedett energiaigénye megkívánt. A szaporodás sebessége ezzel szemben nyilvánvaló kezdeti korlátozódást mutatott *(104. ábra: a)*. Ez alatt a lag-fázis alatt és a szaporodás következő exponenciális fázisa során a bkl.-koncentráció logaritmikusan növekedett.

A bkl.-koncentráció erőteljes növekedése a pigmentnek mind a reakciócentrum-, mind az LH-alakjaira egyaránt kiterjedt. Az LH bkl. II./LH bkl. I. aránya megnövekedett. Egyidejűleg az egységnyi sejtproteinre számított bkl. 24-szeresére gyarapodott. Ezek az adatok nyilvánvalóvá teszik, hogy a kemotrófról a fototróf anyagcserére való átmenet után



104. ábra

a) A *Rhodopseudomonas pallustris* szaporodása élesztőkivonat–malát közegben, 30 °C-on, aerob, sötét (gázfázis: levegő) körülmények közül megvilágított, anaerob (gázfázis: tiszta nitrogén) viszonyok közé történt átvitel után. O.D.: a tenyészet optikai denzitása. bkl: bakterioklorofill. *b)* Átmenet a fotoheterotróf szaporodásról a kemoheterotrófra. A megvilágított, anaerob szaporodású kultúrát sötétbe helyezték és (0 órától) átlevegőztették. *c)* A fényintenzitás változásának hatása a *Rhodopseudomonas pallustris* anaerob kultúrájára. A fényintenzitást (fehér fényű lámpák, 6 × 200 watt) a fermentor edények felületénél 10^6-tól 10^5 erg $cm^{-2}s^{-1}$-re csökkentették

mind az ICM/sejt mennyisége, mind az egységnyi membránfelületre számított fotoszintetikus egységek száma, mind a fotoszintetikus egységek mérete egyaránt megnövekszik. A légzési enzimek szintézisének mértéke viszont a fotoszintetikus szaporodás alkalmával csökken *(25. táblázat)*.

Más vizsgálati sorozatokban a fotoheterotróf módon szaporodott sejteket sötétben levegőztetett körülmények közé juttatva tenyésztették tovább. Az előző kísérletekkel ellentétben ezek a kultúrák exponenciális szaporodásukat tovább folytatták, ami viszont azt igazolja, hogy a fotoheterotróf módon növekedő sejtek a légzési enzimeket az ilyen átállást áthidalni képes mennyiségben szintetizálhatnak. Ez utóbbiaknak tehát a membránprotein-egységre számított viszonylag alacsony koncentrációját az ICM hatalmas felületi mérete messzemenően kompenzálja. Az aerob sötét inkubáció kezdetétől a sejtprotein-egységre számított bkl.-tartalom csökkent *(104. ábra: b)*. A sejt ICM-ének infravörös

25. táblázat

A *Rhodopseudomonas pallustris* intracitoplazma-membránjának differenciálódása aerob sötét tenyésztésről anaerob megvilágítottra történő áttérés után

A fénykultiváció kezdete után eltelt idő órákban	Bakterioklorofill			A fotoszintetikus egység mérete: totál bkl mol/reakciócentrum-bkl	Respiráció	
	µg/mg sejtprotein	nmol/mg membránprotein	nmol reakciócentrum bkl/mg membránprotein		Szukcinát-oxidáz	NADH-oxidáz
					nmol O_2/perc/mg membránprotein	
I. 0	0,23	2,3	0,052	45,2	31,0	15,5
4	0,30	4,9	0,097	50,9	27,6	14,6
9	5,52	23,0	0,297	76,9	13,4	11,0
II. 0	0,22	2,4	0,059	40,1	29,5	11,3
4	0,96	6,8	0,088	77,2	25,6	16,4
9,9	5,43	20,0	0,159	127,1	8,8	7,0

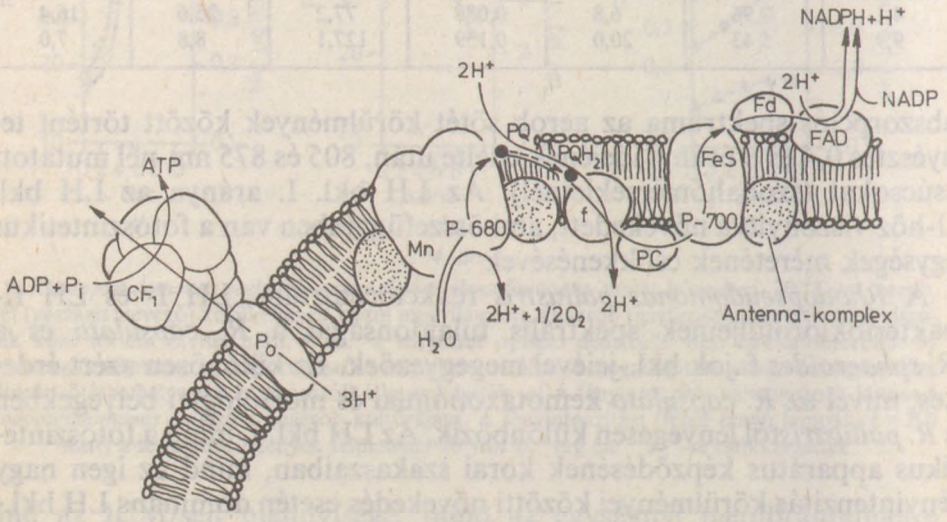
abszorpciós spektruma az aerob sötét körülmények között történt tenyésztés 0,4 és 8 órányi idejének eltelte után, 805 és 875 nm-nél mutatott csúcsokat (szobahőmérsékletnél). Az LH bkl. I. aránya az LH bkl. II-höz viszonyítva növekedett, ami összefüggésben van a fotoszintetikus egységek méretének csökkenésével.

A *Rhodopseudomonas pallustris* reakciócentrum-, LH I- és LH II-bakterioklorofilljeinek spektrális tulajdonságai a *R. capsulata* és a *R. sphaeroides* fajok bkl.-jeiével megegyezőek. Ez különösen azért érdekes, mivel az *R. capsulata* kemotaxonómiai és morfológiai bélyegekben a *R. pallustris*tól lényegesen különbözik. Az LH bkl. I. mind a fotoszintetikus apparátus képződésének korai szakaszaiban, mind az igen nagy fényintenzitás körülményei közötti növekedés esetén domináns LH bkl.-species. A reakciócentrum bkl.-hez viszonyított moláris aránya viszonylag konstansnak tekinthető: az alacsony hőmérsékleti abszorpciós spektrumokból és az összes bkl.-nek a reakciócentrum-bkl.-hez viszonyított moláris arányából 30 : 1 és 40 : 1 közötti értékeket kalkuláltak. Más *Rhodopseudomonas* fajokkal kapcsolatban is hasonló értékekhez jutottak. A fototrofikusan növekedő sejtek intracitoplazma-membránjában a reakciócentrum koncentrációját 0,2–0,5 nmol/mg membránprotein között észlelték.

1.23.20. A cianobaktériumok (kék-zöldalgák) és a növények fotoszintézise

Amint arra már utaltunk (272. old.), a második (II-es) fotorendszer, mely a víz fotolíziséhez kapcsolódik, pontosabban a víz bontását fény segítségével energizálja, elsőnek a cianobaktériumoknál jött létre. Ezzel,

vagyis az I-es és a II-es fotorendszerek koordinatív, összekapcsolt működésével az algáknak és a magasabb rendű növényeknek oxigéntermelő és a NADP direkt fotoredukciójára képes modern fotoszintetikus mechanizmusa jelent meg. Az egykori cianobaktériumok mint szimbionták, ősprotoeukariota sejtekkel társulva a kloroplasztiszok őseivé váltak. A két fotorendszer összekapcsolt működését megérthetjük, ha a *105. ábra* vázlata alapján a növények kloroplasztiszainak membránjában lokalizált fényfelfogó és -hasznosító rendszerek komponenseit, természetes lokalizációjukat megközelítően visszatükröző elrendezésben és kapcsolatban szemügyre vesszük. Az átalakulások láncolata a belső membrán belső oldalán vízmolekula bontásával kezdődik, és a membrán külső oldalán $NADP^+$ redukciójával végződik. A vízmolekula megbontásához



105. ábra

A növényi kloroplasztisz belső membránjában elhelyezkedő fotoszintetikus elektrontranszportrendszer és ATP-előállító enzimkomplex vázlata HINKLE és MCCARTY szerint (1978)

szükséges energiát a II-es fotorendszer (P-680) fényabszorpciója szolgáltatja. Mint látható, ez a fotorendszer a membránt teljes szélességben átíveli, míg körülötte a belső oldalon a fénygyűjtő antennakomplexek láthatók. Két fotont, ill. két fénykvantumot kell elnyelni ahhoz, hogy a vízből származó egyes elektronok a végső elektronakceptorra, a $NADP^+$-re jussanak. Az elektronszállítók láncán áthaladó 2-2 elektronra számítva a kloroplasztisz külső oldaláról 3-3 proton lép be és a belső oldalon összesen 4-4 jelenik meg. Fény hatására tehát a belső térben a protonok száma megnő és a membránon át protonkoncentráció-gradiens jön létre. Ez a különbség a protonok visszaáramlásával a membrán-

ba beépült CF_1–F_0 komplexen (membránkötődésű ATP-áz) keresztül egyenlítődik ki. Az F_0-jelzésű membráncsatornán, majd a CF_1-en át visszafelé haladó protonok energiája 3–3 protonra számítva egy molekula ADP-ből és egy molekula Pi-ből egy molekula ATP szintézisét teszi lehetővé.

A II-es fotorendszerben a fényfotonok felfogásában a P-680 jelzésű specializált klorofillmolekula körül sok száz proteinhez kötött klorofillmolekula és más pigment vesz részt. Ez az antennakomplex is membránba ágyazott. A P-680-ról leváló (és a vízről folyamatosan utánpótlódó) nagy energiájú gerjesztett elektronok a membrán külső felszínére, egy elektronszállítóra, a plasztokinonra kerülnek. A két oxidált P-680 molekulát egy mangántartalmú enzim segítségével vízről származó két elektron redukálja vissza. A vízből szabaddá lett oxigén diffúzióval kijut a kloroplasztiszból, míg a két proton a belső membránon belül oldatba megy. A víz két, plasztokinonra került elektronja a membrán külső felszínén a külső oldatból két protont ragad magával, miközben a Pq (a plasztokinon) PqH_2-vé redukálódik. Utóbbi, mely a membránban könnyen mozog, visszatér a belső felszínre, ott a két protont a belső térbe leadja, míg az elektronok a citokróm-f-re kerülnek. Az elektronok erről a réztartalmú plasztocianinra továbbítódnak, mely viszont a második fotokémiailag aktív szituszra (I-es fotorendszer) juttatja őket. Az I-es fotorendszer legfontosabb komponense ismét egy specializált klorofillmolekula, a P-700. Ennek az antennakomplexe ugyancsak fénygyűjtő szerepet játszik. A P-700 a vízről érkező, már fáradt elektronokat újra gerjeszti. Ezek az energiával feltöltött elektronok ismételten a membrán külső felszínére jutnak, ahol azokat egy vas–kén protein fogja fel. Útjukat ezután a külső felszín mentén folytatják és ferredoxinon, továbbá FAD-on át a $NADP^+$-re jutnak. A $NADP^+$ a redukált FAD-tól két elektront és egy protont vesz át. Az elektrontranszport befejeztével a membrán külső oldaláról összesen három proton tűnt el és a belső oldalon négy proton jelent meg.

1.24. A fotofoszforiláció különleges megoldása az archaikus baktériumok egy csoportjában

A halobaktériumokkal *(Halobacteriaceae)* folytatott kutatások (Oesterhelt és Stoeckenius, 1973; Lozier és munkatársai, 1975; Fischer és Stoeckenius 1977; Henderson, 1977; Schulten és Tavan, 1978 stb.) egy sajátos, mechanizmusában az eddig ismertektől merőben eltérő fotofoszforilációs rendszer felfedezéséhez vezettek. Jóllehet e szervezetek sejtjeiben klorofill nincs jelen, mégis ATP szintéziséhez, ill. bizonyos

anyagcsere-folyamatok energiaigényének fedezésére fényenergiát fognak be és kémiaivá konvertálnak. Ezt számukra egy, az állatok látópigmentjével nagy hasonlóságot mutató kromoprotein teszi lehetővé. E pigment a sejtmembránba épül be, ahol fényenergia felhasználásával részt vesz protonoknak elektromos potenciál és protonkoncentráció-gradiens létrejöttéhez vezető, membránon keresztül haladó transzportjában. Mielőtt e sajátos mechanizmussal, melynek különös érdekessége már a látás evolúciója szempontjából is jelentkezik, foglalkoznánk, előbb röviden magukkal a halobaktériumokkal kell megismerkednünk.

1.24.1. A halobaktériumok

A halobaktériumok magányos, GRAM-negatív, pálcika alakú (0,6–1,0 × 1–6μm), polárosan elhelyezkedő csillók bojtjaival mozgó, spórát nem képző sejtjei szaporodásukhoz nagy sókoncentrációkat igényelnek. 3,5 M NaCl-oldatban pálcika alakjukat még megtartják, de fokozatosan alacsonyabb sókoncentrációknál egyre inkább pleomorfokká válnak. Végül 1,5 M-nél alacsonyabb koncentrációjú NaCl-oldatokban sejtfalukat és ezzel együtt normál pálcika alakjukat teljesen elvesztik és legömbölyödnek. A parciális lízis eredményeként ilyen alacsony sókoncentrációjú oldatokban sejtszuszpenzióik erősen viszkózusak. 0,5 M NaCl a *Halobacterium*-sejtek túlnyomó többségére nézve már letális sószintet jelent. Normális sejtstruktúrájuk fenntartásához nátrium, klorid és magnézium szükséges. Ezek optimális koncentrációját csökkentve sejtfaluk oldatba megy, míg citoplazmamembránjuk fragmentekre esik szét. Citoplazmájuk belső miliőjében a riboszómák strukturális integritásának fenntartásához és magához a proteinszintézishez is káliumionok nélkülözhetetlenek. A *Halobacterium cutirubrum* ősbaktérium kultúráin végzett RNS és fehérje mérések szerint (CHANT és munkatársai, 1986) ezek nagyon gazdagok riboszómákban, melyek szintézise a szaporodás intenzitásától függ, hatékonyságuk azonban viszonylag csekély, minthogy másodpercenként egy egységükre számítva csupán két aminosavat polimerizálnak. A DNS-tartalom is igen magasnak bizonyult, ami arra utal, hogy a sejtekben a genomnak szokatlanul nagy másolati példányszáma lehet jelen. Sejtfaluk az archaikus baktériumokra (*lásd* 150. old.) jellemzően sem diamino-pimelinsavat, sem muraminsavat nem tartalmaz! Főleg lipoproteinek alkotják. Savanyú karakterű mégpedig sokkal inkább, mint bármely más GRAM-negatív baktérium. Agartápközegek felületén a halobaktériumok kicsiny, kerek, vöröses színű kolóniákat képezve szaporodnak. Anyagcseréjük respiratorikus és sohasem fermentatív. Aminosavakat energianyerésre is hasznosí-

tanak. Ezzel szemben szénhidrát-értékesítésük csak csekély mérvű. Karotinoidokat tartalmaznak. Legfontosabb pigmentjük a bakterioruberin, egy 50 szénatomos karotinoid, melynek négy hidroxilcsoportja van. Ez a pigment egyébként nem csupán halofilekben fordul elő, hanem pl. korinebaktériumokban is. Színtelen mutánsaikat is izolálták már. 25–30% NaCl jelenlétében indolt termelnek. Oxidáz és kataláz pozitívak. Szigorúan aerobok. Folyékony közegben és szilárd felületeken szaporodnak. Tenyésztésükhöz azok a proteintartalmú, komplex tápközegek a legalkalmasabbak, melyek legalább 3 M NaCl-t, továbbá magnézium- és káliumionokat is tartalmaznak. A *Halobacterium halobium* sejtjeiből retinált és egy vele kapcsolódó proteint (bakteriorodopszin) mutattak ki. SENGBUSCH (1979) a halobaktériumok szokatlan tulajdonságait a következőkben sorolja fel:

1. Membránjuk főleg proteinből áll.
2. Peptidoglikánnal és teichosavakkal nem rendelkeznek.
3. Szénhidrátokat csak kis mennyiségben tartalmaznak.
4. Normális tenyészkörülmények között zsírsavakat nem szintetizálnak.
5. Sejtmembránjuk lipidjei kizárólag dihidrofitol-láncokból állnak, melyek éterkötéssel glicerinhez kapcsolódnak.
6. Az eddig tanulmányozott enzimeik többsége csak 2 M NaCl töménységű oldatokban aktív.
7. Alacsony ionerősségű oldószerekben sejtjeik lizálnak, mikor is nagy mennyiségű protein válik szabaddá, miközben denaturálódnak, ugyanakkor a riboszómák disszociálnak és a membránképletek különböző nagyságú apró darabkákra dezintegrálódnak.

1.24.2. A halobaktériumok citoplazmamembránja

A *H. halobium* tenyészetei legjobban 4,3 M NaCl-oldatban (250 g só/liter) szaporodnak. E szervezetről korábban feltételezték, hogy egyetlen energiaszerző mechanizmusa az oxidatív foszforiláció. 2,0 M-nak megfelelő koncentrációjú oldatban a sejtek fala szétesik és dezintegrálódik, míg 1,0 M-os oldatban a sejtekből még visszamaradt, membrán alkotta üres „zsákok" széthullása is megindul. A membrán fragmentációja csak bizonyos határig tart (a töredékek átmérője egy századtól fél mikrométerig variál), és azon túl sem további dezintegráció, sem oldódás már nem tapasztalható. E fragmentek funkcionális egyenértékűségét tanulmányozva (szeparálás méret és úszósűrűség alapján centrifugálással) az első lépésben három membránfrakciót különítettek el:

1. Alacsony denzitású narancsvörös vagy vörös frakció.

2. Sűrűbb, mély bíborszínű frakció (1,18 g/cm^3).
3. Legnagyobb mérvű denzitást mutató sárga frakció.

Az első vagy vörös frakció, mely egyébként a membrán fő tömegét alkotja, nagyon különböző méretű és összetételű fragmentekből áll. Vörös színe a bakterioruberin nagy mennyisége jelenlétének tulajdonítható. Ez a pigment feltehetően a nagy intenzitású kék fény letális hatásától védi a sejtet. Ilyen fényhatásnak a halobaktériumok természetes előfordulási helyükön is gyakran ki vannak téve. A vörös frakció citokrómokat, flavoproteineket és a légzési láncnak még más, az oxidatív foszforilációhoz csatlakozó egyéb vegyületeit is tartalmazza.

A két másik frakció már lényegesen egységesebb. A sárga frakció csaknem kizárólag a gázvakuolumok membrántömlőjének anyagát tartalmazza. Ezeknek a citoplazmában előforduló kicsiny gázzal töltött zsákoknak a feladata, hogy a sejtet bizonyos (a szaporodás számára optimális) vízmélységben lebegve tartsák. A szétesett citoplazmamembrán sötét bíborszínű fragmentjeit tartalmazó „bíbormembrán"-frakció összetételében ugyancsak meglehetősen egységes. E fragmenteket elsősorban is proteinek építik fel. Nagy denzitásáért a viszonylag nem magas, 25%-ot kitevő lipidtartalma a felelős. Röntgendiffrakciós vizsgálatok szerint a bíbormembrán anyaga proteinek kristályos elrendeződésére utal. Elektronmikroszkópos vizsgálatok is szabályos struktúrát igazolnak.

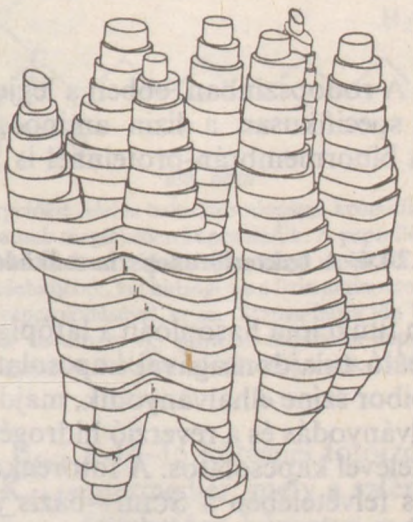
A bíbor frakció anyagának a teljes sejtmembrán anyagával történt összehasonlítása során megállapítható volt, hogy a bíbor frakció a citoplazmamembránban nem egyenletesen oszlik el. A bíbormembrán az érintetlen sejt „citoplazmamembrán-zsákjába" különálló, szeparált, de szervesen beilleszkedő foltok alakjában épül be.

1.24.3. A bíbormembrán szerkezete

A bíbormembrán csupán egy, jórészt hidrofób aminosavakból felépített, 26 000 molekulasúlyú proteint tartalmaz. Az egyes proteinmolekulák nagy felülettel ékelődnek a membrán hidrofób belsejébe. A bíbormembrán síkjában az anyagok hexagonális, rácsszerű elrendeződése figyelhető meg (Fischer és Stoeckenius, 1977). Ebben a rácsban a legkisebb ismétlődő egységek („sejtek") három molekula proteint és 40 molekula lipidet tartalmaznak. A bíbormembrán anyagának szuszpenziója a látható spektrum sárga–zöld régiójában egy széles abszorpciós sávot (a csúcs 560 és 570 nanométerek között), míg az ultraibolya régióban 280 nanométernél egy, a fehérjékre jellemző, meredek csúcsot mutat *(106. és 107. ábra)*.

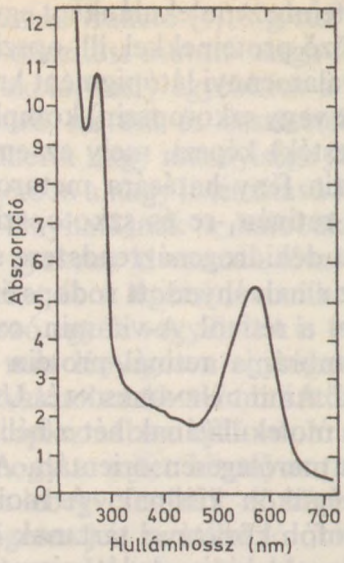
A bíbormembrán-proteinhez molekulánként egy retinálcsoport csatlakozik. A retinál különböző proteinekkel, ill. opszinokkal alkot komplexeket, és az állatokban valamennyi látópigment kromofórja. Egy sajátos opszinnal (pálcikafehérje vagy szkotopszin) komplexet alkotva a rodopszint (látóbíbor, retinafesték) képezi, mely az emberi szem pigmentje. (Megjegyzés: A rodopszin fény hatására metarodopszin-származékká alakul, mely karotinoid-retinén$_1$-re és szkotopszinra bomlik. A sárga színű retinén$_1$-et a retina dehidrogenázrendszere színtelen A-vitaminná redukálja. A sötétben az elhalványodott rodopszin gyorsan regenerálódik. Retinén = retinál = a retinol, A-vitamin, oxidált alakja.) A halobaktériumok vörös membránja retinál–protein komplexét bakteriorodopszinnak nevezték el. Amint HENDERSON és UNWIN (1975) kiderítették, a bakteriorodopszin molekulájának hét α-hélixe van. Maga a molekula a membrán síkjára merőlegesen orientált. Az α-hélixek csúcsai a membránból mindkét végükön kiállnak. A molekula középső részei viszont a membrán hidrofób körletével tartanak összeköttetést.

A retinál az A-vitamin aldehidje. A látópigmentekben SCHIFF-bázis révén kapcsolódik a proteinhez. Ez lényegében a retinál aldehidcsoportja (—CHO) és a protein egy aminosavának aminocsoportja (—NH_2) kö-



106. ábra

A bíbormembránban elhelyezkedő bakteriorodopszin protein-molekula modellje HENDERSON és UNWIN (1975) szerint. Az egymástól elkülöníthető hét szerkezeti elem hét α-helixnek felel meg. Minthogy a molekula a membránra merőlegesen orientált az α-hélixek csúcsai a membrán két oldalán mintegy előremerednek. A 7 α-hélix közül három gyűrűt képez s így egy 20 Å széles csatornát alakít ki. E molekulaszerkezet számos részletében tisztázatlan. Így a hét α-hélix közötti kapcsolódás is felderítetlen



107. ábra

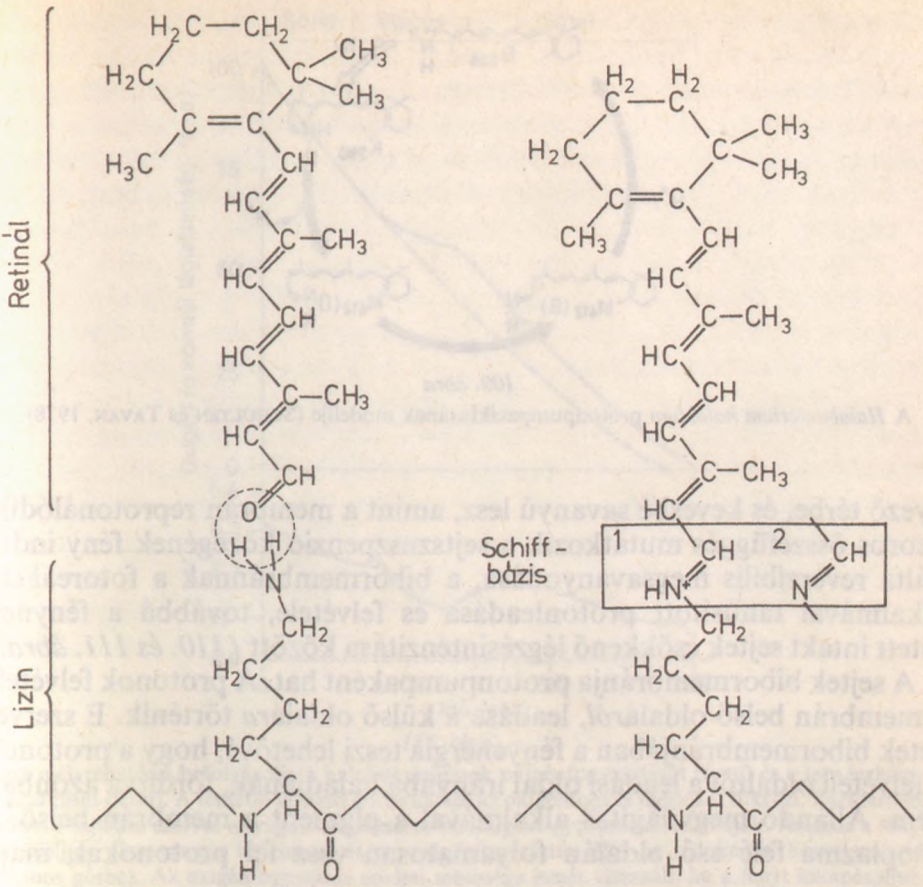
A bíbormembrán-frakció abszorpciós spektrumára két nagyobb csúcs jellemző: egy széles sáv 570 nanométer körül és egy meredek csúcs kb. 280 nanométernél. A spektrum sárga-zöld tartományában található széles abszorpciós sáv az anyag bíbor színére ad magyarázatot. A rövid hullámhosszú csúcsért főleg a proteinkomponens aromás aminosavai lehetnek felelősek (OESTERHELT és STOECKENIUS, 1973)

zött létrejövő kötés. A rodopszinban, ebben a legjobban ismert látópigmentben, a retinál specifikusan a lizin aminocsoportjához kötődik. Ugyanez a helyzet a bíbormembrán-proteinnél is *(108. ábra)*.

1.24.4. A bakteriorodopszin működése

A bakteriorodopszin funkciója hasonlóan a látópigmentekéhez, elsősorban is fényabszorbeáló tulajdonságával kapcsolatos. Fény hatására a bakteriorodopszin bíbor színe elhalványodik, majd az eredeti színét újra visszanyeri. Az elhalványodás és a reverzió hidrogénionok, ill. protonok leadásával, ill. felvételével kapcsolatos. A fotoreakció alkalmával a protonok leadásában és felvételében a SCHIFF-bázis játszik szerepet *(lásd 108. ábra)*. Az elhalványodott komplex deprotonált, míg a reverzió a komplex reprotonációjával jár együtt: *107.* és *108. ábrák*.

A *Halobacterium halobium* SCHULTEN és TAVAN (1978) által javasolt protonpumpaciklusát a *109. ábra* mutatja be. A fényt az 568 nm abszorpciós maximumú bakteriorodopszin (B_{568}) abszorbeálja, mely protonált SCHIFF-bázis révén „all-trans"-retinált tartalmaz, lizin maradék-

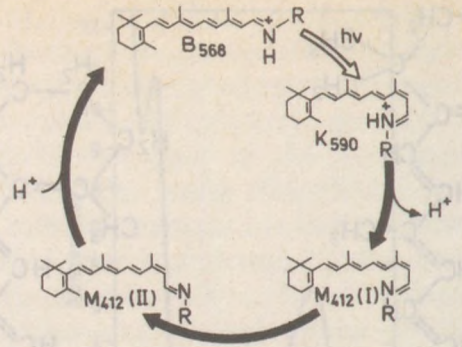


108. ábra

A retinál, mely a fényabszorpcióért felelős bakteriorodopszin kromoforja, a protein polipeptidláncához az itt bemutatott vázlatnak megfelelően kapcsolódik. A peptidlánc lizin alegysége és a hozzá kapcsolódó retinál a bal oldalon látható. Kötődésükkor egy molekula víz távozik, melynek oxigénatomja a retinál terminális aldehidjéből, két hidrogénje a lizin aminocsoportjából származik. A szén- és a nitrogénatomok ilyen kapcsolódásával az ún. SCHIFF-bázis jön létre. A fotoreakció során a SCHIFF-bázis hol elveszít, hol visszanyer egy protont, miközben deprotonált és protonált alakjai egymásba átalakulnak (STOECKENIUS, 1976)

hoz kapcsolódva. A B_{568} a 14–15 kötésnél fotoizomerizálódik, miközben létrejön az első K_{590}-intermedier, mely a szférikusan gátolt 14-cisz alakot képviseli. A K_{590}, feltehetően közvetve, a membránon át kifelé lead egy protont és a deprotonált 14 S-cisz M_{412} (I) intermedier alakjába megy át. Ez visszaizomerizálódik „all-trans" M_{412} (II)-vé, mely a membrán citoplazma felőli oldaláról protont fogad el és B_{568}-á alakul.

A protonok mozgását a közeg változó pH-ja is visszatükrözi, mely savanyúbbá válik, midőn a protonok a membránon át kilépnek a kör-

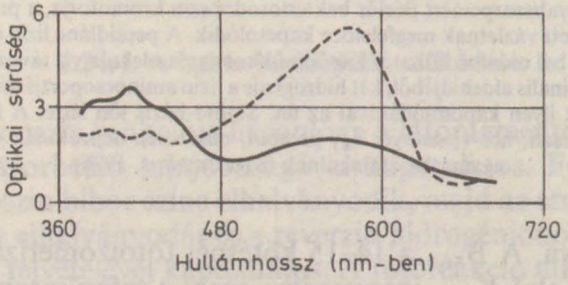


109. ábra

A *Halobacterium halobium* protonpumpaciklusának modellje (SCHULTEN és TAVAN, 1978)

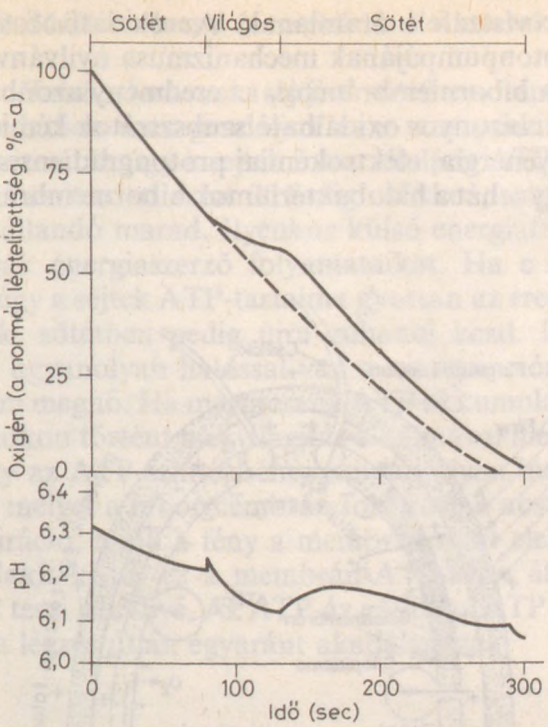
nyező térbe, és kevésbé savanyú lesz, amint a membrán reprotonálódik. Szoros összefüggés mutatkozik a sejtszuszpenzió közegének fény indukálta reverzíbilis megsavanyodása, a bíbormembránnak a fotoreakció alkalmával tanúsított protonleadása és felvétele, továbbá a fénynek kitett intakt sejtek csökkenő légzésintenzitása között *(110. és 111. ábra.)*

A sejtek bíbormembránja protonpumpaként hat. A protonok felvétele a membrán belső oldalá*ról,* leadása a külső oldalá*ra* történik. E szervezetek bíbormembránjában a fényenergia teszi lehetővé, hogy a protonok a felvételi oldaltól a leadási oldal irányába haladjanak, fordítva azonban nem. Állandó megvilágítás alkalmával a pigment a membrán belső, a citoplazma felé eső oldalán folyamatosan vesz fel protonokat, majd



110. ábra

A bíbormembránnak a fotoreakció alkalmával bekövetkező, fényindukálta, reverzibilis elhalványodását az alacsony hőmérsékleten végzett spektroszkópiás vizsgálatok eredményei bizonyítják. Sötétben fagyasztva a membránminta, eltekintve a csúcsnak az 575 nanométerhez való eltolódásától, a szokásos bakteriorodopszin-spektrumot mutatja (szaggatott görbe). A fénynek kitett fagyasztott minta viszont már 415 nanométernél csúcsot mutat (folytonos görbe). A fény az elhalványodás és a reverzió ciklusát idézi elő. A reverzió hőmérsékletre sokkal érzékenyebb és ezért, ha az anyagot fagyasztjuk, az elhalványodott komplex felhalmozódik. Amennyiben az anyagot felmelegítjük, majd sötétben újra lehűtjük, úgy az 575 nanométeres csúcs ismét megjelenik (STOECKENIUS, 1976)



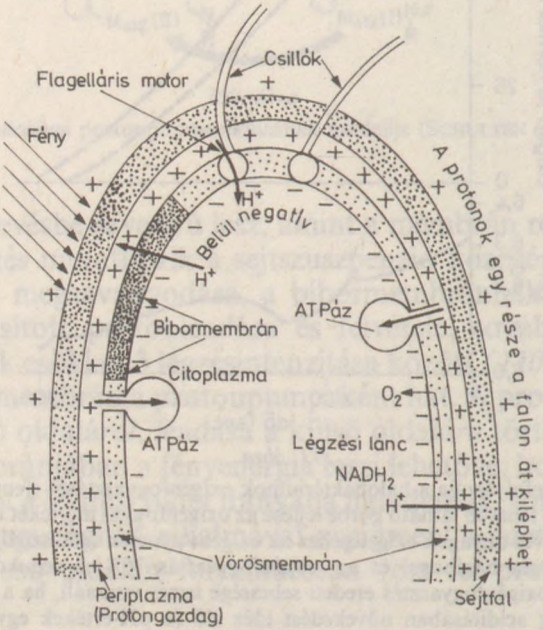
111. ábra

A fény mélyrehatóan befolyásolja a halobaktériumok oxigénfogyasztását (fenn) és a tenyészközegük aciditását (lenn). A fentebb látható görbe lejtése az oxigénfogyás mértékét tükrözi. Zárt térben, sötétben a sejtek a szerves anyagok elégetéséhez az oxigént gyorsan felhasználják. Amikor a fényt bekapcsoljuk, fényenergia hasznosul és az oxigénfogyasztás 76%-os redukciója következik be (folytonos görbe). Az oxigénfogyasztás eredeti sebessége ismét visszaáll, ha a fényt kikapcsoljuk. A fény a tenyészközeg aciditásában növekedést idéz elő (a pH-értékek egyre alacsonyabbak), minthogy a sejtekből protonok lépnek ki a környezetbe (STOECKENIUS, 1976)

azokat kifelé, a környező közegbe ugyancsak folyamatosan adja le. Ezáltal a sejt citoplazmája és a külső közeg között protonkoncentráció- és elektromos potenciálgradiens jön létre. Az elektrokémiai gradiens kialakítása tehát *(lásd 111.* és *112. ábrák)* fényenergia segítségével történik.

A kemiozmotikus elmélet szerint mind az oxidatív foszforiláció, mind a fotofoszforiláció alkalmával az az energia, mely az elektronoknak az elektrontranszportlánc mentén végbemenő áramlásából származik, először is az elektrontranszportláncot tartalmazó membránon át létrejövő elektrokémiai protongradiens alakjában raktározódik. Az így tárolt energia az, ami közvetlenül szolgál – ADP-ből és anorganikus foszfátból – ATP szintéziséhez, mégpedig akkor, amidőn a protonok ugyanezen a membránon keresztül és az e membránba beépült membrán-ATP-áz

enzimen át már visszafelé áramlanak. Az oxidatív foszforiláció és a fotoszintézis protonpumpájának mechanizmusa nyilvánvalóan lényegesen különbözik a bíbormembránétól, az eredmény azonban mindhárom esetben ugyanaz: bizonyos oxidálható szubsztrátok kémiai szabad energiája vagy a fényenergia, elektrokémiai protongradiens szabad energiájává alakul át. Így tehát a halobaktériumok bíbormembránjának elsődle-



112. ábra

A *Halobacterium*-sejtben, amint azt a vázlat szemlélteti, a protontranszport és az energiaszerző, ill. konzerváló anyagcsere-folyamatok között szoros összefüggés van. A citoplazmamembrán foltonként bíbormembránt és légzésilánc-pigmenteket is tartalmaz. A protonok leadását mind a fény, mind az oxigén elősegíti. E folyamathoz a fény hasznosítását a bíbormembrán, míg az oxigén hasznosítását oxidálható szubsztrátok jelenlétében légzési elektrontranszportláncok teszik lehetővé. Az eredményezett membránpotenciál (pozitív a külső oldalon) és protonkoncentrálás (a külső oldalon) a protonokat a membrán-ATPázon át visszafelé hajtja, miközben ez az enzim ADP-ből és anorganikus foszfátból ATP-t állít elő. A membrán-ATPáz működése megfordítható: protonokat bocsát ki akkor, amikor ATP-t hidrolizál

ges funkciója, hogy a légzés alternatívájaként a fényt mint energiaforrást hasznosítsa *(112. ábra)*. Ezt az is bizonyítja, hogy a sejtek bíbormembránt csak akkor szintetizálnak, ha alacsony oxigénkoncentrációknál fény jelenlétében szaporodnak.

1.24.5. ATP-előállítás fénnyel és respirációval a halobaktériumoknál

Amennyiben a *Halobacterium*ok sejtjeit sötétben, tápanyagokat nem tartalmazó sóoldatban szuszpendáljuk és e szuszpenzión nitrogéngázt áramoltatunk keresztül, úgy a sejtek intracelluláris ATP-koncentrációja először gyorsan az eredeti szint 30%-áig csökken, majd ezen a nívón megközelítően állandó marad. Ilyenkor külső energiaforrás hiányában a sejtek leállítják energiaszerző folyamataikat. Ha e sejtszuszpenziót megvilágítjuk, úgy a sejtek ATP-tartalma gyorsan az eredeti szintig vagy afölé emelkedik, sötétben pedig újra zuhanni kezd. Levegő (oxigén) átáramoltatása ugyanolyan hatással van a szuszpenzióra, mint a fény: az ATP-tartalom megnő. Ha mármost az ATP akkumulációját különböző hullámhosszokon történt megvilágítás alkalmával mérjük, nyilvánvalóvá válik, hogy az ATP szintéziséhez csupán olyan hullámhosszúságú fény hatékony, melyet a bíbormembrán fokozottan abszorbeálni képes.

Mind a respiráció, mind a fény a membránon át elektrokémiai protongradienst alakít ki, és ez a membrán-ATP-ázon át kiegyenlítődve ATP szintézisét teszi lehetővé. Az ATP-áz gátlói az ATP szintézisét mind fénnyel, mind a légzés útján egyaránt akadályozzák.

1.24.6. A halobaktériumok történetéből levonható következtetések

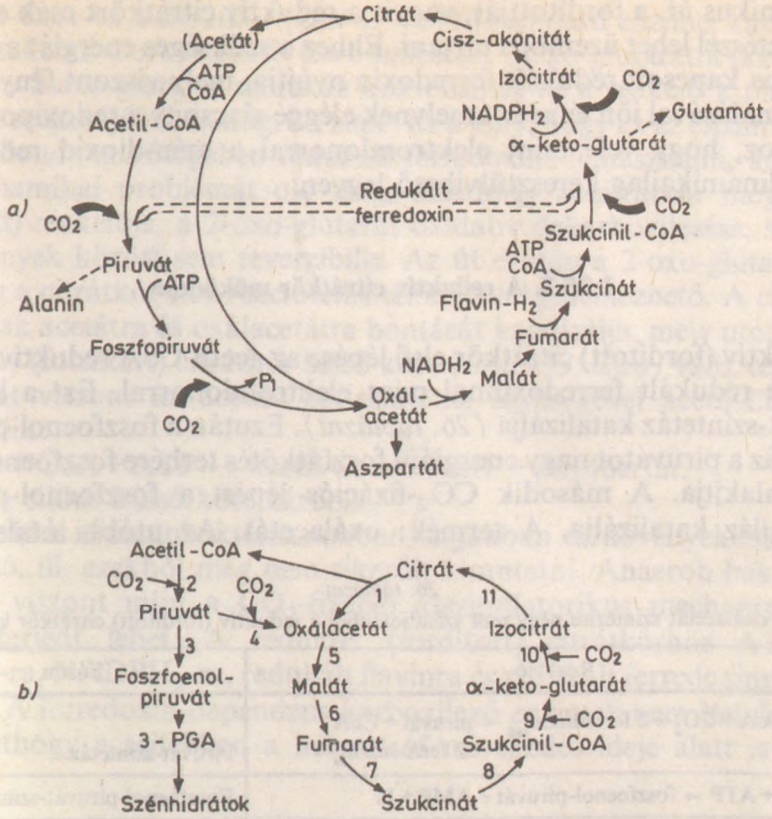
A Földön (a bioszférában) ma élő – növénynek, állatnak vagy mikrobának minősített – szervezetek individuális szintű anyag- és energiaforgalma gyakorlatilag egyugyanazon biokémiai sablon változatait tükrözi. E sablon alapvető körvonalai már mintegy 540 millió éve, a földtörténeti ókor kezdeti időszakában, a kambriumban kialakulhattak, és ettől kezdve az egész bioszférát átfogó közösségi anyagcsere *(community metabolism)* evolúciója minden egyéb esetlegesen korábban kialakult, más típusú biokémiai sablont vagy teljesen megsemmisített, vagy döntően a háttérbe szorított. Más szóval az a tény, hogy ma a bioszféra valamennyi élőlénye a magashegységi, alpin növénytársulások tagjaitól az eupelágikus (mélytengeri) pteropodás (tengeri pillangókkal jellemezhető) iszapok szaprofita közösségeinek fajaiig egyetlen, az egymásrautaltság milliárdnyi kölcsönhatásával átszőtt táplálkozási hálózatot alkot, és elődeik is alkottak már a földtörténet legkorábbi korszakaiban, eleve kizárta a nem beillő, vagy „nem a kor szintjén álló hatékonysággal" dolgozó biokémiai sablonok tartós egzisztenciájának lehetőségét. Mégis, a ma élő (recens) mikroorganizmusok tanulmányozása arra utal, hogy az élet kialakulásának hajnalán az anyag- és energiaforgalom különböző „kísérleti" sablonjai születhettek meg. Így pl. a reduktív (fordított) citrátkör, mint a szén-

dioxid fixálásának és redukciójának egy, a CALVIN-ciklussal szemben sokkal kevéssé hatékony útja, vagy a fotofoszforiláció megvalósítása klorofill nélkül, bakteriorodopszin típusú pigmentekkel stb. ma már csak ritkaságként bár, de mégis kimutathatók. Valamikor ezek az utak a természet úttörő „próbálkozásai" lehettek, de később nagyon visszaszorultak az alkalmasabb mechanizmusok kiválogatódásához vezető természetes szelekció során. Érdekes módon, talán annak a feltételezett alapelvnek a következményeként, hogy az evolúciónak egyetlen hasznos lépése sem ment kárba, a divatjamúlt mechanizmusokba illeszkedett struktúrák egészen más jellegű anyagcsereutakon, azokba mintegy átépülve újra feltűnhetnek. Ilyen struktúra a retinál is, mely eredeti rendeltetésétől lényegesen eltérően mint az állatok látásmechanizmusának nélkülözhetetlen alkotóeleme jelent meg újra. Ma minden okunk megvan már annak feltételezésére, hogy ha az élet más bolygókon is kialakult, úgy az nem feltétlenül és mindenütt a Földön megfigyelhető általános biokémiai sablonra támaszkodik, hanem attól többé-kevéssé eltérő, a kérdéses bolygó környezeti viszonyaihoz speciálisan adaptált sablonokat is követhet.

1.25. A reduktív (fordított) citrátkör

1.25.1. Az autotróf CO_2-fixáció egy sajátos ősi mechanizmusa a *Chlorobium thiosulfatophilumnál*

A metanobaktériumok sajátos, egyedülálló, autotróf CO_2-fixációs rendszerén (*lásd 97. ábra.*) és a szélesen elterjedt CALVIN-cikluson kívül az evolúció más autotróf CO_2-fixációs rendszerekkel is kísérletezett. Bizonyosra vehető, hogy az évmilliárdok e próbálkozások kevéssé tökéletes mechanizmusainak többségét már régen és végérvényesen eltüntették. Az obligát anaerob fotoszintetizáló baktériumok egy különösen ősinek tekintett csoportjában azonban sikerült egy ilyen „reliktum szisztémát" még felfedezni, mely létezésével határozottan igazolja, hogy a CALVIN-ciklus egykori előtérbe kerülése különböző, több-kevesebb hatékonysággal autotrófiát biztosító mechanizmusok szelekciója közepette mehetett végbe. Ez az ősi mechanizmus, mellyel itt foglalkozunk, a reduktív (fordított) citrátkör, mely talán magának a citrátkörnek (*lásd* 499. old.) is őse lehetett. Felfedezése még EVANS nevéhez fűződik, aki 1966-ban a *Chlorobium thiosulfatophilum* (ma *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*) CO_2-fixációját tanulmányozta (EVANS és munkatársai, 1966). Ez a szervezet szigorúan anaerob, GRAM-negatív pálcika. A citoplazma-



113. ábra

a) A reduktív citrátkör. *b)* A *Hydrogenobacter thermophilus* szén-dioxid-asszimilációt szolgáló reduktív citrátkörének javasolt vázlata SHIBA és munkatársai után (1985). Enzimek: 1 = ATP-citrátliáz; 2 = piruvát-szintáz:; 3 = foszfoenol-piruvát-szintetáz; 4 = piruvát-karboxiláz; 5 = malátdehidrogenáz; 6 = fumaráz; 7 = fumarát-reduktáz; 8 = szukcinil-CoA-szintetáz; 9 = α-ketoglutarát- szintáz; 10 = izocitrát-dehidrogenáz; 11 = akonitáz

membránjához kapcsolódó vezikulumokban (*lásd* 186. old.) bakterioklorofill-c-t vagy d-t, továbbá karotinoidokat tartalmaz. Kén-hidrogén jelenlétében fotoszintézisre képes, ugyanakkor környezetében elemi ként halmoz fel.

Elektrondonorként molekuláris hidrogént is használhat. Fotoszintézise során molekuláris oxigén sohasem keletkezik. Polifoszfátokat raktároz. Fototróf, a szén-dioxid fotolitotróf asszimilációját valósítja meg. EVANS szerint kísérleti körülmények között a $^{14}CO_2$ fixációjának legkorábban kimutatható terméke a glutamát, mely 30 másodperc után egy kevés szukcinát, aszpartát és cukorfoszfát mellett a fixált szén 75%-át teszi ki. Ebben a szervezetben a CO_2 fixálása lényegében fordított citrátkör keretében megy végbe *(113. ábra)*. Minthogy a citrátkör maga

exergonikus út, a fordítottját, vagyis a reduktív citrátkört csak energiabefektetéssel lehet üzemben tartani. Ehhez a szükséges energiát a körforgalomba kapcsolt redukált ferredoxin nyújtja, mely viszont fényenergia felhasználásával jön létre és amelynek eléggé alacsony a redoxipotenciálja ahhoz, hogy vele mint elektrondonorral a szén-dioxid redukciója termodinamikailag keresztülvihető legyen.

1.25.2. A reduktív citrátkör működése

A reduktív (fordított) citrátkör első lépése az acetil-CoA reduktív karboxilezése redukált ferredoxinnal mint elektrondonorral. Ezt a lépést a piruvát-szintetáz katalizálja *(26. táblázat)*. Ezután a foszfoenol-piruvát-szintetáz a piruvátot nagy energiájú foszfátkötés terhére foszfoenol-piruváttá alakítja. A második CO_2-fixációs lépést a foszfoenol-piruvát-karboxiláz katalizálja. A termék: oxálacetát. Az utóbbi átalakítását

26. táblázat

Egy mol oxálacetát szintézise négy mol széndioxidból a reduktív (fordított) citrátkör keretében*

Reakció	Enzim
Acetil-CoA + CO_2 + 2 ferredoxin$_{red}$ → piruvát + CoA + 2 ferredoxin$_{ox}$	Piruvát-szintetáz
Piruvát + ATP → foszfoenol-piruvát + AMP + Pi	Foszfoenol-piruvát-szintetáz
Foszfoenol-piruvát + CO_2 → oxálacetát + Pi	Foszfoenol-piruvát-karboxiláz
Oxálacetát + NADH → malát + NAD	Malát-dehidrogenáz
Malát → fumarát + H_2O	Fumaráz
Fumarát + flavin$_{red}$ → szukcinát + flavin$_{ox}$	Szukcinát-dehidrogenáz
Szukcinát + ATP + CoA → szukcinil-CoA + ADP + Pi	Szukcinát-tiokináz
Szukcinil-CoA + CO_2 + 2 ferredoxin$_{red}$ → 2-oxo-glutarát + 2 ferredoxin$_{ox}$ + CoA	2-oxo-glutarát-szintetáz
2-oxo-glutarát + NADPH + CO_2 → izocitrát + NADP	Izocitrát-dehidrogenáz
Izocitrát → citrát	Akonitáz
Citrát → acetát + oxálacetát	Citritáz
Acetát + ATP + CoA → acetil-CoA + AMP + PPi	Acetil-CoA-szintetáz
Összegezve: 4 CO_2 + 3 ATP + NADH + NADPH + flavin$_{red}$ + 4 ferredoxin$_{red}$ → → Oxálacetát + 2 AMP + ADP + NAD + NADP + flavin$_{ox}$ + 4 ferredoxin$_{ox}$ + 3 Pi + PPi	

* Feltételezve, hogy a ferredoxin egy elektront szállít.

szukcinil-CoA-vá a citrátkör (*lásd* 499. old.) standard enzimei katalizálják. A szukcinil-CoA reduktív karboxilezését 2-oxo-glutaráttá (ketoglutaráttá) a 2-oxo-glutarát-szintetáz közvetíti, és ez a reakció a piruvát-szintetáz reakciójával analóg. Itt ismét az a tény, hogy ez az enzim képes elektrondonor minőségében redukált ferredoxint felhasználni, komoly termodinamikai problémát old meg, minthogy a citrátkör megfelelő (fordított) reakciója, a 2-oxo-glutarát oxidatív dekarboxilezése, semmi körülmények között sem reverzíbilis. Az út ezután a 2-oxo-glutaráttól a citrátig a citrátkör konvencionális reakcióival jellemezhető. A citritáz a citrátnak acetátra és oxálacetátra bontását katalizálja, mely utóbbival a reduktív (fordított) citrátkör belső köre *(lásd 113. ábra)* válik teljessé. Az acetát viszont az acetil-CoA-szintetáz segítségével acetil-CoA-vá aktiválódik:

Acetát + CoA + ATP → acetil-CoA + AMP + pirofoszfát.

Ezzel a ciklus külső köre záródik.

Ez a ciklus a cianobaktériumokban, algákban és növényekben nem fordul elő, ill. ezekből még nem sikerült kimutatni. Anaerob baktériumokban viszont mint a CO_2-fixáció asszimilatorikus mechanizmusa talán elterjedt lehet. A reduktív (fordított) citrátkörhöz ATP-re, $NADH_2$-ra, $NADPH_2$-ra, redukált flavinra és redukált ferredoxinra van szükség. A ferredoxin-dependens karboxilező enzimek nem indukálhatók, minthogy a sejtekben a heterotróf növekedés ideje alatt is jelen vannak.

1.25.3. Széles körű vita a reduktív citrátkör létezése körül

A reduktív citrátkör szerepét és egyáltalán a létezését sokan vitatták. Ennek okai között a közlésekben rejlő ellentmondások is szerepet játszottak. Kimutatták, hogy a *C. thiosulfatophilum* egyik törzsének CO_2-fixációs termékeit, nátrium-karbonáton, mint egyedüli jelzett szénforráson tenyésztve, a $^{14}CO_2$, $H^{14}CO_3^- + {}^{14}CO_3^{2-}$ molaritása döntően befolyásolja. Így a korai intermedierek lehetnek egyrészt glutamát, α-ketoglutarát, glutamin, citrát és izocitrát, más aspektusban azonban a szén-dioxid beépülésének legfontosabb korai jelzett terméke foszfoglicerát volt. Minthogy a sejtkivonatokban ribulóz-1,5-difoszfát (RuDP)-karboxiláz-aktivitást nem sikerült kimutatni, feltételezték, hogy a foszfoglicerát a reduktív citrátkörben keletkezett. Más szerzők később ugyanebben a törzsben a RuDP-karboxiláz jelenlétét mégis igazolni tudták, jóllehet specifikus aktivitása nagyon alacsony volt (7 nmol megkötött szén-dioxid/min/mg protein; 30 °C-on, pH 8,0-nál, optimális körülmények között). Úgy tűnt, hogy a *Chlorobium* szén-dioxidot a CALVIN-cikluson át is fixál. Másrészt a fényben és maláton növekedő *Rhodospirillum rubrum*

NADP-specifikus izocitrát-dehidrogenáz enzimérol azt mutatták ki, hogy a legkülönbözőbb körülmények között is csak az oxidatív irányban működik, mely viszont éppen ellentétes azzal, mint amit tőle a reduktív citrátkörben elvárnának. Sokan a 70-es évek közepén még úgy vélték, hogy jóllehet néhány fotoszintetizáló baktériumban a reduktív citrátkör enzimeinek egy része kimutatható ugyan, mégis, nincs bizonyíték arra, hogy ez a ciklus a szigorúan autotróf növekedés alkalmával a CO_2-fixáció fő útja lenne, de ezen túlmenően még arra sincs meggyőző adatunk, hogy a heterotróf növekedés alatt egy ilyen ciklus a maga teljességében egyáltalán működne.

Később, az autotróf CO_2-fixáció tanulmányozása alkalmával a különböző karboxilációs reakciókat használó mikroszervezetek csoportosítását a fotoszintézisük során végbemenő szénizotóp-frakcionálás nagyságrendjének alapján kísérelték meg. Ily módon maguknak a magasabb rendű növényeknek három csoportját lehet megkülönböztetni:

1. Azok a fajok, melyek a ribulóz-1,5-difoszfát (RuDP)-karboxilázzal dolgoznak, ezek a C_3-fajok.
2. A foszfoenol-piruvát (PEP)-karboxilázt használók, ezek a C_4-fajok.
3. Fajok, melyek fiziológiai állapotuktól függően vagy a RuDP-karboxilázt, vagy a PEP-karboxilázt használják.

Ez a klasszifikációs rendszer azokra a megfigyelésekre alapul, hogy a növények két karboxilációs kulcsenzime a RuDP-karboxiláz és a PEP-karboxiláz eltérő izotópdiszkriminációs tulajdonságokat mutat. A $^{12}CO_2$ és a $^{13}CO_2$ keverékével végrehajtott vizsgálatoknál a PEP-karboxiláz a két izotóp egyikével szemben sem mutatott különösebb preferenciát, míg a RuDP-karboxiláz a ^{12}C javára határozottan szelektált.

1.25.4. Az ősi zöld kénbaktériumok reliktum CO_2-fixációs mechanizmusa

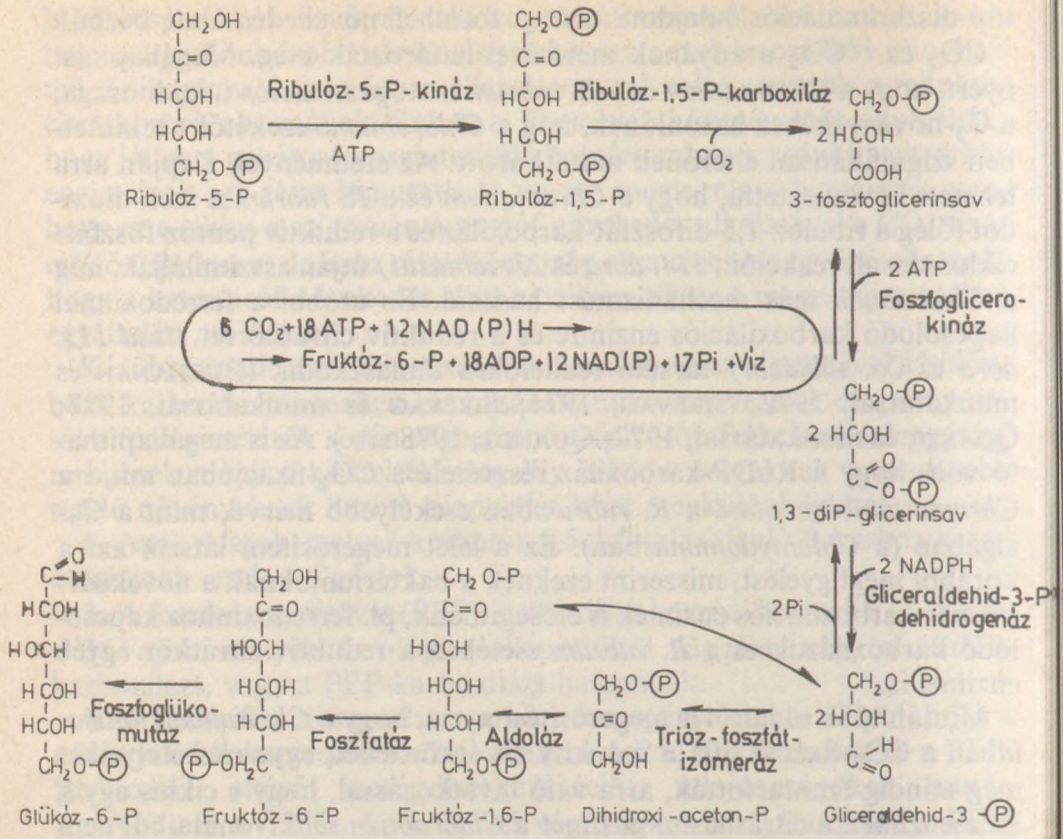
Jelen véleményünk szerint a fotoszintetizáló baktériumok túlnyomó többsége az autotróf növekedés során a szénasszimiláció két alternatív mechanizmusának egyikét használja:

1. RuDP-karboxiláz és a pentóz-foszfát-ciklus társuló reakciói, mely azonos a magasabb rendű növények C_3-útjával.
2. α-ketoglutarát-szintetáz, piruvát-szintetáz, PEP-karboxiláz, izocitrát-dehidrogenáz és a reduktív citrátkör társult reakciói, vagyis egy főleg az anaerob fotoszintetizáló baktériumoknál előforduló út.

A fotoszintetizáló baktériumok három típusának *(Chlorobium thiosulfatophilum, Rhodospirillum rubrum* és egy *Chromatium)*, továbbá összehasonlításul egy C_3-algának, a *Chlamydomonas reinhardii*nek szénizo-

tóp-diszkriminációs tulajdonságait a fototróf növekedés alatt beépült $^{13}CO_2$ és $^{12}CO_2$ arányának mérésével határozták meg. Megállapítást nyert, hogy a *Chromatium* és a *R. rubrum* izotópszelekciós tulajdonságai a C_3-növényekéhez hasonlónak, míg a *Chlorobium*é ezekétől e tekintetben szignifikánsan eltérőnek mutatkozott. Az eredmények alapján arra lehetett következtetni, hogy a *Chromatium* és a *R. rubrum* a szén-dioxidot főleg a ribulóz-1,5-difoszfát-karboxiláz és a reduktív pentóz-foszfát-ciklus társult reakciói *(114. ábra* és *27. táblázat)* útján asszimilálják, míg a *Chlorobium* más mechanizmust használ. Ez utóbbi a ferredoxinnal kapcsolódó karboxilációs enzimre és a reduktív citrátkörrel *(lásd 113. ábra* és *26. táblázat)* társuló reakciókra támaszkodik (BUCHANAN és munkatársai, 1972; SIREVAG, 1974; SIREVAG és munkatársai, 1977; QUANDT és munkatársai, 1977; QUANDT, 1978 stb.). Az is megállapítható volt, hogy a RuDP-karboxiláz részvétele a CO_2-fixációban mind a *Chromatium*ban, mind a *R. rubrum*ban csekélyebb mérvű, mint a C_3-algában (a *Chlamydomonas*ban). Ez a lelet megerősíteni látszik azt a korábbi megfigyelést, miszerint ezeknek a baktériumoknak a növekedését más karboxilációs enzimek is elősegíthetik, pl. ferredoxinhoz kapcsolódó karboxilázok és a *R. rubrum* esetében a reduktív citrátkör egyéb enzimei is.

Miután több oldalról is megerősítést nyert, hogy a *Chlorobium limicola*ban a CO_2-fixáció útja a reduktív citrátkör lehet, egyesek kételyeiket még mindig fenntartották, arra való hivatkozással, hogy e ciklus egyik kulcsenzimét, a citráthasító enzimet a *Chlorobium* sejtkivonataiból nem lehetett kimutatni. Ezenkívül a *C. limicola*ban a ribulóz-1,5-difoszfát-karboxilázt viszont kimutatták, ami csak fokozta a kritikusok meggyőződését, miszerint mégiscsak a CALVIN-ciklus az, ami univerzálisan minden autotrófban működik. FUCHS és munkatársai (1980*a*) annak eldöntésére, hogy e szervezetben végtére is melyik a CO_2-fixáció tényleges útja, a tenyésztéseket ásványi sóközegben, szén-dioxiddal mint fő szénforrással végezték, de e közeget még specifikusan jelzett ^{14}C-piruváttal is kiegészítették. A ^{14}C beépülését alaninba (≙ intracelluláris piruvát), aszpartátba (≙ oxálacetát), glutamátba (≙ α-ketoglutarát) és a glükózba (≙ hexóz-foszfát) hosszú lejáratú jelzési kísérletek keretében, a sejtek exponenciálisan növekedő szakaszában mérték. A piruvát jelenlétében végbement szaporodás során, a sejtszén 20%-a a közeg piruvátjából, míg 80%-a a szén-dioxidból származott. Minthogy a piruvát nem oxidálódott szén-dioxiddá, csupán azok a vegyületek váltak jelzetté, melyek ez utóbbiból jelzett piruvát részvételével szintetizálódtak. A glükóz és a három aminosav jelzett volt. Az extracelluláris piruvát specifikus radioaktivitásának egyötödét az alanin viselte, ami azt jelenti, hogy az intracelluláris



114. ábra

A szén-dioxid-fixálás reduktív pentóz-foszfát-ciklusa (CALVIN-ciklus)

piruváttartalékok 20%-a a közeg piruvátjából származott, míg 80%-a szén-dioxidból szintetizálódott. A glükóz az alanin specifikus radioaktivitásának kétszeresét mutatta. Ez arra utal, hogy a hexóz-foszfát szintézise szén-dioxidból piruváttartalékokon keresztül haladt. Ez viszont ellentmond annak a feltevésnek, hogy e baktériumban CALVIN-ciklus működik, minthogy ebben a piruvát egyáltalán nem köztitermék. Az aszpartát és a glutamát specifikus radioaktivitásai egymás között gyakorlatilag azonosak voltak, azonban jelentősen alacsonyabbak az alaninénál (≙ intracelluláris piruvát), ami viszont azt igazolja, hogy az autotróf CO_2-fixáció mechanizmusa esetükben feltétlenül a reduktív citrátkör volt.

FUCHS és munkatársai (1980b) másik tanulmányukban ezeket a kísérleteket ^{14}C jelzésű propionáttal végezték és a ^{14}C beépülését alaninba, aszpartátba és glutamátba kísérték nyomon. Mindhárom aminosav jelzett volt. A propionát asszimilációja propionil-CoA-n, metil-malonil-

CoA-n és szukcinil-CoA-n át történt. A propionát az aminosavakba szukcinil-CoA-n, α-ketoglutaráton, izocitráton és citráton át épült be, miután a citrát si-típusú hasítása oxálacetátot és acetil-CoA-t vagy acetátot eredményezett. Eszerint tehát ezeknél az autotróf módon szaporodó sejteknél a reduktív citrátkörben feltételezett valamennyi reakciót ki lehetett mutatni.

A nem CALVIN típusú széndioxid-asszimiláció problémája a 80-as években egyre intenzívebb kutatások tárgyát képezi. 1983-ig azt tartották, hogy ilyen különleges széndioxid-fixációs utak csak az ősbaktériumokban és anaerob eubaktériumokban fordulnak elő. A *Sulfolobus brierleyi*ben, ebben a termoacidofil ősbaktériumban feltételezhetően reduktív TCA ciklus működik. 1985-ben SHIBA és munkatársai bizonyították, hogy nem CALVIN típusú autotróf CO_2-fixáció aerob eubaktériumokban is létezik. Az extrém termofil, aerob, hidrogénoxidáló *Hydrogenobacter thermophilus*ban a reduktív TCA ciklusnak új típusát mutatták ki (113. b. ábra). E mikroba sejtmentes kivonataiban a ribulóz-1,5-difoszfát karboxiláz és a foszforibulokináz hiányoznak. Ezzel szemben a szén-dioxid-fixáció elsődleges termékeiből aszpartát és glutamát jön létre.

1.26. A CO_2-fixáció ribulóz-difoszfát útja és ennek lehetséges evolúciója

1.26.1. A CALVIN-ciklus

A reduktív pentóz-foszfát-ciklus (CALVIN-ciklus: *lásd 114. ábra*) jelen van számos autotróf baktériumban, valamennyi algában és zöld növényben. A ciklust részleteiben a *27. táblázat* mutatja be. Egy karboxilációs reakció keretében a szén-dioxid ribulóz-1,5-difoszfáthoz kapcsolódik és két molekula foszfoglicerinsav jön létre. Az ezután következő reduktív szakaszban (lényegében az eredeti fényenergia terhére) a glicerinsavfoszfát trióz-foszfáttá redukálódik, miközben ATP és $NADH_2$, ill. $NADPH_2$ használódik el. Ezután az ún. regenerációs szakasz következik, melynek során a ribulóz-1,5-difoszfát, vagyis a szén-dioxid akceptora, regenerálódik. A ciklus egy körforgása során 3 molekula ribulóz-1,5-difoszfát kerül felhasználásra és ugyanannyi regenerálódik, másrészt viszont egy trióz áll elő nyereségként. Két fordulat tehát tisztán egy hexóz nyereséget eredményez. Egy fordulatnál 9 ATP és 6 $NAD(P)H_2$ fogy el, minthogy a ciklusban 3 mól ATP és 2 mól $NAD(P)H_2$ szükséges 1 mól szén-dioxid szénhidrátszintre való redukálásához. Egy molekula szén-dioxid redukálásához ma több, mint négy fénykvantummal számol-

27. táblázat

Egy mol hexóz-monofoszfát szintézise hat mol CO_2-ből a reduktív pentóz-foszfát-ciklus keretében.

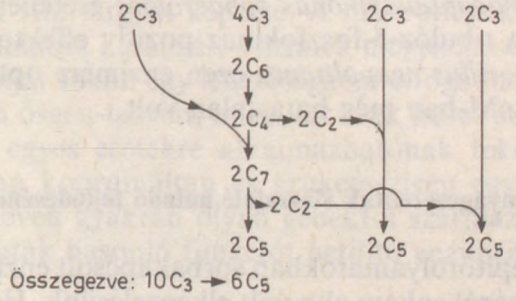
Reakció	Enzim
6 Ribulóz-1,5-difoszfát + 6 CO_2 → 12 3-foszfoglicerát	Ribulóz-difoszfát-karboxiláz
12 3-foszfoglicerát + 12 ATP → 12 1,3-difoszfoglicerát + 12 ADP	Foszfoglicerát-kináz
12 1,3-difoszfoglicerát + 12 NAD(P)H → 12 glicerinaldehid-3-foszfát + 12 Pi + 12 NAD(P)	Glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz
5 glicerinaldehid-3-foszfát → 5 dihidroxi-aceton-foszfát	Trióz-foszfát-izomeráz
3 Glicerinaldehid-3-foszfát + 3 dihidroxi-aceton-foszfát → 3 fruktóz-1,6-difoszfát	Aldoláz
3 Fruktóz-1,6-difoszfát → 3 fruktóz-6-foszfát + 3 Pi	Hexóz-difoszfatáz
2 Fruktóz-6-foszfát + 2 glicerinaldehid-3-foszfát → 2 xilulóz-5-foszfát + 2 eritróz-4-foszfát	Transzketoláz
2 Eritróz-4-foszfát + 2 dihidroxi-aceton-foszfát → 2 szedoheptulóz-1,7-difoszfát	Aldoláz
2 Szedoheptulóz-1,7-difoszfát → 2 szedoheptulóz-7-foszfát + 2 Pi	Hexóz-difoszfatáz
2 Szedoheptulóz-7-foszfát + 2 glicerinaldehid-3-foszfát → 2 xilulóz-5-foszfát + 2 ribóz-5-foszfát	Transzketoláz
2 Ribóz-5-foszfát → 2 ribulóz-5-foszfát	Ribóz-foszfát-izomeráz
4 Xilulóz-5-foszfát → 4 ribulóz-5-foszfát	Ribulóz-5-foszfát-3-epimeráz
6 Ribulóz-5-foszfát + 6 ATP → 6 ribulóz-1,5-difoszfát + 6 ADP	Foszforibulókináz
Összegezve: 6 CO_2 + 18 ATP + 12 NAD(P)H → fruktóz-6-foszfát + 17 Pi + 18 ADP + 12 NAD(P)	

nak, minthogy két molekula $NAD(P)H_2$ és két molekula ATP létrejöttéhez 2 vízmolekula fotolízise, vagyis négy hidrogén reakcióképes állapotba vitele szükséges (egy ATP tehát még hiányzik):

$$4\ \text{ferredoxin}_{ox} + 2\ ADP + 2\ \text{anorg. foszfát} + 2\ H_2O \xrightarrow{h \cdot \nu} 4\ \text{ferredoxin}_{red} + \\ + 2\ ATP + O_2 + 4\ H^+$$

A redukált ferredoxinról az elektronátvitelt a NADP-re a ferredoxin NADP-reduktáz közvetíti. A teoretikus kb. 4 kvantum/O_2-érték helyett a gyakorlatban 8 kvantum/O_2-értékkel kalkulálnak. A fényenergia hasznosításának mértéke így 50% körül, ill. az alatt lehet. A fentebb említett ATP-hiányt a ciklusos fotofoszforiláció pótolja. Az anaerob fotoszintetizáló baktériumoknál azonban a redukálóképesség előállítása a NAD (és nem NADP) direkt fotoredukciójával aligha valósul meg. Sokkal inkább a ciklusos fotofoszforiláció során nyert energiával, valamilyen – főleg – anorganikus elektrondonor segítségével, energiaigényes, fordított elektrontranszport útján.

Két enzimet, a ribulóz-5-difoszfát-karboxilázt és a ribulóz-5-foszfokinázt csak autotróf sejtekben találtak. Az első a fakultatív autotrófokban csak akkor van jelen, ha ezek szén-dioxidon élnek. A fotoszintetizáló szervezetek a szükséges ATP-t és talán a redukált NAD-ot, ill. NADP-t is könnyen állítják elő, a kemolitotrófok azonban a redukálóképességet minden bizonnyal csak nagy áldozatok árán. A ciklusban a ribulózdifoszfát regenerálása a reakciók során át történik *(115. ábra)*. Fontos tény, hogy az autotróf sejtekben a szén-dioxid megkötését még a reduktív pentóz-foszfát-ciklus (CALVIN-ciklus) biztosan kimutatható jelenlété-



115. ábra

A ribulóz-difoszfát regenerálódása a CALVIN-ciklusban. Az előállított trióz (C_3)-molekuláknak csupán egyhatoda vesz részt a glükózképzésben (2 $C_3 \rightarrow C_6$). A visszamaradó öthatod rész a pentóz-foszfát regenerációjára (10 $C_3 \rightarrow 6\ C_5$) használódik el. Egy C_2-csoport leválasztása és átvitele glükózról (C_6) eritrózt (C_4), egy másiké szedoheptulózról (C_7) pentózt (C_5) eredményez. A C_2-csoportok C_3-csoportokkal kapcsolódva pentózokat szolgáltatnak. A szedoheptulóz triózból (C_3) + eritrózból (C_4) képződik

ben is nem kizárólag és egyedül ez a mechanizmus bonyolítja le. Ezenkívül e ciklus számos enzimét, különösen a ribulóz-1,5-difoszfát-karboxilázt az ilyen sejtekben gyakran csak alacsony koncentrációban, csekély aktivitással észlelhetjük.

A kemo- és fotolitotróf anaerob baktériumok, továbbá az oxigéntermeléssel jellemezhető fotoszintetizáló növények és cianobaktériumok szénanyagcseréje között lényeges különbséget jelent, hogy az előbbiek a szén-dioxid reduktánsaként NADPH helyett NADH-t használnak.

A *Hydrogenomonas facilis* (ma *Pseudomonas facilis*) extraktumában ATP- és NADH-dependens CO_2-fixálást tapasztaltak. A szén-dioxidnak ezt az egyébként még Mg^{++}-dependens beépülését AMP gátolta. Ez a megállapítás, továbbá az a tény, hogy a szén-dioxidnak esetleges CALVIN-cikluson kívüli beépülése a lehetséges akceptor, illetve akceptorok nem kevesebb, mint 10–15 mol/liter totál endogén koncentrációját igényelné, arra engedett következtetni, hogy a beépülés magában a CALVIN-ciklusban történt. Valóban, a CO_2-fixáció specifikus aktivitása a D-ribulóz-1,5-difoszfát (RuDP)-karboxiláz aktivitásával jól követhető korrelációt mutatott. Megjegyzendő, hogy más autotróf baktériumoknál (pl. *Chromatium*) is megállapítást nyert, miszerint a CO_2-fixációt az AMP, feltehetően a ribulóz-1,5-foszfokináz (mely a ribulóz-5-P-ot ATP jelenlétében, ribulóz-1,5-P_2-vé alakítja) gátlásával akadályozza. Később kiderült, hogy a NADH a *P. facilis* ribulóz-5-foszfokinázának pozitív allosztérikus effektora. Mindezt figyelembe véve, a *P. facilis* extraktumában végbemenő CO_2-fixációnál a NADH egyrészt mint a szén-dioxid reduktánsa, másrészt mint a ribulóz-5-foszfokináz pozitív effektora egyaránt közreműködhet. Az utóbbi valószínűen gyorsítja a szénátfolyást a CALVIN-cikluson át, ami viszont e reduktáns koncentrációját csökkenti. Újabban a *Rhodopseudomonas sphaeroides* esetében is kimutatták, hogy a NADH a ribulóz-5-foszfokináz pozitív effektoraként szerepel, azonban a *Thiobacillus neapolitanus* ezen enzimére optimális körülmények között 3,5 mM-ban még hatástalan volt.

1.26.2. Az anyagcsereutak visszafelé haladó fejlődésének elmélete

A bioszintetikus építőfolyamatokban sorbakapcsolt enzimek evolúciójának mechanizmusáról sokáig alig volt elképzelésünk. HOROWITZ kitűnő gondolata volt, hogy az a korábbi feltételezés, miszerint az anyagcsereutakon egymást követő enzimek, a fejlődés folyamán, a bioszintézis első lépésétől az utolsóig menő „logikai" sorrendben, egymást követően jelentek meg, eleve abszurd és lehetetlen. Szerinte a bioszintetikus utak fejlődése a gyakran retroevolúciónak nevezett folyamathoz hasonlóan

bontakozhatott ki. Mit jelent ez? Vegyük pl. egy aminosav bioszintézise evolúciójának így feltételezett útját:

$$A \xrightarrow{a} B \xrightarrow{b} C \xrightarrow{c} D \xrightarrow{d} E \xrightarrow{e} \text{aminosav}$$

Amennyiben e létfontosságú aminosav a primitív mikroba környezetéből elfogyott, úgy ha rendelkezett egy olyan enzimmel (*e*), mely a környezetében fellelhető *E*-vegyületet aminosavvá alakította, úgy ez ránézve óriási szelektív előnyt jelentett. Tovább folytatva ezt az okoskodást feltételezhető, hogy a mikroba a szóban forgó aminosav szintéziséhez vezető anyagcsereút valamennyi enzimére „hátrafelé haladva" tett szert. Ezt az elgondolást később tovább finomították, feltételezve, hogy a terminális enzimet (jelen esetben az *e*-t) specifikáló ősi gén (ősgén) duplikációja redundáns gént eredményezhetett, mely mutációval vagy mutációkkal úgy módosult, hogy most már a bioszintetikus út utolsó előtti lépését katalizálni képes protein (*d*) információjának letéteményesévé vált. Ennek értelmében egy anyagcsereút valamennyi strukturális génjének retroevolúciója tandem duplikációk és folyamatos mutációk révén, egy közös ősi vagy kiinduló géntől (az utolsó lépést katalizáló enzimet kódoló géntől) származtatható. Ezt a feltételezett evolúciós mechanizmust még valószínűbbé teszi, ha meggondoljuk, hogy az ősi, prekurzor gén annak a szubsztrátnak háromdimenziós kötőhelyét specifikálta, mely a bővülő anyagcsereút megelőző reakciójának terméke lett. Így a mutációnak ahhoz, hogy új kötőhelyet és katalitikus aktivitást eredményezzen, a már meglevő kötőhely kódját csak módosítania kellett. Magának az operonnak a létezése, vagyis a szorosan együttműködő, ill. működésükben egymást követő enzimek génjeinek, egyetlen DNS-szekvenciát alkotó sorbakapcsolása ezt az elméletet még inkább alátámasztja. Mindennek ellenére az anyagcsereutak retroevolúciójának koncepciója mind a mai napig sok vita tárgyát képezte. A makromolekulák építőelemei szintetikus folyamatait katalizáló enzimek megjelenésének hátrafelé haladó evolúciós útját sokan egy lehetőségként elfogadhatónak tartják, de a differenciálódó ősgén-teóriát, mivel ezt csak kevés adat támasztja alá, legtöbben csak egyes esetekre alkalmazhatónak tekintik. Az azonos anyagcsereutakon koordináltan és szukcesszíven együttműködő enzimek mutációk révén gyakran olyan génektől származtathatók, melyek más anyagcsereutak hasonló funkciót betöltő enzimeit kódolják.

1.26.3. A CO_2-fixáció evolúciójának kérdésköre

Amennyiben elfogadjuk azt az egyetlen ésszerű feltevést, hogy a legprimitívebb szervezetek nagyon korlátozott bioszintetikus kapacitású heterotrófok voltak, úgy máris feltehetjük a kérdést, miként jöttek létre,

mégpedig viszonylag már nagyon korán, a fokozott szintetikus kapacitással rendelkező autotrófok. Közöttük a legelsők egészen bizonyosan még anaerobok voltak. Semmiképpen sem lehettek obligát autotrófok. Sokkal inkább mixotrófok voltak, melyek megszerezve a CALVIN-ciklus működtetéséhez szükséges enzimeket, a CO_2-asszimiláció termékeivel mintegy kiegészítették heterotróf anyagcseréjüket.

Az első autotrófok mintegy $3–4 \times 10^9$ évvel ezelőtt jelenhettek meg. Az autotrófia a heterotrófiával szemben feltétlenül nagy előnyt nyújthatott, mivel a légköri szén-dioxid, illetve az akvatikus karbonát-tartalékok direkt biológiai hasznosítását tette lehetővé és a biológiailag értékesíthető molekulák véletlenszerűen haladó, lassú, abiotikus, tisztán kémiai evolúcióját a gyors biológiai szervesanyag-szintézisek párhuzamos evolúciójával bővítette.

A CO_2-fixáció evolúciója bonyolult kérdéskomplexumában figyelembe kell venni, hogy a cukrokhoz vagy a formaldehidhez hasonló redukált szénvegyületekből végbemenő sejtszintézissel szemben a sejtanyagszintézis szén-dioxidból endergonikus folyamat. Ezért tehát a CO_2-hasznosítás képességének létrejötténél nem csupán a fixáció enzimei iránti, hanem a kémiai energia előállítása és átvitele iránti igény is felmerül. Az anyagcserének ez a komplexitása QUAYLE és FERENCI (1978) szerint olyan asszimilációs utakon át is fejlődhetett, melyek nem voltak endergonikusak és ezért nem feltétlenül igényelték az energiatranszdukció kiegészítő mechanizmusát.

1.26.4. Metilotrófia és autotrófia

A mikroorganizmusok több olyan anyagcsereúttal is rendelkeznek, melyek egyszénatomos vegyületekből (C_1) különböző redukciós szinteken sejtalkotó elemeket szintetizálnak. Metilotróf az a szervezet, mely valamennyi sejtalkotóelemét vagy olyan szénvegyületből, mely egy vagy több szénatomot, de szén–szén kötéseket nem tartalmaz, vagy egy ilyen vegyület és szén-dioxid keverékéből állítja elő. Néhány mikroba anyagcseréje olyannyira rugalmas, hogy ezeket a szaporodási körülményektől függően hol metilotrófoknak, hol autotrófoknak jelölhetjük. C_1-vegyületekből, mint pl. formaldehidből, intermedier metabolitok nettó szintézisét már ténylegesen exergonikus bioszintetikus anyagcsereutakon is észlelték. Jóllehet a valódi autotrófiával néhány redukált C_1-vegyület asszimilációs anyagcsereútjainak csak kevés evolúciós kapcsolata lehet, mégis nincs kizárva, hogy egykoron valamelyik közülük nem szolgálhatott-e olyan templátként, melyen az autotróf anyagcsere formálódott. E szempontból QUAYLE és FERENCI (1978) szerint a formaldehid-fixáció ribulóz-monofoszfát-ciklusa (RuMP-ciklus) a lehetséges autotróf temp-

lát jelöltjeként merül fel. Alant e szerzőknek a CO_2-fixáció evolúciójának merőben új megközelítését mutatjuk be, mely már mélyebb bepillantást nyújt az élet és biokémiai mechanizmusa eredete utáni kutatómunka egy speciális területébe.

1.26.5. A „formózreakció" hálózata

A formaldehid mely a tejútrendszer csillagközi felhőiben is előfordul (ZUCKERMAN, 1977) szimulált prebiotikus körülmények között rendkívül könnyen jön létre és önmagával kondenzálódva szénhidrátokat eredményez. Jóllehet a csillagközi térben a formaldehid koncentrációja rendkívül csekély, kb. 10^3 molekula/cm^3, ami már az ultravákuum állapotának felel meg, mégis együttes jelenléte más prebiotikus prekurzorjelöltek (szén-monoxid, hidrogén-cianid, ciano-acetilén, metilalkohol, hangyasav stb.) meglepően nagy számával arra enged következtetni, hogy egyfajta kémiai evolúció a csillagközi térben is végbe mehet, és ez akár a poliszacharidképzés szintjéig is előre haladhat (lásd *1.3.1.* alfejezet).

Prebiotikus állapotokat szimulálva, laboratóriumi körülmények között formaldehidet állítottak elő metán és víz keverékén át létrehozott elektromos kisülések alkalmával, a szén-dioxid és ferrovas vizes oldatát α-részecskékkel besugározva, szén-dioxid és víz UV- vagy γ-besugárzásakor, metán, ammónia, víz és hidrogén keverékén át kiváltott szikrakisüléskor stb. (GARRISON és munkatársai, 1951; GETOFF és munkatársai, 1960 stb.) Ezért nagyon valószínű, hogy a kémiai evolúció alatt a formaldehid nagy mennyiségekben képződhetett. A formaldehid erősen reaktív vegyület, és ha már egyszer létrejött, úgy számos reakciót kezdeményezhet. Kialakulását a primitív atmoszférában a 370 nm-nél rövidebb hullámhosszú UV-sugarak okozta destrukciója követhette. Az óceánok vizében viszont hidratált alakja az UV-sugárzással szemben már védelmet talált. Oldatában a formaldehid számtalan vegyületet hozhat létre. Pl. neutrális vagy savanyú körülmények között paraformaldehiddé és metaformaldehiddé polimerizálódhat; ammóniával pl. hexametilén-tetraminná polimerizálódhat; tiolokkal reakcióba lépve tiohemiacetálokat képezhet; cianidokkal glikonitrilt ($HOCH_2CN$), míg önkondenzációval monoszacharidokat eredményez stb. A formaldehid kicsiny molekulájának kémiai reaktivitása egyedülálló, nagy gyorsasággal a polimereknek, cukroknak, fenoplasztoknak és az aminoplasztoknak egész „családjait" produkálhatja, melyek valamennyien a formaldehid-eredet bélyegeit viselhetik. A formaldehid bázikus viszonyok között önkondenzációval cukrok keverékét eredményezi. Ez a „formózreakció" (*formose reaction;* MIZUNO és WEISS, 1974) autokatalízisre vezethető vissza, mely

egy nem teljesen tisztázott mechanizmusú, lassú, közvetlenül glikolaldehiddé való kondenzálódással kezdődik

$$2\,CH_2O \rightarrow HOCH_2 \cdot CHO \qquad (1)$$

Amint ez létrejött gyors aldolkondenzációk és tautomerizációk egyenes láncú cukrokat:

$$HCHO + HOCH_2 \cdot CHO \rightarrow HOCH_2 \cdot CHOH \cdot CHO \qquad (2)$$

$$HOCH_2 \cdot CHOH \cdot CHO \rightleftharpoons HOCH_2 \cdot CO \cdot CH_2OH \qquad (3)$$

$$HCHO + HOCH_2 \cdot CO \cdot CH_2OH \rightarrow HOCH_2 \cdot CHOH \cdot CO \cdot CH_2OH \qquad (4)$$

$$HOCH_2 \cdot CHOH \cdot CO \cdot CH_2OH \rightleftharpoons HOCH_2 \cdot CHOH \cdot CHOH \cdot CHO \qquad (5)$$

vagy elágazó láncú cukrokat:

$$HCHO + HOCH_2 \cdot CHOH \cdot CHO \longrightarrow HOCH_2 \cdot \underset{\displaystyle CH_2OH}{\overset{\displaystyle |}{C}}OH \cdot CHO \qquad (6)$$

eredményeznek.

Kereszteződő CANNIZZARO-reakciók cukoralkoholok megjelenéséhez is vezethetnek (a CANNIZZARO-reakció az α-szénatomon hidrogénatomokat nem tartalmazó aldehidek reakciója: részben savvá oxidálódnak, részben alkohollá redukálódnak), pl.:

$$HOCH_2 \cdot CHOH \cdot CHO + HCHO + OH^- \rightarrow HOCH_2 \cdot CHOH \cdot \cdot CH_2OH + HCO_2^- \qquad (7)$$

A létrejött aldózok maguk is reagálhatnak aldolkondenzáció révén aktivált metiléncsoportokkal, mely tovább szélesíti a lehetséges reakciótermékek számát

$$R' \cdot CHO + HOCH_2 \cdot CO \cdot R'' \rightarrow R' \cdot CHOH \cdot CHOH \cdot CO \cdot R'' \qquad (8)$$

ahol R' = R'' = $(CHOH)_n\,CH_2OH$. Ha a reakciókeverékhez glikolaldehidet vagy más aciloinokat adunk, úgy a kezdeti indukciós periódus elmarad, jelezvén, hogy ezek a vegyületek az **1**-es reakciót katalizálják.

Bár a lehetséges reakciótermékek száma elméletileg csaknem határtalan *(semi-chaotic system)*, a valóságban azonban a nagy változatosságnak korlátai vannak. A szintézisek ugyanis a több mint nyolc szénatomot tartalmazó egyenes láncú cukrokkal megállnak, minthogy C_5-cukrokkal kiindulva a furanóz- és a piranózgyűrű-képződés az α-hidroxi-metiléncsoport szükséges aktiválását elvonja. A **6**-os és a **7**-es reak-

ciókhoz hasonló reakciók zsákutcának számítanak *(dead-end reactions)*, akár az α-hidrogénatom, akár az aktivációjáért felelős karbonilcsoport elvonása miatt. Mindazonáltal még ilyen korlátozásokkal is, MIZUNO és WEISS (1974) az analízisek pontosított módszereit alkalmazva, különleges „kémiai kemosztátban" (a reakcióedénybe formaldehidet és kálciumhidroxidot juttatva) a reakciókeverékből több mint 30 cukorféleséget mutattak ki: közöttük valamennyi közönséges heptóz, hexóz, pentóz, tetróz és trióz előfordult. A reakciótermékek keverékének összetételét mind a hőmérséklet, a pH, a reakcióidő, mind a formaldehidnek a fémhidroxid-katalizátorhoz viszonyított aránya egyaránt befolyásolhatja.

A formózreakció szerepe a prebiológiai evolúció során feltehetően fontos lehetett, minthogy:

1. A 2–8 szénatomot tartalmazó, egyenes láncú cukrok valamennyi élő sejt uralkodó szénhidrátkomponensei. A formózreakció pedig éppen ilyeneket és nem nagyobbakat eredményez.

2. Az általános formózreakció termékei és reakciói mintegy mintául szolgálhatnak számos fontos, az intermedier szénhidrát-anyagcserében szerepet játszó enzim (aldolázok, transzaldolázok, izomerázok és epimerázok) katalizálta reakcióhoz.

3. A formaldehid a kémiai evolúció során folyamatosan és nagy mennyiségben keletkezhetett.

Feltehető azonban a kérdés: hogyan bontakozhatott ki a formózreakció a primitív Földön? Laboratóriumi viszonyok között, ahhoz, hogy ez egyáltalán detektálható legyen, irreálisan nagy formaldehid- és alkálikoncentrációk szükségesek. Forralással és alumínium, kaolinit vagy karbonát-apatit mint katalizátor jelenlétében, így például primordiális hidrotermális források szimulálásakor, cukrok sokkal hígabb (10^{-2}M) formaldehidoldatokban is létrejönnek. Elképzelhető, hogy a hideg HALDANE-levesben a folyamatos formaldehidképzés állandó paraformaldehid-precipitációt eredményezett, ami viszont már koncentrálódási folyamatnak tekinthető. Későbbi helyi felmelegedések ugyanis, így pl. meleg források forróvíz-kitörései, depolimerizációt és a formózreakció számára kedvezően nagy lokális formaldehid-koncentrációkat eredményezhettek.

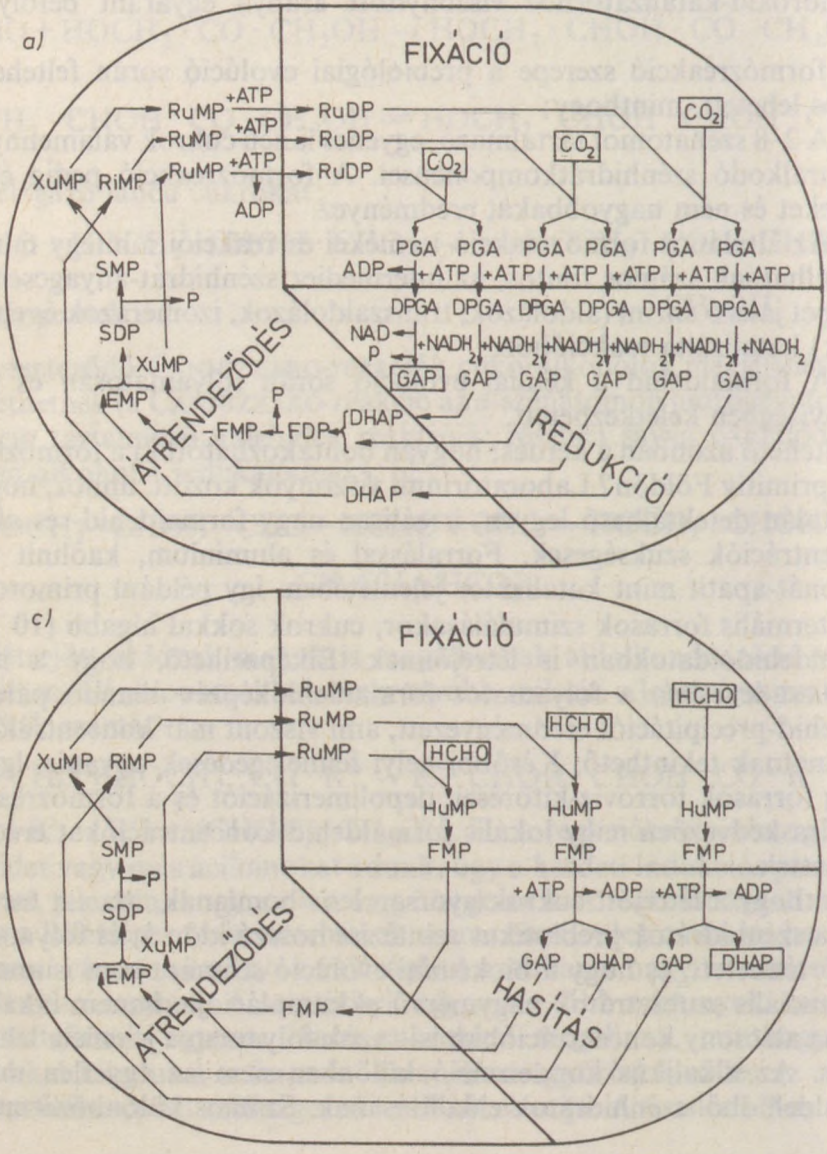
Minthogy a létrejött cukrok gyorsan le is bomlanak, ma azt tartjuk, hogy a szénhidrátok prebiotikus szintézise hosszú időn át és folyamatosan történhetett, és hogy a biokémiai evolúció számára nem is annyira a potenciális szubsztrátok nagymérvű akkumulációja, hanem inkább – még ha alacsony koncentrációban is – azok folyamatos jelenléte lehetett fontos. Az alkalikus kondenzáció különben nem az egyetlen módja formaldehidből szénhidrátok előállításának. Számos különböző cukor,

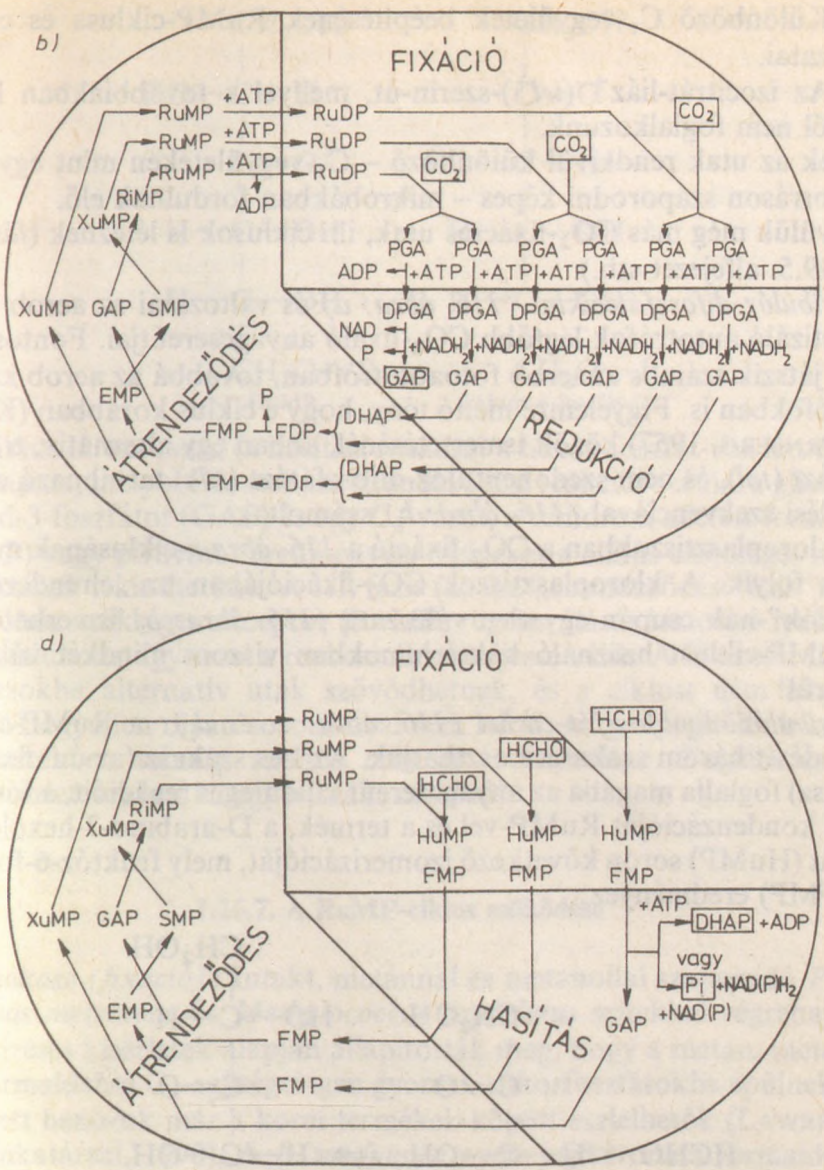
közöttük pentózok, dezoxipentózok és hexózok képződését figyelhették már meg formaldehidtartalmú oldatokban, pl. UV- vagy γ-besugárzás hatására.

1.26.6. A modern RuDP- és RuMP-ciklusok

A C_1-vegyületekből C_3-, ill. C_4-vázak nettó szintézisének jelenleg ismert fontosabb asszimilációs anyagcsereútjai:

1. A CO_2-fixáció ribulóz-difoszfát-ciklusa (RuDP-ciklus) és változatai.





116. ábra

a) A RuDP-ciklus (I). A ciklusban szedoheptulóz-difoszfatáz szerepel, transzaldoláz nem. Rövidítések: DPGA: 1,3-difoszfoglicerát; EMP: eritróz-4-foszfát; SMP: szedoheptulóz-7-foszfát; GMP: glükóz-6-foszfát; XuMP: xilulóz-5-foszfát; NuMP: nukleozid-monofoszfát; 6-PG: 6-foszfoglükonát; Pi: piruvát. *b)* A RuDP-ciklus feltételezett, hipotetikus változata (II). E változatban transzaldoláz szerepel, de szedoheptulóz-difoszfatáz nem. *c)* A RuMP-ciklus (I). Ebben a vázlatban a szedoheptulóz-difoszfatáz és nem transzaldoláz szerepel. *d)* A RuMP-ciklus (II). Ez az elrendeződési változat transzaldolázzal, és nem szedoheptulóz-difoszfatázzal számol. Ez esetben a hexóz-foszfát-váz hasításának két alternatív módja került feltüntetésre, melyekben FDP-aldoláz, ill. KDPG-aldoláz szerepelnek (QUAYLE és FERENCI, 1978)

2. Különböző C_1-vegyületek beépítésének RuMP-ciklusa és ennek változatai.

3. Az izocitrát-liáz$^+$ (*icl*$^+$)-szerin-út, mellyel a továbbiakban közelebbről nem foglalkozunk.

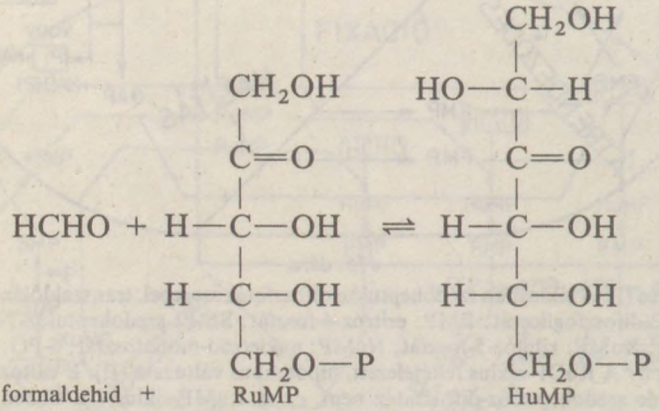
Ezek az utak rendkívül különböző – C_1-vegyületeken mint egyedüli szénforráson szaporodni képes – mikrobákban fordulnak elő.

Kívülük még más CO_2-fixációs utak, ill. ciklusok is léteznek (*lásd* pl. az 1.19.5. alfejezet stb.).

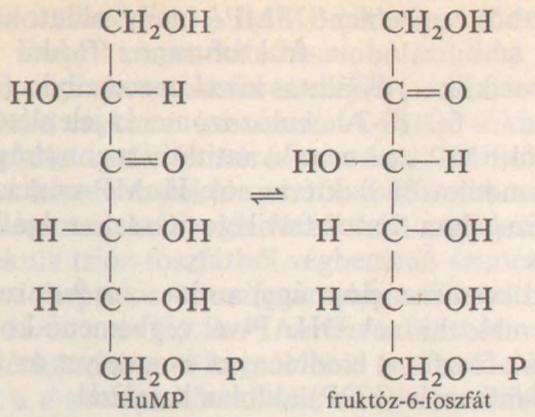
A ribulóz-difoszfát-ciklus (116. ábra: a) és változatai az aerob fotoszintetizáló autotrófok legfőbb CO_2-fixáló anyagcsereútjai. Fontos szerepet játszik számos anaerob fotoautotrófban, továbbá az aerob kemolitotrófokban is. Figyelemre méltó tény, hogy e ciklus korábban (KREBS és KORNBERG, 1957) közölt ismertetésénél, abban egy alternatív, transzaldolázt (*tal*), és nem szedoheptulóz-difoszfatázt (*sda*) tartalmazó elrendeződési szekvenciával *(116. ábra: b)* számoltak.

A kloroplasztiszokban a CO_2-fixáció a *116. ábra a*-ciklusának megfelelően folyik. A kloroplasztiszok CO_2-fixációjában az „elrendeződési reakciók"-nak csupán egyetlen változata *(116. ábra: a)* ismerhető fel. A RuMP-ciklust használó baktériumokban viszont mindkét változat felmerül!

A ribulóz-monofoszfát-ciklus (116. ábra: c. és d.): a RuMP-ciklus működését három szakaszra oszthatjuk. Az I-es szakasz (az ún. fixációs szakasz) foglalja magába az anyagcsereút különleges reakcióit, a formaldehid kondenzációját RuMP-vel és a termék, a D-arabino-3-hexulóz-6-foszfát (HuMP) soron következő izomerizációját, mely fruktóz-6-foszfátot (FMP) eredményez:



(9)



(10)

A ciklus II. szakasza (a hasítási szakasz) a hexóz-foszfát-váz hasítását tartalmazza, mely a III. szakasz elrendeződési reakciói számára glicerinaldehid-3-foszfátot (GAP) és egy C_3-vázat, a dihidroxi-aceton-foszfátot (DHAP) vagy piruvátot eredményez, melyeket a ciklus elsődleges nettó termékeinek tekinthetünk. A III. fázis (az ún. „elrendeződési fázis") a **9.** reakcióhoz szükséges akceptor (RuMP) regenerálását biztosító reakciókat tartalmazza, így ezzel a reakcióciklus teljessé válik. A II-es és a III-as szakaszokba alternatív utak szövődhetnek, és a ciklust nem lehet a reakciók egyetlen olyan sorozatával sem leírni, mely a legkülönbözőbb szervezetekben mindig azonos módon érvényesülne. Foglalkozzunk most részletesebben az egyes szakaszokkal!

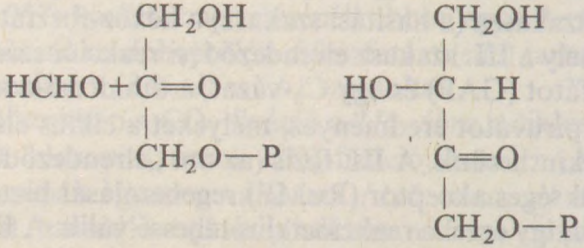
1.26.7. A RuMP-ciklus működése

I-es szakasz (fixáció): Intakt, metánnal és metanollal szaporodó *Pseudomonas methanica* és *Methylococcus capsulatus* sejtekkel végrehajtott ^{14}C-jelzéses kísérletek alapján állapították meg, hogy a metán, metanol és a formaldehid C_1-egységei igen gyorsan cukorfoszfátokba épülnek be, és jelzett hexózok már a korai termékek között észlelhetők (LAWRENCE és munkatársai, 1970). A *P. methanica* nyers sejtkivonata formaldehid beépülését katalizálhatja, melynek során hexóz-foszfát jön létre. A **9**-es reakcióban RuMP az akceptormolekula. A **9**-es reakció termékét e szervezetnél D-eritro-L-glicero-3-hexulóz-6-foszfátként azonosították, egy olyan cukornak, melyet mindezidáig mint biokémiai köztitermékeket még nem észleltek. A *M. capsulatus*ban a **9**-es és a **10**-es reakciókat katalizáló enzimek tisztított készítményeit vizsgálva az akceptor RuMP-nak, a köztitermék HuMP-nek bizonyult. A **9**-es és a **10**-es reakciók egyensúlyi konstansainak kumulatív hatása olyan, hogy a formaldehid-

ből és a RuMP-ből végbemenő FMP- (mely oldatokban főleg mint gyűrűs alakban stabilizálódott fruktofuranóz fordul elő, és eltér a HuMP-től, mely aciklikus) előállítás közel irreverzíbilis folyamat. Tisztított HuMP-szintáz és foszfo-3-hexulóz-izomeráz jelenlétében RuMP-ből és formaldehidből FMP csaknem kvantitatív mennyiségben állt elő.

A különböző metilotróf baktériumok HuMP-szintázainak részletes összehasonlító vizsgálata fontos felvilágosítással szolgálhatna evolúciós kapcsolataikról.

A formaldehid kondenzációja úgy, amint az a **9**-es reakcióban történik, analóg a formaldehidnek DHAP-vel végbemenő kondenzációjával, mely L-eritrulóz-1-foszfátot eredményez és amelyet az izomból előállított fruktóz-1, 6-difoszfát-(FDP) aldoláz katalizál:



(11)

Hasonló reakció megy végbe a patkány májában, továbbá az eritriten szaporodó *Propionibacterium pentosaceum*ban is (WAWSZKIEWICZ és BARKER, 1968 stb.).

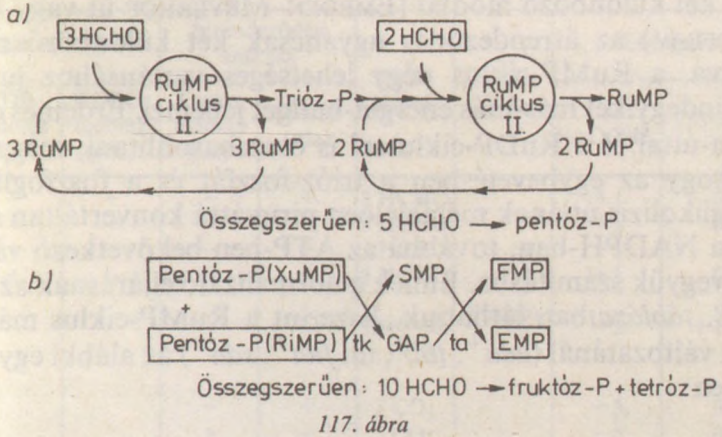
Kevéssé ismerjük a HuMP-izomerázt, azt az enzimet, mely a **10**-es reakciót katalizálja. Specifikus a HuMP és az FMP egymásba alakításáért.

II. szakasz (hasítás): A RuMP-ciklussal rendelkező szervezetek enzimeit tüzetesebben számbavéve merült fel a gondolat, hogy azokban ENTNER–DOUDOROFF-típusú hasítás (*lásd* 511. old.) mehet végbe, vagy a ciklusban a glikolízis anyagcsereútjának egy alternatívája szerepelhet. A metánhasznosító *P. methanica* és *M. capsulatus* baktériumokban valamennyi, az FMP-nek mindkét úton megvalósítható hasításához szükséges enzim egyaránt jelen van. Mindmáig sincs azonban bizonyítékunk arra, hogy ebben a két mikrobában e két út milyen mértékben működik és hogy közülük az egyik a másikkal szemben nincs-e előnyben részesítve. A metanolon szaporodó *Pseudomonas* W 6-törzs csupán az ENTNER–DOUDOROFF-hasítás enzimeit tartalmazza, míg foszfofruktokinázt és FDP-aldolázt nem. Az egyszén-egységeket tartalmazó vegyületeken, pl. trimetil-aminon, metil-aminon, metanolon szaporodó, nem metán hasznosító baktériumokban a RuMP-ciklus enzimeit mutatták ki. Egyikükben sem volt azonban mindkét hasítási út jelen, miként a metán hasznosítókban.

III. szakasz (átrendeződés): A RuMP-ciklusban a formaldehid akceptoraként ható RuMP regenerálódásának, továbbá a CO_2-fixáció RuDP-ciklusában az akceptorként szereplő pentóz-foszfát regenerálódásának problémái csaknem azonosak. A RuDP-ciklusban teoretikailag, az átrendeződési reakcióknak két sorozata, sablonja is számításba vehető, éspedig a három molekula pentóz-foszfátnak vagy egy molekula FMP-ből és három molekula trióz-foszfátból, vagy két molekula FMP-ből és egy molekula trióz-foszfátból végbemenő szintézisét tekintve. Az *a*-sablonban szedoheptulóz-difoszfatáz, míg a *b*-ben transzaldoláz vesz részt *(lásd 116. ábra: a.* és *b.)*. A *P. methanica* és a *M. capsulatus* metánhasznosító baktériumokban a formaldehid asszimilációjánál az elrendeződési reakciók a *d*-sablont követhetik, minthogy ezekben a mikrobákban a transzaldoláz nagy aktivitással van jelen, a szedoheptulóz-difoszfatáz azonban hiányzik. Ugyanez a *d*-sablon érvényesülhet más mikrobákban is. Vannak azonban olyanok is, melyekben a transzaldoláz-aktivitás elhanyagolható mértékű, viszont jelen van a szedoheptulóz-difoszfatáz. Utóbbiak az átrendeződéshez minden bizonnyal a *c*-sablont alkalmazzák.

Az alapvető RuMP-ciklusban, mint az a *116. c.* és *d. ábrák*ról látható, a trióz-foszfát vagy a piruvát (Py) nettó szintézise három molekula formaldehidből történik. Ha azonban a trióz-foszfát reciklizálódik, úgy formaldehidből tetróz-, pentóz- és hexóz-foszfátok nettó szintézise is megvalósulhat *(117. ábra)*. Ennek folytán a RuMP-ciklus a sejtfal, az aromás aminosavak, a nukleinsavak és a poliszacharidok szintéziséhez szükséges szénhidrátvázakat állíthat elő.

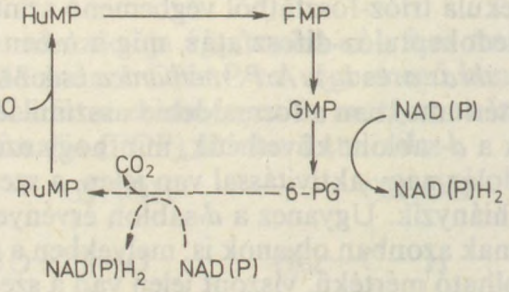
A fentebb tárgyalt asszimilációs anyagcsereutak enzimei közül számos a formaldehid → szén-dioxid oxidációs ciklusban *(118. ábra)* is részt



117. ábra

Tetróz, pentóz és hexóz nettó szintézise a RuMP-ciklusban (QUAYLE és FERENCI, 1978)

vesz. Ebben a disszimilációs ciklusban szereplő további enzim a foszfoglükonát-dehidrogenáz, melyet már a *P. methanica*ban, a *M. capsulatus*ban és több más mikrobában is kimutattak. Egyes mikrobák a formaldehid és a formiát direkt oxidációjára alternatív enzimekkel rendelkeznek. A disszimilációs ciklusnak feltehetően, azon mikrobák energiaellátásában lehet közvetlen szerepe, melyek, bár az oxidációs ciklus vala-



118. ábra

A formaldehid-oxidáció disszimilációs ciklusa. A szaggatott vonalak azt az egyetlen lépést mutatják, mely kiegészítésként járul azokhoz, melyek különben az asszimilációs ciklusban is részt vesznek (QUAYLE és FERENCI, 1978)

mennyi enzimével rendelkeznek, formaldehid- és formiát-dehidrogenázzal azonban nem. Az ilyen baktériumokban szokatlanul magas NADPH-oxidázszint észlelhető.

1.26.8. A RuMP-ciklus négy lehetséges variánsa

A hasítás két különböző módját (EMBDEN–MEYERHOF-út vagy ENTNER–DOUDOROFF-út) az átrendeződés ugyancsak két különböző módjával kombinálva, a RuMP-ciklus négy lehetséges variánsához juthatunk, melyek mindegyikét más-más energia-budget jellemzi. Érdemes ezeket az icl^+-szerin-úttal és a RuDP-ciklussal is összehasonlítani, mégpedig oly módon, hogy az egybevetésben a trióz-foszfát és a foszfoglicerinsav (PGA) a glikolízis útjának megfelelően piruváttá konvertáltan szerepeljenek, és a NADPH-ban, továbbá az ATP-ben bekövetkező változásokat is így vegyük számításba. Ennek a normalizáló eljárásnak az eredményeit a *28. táblázat*ban láthatjuk. Eszerint a RuMP-ciklus második és harmadik változatánál (eda^+, tal^+, ill. fda^+, sda^+) az alábbi egyenletnek megfelelően:

$$3\,CH_2O + NAD(P) \rightarrow \text{piruvát} + NAD(P)H_2 \qquad (12)$$

nettó ATP-változás nincs. Ezzel szemben a negyedik változatnál (*fda*$^+$, *tal*$^+$)

$$3\,CH_2O + NADP + ADP + Pi \rightarrow \text{piruvát} + NAD(P)H_2 + ATP \quad \textbf{(13)}$$

(Pi: anorganikus ortofoszfát), az anyagcsereút formaldehidből piroszőlősav exergonikus szintézisét teszi lehetővé, mely megoldás egyúttal a C_1-asszimilációs szekvenciák között egyedülálló. Ezzel a változattal a formaldehid laktáttá fermentálása elméleti úton is energiaszolgáltató lehet:

$$3\,CH_2O + ADP + Pi \rightarrow \text{laktát} + ATP \quad \textbf{(14)}$$

A RuMP-, az *icl*$^+$-szerin- és a RuDP-ciklusok energetikájának ez az összehasonlítása azt mutatja, hogy az asszimilációs folyamatban C_1-egységként, inkább a szén-dioxidot mint a formaldehidet hasznosító szervezetek energetikai kiadásai a nagyobbak. E számításokat a gyakorlat igazolja: GOLDBERG és munkatársai (1978) nyolc, C_1-vegyületeken szaporodni képes baktériumfaj növekedéshozamát *(growth yields)* mérték. A RuMP-ciklust használó baktériumoknál a metanol esetében kapott moláris növekedéshozam 17,44%-kal magasabb volt, mint azoké, melyek a szerin-utat használták. Előreláthatóan az *eda*$^+$/*sda*$^+$ változat nagy energiaigénye miatt aligha lehet gyakori, ha ilyen a természetben egyáltalán előfordul. Nem meglepő, hogy mindmáig ennek megfelelő enzimprofillal rendelkező mikrobát még egyáltalán nem izoláltak. A fennmaradó másik három változat működtetéséhez szükséges enzimeket már igen különböző mikrobákból írták le.

28. táblázat

Piruvátprodukcióra normalizált C_1-asszimilációs utak energia-budgetjei (QUAYLE és FERENCI, 1978)

Ciklus	Hasítási szakasz		Átrendeződési szakasz		Reaktánsok	Termékek	Energiaváltozás		
	FDP-aldoláz (fda)	KDPG-aldoláz (eda)	Transz aldoláz (tal)	SDPáz (sda)			Δ $NAD(P)H_2$	ΔFPH_2	ΔATP
RuMP	−	+	−	+	3 HCHO		+1	0	−3
	−	+	+	−	3 HCHO		+1	0	0
	+	−	−	+	3 HCHO		+1	0	0
	+	−	+	−	3 HCHO		+1	0	+1
icl$^+$-szerin					2 HCHO + 1 CO_2	Piruvát	−2	+1	−2
RuDP			−	+	3 CO_2		−5	0	−7
			+	−	3 CO_2		−5	0	−7

A RuMP-ciklus változatai a bakteriális szénhidrát-anyagcsere jóformán minden útjával szorosan kapcsolódnak. Formaldehidnek mint egyedüli bevételi molekulának a segítségével, a nettó bioszintézisek minimális vagy nulla energiafelvétellel folyhatnak, sőt bizonyos esetekben energialeadás észlelhető! Lényegében ezek azok a tulajdonságok, ami miatt e ciklusnak a biokémiai evolúcióban megkülönböztetett fontosságot tulajdoníthatunk.

1.26.9. Az ősi szénhidrát-anyagcsere

Mint láthattuk, a szénhidrátok prebiotikus szintézise a formóz-reakcióhálózat keretében bontakozhatott ki. A kezdeti szénhidrátkeverékből kiinduló szénhidrát-anyagcsere biokémiai evolúciójára két fontos tényező is szelekciós nyomást gyakorolhatott:

1. Először is, minthogy a nukleinsavak saját replikációjukat már eleve kódolták, a nukleinsav-prekurzorok iránti igény és a tisztán kémiai úton létrejött nukleotidok iránti kereslet állandóan fokozódhatott. Ez viszont fokozott pentózelvonással is párosult akkor, amikor a nukleozid-foszfát-szintézis katalizátorai kifejlődtek.

2. A második tényező a makromolekuláris szintézisek endergonikus természetéből fakad, és a primitív sejt számára szükséges energiaforrások kifejlesztésével kapcsolatos. E tekintetben a glikolízis szubsztrát szintű foszforilációs lépései olyannyira egyszerű jellegűek, hogy feltételezhetően a legkorábbi biológiai energiatranszdukciós rendszerek között szerepelhettek. A szénhidrát-fermentáció már nagyon korán kibontakozó anyagcsereútjai tehát ugyancsak erőteljes igényt támaszthattak az abiotikus úton előállított szénhidrátokra.

A nukleinsav-szintézisek egyre fokozódó pentózigénye olyan enzimek megjelenését segíthette elő, melyek a rendelkezésre álló prekurzorokból (cukrok vagy cukorfoszfátok) a pentózok és a pentóz-foszfátok produkcióját meggyorsították. A „formózhálózatban" fellépő reakciók számos cukor, közöttük pentózok egymásba alakítását eredményezik és templátként szolgálhattak azoknak a reakcióknak, melyeket ma szélesen elterjedt aldolázok, transzaldolázok, epimerázok és izomerázok katalizálnak. Ezeknek az egymásba alakításoknak a kémiai mechanizmusa alapvetően mit sem változik, ha a cukrokat cukorfoszfátok helyettesítik. Ma már számos olyan enzimet ismerünk, melyek inkább hatnak a szabad cukrokra, mintsem foszfátjaikra. Tény, hogy a cukroknak anorganikus foszfáttal végbemenő direkt foszforilációs reakciói

$$\text{cukor} + H_3PO_4 \rightarrow \text{cukorfoszfát} + H_2O \qquad (15)$$

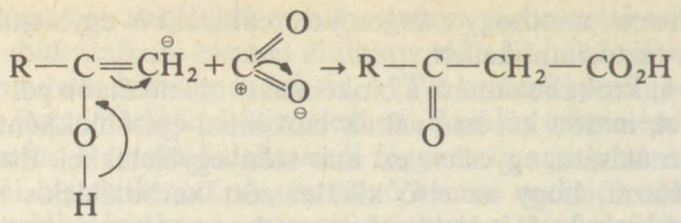
$$2\,H_3PO_4 \rightarrow H_2O_3P\text{-}O\text{-}PO_3H_2 + H_2O \qquad (16)$$

nem tűnnek könnyen kivitelezhetőnek, különösen nem, ha figyelembe vesszük, hogy ezekhez vizes oldatokban is reaktív vízelvonó ágensek jelenléte szükséges. Mindenesetre ennek is megvoltak a lehetőségei, amint azt fentebb láthattuk (*lásd* a cianid/karbodi-imid problémakört). Ezenkívül ha pl. adenin, ribóz és metafoszfát oldatát UV-sugárzásnak vetik alá, AMP, ADP és ATP stb. jön létre. Amint nőtt egykoron az ősi primitív szervezetek száma, úgy csökkent környezetükben a kémiai úton előállított monomerek mennyisége, ami biokémiai szintéziseket tett szükségessé. Az endergonikus bioszintéziseknek viszont exergonikus reakciókkal kellett összekapcsolódniok. A megoldást a pirofoszfátkötések jelentették, melyek uralkodó biokémiai–energetikai „fizetőeszközzé" váltak. A pirofoszfátkötés iránti igényt kielégítő legegyszerűbb mechanizmus a szubsztrát szintű foszforiláció evolúciójával született meg, mely alternatív azokkal a sokkal bonyolultabb és később tökéletesedett energiatranszdukciós mechanizmusokkal, melyeknél az elektrontranszport foszforilációval kapcsolódik. Az utóbbiak azonban protonimpermeabilis membránokat igényelnek (*lásd* 1.16.21. alfejezet), melyek viszont a heterotrófok szubsztrátpermeabilitását akadályozzák, jóllehet ezek a szervezetek a szubsztrátok széles skálájának felvételére utaltak. Bár a szubsztrát szintű foszforiláció elméletileg bármely aldehid–karboxilát átalakításon kifejlődhetett, mégis a több mint négy szénatomot tartalmazó aldózfoszfátok gyűrűképzése ezeket templát minőségében sokkal kevéssé tehette alkalmassá, mint a GAP-ot, mely szükségszerűen aciklikus és ennélfogva aldehid. A GAP dehidrogénezése a pirofoszfát kötési energiaforrásául szolgált, és e ponton a primitív szénhidrát-anyagcserében fontos szubsztrát szintű foszforilációs megoldást jelenthetett. A létrejött foszfoglicerátmolekula a biokémiai evolúció útján további rendkívül fontos lépések felé vezethetett, amennyiben izomerációja és dehidratációja foszfopiruváttá egy másik, szubsztrát szintű, nagy energiájú kötést eredményezett.

A ribulóz-monofoszfát-ciklus ősi, primitív anyagcsereút. A prebiotikus cukorkészletek kimerülésekor a glükóz neogenezise a glikolízis útján visszafelé haladva is végbemehetett. Ez az út azonban ATP-t és a glükózneogenezis szubsztrátjait is igényli.

1.26.10. A RuMP-ciklus megjelenését eredményező egykori környezeti stresszhatások

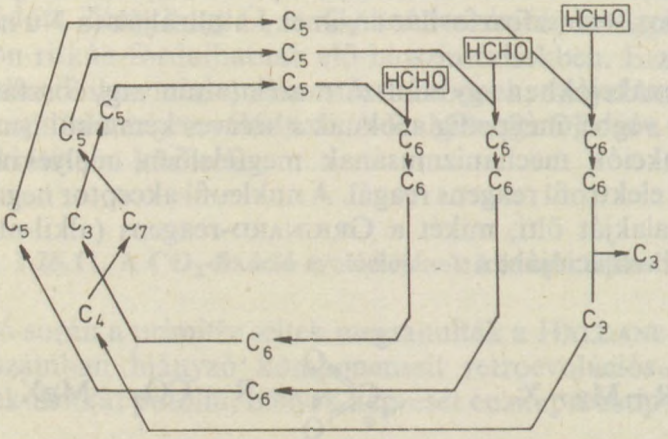
A környezet krónikus cukorhiányát QUAYLE és FERENCI (1978) szerint napjaink RuMP-ciklusához hasonló ősi anyagcsereút kompenzálhatta, mely formaldehidből nettó cukorszintézist valósított meg. A RuMP-



(23)

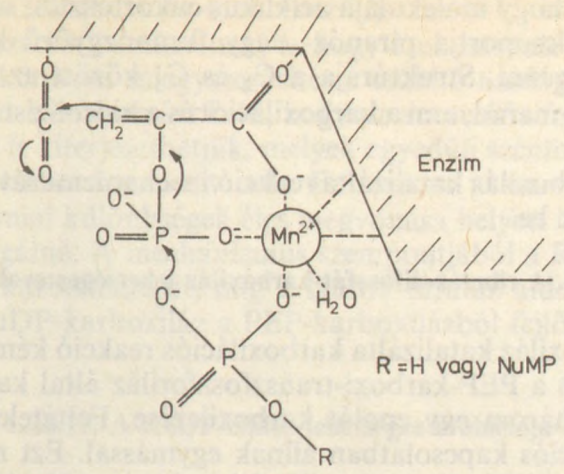
A PEP-karboxikinázzal és a PEP-karboxi-transzfoszforilázzal működő reakciók mechanizmusa feltehetően a **23**-as reakciót követi *(120. ábra)*. A PEP-karboxiláz reakciómechanizmusa valamivel eltérő lehet, minthogy itt a reaktív rész a hidrogén-karbonát-ion és nem a szén-dioxid. A karboxiláció „aktív szubsztrátja" után nyomozva tehát az enolstruktúrára kell figyelnünk, minthogy ezzel a reakció spontán, plusz energiaforrás igénye nélkül megy végbe. Láthattuk, hogy a PEP a glikolízis primitív megoldásai során köztitermékként jöhetett létre és különösen előnyös vegyületnek bizonyult, mivel részvételével egy további szubsztrát szintű foszforiláció valósulhatott meg. A PEP spontán karboxilezése C_4-vázat szolgáltathatott, melyből azután számos, más fontos biokémiai köztitermék szintézise mehetett végbe (pl. az aszpartátcsalád aminosavai). Ezért tehát igen erős evolúciós nyomás serkenthette annak a katalizátornak kifejlődését, amely ezt a spontán karboxilációt felgyorsította, és éppen ezért feltehető, hogy a PEP-et karboxilező enzimek családja nagyon régi lehet.

A harmadik, enzim katalizálta karboxilációs reakció a RuDP karboxilezése. E vegyületnek a karboxiláció iránti reaktivitása annak a ténynek



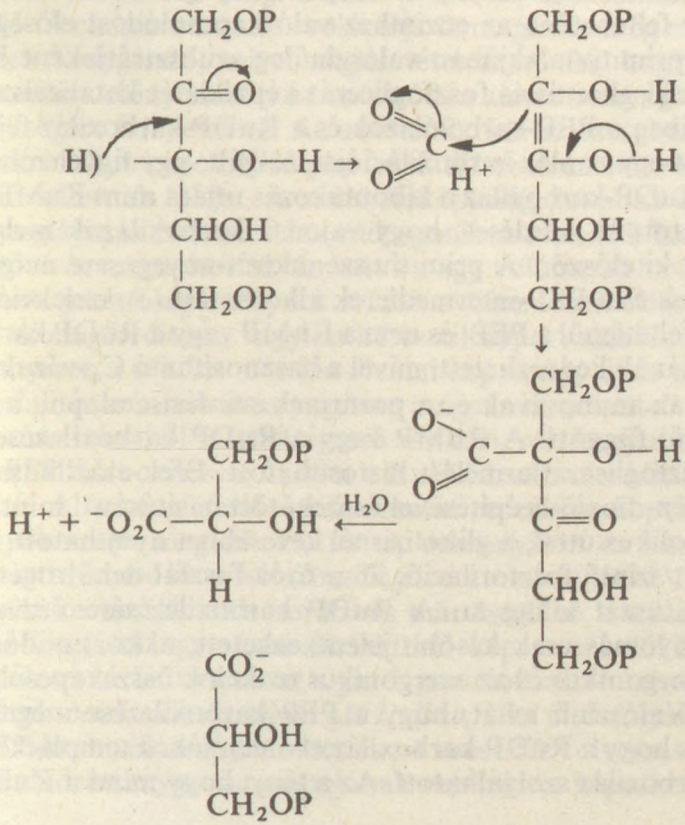
119. ábra

A formóz-reakcióhálózatban részt vevő kémiai reakciókból származtatott reakcióhálózat (QUAYLE és FERENCI, 1978)



120. ábra

A PEP-karboxi-kináz és a PEP-karboxi-transzfoszforiláz révén katalizált reakció mechanizmusa (QUAYLE és FERENCI, 1978)



tulajdonítható, hogy molekulája aciklikus cukorfoszfát, ugyanis a szén-dioxid karbonilcsoportja piranóz- vagy furanózgyűrű kialakításában nem tud részt venni. Struktúrája a C_2 és C_3 között az enediolképzés számára nyitott marad, ami a karboxilációt és a hidrolízist teszi kivitelezhetővé.

A RuDP-karboxiláz katalizálta reakció mechanizmusát a 427. oldalon (lenn) mutatjuk be.

1.26.12. A ribulóz-difoszfát-karboxiláz lehetséges evolúciója

A RuDP-karboxiláz katalizálta karboxilációs reakció kémiailag, a PEP-karboxikináz és a PEP-karboxi-transzfoszforiláz által katalizáltakéhoz hasonló: mindhárom egy enolát karboxilezése. Feltételezhető, hogy e reakciók evolúciós kapcsolatban állnak egymással. Ezt nyomozva először is a ribulóz-difoszfát-karboxiláz lehetséges evolúciójával foglalkozunk.

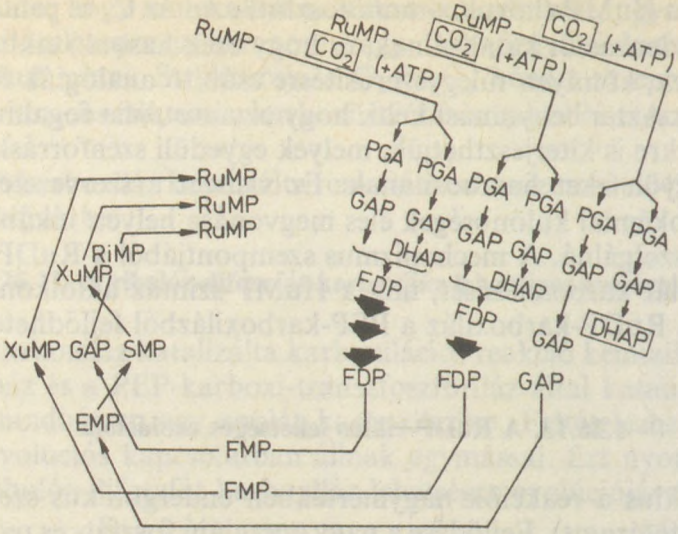
A RuDP-nek mint a karboxiláció szubsztrátjának lényeges strukturális tulajdonsága, hogy aciklikus, amiért a C_5-ön lévő foszfátcsoport a felelős. A C_1-en lokalizált foszfátcsoport lényeges kémiai szerepet nem játszik, bár feltehetően az enzimhez való kapcsolódást elősegíti. Ez az enzim ősi, primitív alakjában valószínűleg szubsztrátjaként RuMP-vel fejlődhetett ki glicerát és foszfoglicerát képződését katalizálva.

Amennyiben a PEP-karboxilázok és a RuDP-karboxiláz fejlődéséhez templátként egy enolát karboxilációja szolgált, úgy figyelembe véve azt is, hogy a RuDP-karboxiláz a kibontakozás útjára mint RuMP-karboxiláz indulhatott el, kérdéses, hogy vajon a karboxilázok melyik típusa fejlődhetett ki először. A primitív szénhidrát-anyagcsere magját a pentóz-foszfátok és a PEP-intermedierek alkothatták. A szelekciós nyomás kezdetben feltétlenül a PEP, és nem a RuMP vagy a RuDP karboxilációja evolúciójának kedvezhetett, mivel a hasznosítható C_4-vázak evolúciója, melyen az aminosavak és a porfirinek szintézise alapul, a PEP karboxilezésétől függött. A RuMP vagy a RuDP karboxilezése glicerát- és/vagy foszfogliceráttermelést biztosíthatott. Ezek előállítása azonban a pentóz szén-dioxid beépítésével összekötött hasításával mint potenciálisan katabolikus úttal, a glikolízisnél kevesebbet nyújthatott, minthogy a szubsztrát szintű foszforiláció, ill. a trióz-foszfát dehidrogénezése potenciális szituszát kihagyta. A RuDP karboxilezésére nézve kedvező szelekciós nyomás csak később jelentkezhetett, akkor, midőn a sejtek már az endergonikus és az exergonikus reakciók összekapcsolását kifejlesztették. Valószínű tehát, hogy a PEP karboxilezése megelőzhette a RuDP-ét és hogy a RuDP-karboxiláz evolúciójához templátként, primitív PEP-karboxiláz szolgálhatott. Az a tény, hogy mind a RuDP-karbo-

xiláz, mind a HuMP-(hexulóz-monofoszfát)-szintáz C_1 és pentóz-foszfát közötti kondenzációt katalizálnak, és hogy ezek hasonló ciklusokban a kulcsenzimek, könnyen túlegyszerűsítésre csábító analógiák feltételezésére késztet. Azt a benyomást kelti, hogy az autotrófia fogalmát azokra a szervezetekre is kiterjeszthetjük, melyek egyedüli szénforrásként redukált C_1-vegyületeket hasznosítanak. Ez viszont a szervezetek közötti alapvető biokémiai különbségek éles megvonása helyett inkább a ködösítés ügyét szolgálná. A mechanizmus szempontjából a RuDP-karboxiláz egy enolát karboxilezését, míg a HuMP-szintáz aldolkondenzációt katalizál. A RuDP-karboxiláz a PEP-karboxilázból fejlődhetett ki.

1.26.13. A RuDP-ciklus lehetséges evolúciója

A RuDP-ciklus a reakciók nagymértékben endergonikus szekvenciája (*lásd* a *28. táblázat*ot). Fejlődése a nagy energiájú foszfát- és redukálóképesség-ellátástól függhetett. A redukáló környezet már eleve rendelkezésre állhatott, az első azonban csak a biokémiai evolúció hosszabb szakasza után jelenhetett meg. Ehhez a szerves szubsztráthoz kötött foszforiláció mechanizmusának evolúciója önmagában még semmi esetre sem lehetett elegendő, mivel aligha tételezhető fel, hogy valamely szervezet számára előnyös lehet az autotrófián alapuló anyagcserét heterotrófia költségére kifejleszteni. Az autotrófia felé az exergonikus anorganikus reakciókhoz kapcsolódó pirofoszfátkötések szintézise és a fotofoszforiláció adhattak lökést. A redukálóképesség, továbbá a pirofoszfátkötés energiájának hasznosítása endergonikus reakciók katalizálását tették lehetővé és megnyitották az utat a nagy volumenű bioszintézisek felé. Központi jelentőségű ténynek számít a trióz-foszfát-dehidrogenáz aktivitásának megfordítása, vagyis a karboxilcsoport aldehiddé redukálása. Amennyiben a sejt ezt már katalizálni képes, úgy új út nyílik meg, melyen a primitív szénhidrát-anyagcsere magvának „etetése" formaldehid helyett más irányból is lehetségessé válik. Arról, hogy a szelekció a fejlődést a PEP karboxilezése és nem a RuDP karboxilezése felé terelte, már volt szó. A foszfoglicerát→trióz-foszfát redukálás képessége ezt a helyzetet gyökeresen megváltoztathatta, amennyiben ez két folyamat áthidalását tette lehetővé: a két (foszfo)glicerátmolekulát előállító ribulóz-(di)foszfát karboxilációt a korábban már meglévő, a trióz-foszfátot és a pentóz-foszfátot egymásba átalakítani képes reakciókkal. Ez az áthidalás szélesre tárhatta az utat a gazdagon előforduló szén-dioxidból a szénhidrátok nettó szintéziséhez *(121. ábra)*. Az első folyamat templátjait a PEP-karboxilázok jelenthették; a második folyamat viszont a primitív szénhidrát-anyagcsere magjának már részét képezhette.



121. ábra

A RuDP-ciklus lehetséges evolúciója (QUAYLE és FERENCI, 1978)

Amennyiben a primitív karboxiláz szubsztrátja RuDP helyett RuMP volt, úgy abból a célból, hogy a szénhidrát-anyagcsere fő hálózatába mindkét glicerátváz visszatérhessen, egy glicerátmolekulát szükségszerűen foszforilálni kellett. Az ilyen, a CO_2-fixáció RuMP-ciklusának nevezhető ciklus energetikája a RuDP-ciklusáéval azonos lehetett, ahol viszont a szükséges foszforiláció már pentóz-foszfáttal mint szubsztráttal történt. A RuDP-nek mint a karboxiláció szubsztrátjának végső szelekcióját a ciklus regulációja bontakoztatta ki, melynek során e pentózfoszfát foszforilációja előnyösebbnek bizonyult. Hasonlóan, a *116. ábra a*-változatán bemutatott folyamatok későbbi előtérbe kerülését az az előnyük biztosíthatta, hogy e ciklusban az ellenőrzés központjában egy másik irreverzíbilis enzim is van. Jól ismert, hogy a kloroplasztiszban a ciklus ellenőrzése a RuDP-karboxiláz, a foszforibulokináz és a fruktóz-1,6-difoszfatáz modulációjával történik.

Az első fotoszintetizáló baktériumok anaerobok voltak és a nagyenergiájú foszfátok előállítására a ciklikus fotofoszforilációhoz hasonló rendszert használhattak. A fotoszintézishez szükséges redukálóképesség elektron-forrása a primitív környezet nagyszámú redukáló ágenseinek soraiból került elő. A redukálóképesség előállítását szolgáló nem ciklikus elektrontranszport bakteriális változata kis mutációs lépések során át fokozatosan haladhatott a redoxiskála egyre negatívabb szakaszai felé, minthogy a hidrogénmentes környezetben egyre hatékonyabb re-

duktánsok iránti igény jelentkezett. Az elektronok visszatartása redukció céljaira az elektrondonor vegyületek, így a szulfid és az ammónia szulfáttá és nitráttá történő oxidációját eredményezhette. Az adaptáció ez irányú kibontakozása végül is a biokémiai evolúció egyik legnagyobb előnyt biztosító lépéséhez, a víz oxigénfelszabadulással járó biológiai fotolíziséhez vezetett.

1.26.14. Az eredendően autotróf és alkalomszerűen metilotróf szervezetek

Napjainkban már a redukált C_1-vegyületek autotróf (!) hasznosítása terén is érdekes megállapításokra jutottak. Egyes mikrobák a jelentős mérvű energetikai kiadások ellenére is a redukált C_1-vegyületek asszimilációját a szén-dioxiddá történő oxidálás és az így nyert szén-dioxid autotróf fixálásának kerülő útján valósítják meg. Ilyen mikroorganizmusok pl.: *Alcaligenes* FOR 1; a *Pseudomonas oxalaticus* és a *Thiobacillus novellus* formiáton végbemenő aerob szaporodás alkalmával; a *Rhodopseudomonas palustris* formiáton fotoszintetikus szaporodás alkalmával; a *Micrococcus denitrificans* metanolon aerob körülmények között szaporodva és a *Rhodopseudomonas acidophila* metanolon fotoszintézissel szaporodva. Az első kivételével ezek a szervezetek fakultatív autotrófok, és lehetséges, hogy miután szert tettek a C_1-vegyületek oxidálásának képességére, ezzel egyúttal már újabb enzimek megszerzése nélkül is azokon mint egyedüli szénforráson szaporodni is képessé váltak. Táplálkozási sokoldalúság érhető így el extra enzimek szintézisének csekély költségével, ami feltehetően kiegyensúlyozza azt a hátrányt, ami az energetikailag kedvezőtlen út használatából származik. Ezek a mikrobák valószínűen „eredendően" autotrófok és „alkalomszerűen" metilotrófok. Gyaníthatóan sok autotróf rendelkezhet ilyen anyagcserével.

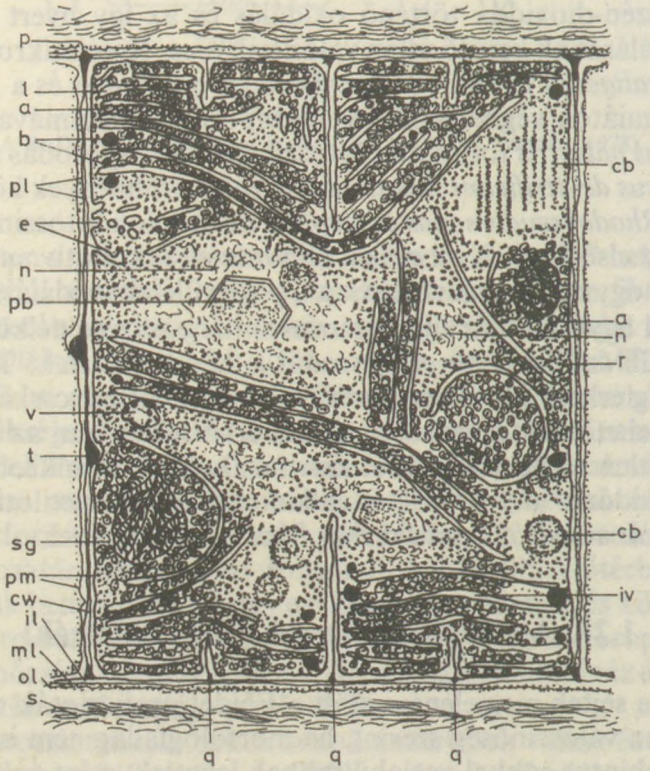
1.27. A cianobaktériumok (kék-zöldalgák)

Az eukariota sejtek megjelenése előtt a Földet prokarioták népesítették be, és minden valószínűség szerint, ha morfológiailag nem is, de anyagcseréjüket tekintve sokkal variabilisabbak lehettek, mint eukariota utódaik (Schopf, 1978). A modern prokariotákhoz hasonlóan az ősi fajok oxigéntoleranciája is széles skálán ingadozhatott. Sokoldalú és kiterjedt vizsgálatok eredményei teszik ma már valószínűvé, hogy a prokarioták egy csoportja, a cianobaktériumok, a prekambiumban különös fontosságra tettek szert és minden jel szerint az oxigéngazdag légkör létrejöttéért is ők a felelősek. Minthogy ezek a szervezetek a bioszférában ma is

fontos szerepet töltenek be – így pl. a vizekben az N_2-fixálók legjelentősebb képviselői –, egykori szerepük behatóbb mérlegelése megkívánja, hogy mai modern alakjaikkal közelebbről megismerkedjünk.

1.27.1. A cianobaktériumok mint prokarioták

A cianobaktériumok vagy más nevükön kék-zöldalgák a fosszilis leletek tanúsága szerint a korai prekambriumban jöttek létre és a középső prekambriumban váltak gyakoriakká. Ma az egész világon előfordulnak. Az Arktisz és az Antarktisz területein a fő nitrogénkötők. A mérsékelt égöv talajaiban kevéssé jelentős nitrogénkötők, azonban egyes óceá-



122. ábra

A *Symploca muscorum* (cianobaktérium) egy sejtje elektronoptikai hosszmetszetének vázlata. a,b: különböző szemcsék; cb: cilindrikus testecskék; cw: keresztfal; e: a plazmamembrán nyúlványai; il, ml, ol: a sejtfal rétegei; l: fotoszintetikusan aktív lamellák, melyek korongokat (iv) képeznek; n: nukleoplazma; p: pórusok a külső sejtfalban; pb: sokszögű testecskék; pl: a szomszédos sejtek plazmatikus összeköttetései (plazmodezmák); pm: plazmamembrán (plazmalemma); q: falképződmény; r: riboszómák; s: hüvely; sg: strukturált szemcse; t: a keresztfal megvastagodása; v: vakuolaszerű képződmény (Fott, 1971)

ni régiókban, sivatagokban, homokdűnéken, szűztalajokban és különösen a trópusi övezetben, ahol mint a rizsföldek nitrogénszükségletének utánpótlói felbecsülhetetlen gazdasági jelentőségűek. Tipikus prokarioták *(122. ábra)*. Nincs nukleáris membránjuk, sejtjeikben a DNS-hez nem csatlakoznak hisztonok. Nincsen sem kloroplasztiszuk, sem mitokondriumuk. Membránjaikban szterinek nem mutathatók ki. Sejtfaluk strukturális merevségét, miként a baktériumoknál, peptidoglikán biztosítja. Ezért penicillinnel szemben érzékenyek. Ha mozognak, úgy azt nem csillókkal, hanem sajátos csúszómechanizmussal teszik. Hasonlóan a mixobaktériumokhoz, csúszkálni csupán szilárd felületeken tudnak. Feltételezik, hogy e mozgásmód a mixobaktériumokéval lehet azonos. Lehetséges, hogy a cianobaktériumok *Cytophaga*-szerű (GRAM-negatív, pálcika alakú, hormogoniumot, gonídiumot vagy kitartó sejteket képező kemolitotróf vagy mixotróf, csúszómozgással haladó szervezetek) ősöktől származnak. A sejtjeikben tapasztalható differenciálódás előrehaladottabb volta egyesek szerint annak tulajdonítható, hogy vízi élőhelyekhez adaptáltak, nem úgy, mint a mixobaktériumok, melyek szárazföldi cönózisok tagjaivá fejlődtek. A prokarioták között a legkomplexebb életciklussal rendelkeznek, és rendszerezésüknél ezt, továbbá sejtjeik strukturális felépítését veszik elsősorban is tekintetbe.

1.27.2. A cianobaktériumok rokonai a prokarioták körében

A cianobaktériumok mai rokonait kutatva a *Beggiatoaceae* és a *Leucotrichaceae* családok képviselőit is megemlíthetjük. Ezek a cianobaktériumok alakmásai (*29. táblázat*; LEVY és munkatársai, 1973). Közöttük a *Beggiatoa* és a *Thiothrix* állítólag kemoautotrófok, melyek redukált kénvegyületek oxidálásával nyernek energiát. Tény azonban, hogy bioszintézisükhöz elsősorban is redukált szénvegyületekre van szükségük.

29. táblázat

A cianobaktériumok és nem fotoszintetizáló alakmásaik néhány hasonló morfológiai és anyagcserebélyege

Cianobaktériumok (Kék-zöldalgák)	Nem fotoszintetizáló csúszással mozgó alakmásaik	A szubsztrát, melyet valamennyien oxidálnak	Jellemvonások
Oscillatoria	*Beggiatoa*	Redukált kén	Mozgó fonalak,
	Vitreoscilla	Redukált szén	hormogóniumok
Rivularia	*Thiothrix*	Redukált kén	Nem mozgó fonalak, mozgó gonídiumok, rozetták, életciklus, csúcsi differenciálódás
	Leucothrix	Redukált szén	

Más genuszok biztosan heterotrófok. Valamennyi fonalas és aerob. Vízi és iszapbiotópokban élnek. A *Leucothrix*nek már életciklusa is van. Fonalai csúcsáról mozgó, csúszósejtek válnak szabaddá. Ezek vándorolnak, „rozettát" alkotnak és új fonallá nőnek ki. Lehetséges, hogy ezek színtelen cianobaktériumok (kék-zöldalgák).

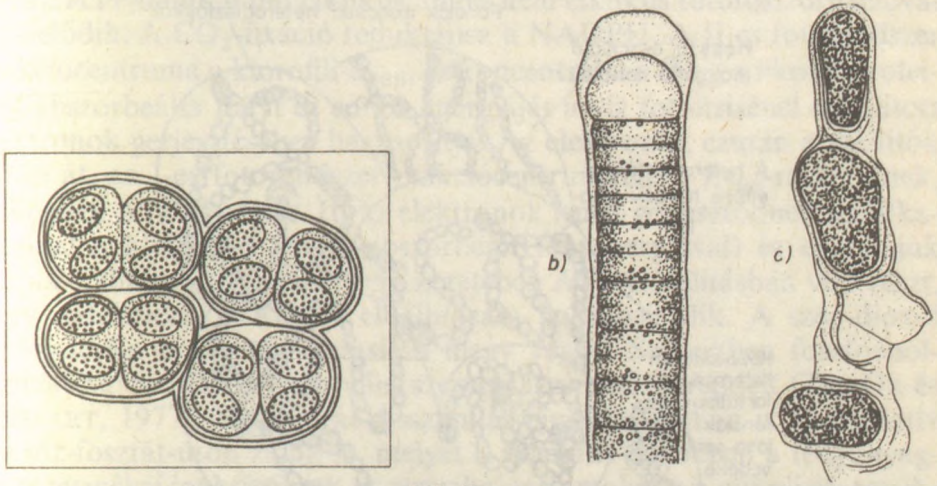
A cianobaktériumok és a GRAM-negatív baktériumok közötti rokonsági kapcsolatokra világítanak rá a sejtfalstruktúrájukon végzett összehasonlító vizsgálatok is (GOLECKI, 1977). A kék-zöldalgáknak tipikus GRAM-negatív sejtfalszerkezete van (ALLEN, 1968; GOLECKI és DREWS, 1974). A GRAM-negatív sejtfalra jellemző lipopoliszacharidokat, proteineket és peptidoglikánt a cianobaktériumokban is kimutatták. Az *Anacystis nodulans* sejtfalának külső membránját fenol/víz-, ill. SDS-extrakcióval szolubilizálták. Az SDS-kivonatban poliakril-amid-gélelektroforézissel 31 komponenst különítettek el (GOLECKI, 1977), közöttük 3–5 nagyobb proteint, melyek molekulasúlya megközelítően 60, 40, ill. 10 kdalton volt. Az *Anacystis*-sejtfal néhány polipeptidje, mobilitását tekintve, különböző GRAM-negatív baktériumok sejtfalából extrahált polipeptidekkel volt összehasonlítható. Az SDS-oldhatatlan elektronsűrű falréteg *(sacculi)* tipikus peptidoglikán-komponenseket, így diaminopimelinsavat, muraminsavat, glutaminsavat, glükóz-amint és alanint tartalmazott, mégpedig 1,0 : 0,9 : 1,1 : 1,5 : 1,9 moláris arányban. Érdekes, hogy az *Anacystis* peptidoglikán-frakciójában a mannóz-amin viszonylag nagy mennyiségét észlelték. A mannóz-amin tehát nem a lipopoliszacharid-rétegben fordul elő. A mannóz-amin kis mennyiségét egyébként már a *Micrococcus lysodeiktus* peptidoglikánjában is kimutatták, ahol mannomuraminsavból volt származtatható. A falat kívülről poliszacharidhüvely zárhatja körül. Belülről a falhoz a citoplazmamembrán csatlakozik, mely a protoplazmát, benne a fotoszintetikus tilakoidokat és a DNS-tartalmú nukleoplazmát övezi *(lásd 122. ábra)*.

1.27.3. A cianobaktériumok funkcionális anatómiája

A cianobaktériumok DNS-ében a guanin + citozin bázistartalom széles skálán ingadozik, és ennek intervalluma (35–71%) csak kissé szűkebb, mint valamennyi prokariotánál együttvéve. Extrém rezisztenciájuk a mutagénekkel és sugárzási károsodásokkal szemben, legalábbis bizonyos cianobaktériumoknál, annak tudható be, hogy a sejtekben a genomnak egynél több másolata van jelen (STEWART, 1978). Sejtjeikben 70 S riboszómák vannak, továbbá membránkötődésű karboxiszómák (poliéderes testek), melyek a CALVIN-ciklus karboxiláló enzimét, a ribulóz 1,5-difoszfát-karboxilázt tartalmazzák. Ezenkívül még megfigyelhe-

tünk szerkezetes szemcséket (az aszparaginsav és az arginin kopolimerjei, melyek a tartalék nitrogénforrás szerepét töltik be), poliglükozidgranulumokat, melyek az intertilakoidális térben helyezkednek el és tartalékszénhidrátok, végül foszfortartalék polifoszfáttesteket. A fotoszintetikus tilakoidokkal gyakran lipidcseppek társulnak, továbbá gázvakuolumok, melyek az úszásképesség fenntartásában vesznek részt. A spórák (akinéták) csak a heterocisztákat tartalmazókban fordulnak elő. Nagyobbak, mint a vegetatív sejtek és gazdagok tartaléknitrogén és szénhidrátalkotó-elemekben. A heterociszták üresnek kinéző, 1–10 μm átmérőjű sejtek, melyeket vastag peptidoglikánfal vesz körül. Elsődleges funkciójuk a N_2-fixálás. A cianobaktériumok legkevéssé differenciált típusai a *Chroococcales* tagjai, melyek általában egysejtűek (pl. *Anacystis*), vagy kötegekben *(123. ábra)* fordulnak elő. A sejtorganizáció legközönségesebb típusai esetében viszont a sejtek hosszú fonalakba szerveződnek. E fonalak a legegyszerűbb esetben nem tartalmaznak differenciált sejteket. Egyes *Oscillatoreaceae*k a fonalak csúcsán hormogóniumot fejlesztenek és annak révén szaporodnak. A hormogónium sejtek kötegéből áll, mely a szülői fonalról leszakadva szabaddá válik.

Sokkal komplexebb a sejtdifferenciálódás a *Nostocaceae*-nál. E család tagjainál heterocisztákat és akinetákat találhatunk. Az elsőkben a nitrogén fixációja megy végbe, és lényegében már annyira differenciált sejteket



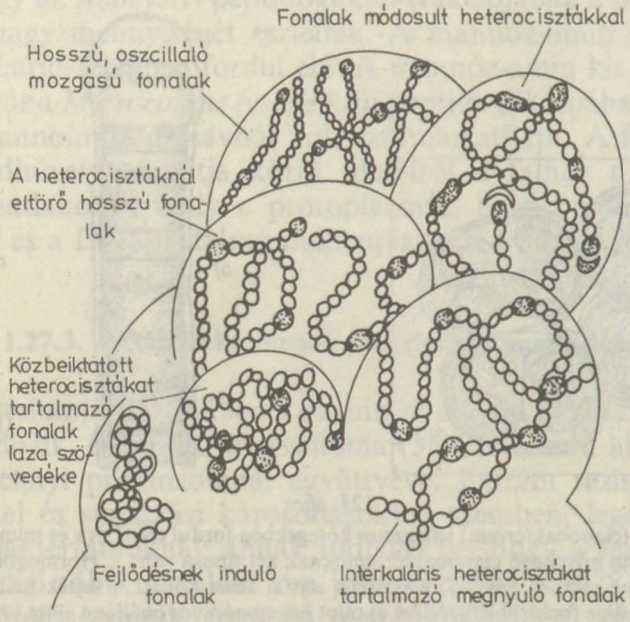
123. ábra

a) a *Chroococcum* (cianobaktérium) jellegzetes kötegekben fordul elő (Levy és munkatársai, 1973). A fonalak alakjában növekedő cianobaktériumoknak két típusa van: **1.** Hormogonális típusú. *b)*. A sejteket ebben az esetben vékony, elasztikus sejtfal veszi körül. A sejtek fiziológiai egységet képeznek. Egy részük a fonalról lefűződhet és mint hormogónium önállóan élhet tovább. A fonalakat rendszerint közös hüvely veszi körül. **2.** Pleurokapszális típusú *c)*. A fonalakban minden egyes sejtnek vastag sejtfala van és önálló fiziológiai egységet képez. *b)*: *Tolypothrix cucullata; c)*: *Hyella caespitosa* (Fott, 1971)

képviselnek, hogy feltehetően további szaporodásra képtelenek. Az ilyen sejtek a *Rhizobium*ok bakteroidjaival lehetnek analógok. Valószínűen aerob környezetben végrehajtott, alacsony potenciálú redukciók kivitelezésére specializálódtak. Sejtstruktúrájuk oly módon szerveződhetett át, hogy abban a nitrogenáz az oxigéntől védve van. A heterociszták gyakorta a fonalak elágazási pontjain találhatók. Fontos megjegyezni, hogy a nitrogén fixációjára egysejtű cianobaktériumok is képesek, anélkül tehát, hogy specializált heterocisztákra szükségük lenne.

Az akineták spóraanalógok. Tulajdonképpen kiszáradásrezisztens sejtek. Létrejöttük fiziológiáját alig ismerjük. Életfontosságúak, minthogy a cianobaktériumok gyakran időszakos kiszáradásnak alávetett sekély vizeket, mocsarakat, rizsföldeket népesítenek be. Az akineták nemcsak túlélést biztosítanak, de az elterjedésnek is eszközei. Minthogy a hormogóniumok a vízi miliőkben, az akineták pedig a légtérben teszik lehetővé a cianobaktériumok gyors szóródását, könnyen érthető, hogy elterjedésük a Föld felszínén rendkívül erőteljes és általában az új környezetek, pl. új vulkáni szigetek első kolonizálói közé tartoznak.

A *Nostocaceae* család bizonyos fajainál már nagyon bonyolult a sejtdifferenciálódás. A *Nostoc muscorum* pl. telepet fejleszt (fonalak elrendeződése meghatározott struktúrákká) és ennek típusa a tenyészviszonyok-



124. ábra

A *Nostoc muscorum* glükóz hatására fejlesztett, kevésbé differenciált telepei. Vázlat (LAZAROFF és VISHNIAC, 1964)

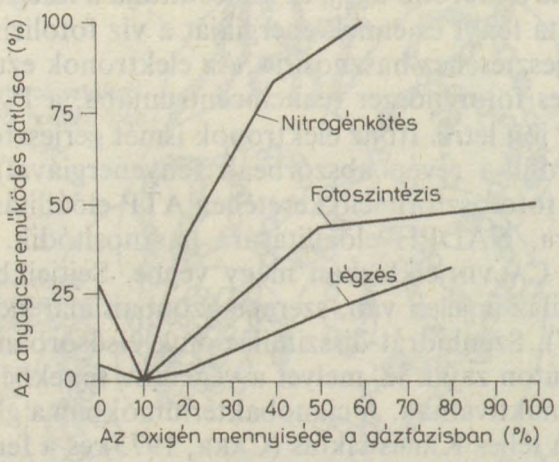
tól is függ. Ha a tenyészetet fény hatásának csak rövid időre tesszük ki, úgy utána a sötétben egyszerű, elágazatlan telep jön létre. Folyamatos megvilágítás hatására azonban elágazó fonalakból a fény felé hajló kolónia fejlődik, s benne meghatározott sorrendben heterociszták és mozgó hormogóniumok jelennek meg. Ha a tenyészethez glükózt adnak, úgy a telepfejlődésnek ez a menete elmarad. Ilyenkor hormogóniumok nem jönnek létre, és a kialakuló telep viszonylag differenciálatlan marad *(124. ábra)*. Azok a cianobaktériumok, melyeknek nagy felületet nyújtó telepei mozgó vízben szilárd aljzatra rögzülnek, a tápanyagok maximális abszorpcióját valósíthatják meg.

1.27.4. A cianobaktériumok általános biokémiája

A magasabb rendű növényekhez hasonlóan a cianobaktériumok is aerob fotoszintetizálók. A víz náluk is elektrondonor, mely közvetve a koenzimeket redukálja, miközben oxigéngáz termelődik. A cianobaktériumok az általuk termelt oxigént nemcsak tolerálják, hanem aerob respirációjukhoz terminális elektronakceptorként is felhasználják, sőt a szintézisekhez, így a klorofill-a előállításához is igénylik. Fotoszintézisük mechanizmusában a két fotorendszer bensőségesen kapcsolódik (STEWART, 1978). ATP náluk mind ciklikus, mind nem ciklikus fotofoszforilációval termelődik. A CO_2-fixáció reduktánsa a NADPH. A II-es fotorendszer reakciócentruma a klorofill-a_{680}, ez koncentrálja a főleg a fikobiliproteinek abszorbeálta fényt és ennek energiáját a víz fotolízisénél előállított elektronok gerjesztéséhez hasznosítja. Az elektronok ezután a szállítók során át, az I-es fotorendszer reakciócentrumába, a P_{700}-ra kerülnek, miközben ATP jön létre. Itt az elektronok ismét gerjesztődnek (ez alkalommal a klorofill-a révén abszorbeált fényenergiával) és energiájuk vagy a ciklikus fotofoszforiláció keretében ATP-előállításban vesz részt, vagy redukcióra, NADPH előállítására hasznosítódik. A szén-dioxid fotofixációja a CALVIN-ciklusban megy végbe. Sejtjeikben foszfoenolpiruvát-karboxiláz is jelen van, szerepe azonban alárendelt (TEL-OR és STEWART, 1977). Szénhidrát-disszimilációjuk elsősorban is az oxidatív pentóz-foszfát-úton zajlik le, melyet a vegetatív sejtekben a fényanyagcsere termékei inaktiválnak. A cianobaktériumokban a glikolízis, továbbá a náluk nem teljes KREBS-ciklus (CARR, 1973) és a fermentáció mint reduktánsok forrásai, nem jelentősek. A megszakított KREBS-ciklus, melynek bizonyos enzimeinél a transzkripciós kontroll hiányzik, az ammónia asszimilációhoz 2-oxo-glutarátot és a tetrapirrol szintéziséhez szukcinátot állít elő. A nem ciklusos fotofoszforilációval és a ciklikussal együttesen vagy csak az utóbbival egyedül előállított ATP az optimális

szaporodáshoz és a maximális nitrogenázaktivitás fenntartásához teljesen elegendő. Az oxidatív foszforiláció azonban erre egyedül már nem képes, míg a fermentáció egyenesen jelentéktelen.

Biokémiájuk lényegesen eltér a zöld eukariota növényekétől, minthogy még azokból az időkből származnak, amikor a légkörben az oxigén koncentrációja szerfelett ingadozott. Így pl. jóllehet, telítetlen zsírsavakat számos cianobaktérium oxidatív deszaturációval állít elő, közülük nem egy e célból az ősibb anaerob mechanizmussal is él, vagyis a kettős kötéseket a szénlánc fokozatos kiépítése alkalmával építi be. Hasonló módon, egyesek közülük bizonyos szterinek oxigéndependens előállítását kivitelezik, azonban az ily módon szintetizált szterinek mennyisége csekély. Más cianobaktériumokban ilyen szterinek egyáltalán nem találhatók, minthogy ezeknél a bioszintetikus út az utolsó anaerob lépésnél, a szkvalén kialakításánál már be is fejeződik. Biokémiájukat tekintve tehát a cianobaktériumok átmenetet képeznek az anaerob baktériumok és az eukarioták között. Anyagcseréjükben még további átmeneti vonásokat is felismerhetünk: bár napjaink tipikus aerob környezeteiben tömegesen szaporodnak, mégis sok fajuk oxigénoptimuma csak 10% körül van, mely mindössze fele a jelenlegi atmoszféráénak (SCHOPF, 1978). Ha az oxigén koncentrációja ezen optimum fölé emelkedik, mind fotoszintézisük, mind légzésük folyamatosan alábbhagy *(125. ábra)*. Egyes fajaik sejtanyagcseréjüket az oxigén rendelkezésre állása szerint sokoldalúan változtatni képesek (SCHOPF 1978). Oxigénhiányos környezetben például



125. ábra

A fokozódó oxigénkoncentráció a heterocisztaképző *Anabaena flos-aque* (cianobaktérium) tenyészeteinek anyagcsere-aktivitását egyre inkább gátolja, ami arra utal, hogy ez az aerob prokariota mintegy 10% oxigénkoncentrációhoz alkalmazkodott. Magas oxigénszinteknél a nitrogénkötés teljesen leáll, azonban maga a respiráció is, mely pedig közismerten oxigént igényel, parciálisan gátlást szenved (SCHOPF, 1978)

nem csupán respirációjukat függesztik fel, hanem anaerob típusú fotoszintézisre térnek át. Ilyenkor elektrondonorként víz helyett kén-hidrogént használnak és oxigén helyett ként bocsátanak ki. E képességük is hosszú evolúciós fejlődési útjuk korábbi szakaszára nyúlik vissza és igazolja, hogy ősi anaerob fotoszintetizáló baktériumokból fejlődtek. A cianobaktériumok kettős autotrófok, minthogy mind nitrogént, mind szén-dioxidot egyaránt fixálnak, és ma már bizonyítékaink vannak arra, hogy kevés fény esetén szaprofita életmódra is képesek (mixotrófok). Vízi életterekben szaporodásuk legfőbb korlátozói a foszfátok. Ha a vizekbe foszfátok nagy mennyiségben kerülnek, úgy a felszínen vízvirágzást idéznek elő. Pusztulásuk után a víz szervesanyag-tartalma jelentősen megnövekedik, ami a nem fotoszintetizáló baktériumok gyors szaporodását és a szabad oxigénkészlet felélését vonja maga után. Ez viszont a vízi állatok pusztulásához vezet. Ezek szerint a kék-zöldalgák eutrofizációt nitrátszennyeződés nélkül is előidéznek.

1.27.5. A cianobaktériumok nitrogén-anyagcseréje

A nitrogén a vízben az oxigénnél jelentősen gyengébben oldódik. Minthogy az atmoszféra 78%-át alkotja, egyensúlyi állapotban a vízben oldott gázok 65%-át teszi ki *(30. táblázat)*. Kémiailag meglehetősen inert és a vízzel nem lép reakcióba. A cianobaktériumok ezt a részben a vízi denitrifikálóktól eredő, vízben oldott nitrogénfrakciót fixálják.

30. táblázat

Különböző gázok egyensúlyi koncentrációja a légkörben és a vízben (ml/l-ben és a teljes gázkoncentráció százalékában)

Gáz	Légköri koncentráció	Telítődés vízben
Oxigén	210 ml/l (21%)	7 ml/l (32,9%)
Nitrogén	780 ml/l (78%)	14 ml/l (65,7%)
Szén-dioxid	0,3 ml/l (0,03%)	0,3 ml/l (1,4%)

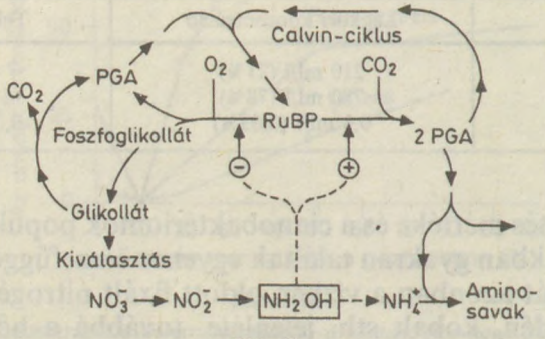
A nitrogénkötés mértéke és a cianobaktériumok populációinak denzitása között tavakban gyakran találtak egyenes összefüggést. A nitrogénkötés intenzitását azonban a vízben oldott fixált nitrogén, foszfor, vas, kalcium, molibdén, kobalt stb. jelenléte, továbbá a hőmérséklet és a fényintenzitás is befolyásolják. Előfordul, hogy a nitrogénkötés csökkenésének okát, a cianobaktériumok szaporodását nem, de a nitrogénkötés mechanizmusát már negatívan befolyásoló környezeti faktorok érvényre

jutásában (hőmérséklet, fényintenzitás, molibdén- és foszforhiány stb.) kell keresnünk.

A cianobaktériumok ammóniumot vagy nitrátot nitrogénforrásként egyaránt hasznosítanak. Sejtjeikbe szerves nitrogénvegyületek csak nehezen hatolnak be. Az ammónia a nitrát felvételét és a nitrogénkötést az *Anabaena cylindrica*nál, gyorsan és reverzíbilisen gátolja. Ugyanakkor e szervezet szubcelluláris frakcióiban végbemenő nitrátredukciót az ammónia egyáltalán nem befolyásolja. Sejtjei az ammóniát ugyanolyan sebességgel veszik fel, mint a nitrátot és a karbonil-cianid p-trifluormetoxi-fenil-hidrazon, amely a foto- és az oxidatív foszforilációk szétkapcsolója, mindkettő felvételét akadályozza. A kloroplasztiszokban a fotofoszforiláció szétkapcsolását ammóniával már korábban megfigyelték. Az ammónia a nitrát felvételét már 10 μM koncentrációnál megakadályozza, ami viszont túl alacsony szint ahhoz, hogy a foszforiláció szétkapcsolását indukálhassa. Az ammónia az N_2-fixációt hatékonyan csak akkor nyomja el, ha asszimilációja aerob körülmények között folyik. Ezeknek a megfigyeléseknek a hátterében az a tény áll, hogy az ammóniaasszimiláció, a nitrátfelvétel és a nitrogénkötés rendszerei egymás között ATP-igényeik kielégítéséért konkurálnak.

1.27.6. A hidroxil-amin sokoldalú szerepe a cianobaktériumok nitrogén-anyagcseréjében

Okabe és munkatársai (1979) az *Anabaena cylindrica* kivonataiban in vitro hidroxil-aminnal, mely a cianobaktériumokban a nitrátnak ammóniáig menő redukciójában intermedierként szerepel, szimultán stimulál-



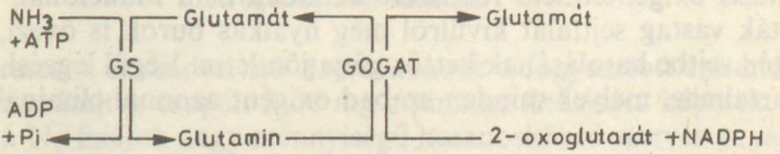
126. ábra

A hidroxil-amin és a RuDP-karboxiláz/oxigenáz között feltételezett kölcsönhatások. A folyamatos vonalak anyagcsereutakat jeleznek, a szaggatott vonalak enzimaktivitások gátlását (−) vagy aktiválását (+) szemléltetik. PGA: 3-foszfoglicerinsav. RuBP-RuDP (Okabe és munkatársai, 1979)

ták a karboxiláz- és gátolták az oxigenázaktivitást. Véleményük szerint a hidroxil-amin nitrát jelenlétében az ammóniaszintek és a szénvázellátás finom koordinációs ellenőrzését biztosíthatja *(126. ábra)*. A hidroxilaminnak a ribulóz-1,5-difoszfát-karboxilázra (RuDP) kifejtett stimuláló hatása és egyidejű gátlása a fotorespirációra a karbonbevételt növelheti, miáltal az aminosav-bioszintézisekhez a megfelelő szénvázellátásban hiány nem jelentkezik.

1.27.7. Az ammóniaasszimiláció útja

Az ammóniaasszimiláció legfontosabb útja a glutamin-szintetáz(GS)–glutamát-szintáz- (GOGAT)-út:



Az újonnan fixált ammóniát a 2-oxo-glutarát fogja fel és két molekula glutamát termelődik. Ezek egyike reciklizálódik, míg a másik más aminosavak szintéziséhez használódik el, többnyire transzaminázzal közvetített reakciók során. A glutamin-szintetáz, az ammónia-asszimilációban való részvételén kívül, számos regulációs folyamatban is közreműködik, közöttük a nitrogenáz bioszintézisében is.

A dinitrogénnel szaporodó *Anabaena* sejtekben a glutamin-szintetáz (GS) aktivitása magas, azonban a glutamát-dehidrogenázé nagyon alacsony. Ha nitrogénre éheztetett *Anabaena* sejteket nitrogéngázzal vagy ammóniával látnak el, úgy azokban glutamin akkumulálódik. A nitrogén-redukció során termelt ammónia a GS és a glutamát-szintáz közvetítette úton kerül felhasználásra. A glutamin szintéziséhez ammóniából és glutaminsavból ATP szükséges. Megállapítást nyert, hogy ha molekuláris nitrogénen szaporodó *Anabaena cylindrica*-sejteket sötétben ammónia (50 μM–5mM) hatásának tesznek ki, úgy azokban az ATP-készlet 1 percen belül 40%-kal csökken, de az eredeti ATP-szint 5–6 perc után újra helyreáll. Az ATP csökkenése az ADP és AMP növekedésével párosul, ugyanakkor a teljes adeniláttartalom változatlan marad. Az ATP-készlet ammónia indukálta változását teljesen meg lehetett szüntetni, ha a sejteket L-metionin-DL-szulfomiximinnel, a glutaminszintézis inhibitorával kezelték. Ebből arra lehet következtetni, hogy az ammónia a glutamin-szintetázzal közvetett úton gyorsan asszimilálódik, ami az ATP-készlet redukciójával kapcsolódik.

1.27.8. A nitrogenázrendszer molekuláris oxigén elleni védelme

A nitrogénkötés a cianobaktériumoknak már a „légkörváltást" megelőző időkben létrejött tulajdonsága. A nitrogénkötés kulcsfontosságú enzime a rendkívül oxigénérzékeny nitrogenáz. Sejtmentes kivonatokban a nitrogenázt már 0,5% oxigén percek alatt teljesen és irreverzíbilisen inaktiválja. Ilyen enzim, ill. enzimkomplex csak az ősi reduktív légkör idejéből származhat, és ma is csak oxigéntől védve funkcionálhat. Számos nitrogénfixáló mikroba a molekuláris nitrogént a jelenben is kizárólag csak anaerob körülmények között köti meg. A cianobaktériumoknál a molekuláris oxigén tolerálására már különböző megoldások alakultak ki. Így pl. a nitrogenázt gyakran heterociszták nevezett, speciális sejt védi, melynek belső miliője szabad oxigéntől mentes, minthogy a fotoszintézis oxigéntermelő rendszere azokban nem funkcionál. A heterociszták vastag sejtfalát kívülről még nyálkás burok is övezi, és így az oxigén sejtbe hatolásának kettős gátja jön létre. Végül légzési enzimeket is tartalmaz, melyek minden szabad oxigént azonnal eliminálnak.

1.27.9. A heterociszták és a N_2-fixáció földtörténeti múltja

Az ősi heterociszták a kőzetcsiszolatokban a fosszíliák között vastag sejtfaluk következtében könnyen felismerhetők. Valószínűsített alakjaikat számos prekambriális kőzetből mutatták már ki. A legidősebbek 2,2 miliárd évesek lehetnek (SCHOPF, 1978). Megjelenésükből arra lehet következtetni, hogy környezetükben a szabad oxigén, hacsak nagyon csekély koncentrációban is, de már jelen volt.

Minthogy a nitrogénkötés jelentős energiabefektetést igényel (*lásd* 4. fejezet), előnyeit csak fokozott fixált nitrogénhiány esetén lehet kihasználni. Napjainkban biológiailag értékesíthető fixált nitrogén az ipari és a biológiai nitrogénkötésen kívül többek között a légköri nitrogén és oxigén abiotikus és nitrátot eredményező reakciójával is létrejön. A korai prekambrium reduktív légkörében az utóbbi mechanizmus természetesen nem működhetett. A légköri oxigén egykori hiánya, hacsak közvetve is, az ammóniakoncentráció nagyon alacsony szintjéért is felelős lehetett. Az ammónia ugyanis, akkor még a behatoló ultraibolya sugárzás hatására, legnagyobbrészt nitrogénre és hidrogénre disszociált. Csak a szabad oxigén megjelenése tette lehetővé a számára is védőhatású ozonoszféra kifejlődését.

A nitrogénkötés képessége a primitív prokarioták körében a korai prekambriumban fejlődött ki, akkor, midőn fixált nitrogénben már hiány jelentkezett. A nitrogenáz enzim oxigénérzékenysége természete-

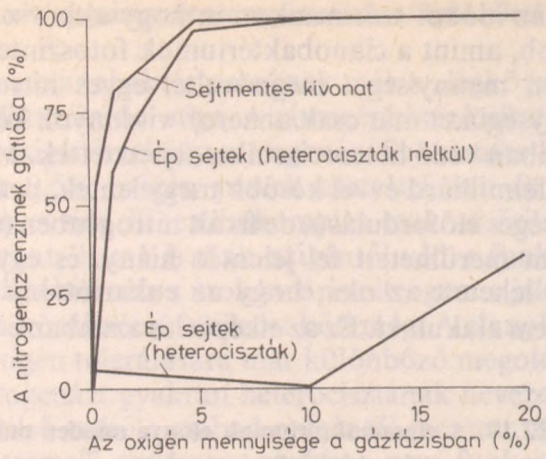
sen nem abból az időből származik, minthogy akkor oxigén még jelen sem volt. Később, amint a cianobaktériumok fotoszintetikus aktivitása a légköri oxigén mennyiségét megnövelte, egyes nitrogénkötők ezen fixációs tevékenységüket már csak anaerob viszonyok között folytathatták, mások azonban védő heterocisztákat fejlesztettek. Midőn az eukarioták több mint félmilliárd évvel később megjelentek, nemcsak az oxigén volt már közönséges előfordulású, de fixált nitrogénben (mind ammónia, mind nitrát) sem merülhetett fel jelentős hiány, és egyes elképzelések szerint talán ez lehetett az oka, hogy az eukariotáknál az N_2-fixáció képessége sohasem alakult ki. Ez az elképzelés azonban erősen kifogásolható.

1.27.10. A cianobaktériumok előnye minden más nitrogénkötővel szemben

Mint ismeretes, a szabadon élő *Azotobacter*ek a fogyasztott szénhidrát grammjaira számítva csupán 5–50 mg ammónia fixálására képesek. Az ilyen típusú N_2-fixálók nagy mennyiségű hasznosítható szerves anyagot igényelnek, ami a legtöbb természetes talajban nem könnyen elérhető. A gyökérgumók szimbionta *Rhizobium*ai esetében a fixált szén rendelkezésre áll ugyan, de a molekuláris nitrogén redukciójához a fotoszintézissel előállított anyagokat a növényi produkcióból kell elvonni, ami viszont csökkentheti a terméshozamot. A cianobaktériumok azonban nem csupán nitrogént fixálnak, hanem szén-dioxidból és vízből, fixált szénigényeiket is saját maguk fedezik.

1.27.11. A N_2-fixáló cianobaktériumok csoportosítása

A nitrogénkötő cianobaktériumokat négy nagyobb csoportba oszthatjuk *(31. táblázat)*. Az első csoportba a heterocisztaképző *(127.* és *128. ábra)* alakok tartoznak, melyek nitrogént mind aerob, mind anaerob viszonyok között kötnek. Ezekben a heterociszták olyan belső környezetet teremtenek, amely a nitrogenázt az oxigén-inaktivációtól megvédi. A második csoportba különböző nem heterocisztaképző, fonalas típusok, mint pl. a *Plectonema boryanum* tartoznak, melyek nitrogént csupán anaerob viszonyok között fixálnak, mivel nitrogenázuk oxigén-inaktivációja ellen nincs védelmük *(lásd 127. ábra)*. A harmadik, nem fonalképző csoport tagjai ugyanígy viselkednek. A negyedik csoportban néhány egysejtű alakot találunk, melyek nitrogént csak aerob (!), ill. néhány esetben csak anaerob körülmények között fixálnak. Azokban, melyek nitrogént oxigén jelenlétében is kötnek, az oxigénfejlesztő fotoszintézis



127. ábra

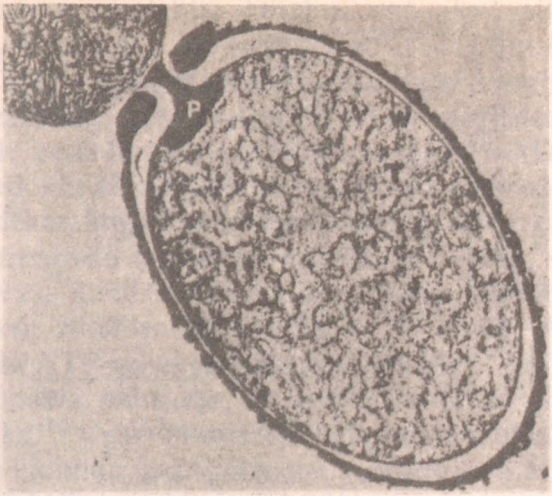
A *Plectonema boryanum* (cianobaktérium) sejtmentes kivonataiban a nitrogenáz enzimet az oxigén még nyomokban is gátolja, és e faj intakt, heterocisztát nem képező sejtjei a nitrogenáznak e gátlással szemben csak kevés védelmet nyújtanak (az ábra bal oldalán). Az ilyen típusú szervezetek csupán anaerob környezetekben kötnek nitrogént. A heterociszták vastag fala és egyéb speciális tulajdonságai lehetnek felelősek azért, hogy pl. a *Nostoc muscorum* nitrogént még teljesen aerob környezetben is folyamatosan köt (az ábra alsó, jobb oldala; SCHOPF, 1978)

és az oxigénszenzitív nitrogenázaktivitás temporálisan szeparálódhat egymástól. Feltehetően a jövőben még további csoportok felfedezésével is számolhatunk, mint pl. olyanokkal, melyek nem heterocisztaképzők, fonalasak és nitrogént oxigén jelenlétében is fixálnak. Ilyeneket azonban jelenleg még nem ismerünk.

31. táblázat

A nitrogénkötő cianobaktériumok főbb csoportjai

Csoport	Oxigénrezsim és nitrogenázaktivitás	Reprezentatív genuszok
Heterocisztákat viselő, fonalképző típusok	Nitrogént mind aerob, mind anaerob körülmények között valamennyi köt.	*Anabaena, Aulosira, Calothrix, Nostoc, Stigonema, Tolypothrix*
Heterocisztát nem képező, fonalas alakok	E csoport tagjainak mintegy fele, de csak anaerob körülmények között, fixál nitrogént	*Spirulina, Oscillatoria, Lyngbya Plectonema*
Pleurocapsaceae	E csoport tagjainak mintegy fele, de csak anaerob körülmények között, fixál nitrogént	*Dermocarpa, Xenococcus, Myxosarcina, Pleurocapsa*
Különböző egysejtűek	N_2-fixációra csak kevés képes. Ezek nitrogént részben aerob, részben anaerob viszonyok között kötnek.	*Gloeothece, Synechococcus*

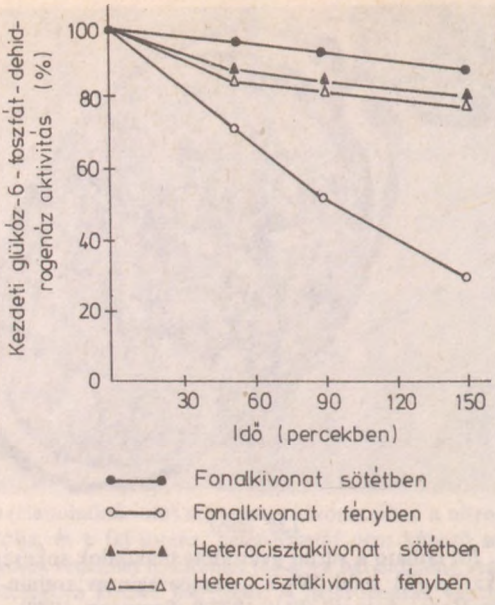


128. ábra

Nostoc sp. heterocisztája. Jól látható a sűrűn gyűrődött tilakoidok sokasága (T), a zárványtestek hiánya, a heterociszta takarója (E), a fal (W) és az aszparaginsav:arginin-kopolimerből felépített poláros „dugasz" (P), × 12 500 (STEWART, 1978)

1.27.12. A heterociszták néhány biokémiai sajátossága

Annak a morfológiai, fiziológiai és biokémiai szerveződésnek, mely szimultán fotoszintézist és nitrogenázaktivitást tesz lehetővé, példájául a heterocisztaképző *Anabaena cylindricát* mutathatjuk be. Ez a cianobaktérium nitrogént csak heterocisztákat tartalmazó tenyészetben köt. Molekuláris nitrogénnel szaporodó kultúráiban a heterociszták az összes sejtnek átlag 4–7%-át teszik ki. Heterocisztákat ammónián tenyésztett kultúrái nem fejlesztenek és ilyen körülmények között nitrogenázaktivitást még oxigén hiányában sem lehet észlelni. Korábban bizonyosra vették, hogy az ammónia a heterocisztaképzés és a nitrogenázaktivitás szabályozója. Ez nem feltétlenül így van, ugyanis, ha a tenyészethez L-metionin-DL-szulfomiximint vagy 5-hidroxi-lizint, vagyis olyan analógokat adunk, melyek a glutamin-szintetáz aktivitását gátolják, úgy mind a heterocisztákat eredményező sejtdifferenciálódás, mind a nitrogenázaktivitás, ammónia jelenlétében is megfigyelhető. Ez azt mutatja, hogy az ammónia vagy egyáltalán nem szerepel a heterocisztaképzés és a nitrogenázaktivitás szabályozásában, vagy – ami még valószínűbb – igen, de nem mint az egyetlen regulátor, hanem a glutamin-szintetázzal vagy egy reakciótermékkel együttesen mindkét folyamat szabályozásába beavatkozhat.



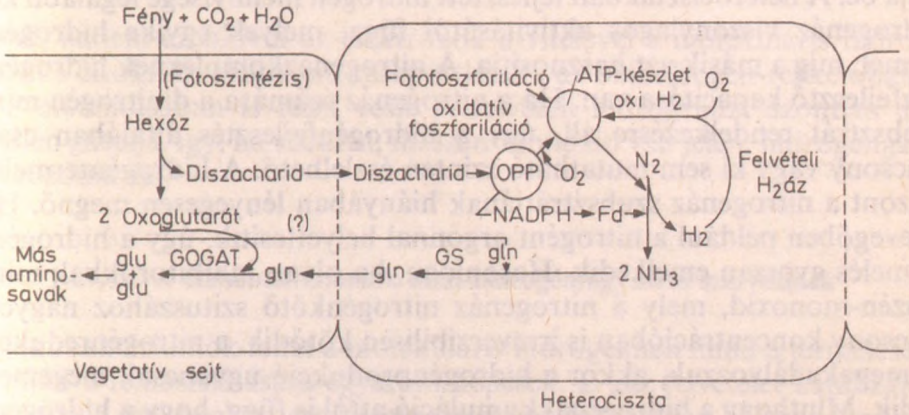
129. ábra

Fény hatása (3000 lx) az oxidatív pentóz-foszfát-út egy kulcsenzimének, a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáznak az aktivitására az *Anabaena cylindrica* teljes filamentjeinek, továbbá heterocisztáinak kivonataiban (STEWART 1978)

Fénymikroszkóp alatt vizsgálva a heterociszták vastag falú, sárgás, meglehetősen üresnek kinéző sejtek, melyek gyakran kissé nagyobbak, mint a szomszédos vegetatív sejtek. Elektronmikroszkóp alatt egyszerű ultrastruktúrát mutatnak sűrűn redőzött tilakoidokkal. Jellemző a szubcelluláris zárványok hiánya, továbbá mindkét végükön egy-egy pórus, bennük mikroplazmodezmával, melyek a heterocisztát a szomszédos vegetatív sejtekkel kötik össze. Az idős heterocisztákban ezeket a pórusokat aszparaginsav: arginin-kopolimerből álló sűrű, ozmiofil poláris dugók töltik ki (STEWART, 1978).

Biokémiailag a heterociszták, összehasonlítva a vegetatív sejtekkel, jellemző sajátosságokat mutatnak, melyek a nitrogenáz hatékony működését teszik lehetővé. Például a nitrogenáz oxigénérzékeny enzim, a heterociszták viszont úgy módosultak, hogy bennük fotoszintetikus úton oxigén nem fejlődik. Ennek megfelelően a II-es fotorendszer fényfelfogó pigmentjeiben (fikobiliproteinekben) és a Mn^{2+}-ionokban, melyek a víz fotolíziséhez szükségesek, deficiensek (TEL-OR és STEWART, 1977). Jóllehet bennük a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc a citokróm-b_{559}-től a ferredoxin $NADP^+$-oxidoreduktázig komplett és fotofoszforiláció is végbemegy (STEWART, 1978), a szén-dioxid fotofixációja azonban már nem, minthogy a ribulóz 1,5-difoszfát-karboxiláz a CALVIN-ciklus kulcs

CO_2-fixációs enzime, legalábbis katalitikusan aktív állapotban nincs jelen. Így a CO_2-fixáció és a N_2-fixáció között ATP-ért és reduktánsért nem jöhet létre kompetíció. A heterociszták, ezzel szemben, a szomszédos fotoszintetizáló vegetatív sejtekből fixált szénvegyületeket kapnak és a rendkívül aktív oxidatív pentóz-foszfát-út révén NADPH-t állítanak elő, mely a ferredoxin-NADP-oxidoreduktázzal a ferredoxinra elektronokat juttat. Érdekes, hogy a heterocisztákban az aktív, oxidatív pentóz-foszfát-út és a ferredoxin redukciója ferredoxin-$NADP^+$-oxidoreduktáz révén mind fényben, mind sötétben kimutatható, jóllehet ezek a vegetatív sejtekben csak sötétben működnek *(129. ábra)*. A nitrogenáz a rendelkezésre álló ATP-vel és reduktánssal (és Mg^{2+}-val) a molekuláris nitrogént ammóniává redukálja. A heterocisztákban glutamát-szintáz nem mutatható ki. ^{15}N és ^{13}N nyomjelző tanulmányokból valószínűnek látszik, hogy az újonnan fixált nitrogén a pórusokon át mint glutamin távozik, és a vegetatív sejtekben ez a glutamin lesz az aktív glutamát-szintáz szubsztrátja. A glutamát ezután specifikus enzimek és a transzaminázzal közvetített reakciók révén más aminosavak bioszintéziséhez a központi vegyület szerepét tölti be és az is lehet, hogy a vegetatív sejtekben előállított glutamátból a heterocisztákba is visszakerül, hogy ott a glutamin-szintetáz számára szubsztrátként szolgálhasson (THOMAS és munkatársai, 1977). A heterocisztában és a szomszédos sejtekben végbemenő folyamatokat a *130. ábra* mutatja be. A cianobaktériumok, bár morfológiailag egyszerűnek tűnhetnek, azonban ez a látszólagos egyszerűség más élő sejtekben ritkán észlelhető biokémiai komplexitással társul.



130. ábra

Az *Anabaena cylindrica* vegetatív sejtjei és heterocisztái között végbemenő valószínű anyagcserekölcsönhatások. GS: glutamin-szintetáz; GOGAT: glutamát-szintáz; gln: glutamin; glu: glutamát; H_2áz: hidrogenáz; OPP: oxidatív pentóz-foszfát-út; oxiH_2: oxihidrogén-reakció; Fd: ferredoxin; ox-fosz: oxidatív foszforiláció

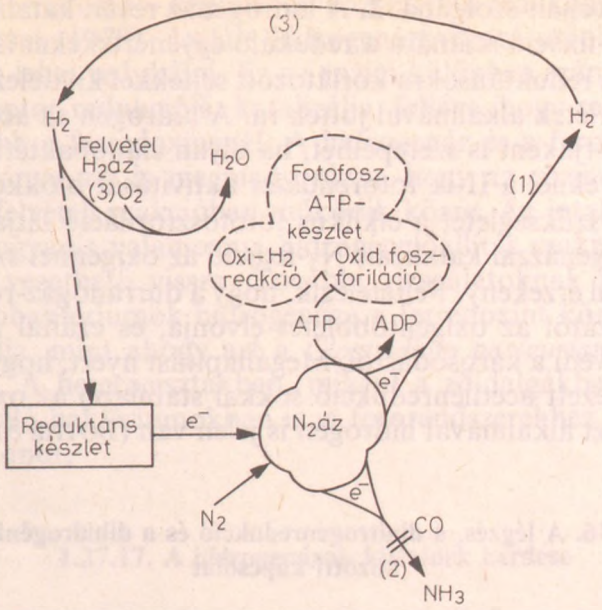
1.27.13. Hidrogéntermelés cianobaktériumok tenyészeteiben

A nitrogénkötő cianobaktériumok napenergiát és vizet használva, molekuláris hidrogéngázt fejlesztenek és juttatnak a levegőbe. A biológiai napenergia-átalakításnak ez a folyamata, amit a nitrogenáz enzim katalizál, rendkívül sajátos. Különben arra vonatkozóan, hogy a szimbiontákkal nitrogénkötő növények hidrogént fejlesztenek, már fél évszázada vannak adataink. Ennek ellenére a 60-as évek elején mutatták ki tisztított nitrogenázt használva, hogy a hidrogénfejlesztés éppen a nitrogenáznak tulajdonítható, mely ha több elektronnal látják el, mint amennyit a szubsztrátredukcióhoz felhasznál, úgy egy ATP-dependens folyamatban hidrogéngázt szabadít fel.

A heterociszta képző cianobaktériumok, szemben a magasabb rendű növények kloroplasztiszaival és a többi cianobaktériummal, a napenergiát levegő jelenlétében is molekuláris hidrogén képzéséhez hasznosíthatják, minthogy ezeknek nemcsak nitrogenázaktivitásuk van, hanem ez az enzim a heterocisztákban az oxigéninaktivációtól is védve van. E tulajdonságuk ipari kihasználására ma kiterjedt kutatásokat folytatnak.

1.27.14. A nitrogenáz- és a hidrogenázreakciók közötti kölcsönhatások az *Anabaena cylindrica*nál

A *131. ábra* a nitrogenáz- és a különböző hidrogenáz-reakciók között az *Anabaena cylindrica* heterocisztáiban lehetséges kölcsönhatásokat mutatja be. A heterocisztákban fejlesztett hidrogén mennyisége legalább két hidrogenáz viszonylagos aktivitásától függ, melyek egyike hidrogént termel, míg a másik azt hasznosítja. A nitrogenázkomplexnek hidrogéngázfejlesztő kapacitása van. Ha a nitrogenáz számára a dinitrogén mint szubsztrát rendelkezésre áll, úgy a hidrogénfejlesztés általában csak alacsony vagy ki sem mutatható szinten észlelhető. A hidrogéntermelés viszont a nitrogenáz szubsztrátjának hiányában lényegesen megnő. Ha a levegőben például a nitrogént argonnal helyettesítik, úgy a hidrogéntermelés gyorsan emelkedik. Hasonlóan, ha olyan inhibitorokkal, mint a szén-monoxid, mely a nitrogenáz nitrogénkötő szituszához nagyon alacsony koncentrációban is irreverzíbilisen kötődik, a nitrogénredukciót megakadályozzuk, akkor a hidrogénprodukció ugyancsak megemelkedik. Minthogy a hidrogénakkumuláció attól is függ, hogy a hidrogéntermelés miként haladja meg a hidrogénfelvételt, a hidrogénfejlesztés fokozását a felvevő hidrogenáz gátlásával is elérhetjük. Ez az enzim normális körülmények között a nitrogenáz által elvesztett hidrogén reciklizálásában működik közre, miközben nem csupán reduktánst kon-



131. ábra

A nitrogenáz- és különböző hidrogenázreakciók között lehetséges kölcsönhatások az *Anabaena cylindrica* heterocisztáiban. 1. A nitrogenáz mint ATP-dependens hidrogenáz hathat. 2. Ha a nitrogénredukciót szén-monoxid akadályozza, úgy az elektronok hidrogén előállításában vesznek részt. 3. Felvételi hidrogenáz a fejlesztett hidrogén reciklizálásában vesz részt. Kérdéses, hogy ez a felvételi hidrogenáz-aktivitás szállít-e elektronokat a nitrogenáz reduktáns készletéhez, vagy csupán az oxihidrogén-reakció révén ATP előállításában vesz részt. Az azonban tény, hogy a hidrogén reciklizálódik (STEWART, 1978)

zervál, hanem ezenkívül az elektronok átvitelével a molekuláris hidrogénről a citokróm-elektrontranszportláncra az oxihidrogén-reakcióban, ATP előállításában is részt vesz. A felvételi hidrogenázt azonban az acetilén gátolja, így, ha acetilén, ill. szén-monoxid van jelen, hidrogéngáz halmozódik fel.

1.27.15. A cianobaktériumok mint hidrogénfogyasztó szervezetek

A cianobaktériumok tehát a molekuláris hidrogénnek mind a termelésére, mind a felhasználására egyaránt képesek. E gáz felvételét katalizáló hidrogenáz ezekben az aerob szervezetekben feltehetően hármas funkciót tölt be (EISBRENNER és munkatársai, 1978): **1.** Mind megvilágítva, mind sötétben a hidrogén főleg az oxihidrogén-, ill. durranógáz-reakcióban használódik el. A hidrogénnek ez az oxigéndependens hasznosítása a légzési lánc felhasználásával történik és a sejtanyagcsere számára a pót

ATP-ellátás céljait szolgálja. **2.** A hidrogenáz révén katalizált hidrogénfelvétel a N_2-fixáció számára a redukáló egyenértékeket is biztosíthatja. Erre a tényre reduktánsokra korlátozott sejtekkel kivitelezett acetilénredukciós kísérletek alkalmával jöttek rá. A hidrogén az acetilénredukció elektrondonorjaként is szerepelhet, ha olyan cianobaktériumokat használnak, melyeknél a II-ik fotorendszer aktivitását blokkolták és a N_2-fixáció ATP-szükségletét a ciklikus fotofoszforiláció látja el. **3.** A sejtmentes nitrogenázzal katalizált N_2-fixáció az oxigénnel szemben általában rendkívül érzékeny. Feltételezik, hogy a durranógáz-reakció a nitrogenáz szituszától az oxigéntöbbletet elvonja, és ezáltal a hidrogén az enzimet megvédi a károsodástól. Megállapítást nyert, hogy az *Anabaena* révén kivitelezett acetilénredukció sokkal stabilabb az oxigénnel szemben, ha a teszt alkalmával hidrogén is jelen van (BOTHE és munkatársai, 1977).

1.27.16. A légzés, a dinitrogénredukció és a dihidrogénfelvétel közötti kapcsolat

Ez a hármas funkció arra utal, hogy a hidrogéngáz-felvétel, a nitrogénkötés és a légzés között szoros térbeli kapcsolat lehet. A cianobaktériumok két különböző anyagcsere-úton fogyasztanak hidrogént. Ezt a két utat egyrészt a durranógáz-reakció, másrészt az izolált heterociszták fénydependens, hidrogénigényes acetilénredukciója reprezentálja.

Sötétben a hidrogenáz katalizálta hidrogénfelvétel az oxigén jelenlétét valamennyi fajnál szigorúan megköveteli, tekintet nélkül arra, hogy hidrogénnel vagy anélkül szaporodik-e. A cianobaktériumot ez a durranógáz- vagy oxihidrogén-reakció látja el pót ATP-vel a légzési elektronáramból. Ezt a megállapítást arra a megfigyelésre alapítják, hogy az *Anabaenában* a durranógáz-reakció szenzibilis az oxidatív-foszforiláció szétkapcsolóira. Másrészt újabban, az *Anabaena* 7 120-as jelzésű törzsből izolált heterocisztákkal, az ADP-nek hidrogén- és oxigéndependens foszforilációját mutatták ki.

A másik út akkor válik érzékelhetővé, ha a kísérleteket fényben kivitelezik. Intakt sejtekkel végzett előzetes vizsgálatok arra utaltak, hogy a hidrogén a fénydependens nitrogénkötésben (acetilénredukció) elektrondonorként szerepelhet, különösen reduktánsokra nézve korlátozott sejtekben. Ez az út nem igényli oxigén jelenlétét, és ebben a tekintetben élesen különbözik a durranógáz-reakciótól. Az izolált heterociszták hidrogénigényes acetilénredukciójánál tapasztalható volt, hogy a hidrogenáz e sejtek I-es fotorendszere előtt, a fotoszintetikus elektrontranszportlánc egyik komponenséhez kapcsolódik. Sötétben, a hidrogén és a hidrogenáz a N_2-fixáció elektronszállítóját – mely valószínűen a cianobaktéri-

umokban is ferredoxin – képtelenek közvetlenül redukálni (EISBRENNER és munkatársai, 1978). Izolált hidrogenázpreparátumokkal e vaskén proteint nem lehet redukálni. Ez az enzim különben számos különböző elektronakceptor redukcióját katalizálja, feltéve, hogy redoxipotenciáljuk pozitívabb a ferredoxinénál. A hidrogenáz és a ferredoxin közötti kapcsolat hiánya azt is megmagyarázza, hogy az enzim *in vivo* miért kizárólag a felvételi reakcióban működik közre. Az intakt cianobaktériumokban ugyanis valamennyi hidrogénelőállítás csakis a nitrogenáz aktivitására vezethető vissza. További vizsgálatoknak kell eldönteni, hogy a cianobaktériumok hidrogenáza a ferredoxint közvetlenül miért nem redukálja, mint ahogy azt a *Clostridium pasteurianum* klasszikus enzime teszi. A heterocisztákban, miként a zöldalgákban és bizonyos fotoszintetizáló baktériumokban is, a fotorendszerekhez a hidrogéngáz az elektrondonor.

1.27.17. A hidrogenázok kilétének kérdése

Kérdéses még, hogy a cianobaktériumok hidrogénhasznosításának mindkét útján egy és ugyanazon hidrogenáz szerepel-e? E két út nem működik egymástól függetlenül, minthogy a durranógáz-reakció és a hidrogéndependens acetilénredukció mértéke párhuzamosan fokozódik akkor, amikor a cianobaktériumokat molekuláris hidrogén jelenlétében tenyésztik (BOTHE és munkatársai, 1978). Ezenkívül, az *Anabaena cylindrica*ban a hidrogéngáz-dependens acetilénredukciós aktivitást az oxigénkárosodástól a durranógáz-reakció védi (BOTHE és munkatársai, 1977). E szervezet sejtmentes preparátumait vizsgálva mindössze egyetlen hidrogenáz enzimet sikerült kimutatni. Jelen elképzeléseink szerint tehát a hidrogenáz az elektronokat vagy a durranógáz-reakció keretében a légzési lánc egy komponenséhez, vagy az izolált heterociszták hidrogéndependens acetilénredukciójában a fotoszintetikus elektrontranszport egyik karrierjéhez szállítja. Feltehetően ezek az elektronakceptorok a respirációban citokrómok vagy ubikinon, ill. a fotoszintézisben a plasztokinon lehet.

1.27.18. A hidrogénfogyasztás mértékének környezeti befolyásoltsága

A *32. táblázat* cianobaktériumokban mért durranógáz (oxihidrogén)-reakcióaktivitási adatokat szemléltet. Látható, hogy a hidrogénfogyasztás sebessége drasztikusan növekedik, ha a nitrogénkötő *Anabaena cylindrica* és a *Nostoc muscorum* molekuláris hidrogén jelenlétében szapo-

32. táblázat

Durranógáz (oxihidrogén)-reakció aktivitásértékei cianobaktériumokban* (EISBRENNER és munkatársai, 1978)

Cianobaktérium	Gázfázis a szaporodás alatt		
	$H_2/N_2/CO_2$	N_2/CO_2	levegő/CO_2
1. *Anabaena cylindrica*	28	12	6
2. *Nostoc muscorum*	38	10	6
3. *Anabaena variabilis* ATCC 29413	26	4	2
4. *Anacystis nidulans*	50	6	1
5. *Anabaena variabilis* (nem heterocisztás alak)	36	4	3
6. *Cyanophora paradoxa*	33	3	1

*Megjegyzés: A baktériumokat 2–5 napig különböző gázkeverékben tenyésztették, majd az edényekben 10 mM oxigén jelenlétében hidrogénfogyasztási aktivitásra teszteltek. Az adatok a táblázaton a fogyasztott µmol H_2/óra × mg klorofill értékekben kerültek bemutatásra és átlagokat képviselnek. Az 1-es és a 2-es sorszámú szervezetek tenyészközegében a nitrogénforrás a molekuláris nitrogén, míg a 3–6 esetekben nitrát volt. A N_2-fixációs aktivitást az acetilénredukció módszerével mérték, míg a hidrogénfogyasztást gázkromatográfiával követték. Ez utóbbit egyébként csupán akkor lehet pontosan meghatározni, ha annak mértéke az 1 µmol H_2/óra × mg klorofill értéket meghaladja.

rodtak. Az aktivitás az oxigén optimális mennyisége jelenlétében mérve, az aerob szaporodású sejteknél mintegy 4–7 µmol/óra × mg klorofill volt. Anaerobiozissal ezeket az értékeket kétszeresére lehetett növelni. Ha pedig a sejteket 2–5 nap tartamára H_2:N_2:CO_2 = 20:75:5 keverékével árasztották el, úgy a hidrogénfogyasztás jelentősen tovább növekedett, és elérte a 25–50 µmol/óra × mg klorofillszintet is. A 3–6 számú törzsek a hidrogéngáz jelenlétében történt tenyésztés után magas hidrogénfogyasztási kapacitásukkal tűntek ki, azonban aktivitásuk aerob kultivációt követően jelentősen alacsonyabbnak bizonyult.

Mint fentebb jeleztük, egyes cianobaktériumok, ha nem is éppen a fiziológiai tanulmányokhoz leggyakrabban használtak, heterotróf módon is növekednek. Így az *Anabaena variabilis* sötétben 0,5% agarózt tartalmazó és 5 mM fruktózzal kiegészített nitrogénmentes ALLEN- és ARNON-féle tápközegben szaporítható. Ez a szervezet, sötétben, fermentorkultúrákban exponenciálisan szaporodik, nitrogént fixál és 10 g szárazsúly/liternél nagyobb populációs sűrűséget ér el. Az 5 mM fruktózt tartalmazó fermentorkultúrában nyert cianobaktérium szárazsúly-produkció megfelel a fruktóz-szén sejt-szénné történő 60%-os konverziós hatékonyságának. A sejtek megkettőződési ideje 30 °C-on sötétben mintegy 28 óra agaron, és 36 óra fermentorban.

1.27.19. Cianobaktériumok mint eukarioták szimbiontái

A nitrogénfixáló cianobaktériumok mintegy 30 eukariota növényi genusz tagjaival alakítanak ki társulásokat. Ezek között gombáktól angiospermákig igen különböző gazdaszimbiontákat azonosítottak *(33. táblázat)*. E társulások nagyon specifikusak. A specificitást meghatározó faktorok között lektinek is szerepelnek (STEWART, 1978). Ezek gyakorta glikoproteinek, melyek a szervezetek között molekuláris hidat létesítenek, minthogy különböző sejtfelületek specifikus receptorszituszait kötik össze (*lásd* 4.10.13. alfejezet is). A társulás folyamán mind a gazdaszervezet, mind a cianobaktérium morfológiai elváltozásokat mutathat. Midőn a cianobaktérium ugyancsak fotoszintetizáló szervezettel társul, fotoszintetikus CO_2-fixáló kapacitása redukálódik. Ezzel szemben ATP-t fotofoszforilációval továbbra is előállít, nitrogént megköt, míg fixált szenet a partnerétől szerez be. Lehet, hogy az ilyen szimbionta társulásokban a csökkent oxigénfejlesztési kapacitás a nitrogenázinaktiváció veszélyét is csökkenti. A szimbionta cianobaktériumoknál a legmélyrehatóbb változások azonban az elsődleges ammóniaasszimiláció enzimeinél észlelhetők (STEWART, 1978). Különösen a glutamin-szintetáz és a glutamát-szintáz (GOGAT), melyek a szabadon élő fajokban a primer ammóniaasszimilációt katalizálják, csökkentik aktivitásukat erősen. A szimbionta cianobaktériumok sokkal több nitrogént fixálnak, mint

33. táblázat

Nitrogénkötő cianobaktériumokkal társuló eukariota növények

Eukariota csoport	Eukariota génusz	Cianobaktérium	Megjegyzés
Algák	*Rhizosolenia* spp.	*Calothrix* (?)	Az eukariota tengeri diatomea; az endofita intracellulárisan él.
Gombák	Különböző *Ascomycetes*	Általában *Nostoc*	A kettő szimbiózisa zuzmót hoz létre. A zuzmófajok 8%-a cianobaktériumot tartalmaz.
Bryophita	*Anthoceros*, *Blasia*, *Cavicularia* stb.	*Nostoc*	Csak kevés *Briophyta* genusz fejleszt szimbionta társulást cianobaktériumokkal.
Pteridophita	*Azolla*	*Anabaena*	Az *Azolla* vízipáfrány
Cikádok	*Encephalartos*, *Zamia* stb.	*Nostoc*	A cikádok 9 genuszának van algatartalmú gyökérgumója.
Angiosperma (zárvatermők)	*Gunnera*	*Nostoc*	A *Gunnera* trópusi genusz. Az endofita a levélbázis sejtjeiben intracellulárisan fordul elő.

amennyit felhasználni képesek, az ammónia alakjában leadott felesleget viszont a társuló eukariota partner asszimilálja. Minthogy a glutaminszintetáz a szimbionta cianobaktériumokban az egyedüli fontos ammóniaasszimiláló enzim, ezért csekély aktivitása azt jelenti, hogy bár emiatt a nitrogénkötés magas szinten tovább folyhat ugyan, de szaporodni normális módon már nem lehet és így elsősorban is a szimbionta partner nitrogénellátása folyik. Ez az enzim egyébként az egész szimbiózisnak is a legfontosabb szabályozó tényezője.

A cianobaktériumok nemcsak növényekkel, hanem – bár sokkal kisebb gyakorisággal – tengeri állatokkal is társulhatnak. Így pl. egy echiuroid féreggel (KAWAGUTI, 1971) és korallzátonyok szivacsaival. WILKINSON és FAY (1979) a szivacs cianobaktérium szimbiózist közelebbről is tanulmányozták. Azok a szivacsok, melyek cianobaktériumokkal együtt élnek, nitrogenázaktivitást mutatnak, míg az ilyen szimbionta nélküliek nem. A baktériumok a *Siphonochalina tabernacula* szöveteiben nagy vakuolált sejtekben, az ún. bakteriocitákban találhatók. A szimbiózisban részt vevő cianobaktériumok száma nem nagy és a szivacs volumenének legfeljebb 1%-át foglalják el (legalábbis az elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint).

A nitrogenázaktivitás a megvilágított szivacsszövetekben nagyobb, mint a sötétben tartottakban. Minthogy a szivacsokban a sejtekkel másféle baktériumok is társulnak, közöttük pl. fototróf anaerobok és talán ezek között is vannak N_2-fixálók, a jövőben további beható vizsgálatokra van még szükség.

Láthattuk tehát, hogy a modern cianobaktériumok, jóllehet a prokarióták között a legkomplexebb sejtszerveződéssel rendelkeznek és a modern bioszférában is fontos ökológiai pozíciót töltenek be, mégis anyagcseréjükben számos olyan ősi vonást őriznek, melyek alapján egykori szerepüket a „légkörváltás" idejére viszonylagos biztonsággal rekonstruálhatjuk.

1.28. A sztromatolitok mikrobiológiája

A prekambriális élet nyomai után kutatva már a huszadik század elején fontos felfedezés birtokába jutottak, kellően értékelni azonban még sokáig nem sikerült. Észak-Amerika nyugati területeinek prekambriális rétegeiben számos kis dombra, ill. kupolára emlékeztető vagy oszlopszerű, horizontálisan finoman redőzött, rétegezett mészkőstruktúrát találtak. Ezeket a struktúrákat ma sztromatolitoknak *(132. ábra)* nevezik (a görög *stroma* ágytakarót jelent, míg a *lithos* követ). Egyesek a sztromatolitokat fosszilis zátonyoknak tekintették, melyeket különböző típusú algák hoztak létre. Mások, a sokkal szkeptikusabbak, a sztromatolitokat



132. ábra

Prekambriális sztromatolitok. Vázlat (KUHN és SCHNYDER után, 1967, GÉCZY közvetítésével, 1984)

pusztán abiotikus folyamatok eredményeként kezelték. Az első lelet, mely a biológiai eredetet valószínűsítette, 1954-ből TYLERtől és BARGHOORNtól származik, akik a *„Gunflint Iron formation"* (Ontario, Kanada) sztromatolitjaiban prekambriális, fosszilis, mikroszkopikus méretű növényeket fedeztek fel. A kupola alakú és oszlopszerű sztromatolitok rétegeiben megfigyelt GUNFLINT-fosszíliák többsége, a modern cianobaktériumokhoz (kék-zöldalgákhoz) és baktériumokhoz hasonlít.

1.28.1. Sztromatolitok, onkolitok és oolitok

A szakirodalomban ma különbséget tesznek sztromatolitok, onkolitok *(oncolites)* és oolitok *(oolites)* között. Ilyenek előfordulása kőzetekből egészen a prekambriumig visszamenően ismeretes. E három fogalom definícióját DAHANAYAKE és munkatársai (1985) kísérelték meg. Ezek szerint a sztromatolitok oszlopos vagy kupolás, lemezes vagy kónikus

szerkezetek. Az oolitok szabályosan lekerekedett, folyamatosan koncentrikus rétegezettségű, míg az onkolitok szabálytalanul lekerekedett, koncentrikus, de nem folytonos rétegezettségű szerkezetek. Valamennyi keletkezhetett ugyanazon környezetben is. Így pl. árapály-ingadozásoknak kitett sekély vizeknek üledékmikrobák alkotta rétegezett szövedékeiben. Az oolitok és az onkolitok az ilyen szövedékekben zavartalan körülmények között és bizonyos mértékig elkülönülten fejlődhettek. Az ilyen koncentrikus képződmények magját pl. homokszemcsék vagy akár biogén gázbuborékok is képezhették. Az oolitokat és az onkolitokat tartalmazó kiterjedt szövedékeket általában fotoszintetikus és/vagy kemoorganotróf baktériumok, továbbá gombák alkothatták. Bonyolult kölcsönhatások játszódhattak le az oolitok vagy onkolitok koncentrikus rétegeit és az alapszövedéket alkotó mikrobák között. A szövedékek szerves anyaga később lebomlott és a kemény oolitokat az erózió nagy területeken szórta szét.

1.28.2. Sztromatolitok az egykori őskörnyezetben

BARGHOORN és TYLER (1965) vizsgálatai alapján ma már megközelítő képet alkothatunk arról, hogyan is nézhetett ki a táj és az élet mintegy 1 900 ± 200 millió évvel ezelőtt ott, ahol ma Kanadában, a Felső-tó vidékén a prekambriális *„Gunflint iron formation"* ún. *„algal cherts"*-megjelölésű faciesei találhatók. Az őskörnyezet *(paleoenvironment)* rekonstrukciója nem könnyű feladat. Napjainkban már sehol sem mennek végbe olyan folyamatok, melyek e prekambriális, szilikátos vasformációk létrejöttekor uralkodhattak. Csupán a kőzetek kémiai, fizikai, morfológiai és mikroszkópos, kőzettani–ásványtani vizsgálataira vagyunk utalva. A lokális anyagfelhalmozódás zömét kitevő vas és szilícium egyrészt a már korábban meglévő bázikus, tűzi eredetű kőzetek mállásából, másrészt közvetlen magmatikus forrásból, pl. a tengervíz és a forró lávák reakciójából származhatott. E vasképződmények felhalmozódása víz alatti környezetben mehetett végbe. Feltehetően parti régióban, édes vagy sós vízben, a felszíntől számított csekély mélységben. Az eredetileg létrejött és lerakódott ásványok a greenalit, sziderit, chert, kevés hematit, magnetit és limonit lehettek. A GUNFLINT-vizek szilíciumban gazdagok voltak. Az a szilícium, mely ma a GUNFLINT-formációkban kalcedon és kvarc alakjában található, egykor a vízből mikroszervezetek hatására szilikagél alakjában ülepedhetett le. Az ilyen hidratált gél szinerézissel lassan vizet veszthetett, opálosodott és végül mint kalcedon, ill. kvarc kristályosodott ki. A sekély, mozgó, hullámveréses vízben, mely 18–20 méternél nem lehetett mélyebb, a víz és az üledék találkozásánál, ahová

még elég fény hatolhatott le, a cianobaktériumok kupola alakú képződmények, sztromatolitok alakjában növekedtek. E kupolákból nyert szervesanyag-maradványok stabil szénizotópokra történt frakcionálása alapján kapott sajátos megoszlást a fotoszintézisre lehet visszavezetni. A víz fotolízisén alapuló fotoszintézis létrehozta oxigéntartalmú környezetek kiterjedése azonban csak nagyon csekély és helyi jelenség lehetett, és lényegében a cianobaktérium-kolóniák közvetlen közelére szorítkozhatott. E színhely emlékét őrző kőzet ma uralkodóan fekete, szürke, zöld vagy helyenként alárendelt mértékben, fehér, ill. vörös színű. A fekete, szürke és a zöld színek, pirit, szénült szerves anyag és vastartalmú karbonátok jelenlétére vezethetők vissza. Ezek kialakulása és felhalmozódása viszont a néhai redukáló környezetre utal. Az oxigént elhasználó heterotróf mikrobák és az oxigéntermelő cianobaktériumok térben alig elválasztott tevékenységének hatására az oxidáló és redukáló miliők egymással szorosan érintkeztek. A már erősen transzformált szerves anyagból különben csak kevés aminosavat, míg porfirineket egyáltalán nem mutattak ki. A GUNFLINT-atmoszféra igen kevés oxigént tartalmazhatott, és e légkört a későbbi korokban kialakult, valóban oxidatív atmoszféra felé még csak erősen az átmenet kezdetén levőnek tekinthetjük.

1.28.3. A sztromatolitok jelentősége az élet őstörténete kutatásában

Napjainkig már mintegy 45 sztromatolittartalmú kőzetféleség mikrofosszíliáit azonosították. E fosszíliák gyakran jó megtartásúak. Az ősi mikrobasejtek eredeti, háromdimenziós alakjukban kövesedtek meg, és ezek ma már az élet legkorábbi történetének dokumentumaiként jönnek számításba. Jelenleg mikrofosszíliák után más prekambriális üledékekben is kutatnak, így pl. a néhai partoktól távolabb eső, mélyebb vizekben lerakódott agyagpalákban is. Ezekben a fosszíliák általában nem őrződtek meg olyan jól. A legtöbb a nagy nyomás alatt deformálódott, ellapult. Ennek ellenére vizsgálatuk sok hasznos információt nyújtott az olyan prekambriális mikrobaközösségek felől, melyek nem a sztromatolitok sekélyvízi biotópjaiban éltek. Az ősi, fosszilizálódott mikrobáknak elsősorban is az alakját, méretét és morfológiai komplexitásfokát ismerjük, de gyakran a sejtek belső struktúrái is megmaradtak. A prekambriális evolúciót kutatva, bár biokémiailag egyetlen ma élő (recens) mikrobát sem tekinthetünk 2 milliárd évvel ezelőtti ősével azonosnak, mégis e mikroorganizmusok biokémiai rendszereinek tanulmányozása az anyagcseretípusok egykori differenciálódása ősi útjainak megismerését nagyon megkönnyíti. Ezenkívül még anorganikus geológiai adatokra is támaszkodhatunk. A kőzetekben talált ásványok azokról a fizikokémiai állapo-

tokról informálnak, melyek létrejöttük idején és helyszínén uralkodtak és amely állapotokat biológiai történések is befolyásolhattak. Így pl. a légköri oxigén történetét mindhárom megközelítéssel nyomon követhetjük: meghatározott ásványoknak a földkéreg adott rétegeiben észlelhető elhelyezkedése az oxigén megjelenésének idejét, míg az ugyaninnen feltárt fosszíliák a produkciójáért felelős szervezetek kilétét árulják el. Végül a ma élő mikrobák biokémiájának tanulmányozása az anyagcsere evolúciójának azt az útját mutatja meg, mely egykoron a víz fotolíziséig vezetett.

A sztromatolitok kiemelkedő fontosságú geológiai alakzatok, melyek elsősorban és legnagyobb mennyiségben is a prekambriumból származnak, de amint az a legújabb kutatások nyomán kiderült, mind a mai napig folyamatosan képződnek. A sztromatolitok ősi mikrobaközössége mindmáig létezik, él és tevékenykedik. A sztromatolitok modern definíciója (AWRAMIK és MARGULIS, 1974): „megaszkópos, szervesüledéki struktúrák, melyeket mikroorganizmusok, elsősorban kék-zöldalgák aktivitása és szaporodása eredményeként üledékfelfogás, -megkötés és/vagy kicsapódás hozott létre".

1.28.4. Napjaink sztromatolitképződményei

A *Yellowstone National Park* (Wyoming) meleg forrásainak és gejzírjeinek alkalikus elfolyóiban csaknem amorf szilíciumból álló modern, növekedő cianobaktérium- és baktériumsztromatolitok fordulnak elő (BROCK, 1978). Ezek a sztromatolitok elsődlegesen szilikátosak. Bennük fotoszintetizáló flexibaktériumok nagyon gyakoriak. Növekedő, modern, „*Conophyton*-típusú" sztromatolitok is előkerültek, melyek egyébként külön sztromatolitcsoportot képeznek és termelőikről korábban feltételezték, hogy már régen, közel a prekambrium–kambrium határán, kihaltak.

A YELLOWSTONE-„algaszövedékek" többsége sztromatolitikus. Ezek megaszkóposak, szervesek, a vízből érkező üledékeket felfogják és megkötik, ásványokat csapnak ki és létrejöttük főleg a cianobaktériumoknak tulajdonítható. Yellowstone-ban nagyon sok sztromatolitos struktúra található, de közülük leginkább két típust tanulmányoztak: **1.** A kúp alakúakat, melyek a prekambriális *Conophyton*okhoz hasonlítanak. Ezeket csaknem kizárólag *Phormidium* (cianobakterium) fajok alkotják. **2.** Lapos, rétegezett szövedékek, melyeket a *Chloroflexus* fotoszintetizáló baktérium és a *Synechococcus* (cianobaktérium) társulása alakít ki.

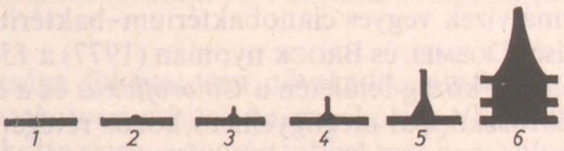
1.28.5. A kúp alakú sztromatolitok morfogenezise

A kúp alakú sztromatolitok morfogenezisét WALTER és munkatársai után (1976) vázlatosan a *133. ábra* mutatja be.

A kúp alakú sztromatolitokat elsősorban is a *Phormidium tenuae var. granuliferum* cianobaktérium fonalai hozzák létre. Növekedésük folyamatát BROCK (1978) szerint így vázolhatjuk:

1. A fonalak véletlenszerű csúszómozgásuk révén, az aljzat felett, először lapos szövedéket alakítanak ki.

2. A szövedék felszínén a *Phormidium* fonalai gyakran helyi, kiemelkedő csomókat képeznek, melyek feltehetően a kúp alakú (konofiton) képződmények központjait kezdeményezhetik. A véletlenszerűen csúszva mozgó fonalak ezután összekuszálódnak és a szövedék felszínéről a csomók térségében feltornyosodnak.



133. ábra

A Yellowstone-i kúp alakú sztromatolitok morfogenetikai sorrendje. 1. Vízszintesen elhelyezkedő fonalak szövedéke. 2. A fonalak a központban csomót képeznek. 3. A felfelé meredő fonalak a csomó felett tincset alkotnak. 4. és 5. A tincs megnyúlik. 6. A fonalak helyenkénti oldalirányú mozgása karéjokat eredményez. E növekedési folyamat alatt szilicifikáció folyamatosan jelentkezik (WALTER és munkatársai, 1976)

3. A fonalak a csomókban felfelé a fényforrás, a Nap irányába haladnak. A csomókon belül a fonalak önárnyékolása ugyancsak pozitív fotofobotaxist eredményez. Így sok fonal szövedékéből álló tincsek alakulnak ki, melyek a csomók fölé merednek.

4. A tincsekből nyúlványok lesznek. Ebben az állapotban már 1–2 mm magasak. Az **1–4** állapot 3 hónap alatt fejlődik ki.

5. A legaktívabban növekedő fonalak a nyúlványokban koncentrálódnak, melyeknek bázisa kúp alakúan kiszélesedik.

6. A kúpok felfelé növekedését a tápanyagellátás, de elsősorban is a felfogható napenergia ritmikus változásai szabják meg. E tényezők időben váltakozó mennyiségű szaporulatot eredményeznek és ennek folytán a szövedékben rétegeződés észlelhető.

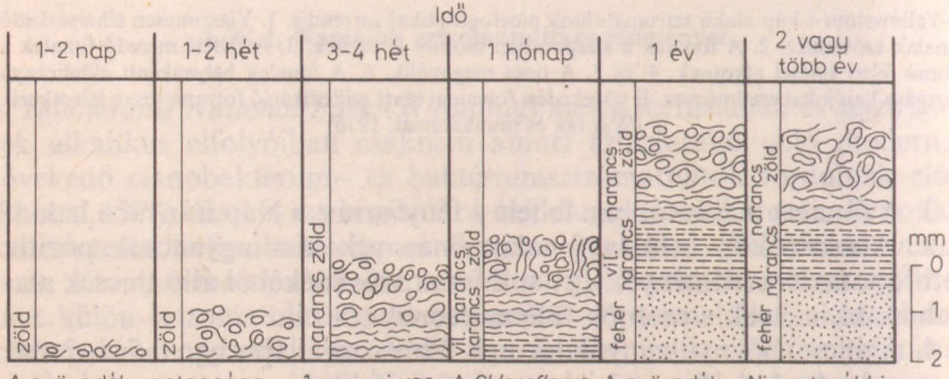
7. A fonalak egyenlőtlen mérvű horizontális növekedése folytán a kúpokon laterális taréjok alakulnak ki.

Tanulmányozták a cianobaktériumok szövedékében a kezdeti csomóképződés okait is. Kimutatták, hogy ha a csomókat diszpergálják, úgy

azok szuszpenzióiban, szemben az intakt szövedékcsomókkal, a fotoszintézis teljes gátlást szenved. A diszperzió magukat a sejteket nem károsította. Egy másik kísérletben azt igyekeztek felderíteni, hogy a kúp alakú struktúra belsejéből származó fonalak, melyek egyébként az önárnyékolás folytán alacsony fényintenzitásnál növekednek, a szuszpenzióban egyenletesen diszpergálva és hatékony fénynek kitéve vajon a fénygátlás miatt nem fotoszintetizálnak-e? E célból a fotoszintézis aktivitását különböző fényintenzitásoknál mérték. Az ép szövedékminta valamenynyi fényintenzitásnál szignifikánsan erőteljesebb fotoszintézist mutatott a diszpergálttal szemben. A diszperzió fotoszintézisgátló hatása tehát nem az intenzív fényre vezethető vissza.

1.28.6. Vegyes mikrobaközösségek alkotta sztromatolitok morfogenezise

Az alkalikus termálvizek vegyes cianobaktérium–baktériumszövedékeinek morfogenezisét Doemel és Brock nyomán (1977) a *134. ábra* mutatja be. Első lépésben a közeg felületén a *Chloroflexus* és a *Synechococcus* vékony, csak mikroszkóppal megfigyelhető közös réteget hoznak létre.



A szövedék vastagsága fokozatosan növekedik. A *Chloroflexus*nak nincs előnyben részesített térbeli orientációja.

1 mm-nyi vastagságra szaporodás után önárnyékolás a *Synechococcus*nál. A mélyebben fekvő *Synechococcus* sejtek elhalnak és lizálnak.

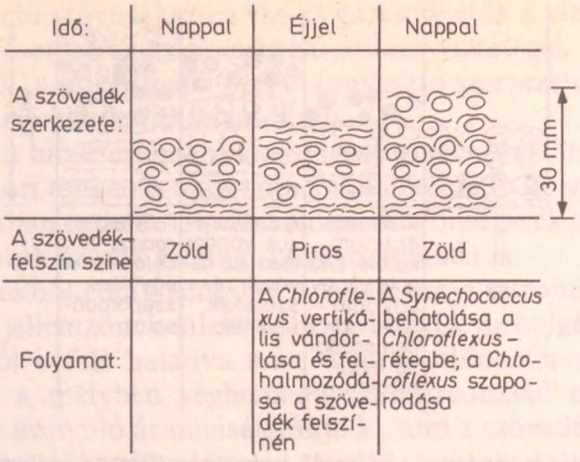
A *Chloroflexus* az alsó rétegből felfelé vándorol. Az alsónak önárnyékolása következik be, emiatt elpusztul, de nem lizál.

A szövedék felső része új, bár kinézésre változatlan. Az egyensúly a *Chloroflexus* üres fonalnál, azonban a szövedék nagyrészt lebomlott.

Nincs további változás a szövedékben. Az alsó részben lebomlás irányába billen.

134. ábra

A rétegezett baktériumszövedékek növekedésének vázlata; a hullámvonal *Chloroflexus*ra, az ellipszoid alakú testecskék *Synechococcus*ra utalnak (Doemel és Brock, 1977)

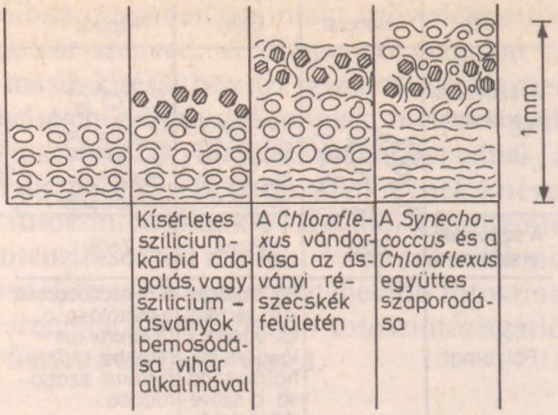


135. ábra

Napi növekedés és vándorlás a *Synechococcus-Chloroflexus* szövedékében (DOEMEL és BROCK, 1977)

E réteg vastagsága fokozatosan növekedik mindaddig, amikor már a mélyben a *Synechococcus*-sejtek önárnyékolása jelentkezik. Ettől kezdve az élő sejtek alkotta rétegvastagság többet már nem változik. Ahol a fény már túlságosan leárnyékolt, ott a *Synechococcus*-sejtek elpusztultak. Ugyanitt azonban a fény a *Chloroflexus* fotoszintéziséhez még elegendő, és ezért ezek itt egy alsó, fajtiszta, élő szövedéket képeznek. A *Synechococcus–Chloroflexus* felső szövedék és a tiszta *Chloroflexus* alsó szövedék között a határ meglehetősen éles, amit a zöld–narancs, átmenet nélküli, éles színváltozás is mutat. 3 mm mélységben, fotoszintetikus tevékenységében már a *Chloroflexus* alsó szövedéke is inaktívvá válik és elpusztul. Eszerint a *Chloroflexus*-populáció is az önárnyékolásig növekedik. A szövedék általános felépítésében további változás már nincs. Egyensúlyi állapot alakul tehát ki, ahol a folytonos növekedést a pusztulás és lebontás ellensúlyozza. Így az élő szövedék vastagsága a térkihasználás dinamikus természete ellenére is lényegében éveken át konstans marad.

A szövedékben végbemenő napi változásokat viszont a *135. ábra* szemlélteti. Nappal a *Synechococcus* és a *Chloroflexus* együtt szaporodnak, éjjel azonban a *Chloroflexus* pozitív aerotaxist mutat és a felszínre települ, ahol így tiszta *Chloroflexus* felszíni bevonat jelenik meg. A következő nap a *Synechococcus* gyors szaporodásával a szövedék felszínét újra részlegesen visszahódítja. Ez a szervezet igen gyorsan osztódik, naponta akár nyolcszor is megkettőződik. Feltehetően a *Chloroflexusé* is hasonló intenzitású, minthogy folyamatosan kevert tenyészetet alkotnak. A *Chloroflexus* a szövedékben elsődlegesen fotoheterotróf anyagcserét folytat.



136. ábra

Szaporodás és vándorlás a leülepedő ásványokon (DOEMEL és BROCK, 1977)

A *136. ábra* a szövedék viselkedését abban az esetben mutatja be, midőn felületére különböző anyagok ülepednek. A szövedékre pl. viharok alkalmával kicsiny szilíciumrészecskék tömege rakódhat le, amit a szövedék szaporodásával újra és újra beborít.

1.28.7. A sztromatolitok és mikrobaközösségeik általános jellemvonásai

A recens sztromatolitok tanulmányozása alapján BROCK (1978) két geológiai fontosságú következtetést vont le. Először is, hogy rétegezett szövedékeket mind fotoszintetizáló, de molekuláris oxigént nem termelő baktériumok, mind cianobaktériumok egyaránt létrehozhatnak. A legrégebbi sztomatolitok feltehetően az elsőktől származnak. Másodszor, a szerves anyag teljes lebomlása anaerob körülmények között is végbemehet és a szilikátos, meszes sztromatolitstruktúrák szerves anyag mentessé válhatnak. A modern sztromatolitok jellemvonásait (KRUMBEIN és munkatársai, 1979., COHEN és munkatársai, 1975 etc.) a következőkben foglalhatjuk össze:

1. A jelenkori mikrobiális sztromatolitos környezetek finoman rétegezettek.

2. Ez a lamináltság, vagyis rétegezettség létrejöttét tekintve napi, hónapi vagy évi biológiai ciklusokat tükröz, míg strukturálisan mikroorganizmusok egymásra települt különböző szövedékzónáiból áll.

3. A szövedékstruktúrákat előállító mikrobatársulások faji összetétele és ezek fiziológiai aktivitása nagyon eltérő lehet és különböző paraméterektől függ, így a szedimentáció mértékétől, a szövedék és a felette lévő

eltérő összetételű szövedékréteg víz- és gázcseréjétől, a víz sótartalmától, a külső környezetet képező és a belső átitató vízrétegek kemizmusától, a fényrezsimtől, a mikrobiális gyepet fogyasztó szervezetektől, a gyepalkotó mikrobák kölcsönviszonyától stb.

4. A modern bioszférában a sztromatolitrendszerek szélesen elterjedtek és a jelenkori tengerek nagy sótartalmú lagúnáin át, a parti övezetek minden fajtájában észlelhetők. Hasonlóan közönségesek hőforrásokban, de megtalálhatók száraz sivatagi környezetekben is.

5. A tengerekből eddig ismertetett valamennyi sztromatolitos mikrobaszövedékre jellemzőnek találták, hogy bennük az oxigén koncentrációja a felszíntől befelé haladva már néhány milliméteren belül nullára csökken, míg a mélyben végbemenő szulfátredukció a kén-hidrogén állandó felfelé irányuló áramlását váltja ki, ami a szövedéken belül nagy szulfidkoncentrációkat hoz létre.

6. A szövedékbe a fény behatolása nagyon korlátozott és ritkán haladja meg az 1–3 mm-t.

7. Az egyes sztromatolittípusokon belül a rétegeződés általában rendkívül finom és a szövedékben az aktív fotoszintetizáló régió ritkán haladja meg a 3–4 mm felületi rétegvastagságot.

8. Bizonyos körülmények között a szövedékben előállított szerves anyag jelentős része hosszú évekig megmaradhat.

9. Kalcium-karbonát beépülése, szilicifikáció stb. a sztromatolitok rétegezett struktúráit oly mértékben konzerválhatják, hogy azok az üledékben is megőrződnek, ami lehetővé teszi, hogy a diagenezisen át a szilárd kőzetek stádiumáig is eljussanak.

10. 1975-ig általánosan elfogadott nézet volt, hogy a sztromatolitos szövedékekben obligát aerob cianobaktériumok, melyek az oxigén nagyon alacsony parciális nyomásánál is tevékenykedni képesek, a fő elsődleges termelők. Kimutatták azonban, hogy a cianobaktériumok anoxigén fotoszintézissel kifejezetten anaerob körülmények között is nagyfokú produktivitást fejthetnek ki.

11. A modern bioszférában található sztromatolitos mikrobaszövedékek modellként szolgálhatnak az egykori prekambriális sztromatolitok fejlődésének megértéséhez. Utóbbiak az Élet történetének több mint kétharmad részén át a legfontosabb ökológiai rendszerek voltak.

12. A mai sztromatolitok ökoszisztémáin belül csaknem valamennyi olyan primitív szervezettípus, mely a földi élet kiterebélyesedése során több mint 2×10^9 éven át valamilyen módon kulcsszerepet játszott, képviselve van. A sztromatolitos szövedékekben ma általában az anaerob és fakultatív anaerob heterotróf baktériumok, hifomikrobák, fotoszintetizáló anaerob baktériumok, cianobaktériumok és bizonyos kemoszintetizáló baktériumok dominálnak.

13. Ezekben a komplex, sokfajú közösségekben a fotoszintézis és a szervesanyag-degradáció dinamikájának tanulmányozása mérésekkel azért is rendkívül bonyolult, mivel a szövedékben a különböző „alközösségek" 1–3 mm vastag, elkülönült, disztinkt rétegeket alkotnak.

14. Az a mintegy 2 milliárd éve lezajlott evolúciós történéssorozat, mely a csupán az I-es fotorendszert használó anaerob fotoszintézistől az I-es és II-es rendszert is alkalmazó aerob fotoszintézishez vezetett, éppen sztromatolitos környezetben mehetett végbe. Ez a miliő kezdeményezte azt a drasztikus változást, amely az egykori, tisztán anaerob környezettől napjaink aerob és anaerob környezeti rendszereinek keveredéséhez vezetett. Ezek a lokális aerob, ill. anaerob miliők ma elsősorban is az eukarioták jelenlétével, ill. hiányával jellemezhetők.

15. A sztromatolitos mikrobiális ökológiai rendszerek a Földtörténet során szénhidrogének termelésében is fontos szerepet játszhattak és feltételezik, hogy a sztromatolitok fosszilis energiahordozók forrásai lehettek, mivel rendkívül produktív sekélyvízi környezetekben fejlődtek, és termékeiket az anaerobiózis könnyen megőrizhette.

1.28.8. A modern sztromatolitok anyagcseréje

A víznek mint elektrondonornak a hasznosítása kétségtelenül nagy előnyt jelenthetett, mivel könnyen hozzáférhető és mindenütt jelen van. Ezt a lépést a sztromatolitok cianobaktériumai kezdeményezhették. Ily módon először az őáltaluk benépesített vizekben, majd az egész atmoszférában megváltoztatták a geokémiai gradienseket. Ezt követően számos olyan ökoszisztéma alakulhatott ki, melyekben az oxigén mennyisége a felszíntől lefelé egészen a zéró értékig fokozatosan csökkent, majd ettől a kemoklintől tovább lefelé a kén-hidrogén vagy a metán egyre inkább növekedő koncentrációi jelentkeztek. Ilyen ma pl. a Fekete-tenger (*lásd* 7.13. alfejezet.), de számos üledékrendszer is, melyek legfelső rétege aerob, míg alatta anaerob üledékek helyezkednek el. Az efféle környezetek átmeneti ökoszisztémáinak klasszikus fizikokémiai redoxidiagramjain az oxigén és a kén-hidrogén kizárják egymást és az ilyenekben a kémiai és a biológiai folyamatokat főleg a szulfát–szulfid, oxigén–hidrogén és a metán–szén-dioxid erős redoxipárok szabályozzák. Ezenkívül ugyanitt a ferri–ferrovas, a nitrát, ammónia és dinitrogén, továbbá bizonyos esetekben a Mn (II) és a Mn (IV) redukciós potenciáljai is közrejátszanak. A kén-hidrogénnek kénné és szulfáttá végbemenő, rendkívül gyors kémiai és biológiai oxidációja az oxigén és a kén-hidrogén kölcsönös kizárását még csak hangsúlyozza. Ennek folytán e két gáz koegzisztenciája, legalábbis az irodalmi adatok szerint, csak szerfelett csekély mennyiségekben lehetséges.

A sztromatolitos környezetek mikrobák kialakította szövedékeiben korábban mindig szigorú oxigéngradiens létezését tételezték fel, mely a szövedékben már 1–3 mm mélységen belül teljes oxigénkimerüléshez vezet, amit azután befelé, ill. lefelé növekvő szulfidkoncentráció vált fel. A szövedékben a mikroorganizmusok megoszlása is ezt mutatja, minthogy általában legkívül az aerob fotoszintetizáló mikrobák egy vagy két rétegét észlelték, melyet lefelé az anaerob fotoszintetizáló baktériumok (zöld vagy bíbor fotoszintetizáló baktériumok, anaerob cianobaktériumok és flexibaktériumok) egy vagy néhány rétege követ. Az általános felfogás szerint az ilyen rendszereket a felszínen az oxigén, a mélybe hatoló fény, a légzés számára elérhető energiaforrások és elektronakceptorok szabályozzák. A légzés révén produkált szulfid az anaerob rétegek fotoszintetizáló populációinak, továbbá a kemolitotróf vagy heterotróf kén-hidrogén-oxidáló baktériumoknak a kén-hidrogén–oxigén érintkezési sávokban elektrondonorként szolgálhat.

1.28.9. A recens Sabkha-sztromatolitok mikrorétegezettsége

KRUMBEIN és munkatársai (1979) az Elat-öböl nyugati partján egy kicsiny, tengervízforrással táplált sós tóban (Sabkha) olyan sztromatolitos mikrobaszövedékeket találtak, melyek jellemvonásaikban a fentebb ecsetelt általános típustól lényegesen eltérnek. Vizsgálataik alapján nemcsak a sztromatolitos ökoszisztémák klasszikus modelljét tették kritika tárgyává, hanem a sztromatolitok lehetséges evolúcióját – a prekambriumtól napjainkig – is felvázolni igyekeztek. Redoximérések, oxigén- és kén-hidrogén-meghatározások adatai, továbbá annak a ténynek az alapján, hogy a „SABKHA"-mikrobaszövedékekben a mikrobák népességeinek nyolc különböző rétegét mutatták ki, a következő megállapításokra jutottak:

1. A SABKHA-mikrobaszövedék-rendszerek a nappali fotoszintézis során igen nagy mennyiségű oxigént termelnek.
2. A szövedéken belül nagy mennyiségű kén-hidrogén termelődik, mégpedig különösen sok a szulfátredukáló baktériumok fekete, legbelső, nyolcas számú zónájában.
3. A szövedék belsejében termelt oxigén részben kidiffundál a külső vízoszlopba, ahol az oxigén tekintetében akár négyszeres túltelítettség is létrejöhet.
4. Minthogy a szövedéken át a kén-hidrogén állandó áramlása folyik, ezért a környező vízben a kén-hidrogénnek jelentős koncentrációi jönnek létre.

5. Az egyik, 2 mm vastagságú szekcióban (0,5 ml szövedékanyag) 4 mg oxigén/l és 25 ppm kén-hidrogén együttes jelenlétét mutatták ki.

6. Az aerob fotoszintézis és az oxigéntermelés legfontosabb helyeit kokkoidális aerob (2-es réteg) és fonalas aerob cianobaktériumok (4-es réteg) népesítik be.

7. A fotoszintetikus potenciál valamennyi rétegben egészen a 7.-ig *(Chromatium* és *Chlorobiaceae)* megmarad!

8. A hiperszalin állapotok, a sivatagi fényrezsim és a szövedék felett elhelyezkedő sekély, tiszta víz (10 cm-nél nem mélyebb) eredményeként a SABKHA-mikrobaszövedékben extrém intenzív, aerob és anaerob fotoszintézis tapasztalható.

9. E sztromatolitrendszer egy esztendő alatt produkált rétegvastagsága nagyobb, mint bármely más eddig ismert mikrobaszövedék-rendszer esetében. Maximum 24 mm-t is kitehet, mely a fekete, szulfátredukciós zóna felett hét megkülönböztethető zónára tagolódhat. Ez a különleges helyzet tette lehetővé, hogy a szövedékben olyan méréseket is végrehajthassanak, amilyenek a 2–5 mm-es, aktív populációjú szövedékekben lehetetlenek.

10. Az oxigén- és a kén-hidrogén-koncentráció, továbbá a redoxipotenciál napi ingadozásainak mérései arra utalnak, hogy a szövedéken belül az oxigén és a kén-hidrogén maximumai vertikálisan, egymástól kevesebb mint 2 mm távolságban egymás alatt, mégpedig alternáló rétegekben elkülönítve jelentkeznek. Így valamely alacsonyabb oxigéntartalmú felszíni zóna alatt, jóllehet a kén-hidrogén mennyisége megnövekedhet, de ez alatt egy újabb, második oxigénben még gazdagabb réteg húzódhat, amit lefelé ugyancsak második, magasabb kén-hidrogénkoncentrációjú réteg követhet. Mindez határozottan jelzi, hogy ahelyett, hogy a kén-hidrogén koncentrációja a szövedék mélyebb részei felé állandóan növekedne, az oxigén kétszer is csúcsértéket érhet el, mégpedig olyan rétegek alatt, melyek szulfidban gazdagok.

11. Aerob fotoszintézis az 1-es, 2-es, 3-as, 4-es és 6-os rétegekben, az anaerob fotoszintézis a 3-as, 5-ös, 6-os és 7-es rétegekben folyik.

12. A szövedékben a cianobaktériumoknál, az anaerobról aerobra átváltó fotoszintézist nem lehetett megfigyelni, bár ezeknek a szervezeteknek erre az átállásra meglenne a potenciálja.

13. Aktív fotoszintézist 20 mm mélységig észleltek, amely csaknem 10-szerese annak az aktív mélységnek, amit eddig ilyen szövedékekben tapasztalni lehetett. Fotoszintézis ezekben 10 μ Einstein cm^{-2} s^{-1}-nél kevesebb fényintenzitásnál is végbemegy.

1.28.10. A Sabkha-sztromatolitok biokémiája

Az oxigén és a szulfid együttes jelenléte, továbbá a rendkívül csekély sugárzásnál is kialakuló fotoszintetikus potenciál érvényre jutása csakúgy, mint a mikrobaszövedék néhány mm-én belül is a fotoszintetizáló baktériumok különböző populációinak éles rétegezettsége, határozottan bizonyítják, hogy a specializáció és adaptáció ezekben a környezetekben is igen magas fokot érhet el. A kén-hidrogén-rezisztens, aerob cianobaktériumok, továbbá az anaerob fotobaktériumok szoros együttműködése az adaptáció hosszú fejlődéstörténetére és az alkalmazkodás különböző irányaira utal. Az ilyen extrém körülmények között is megnyilvánuló nagyon nagy produktivitás arra is magyarázatot adhat, hogy a prekambrium korában milyen ökológiai viszonyok uralkodhattak, és hogy a sztromatolit-ökoszisztémák miként járulhattak hozzá szénhidrogének akkumulációjához. Aerob cianobaktériumok eszerint, oxigénmentes rétegek alatt, anaerob fotoszintézisre való áttérés nélkül is tevékenykedhetnek és ugyanakkor nagy mennyiségű oxigén halmozódhat fel a szövedék nyálkás belső anyagában. Rendkívül érdekes tény, hogy a kén-hidrogén képes három oxigénprodukciós rétegen is áthaladni, melyekben egyébként az oxigén túltelítettsége négyszeres is lehet, és buborékokat képezhet anélkül, hogy a diffúzió alatt teljesen oxidálódna.

Az aerob és az anaerob fotoszintézis, továbbá az aerob és anaerob respiráció és fermentáció egyidejű előfordulása a mikrobaszövedék néhány mm^3-én belül, feltehetően azokat az ősi állapotokat tükrözi, melyek az aerob fotoszintézis evolúciójának kezdetén az anaerob prekambrium sekélyvizeinek üledékeiben fennállhattak. Feltételezhető, hogy nemcsak a közösségek rétegezettsége, hanem ezek fizikokémiai–biológiai paraméterei is hozzájárulhattak a prekambrium sztromatolitjainak lamináltságához. Sőt ezen túlmenően, azok az ún. réteges vasképződmények *(banded iron formations)* is (*lásd* 469. old.), melyek a Földön $2{,}6 \times 10^9$ évnél korábban jöttek létre, ilyen oxigén- és kén-hidrogén-gazdag rétegek váltakozása révén alakulhattak ki.

SCHUBERT és munkatársai (1980) sztromatolitok mikrobaszövedékében előforduló cianobaktériumok és anaerob fotoszintetizáló baktériumok *(Chromatiaceae)* tiszta tenyészeteinek *in vivo* fotoakusztikai spektrumát mérték. A tiszta kultúrák PA-spektrumát a mikrobaszövedékrétegek PA-spektrumával hasonlították össze. Ez a módszer egyelőre csak lehetőségeket rejt magában, mivelhogy ezzel üledékekben és kőzetekben a fotoszintetikus és más pigmentek abszorpciós spektrumának mérése a struktúra destrukciója nélkül, a minták *in vivo* analízisével is lehetővé válik.

1.29. Az oxidatív légkör kialakulásának problémaköre

Az anaerob, redukáló őslégkör oxidatívvá alakulásának kérdésével rendkívül kiterjedt irodalom foglalkozik (DICKERSON, 1978; HENDERSON–SELLERS és HENDERSON–SELLERS, 1978; TOWE, 1978; DEMOULIN, 1979; TOWE, 1979; SCHIDLOWSKI, 1979; CLARK és RUSSEL, 1981; COPE és CHALONER, 1981; JUNGE, 1981 stb.) A továbbiakban e kérdéskomplexum rövid áttekintését adjuk.

1.29.1. A légkörváltás ásványtani bizonyítékai

A légköri oxigén – mint láthattuk – már akkor rendelkezésre állhatott, amikor 1400–1500 millió évvel ezelőtt az első eukariota sejtek megjelentek. Igaz, globális megoszlása és oldódása az óceánok vizében még később is nagyon egyenlőtlen lehetett, és amint arra HENDERSON–SELLERS és HENDERSON–SELLERS is rámutattak (1978), a soksejtű élet kiinduló diverzifikációja mind a déli, mind az északi földtekén elsősorban is csak az 50–70° szélességek között bontakozhatott ki, minthogy számításaik alapján az óceánok felső vízrétegeiben az elegendően magas oxigénszint és megfelelő hőmérséklet kombinációja elsőnek csakis ebben az övezetben jelentkezhetett. Eszerint a prekambriumban az ősi cianobaktériumok tevékenysége még távolabbi múltra nyúlik vissza. Az oxigén megjelenése idejének pontosabb bizonyítékait azok az üledékes ásványok *(sedimentary minerals)* szolgáltatják, melyek lerakódásuk alkalmával már a szabad oxigén közvetlen hatásának voltak kitéve. Ilyen – bár fordított értelemben – bizonyító értékűnek minősített ásvány az uráninit (UO_2), melyet a prekambriális folyómedrek számtalan üledékéből mutattak már ki. Az uráninitszemcsék oxigén jelenlétében könnyen U_3O_8 -dá oxidálódnak és ilyen alakban már oldatba mennek. Az uráninit folyómeder-lerakódásai azt követően, hogy a légköri oxigén koncentrációja 1% fölé emelkedett, többé már nem jöhettek létre. Uráninit egyébként csak a kétmilliárd évnél idősebb üledékekben található, fiatalabbakban egyáltalán nem. Feltehetően a reduktív és az oxidatív légkör váltása erre az időre tehető (CLOUD, 1973; SCHOPF, 1975).

Egy másik fontos és sokak szerint perdöntő ásványi felhalmozódási típust a „vörös rétegek"-nek *(red beds)* nevezett, vasban gazdag képződmények képviselnek. Ezek viszont csak olyan üledékekből ismeretesek, melyek kétmilliárd évnél fiatalabbak, idősebbekből nem. Vas-oxidokkal (a legfontosabb vas-oxid ásvány ezekben a hematit: Fe_2O_3) összetartott ásványi részecskék tömegéből állnak. Nem víz alatt, hanem közvetlenül a légköri oxigén hatásának kitéve, szárazföldi körülmények között jöhet-

tek létre. A keletkezésük körül folyó vitákban a biológusok feltételezik, hogy létrejöttükért a biológiai úton előállított oxigén a felelős. Felmerültek azonban ellenvetések is. Így pl., minthogy a legtöbb *„red bed"* kontinentális felhalmozódás eredménye lehet és nem tengerié, emiatt könnyen elképzelhető, hogy legutolsó, jelenleg feltárt és meghatározott korú településhelyükre már hosszú ideig tartó, erózió kiváltotta vándorlás után jutottak.

Nincs kizárva tehát, hogy e vörös rétegek oxidált vasanyaga már sokkal korábban létrejöhetett és idősebb, mint az a kétmilliárd év, amennyire jelen geológiai feküjük helyzete alapján következtetnek. Eredetük még a reduktív légkör idejére is visszanyúlhat (DICKERSON, 1978). Egyesek szerint a *„red bed"*-ek oxigénje nem biológiai eredetű. Feltételezik, hogy az UV-sugárzás hatására végbement vízbontásból származik. Ez történhetett pl. a Marson, a vörös bolygón, melynek felületén ma hatalmas kiterjedésű *„red bed"*-ek léteznek, jóllehet e bolygó légkörében csak nyomokban van jelen oxigén és élő anyag jelenléte sincs még meggyőzően kimutatva (*lásd* 8.6. alfejezet).

Az oxigéntartalmú légkör megjelenése idejének másik érdekes ásványtani bizonyítéka az ugyancsak vasban gazdag, ún. „rétegezett vasképződmények" *(banded iron formation)* előfordulása. Az ilyen típusú vasfelhalmozódások mennyiségüket tekintve a Földön ma néhány tízmilliárd tonna vasat tesznek ki, mégpedig szilikátokban gazdag mátrixba ágyazott vas-oxidok alakjában. A Föld fő gazdasági vastartalékai. Keletkezésük néhány számillió évet kitevő, viszonylag rövid geológiai periódusra esik, mely valamivel korábban, mint kétmilliárd évvel ezelőtt kezdődött.

1.29.2. A molekuláris oxigén megjelenésének globális geokémiai következményei

A légköri oxigén koncentrációjában bekövetkezett változásokat a jellegzetes „rétegezett vasképződmények" típusú vasszedimentációk alapján, a következő feltételezett történéssorozattal magyarázhatjuk (CLOUD, 1973). Először is a primitív anoxikus óceánban a vas ferroállapotában (oxidációs szám: +2) sók alakjában fordult elő, és mint ilyen, a tengervízben oldatban volt. Az aerob fotoszintézis kialakulásakor az oxigén csekély koncentrációkban az óceán felső régióiba diffundált, ahol az oldott vassal reakcióba lépett. A ferrivé oxidálódott vas (oxidációs szám: +3) hidratált ferri-oxidok alakjában csapódott ki, és szilikátokkal rozsdaszínű rétegeket képezve az óceán fenekén halmozódott fel. Ez a folyamat hosszú időn át tartott és végül is valamennyi vas az óceán fenekére

került (GOLDICH, 1973). Miután a tengerek ferrovaskészlete kimerült, a vas(II) oxidációjának folyamata a szárazföldre tevődött át és ott megkezdődött a vörös homokkövek és vörös agyagok kialakulása.

Miként a vörös rétegek vonatkozásában, úgy a „rétegezett vasképződmények" esetében is újra felmerül az oxigén abiotikus eredetének lehetősége: a nagyon korai prekambriumban lerakódott vasformációk oxigénje a víz direkt fotolíziséből is származhatott. A kétmilliárd évvel ezelőtt végbement, intenzív vas-oxid-felhalmozódásokért azonban a fotokémiai vízbontás magyarázata kevéssé látszik kézenfekvőnek. Ez a folyamat aligha termelhetett olyan nagy mennyiségű oxigént, hogy ezzel a hatalmas mértékű vaslerakódások magyarázhatók lennének. Valójában ehhez csupán egyetlen ismert mechanizmus szolgáltathatott elegendő mennyiségű oxigént: az aerob fotoszintézis, melyet az oxidált vas és a termelt szerves anyag szedimentációja követhetett. Az utóbbi azért, mivel a szerves maradványok teljes aerob lebontása több oxigént igényelt volna, mint amennyi termelődött. A fosszilis sztromatolitok először a 2300 millió éve lerakódott üledékekben váltak gyakoriakká (DICKERSON, 1978), röviddel azt megelőzően, hogy a vasérc fő tömegének felhalmozódása kezdetét vette. A sztromatolitok első széles körű megjelenése feltehetően az oxigéntermelő cianobaktériumok előtérbe kerülését és anyagcseretípusaik fokozódó differenciálódását jelzi. Ettől az időtől kezdve oxigéntermelésük is már számottevő lehetett. Ennek ellenére még néhány százmillió évig az óceánok vizében oldott ferrovas pufferszerepet tölthetett be és a légköri oxigén koncentrációját alacsony szintre szabályozta. A ferrovas folyamatosan oxigénnel reagált és mint ferri-oxid csapódott ki. Midőn az óceán pufferkapacitása kimerült és mentessé vált az oxidálatlan vastól és más hasonló pufferoló ágensektől, a légkör oxigénkészleteinek erőteljes gyarapodása előtt is megnyílt az út.

1.29.3. A víz abiotikus fotolízisének lehetséges szerepe

TOWE (1978) ezzel szemben annak a meggyőződésének adott kifejezést, hogy az oxigén általános anorganikus süllyesztőinek kimerülése először csak lokálisan, majd világméretekben is a víz abiotikus fotolíziséből származó oxigén hatására mehetett végbe. Az oxidált vas- és kénüledékek tömeges megjelenése mintegy kétmilliárd évvel ezelőtt azonban mindenképpen a prekambrium redukáló hidroszférája korszakának végét jelezte. Szerinte a redukáló környezet fokozatos eltűnése és ezzel együtt a szulfidoknak mint potenciális elektrondonoroknak mennyiségi megcsappanása kifejezett evolúciós nyomást gyakorolhatott a lokális mikrobiótákra, és ezek tagjai kénytelenek voltak alternatív reduktánsokhoz

alkalmazkodva kifejleszteni és megvalósítani a sokkal költségesebb vízbontást, az oxigéntermelő II-es fotorendszert és az aerob respirációt. Ezek szerint a biológiai szabad oxigéntermelés csupán csak folytatta, kiegészítette, esetlegesen intenzitásában fölül is múlta az abiotikus fotodisszociáció termelte oxigén mennyiségét. Mindez végül is a mai oxidatív légkör kialakulásához vezetett. Ebben az átmeneti időszakban, amikor a viszonyok – legalábbis lokálisan – az oxidálóból a redukáló környezeti állapotba és vissza gyorsan változhattak, a felszínközeli vizeket elsősorban is azok a cianobaktériumok népesíthették be, melyek alternatív módon fakultatíve mind anoxigén, kén-hidrogén elektrondonorral dolgozó, mind aerob, elektronokat vízbontással előállító fotoszintézist egyaránt megvalósítani voltak képesek.

TOWE-nak (1978) a légköri oxigén kizárólagos biológiai eredetével szembeni érvei közül különösen erős vitát váltott ki az az állítása, miszerint a klorofill-a bioszintéziséhez oxigénre van szükség. Amennyiben ez így van, úgy nagyon nehéz lenne nem feltételezni, hogy a légköri szabad oxigén már azelőtt is létezett, hogy a mikroorganizmusok ezt az oxigénfelszabadító fotoszintézishez feltétlenül szükséges molekulát egyáltalán szintetizálták. Ez az állítás onnan származik, hogy BOGORAD (1966) szerint a klorofill-a bioszintézisében oxigénigényes lépés is szerepel, mégpedig a koprogén oxidatív dekarboxilációja során. Ez a porfirinek (haem, klorofillek, bakterioklorofillek) szintézisénél sokak által általánosan érvényesnek tartott lépés, már BOGORAD értelmezésében sem látszott teljesen egyértelműnek és minden esetben következetesen kimutathatónak. A bíbor, nem kénbaktérium *Rhodopseudomonas sphaeroides*ben pl. az oxigén éppen hogy elnyomja a bakterioklorofill produkcióját.

DEMOULIN (1979) TOWE-val (1978) vitázva rámutat, hogy a fotoszintetizáló baktériumoknál mind aerob, mind anaerob koprogenázaktivitás egyaránt kimutatható. Egyes cianobaktérium-fajok, melyek anaerob viszonyok között nemcsak túlélnek, hanem redukált kénre alapított fotoszintézissel a fotoszintetizáló obligát anaerob baktériumokhoz hasonlóan gyorsan szaporodnak is, a koprogén dekarboxilezésére oxigén nélkül is képesek. Az a feltételezés, folytatja DEMOULIN, hogy a redukáló légkörben a víz hatalmas hidrogénforrásainak hasznosítására nem jelentkezhetett még szelekciós kényszer, nem tűnik következetesnek. A csökkenő mennyiségű reduktánsokért folytatott versengésben teljesen mindegy, hogy ezeket az oxidáló atmoszféra vagy más prokarioták fotoszintetizáló aktivitása fogyasztja-e el. Mindenesetre még nagy kénhidrogén-tartalékok vagy más, a bakteriális fotoszintézishez felhasználható reduktánsok globálisan fölös mennyiségeinek esetén is bizonyos lokális környezetekben határozott reduktánsdeficit azért még jelentkez-

hetett, ami a szervezetek közötti fokozott versengést válthatta ki. TOWE (1979) viszontválaszában kitartott amellett a nézete mellett, hogy a fotodisszociációt mint a korai prekambrium valószínű szabad oxigénforrását semmiképpen sem ignorálhatjuk.

1.29.4. A faszén mint a légköri oxigén geológiai indikátora

A paleoatmoszféra oxigénszintjének kérdésével foglalkozva COPE és CHALONER (1980) javasolták, hogy e problémát döntsék el annak alapján, hogy a kérdéses geológiai üledékekben a faszén származéka, a karkoal (charcoal; fuzinit) jelen van-e vagy sem. A földtörténet során ugyanis a légköri oxigén által táplált erdőtüzekből vagy szerves anyagok égéséből származó hő lehetett a karkoalképződés legfontosabb kezdeményező tényezője. Ha valamely ismert korú geológiai rétegben karkoal nincs jelen, úgy a réteg keletkezésekor a légkör oxigéntartalma legfeljebb csak csekély lehetett. Ez a javaslat sem problémamentes. Az égéshez oxigén szükséges, azonban magához a karkoal (kiinduló anyaga a faszén) képződéséhez nem feltétlenül. Ha fát magas hőmérséklet hatásának tesznek ki, úgy belőle oxigéntartalmú gázok fejlődnek, miközben egy oxigénszegény grafitos hálózat, az ún. karkoal marad vissza. Karkoal anoxikus körülmények között is képződik, mégpedig 200 °C feletti hőmérsékleten. Következésképpen a légköri oxigén koncentrációjának és a karkoal képződésének az összefüggése semmi esetre se lehetett annyira szoros és közvetlen, amint azt egyesek feltételezik. CLARK és RUSSEL (1981) szerint az összetételtől függően, a tanulmányozott faminták egy részének égését már olyan atmoszférában sem mutathatták ki, amely 13–21% oxigént tartalmazott. Következésképpen a karkoalképződés legvalószínűbb hőforrása a bőséges oxigén táplálta égés még viszonylag magasabb oxigéntenzióknál sem állhatott feltétlenül rendelkezésre, és így a karkoalképződés és a légköri oxigénkoncentráció közötti korreláció nagyon laza lehet. COPE és CHALONER (1981) továbbra is fenntartják megállapításukat, miszerint a karkoal jelenlétét valamely rétegben, elvileg értékes geológiai indikátornak tekinthetjük. Megjegyzik azonban, hogy ők a karkoalképződéssel kapcsolatban a sok közül csak a legfontosabb korlátozó tényezőt hangsúlyozták. Ez a tényező a légköri oxigénszint, mely az égéshez legalább 13%-ban szükséges, ami megfelel ~0,6 PAL-nak (PAL: *Present atmospheric level:* jelenlegi légköri szint).

1.29.5. Az oxidatív légkör kialakulásának problémái a modern geokémia szemszögéből

JUNGE (1981) számos geokémiai megfontolásra támaszkodva azt tartja, hogy az ősatmoszféra oxigéntartalma még 10^{-8} térfogatrésznél is kevesebb lehetett. Ezt a magmák felszínre tört gázkomponenseinek valószínű összetételére, a víz és a szén-dioxid egykori disszociációjából kialakulhatott oxigén feltételezett nagyságú parciális nyomására, az egyidejű hidrogén-exhalációkra, továbbá a Föld ősfelszínének oxidációjánál elhasználódhatott oxigén lehetséges mennyiségére alapítja. Jelen tudomásunk szerint az élő anyag fejlődése kifejezetten oxigénmentes körülmények között, organikus vegyületekből, abiotikus úton képződött szerves anyagokból indult ki. Ellenkező esetben a légkörben vagy a tengerekben oldott állapotban előforduló oxigén ezeket az élővé válás útjára jutott anyagokat oxidatíve azonnal lebontotta volna és a biopoézis is eleve lehetetlenné vált volna.

Jelenleg, sajnos, semmiféle adatszerű becslés sem áll rendelkezésünkre arra vonatkozóan, hogy az oxigén parciális nyomása milyen ritmus szerint növekedhetett a kétmilliárd esztendővel ezelőtti kritikus időkben. Laza, vas-oxiddal vörösre festett ásványi képződmények már az oxigén nagyon csekély parciális nyomásánál is kialakulhattak. A fotoszintézis energetikájára, anyagforgalmára és sztöchiometriájára alapítva a szerves anyagok minden egyes szénatomjára egy szabaddá tett oxigénmolekulát számíthatunk. Az üledékek geokémiája arra utal, hogy ezen az alapon a mai légkör szabad oxigénkészlete az üledékekbe zárt szénkészleteknek megfelelően elvárható oxigénmennyiségnek csupán mintegy 5%-át teszi ki, míg a hiányzó 95% kb. azonos arányban az $FeO \rightarrow Fe_2O_3$-má, és a kén $\rightarrow SO_4$-gyé történő oxidációjához használódott el. Az összes biogén úton előállított oxigénnek tehát csak nagyon csekély része található szabadon a mai légkörben. Egyéb, más olyan, a biológiai fotolízistől eltérő mechanizmus, mely a légkörbe szabad oxigént juttatna, az általános földi oxigénforgalom szempontjából alig jöhet számításba. Ilyen mechanizmus lehet azért a víz magaslégköri fotodisszociációja, melynek során a hidrogén a Föld vonzásköréből távozik, míg az oxigén visszamarad és a légköri oxigénkészletet gazdagítja. Ebből, a még ma is végbemenő folyamatból megbízható becslések szerint a jelenlegi összes oxigénnek mintegy 3%-a származhat.

JUNGE (1981) szerint a ^{13}C-mérési értékek arra utalnak, hogy már $3{,}7 \times 10^9$ évvel ezelőtt a Földkéregből kiáramlott összes szén-dioxidnak kb. 25%-a, szerves szén alakjában az üledékekbe kerülhetett. Feltételezik, hogy már nagyon korán tetemes méretű szedimentáció folyhatott, amiben annyi szerves szén szerepelhetett, hogy annak tömege valószínű-

en a mainak akár 50–80%-át is elérhette. Valahol ennek a szerves széntömegnek megfelelő oxidációs ekvivalenseknek is léteznie kellett. Minthogy az ismert különböző fotoszintézistípusok ^{13}C-frakcionálása lényegesen nem különbözik egymástól, ezért jelenleg azt megítélni, hogy az egykori szervesanyag-tömegek a fotoszintézis mely típusának köszönhették létrejöttüket, a redukált kénvegyületekkel vagy a vízzel dolgozó-kénak-e, sajnos, nincs módunkban.

Megoldatlan kérdést jelent az is, hogy ha a fotoszintézis már kétmilliárd évnél sokkal hamarabb létezett, és kvantitatíve is olyan jelentős volt, úgy miért csak annyira későn indult meg a szabad oxigén légköri felhalmozódása? Bizonyosan e téren a fentebb már említett óceánikus és üledékes, redukált vas- és kénkészletek pufferoló hatása játszhatott szerepet, továbbá a biológiai oxigénprodukció intenzitásának feltehetően változó szintjei is. Napjainkban az üledékekben többnyire pirit (FeS_2) alakjában még mindig tetemes mennyiségű redukált vas és kén található annak ellenére, hogy a légkörben szabad oxigén van jelen. A bioszférának ez a hatalmas arányú geokémiai kiegyensúlyozatlansága mindig is folyamatosan létezhetett. Ha a bioszféra működése valamilyen ok folytán hirtelen megszűnne, úgy JUNGE (1981) szerint az üledékekben egy földtörténetileg rövid átalakulási idő eltelte után, a kb. 3×10^9 évvel ezelőtti kémiai egyensúly újra helyreállna és ezzel egyidejűleg a légkörből a szabad oxigén is ugyanúgy eltűnne, mint ahogyan az élet létezése előtt sem volt ott.

Jelen légkörünk oxigénszintjének alakításához még másféle biológiai mechanizmusok is hozzájárulhatnak, így pl. azok, melyek nitrogén-oxidokat redukálnak. Ide tartozik a nitrát bakteriológiai denitrifikációja is. Ugyanis, ha ezek a folyamatok nem léteznének, úgy a levegő összes oxigénje a kémiai egyensúlynak megfelelően, a légköri nitrogén mintegy 7%-ának felhasználásával nitrátok alakjában az óceánokba kerülne.

1.30. Az aerob anyagcsereutak kiépülése

Az élet evolúciójának ősi menetrendjéről az anyagcsere energiaszerző és -konzerváló mechanizmusai, mint már láthattuk, bőséges eligazítást nyújtanak. Az eukariotákban a később kifejlődött respiráció a központi energiaszerző anyagcsere-folyamat. Ezzel szemben számos prokariota a fenntartásához szükséges energiát még ma is csak kizárólag fermentáció révén állítja elő.

A légzés első fő anyagcsere-útszakasza a glikolízis, mely szubsztrátszintű foszforilációval csak kevés energiát szolgáltat, oxigént nem igényel. A második fő anyagcsere-komponens, a citrátkör, a glikolízissel előállított piruváttal üzemel, és az oxidatív foszforiláció számára redu-

kált koenzimeket állít elő. Hexózból kiindulva a respiráció során a sejt nettó energiabevétele mintegy 18-szor nagyobb és a cukorban tárolt energia biológiailag maximális kihasználását teszi lehetővé.

1.30.1. Az aerob légzés anyagcsereútjának ősi (anaerob) és modernebb (aerob) szakaszai

Az anaerob fermentáció mint energiaszerző folyamat, és ennek legfontosabb típusai, a glikolízisre alapuló fermentációk, még az élet történetének legkorábbi szakaszában, a reduktív légkörben jöttek létre. Később a glikolízishez mint ősi alépítményhez, a szénhidrátokból nitrátokkal, majd az oxidatív légkör megjelenése után oxigénnel mint terminális elektronakceptorral sokkal hatékonyabb energiakihasználást lehetővé tevő citrátkör és az oxidatív foszforiláció csatlakoztak. A légzés tehát minden eukariotánál egy-egy, a reduktív- és az oxidatív, légkörben kialakult, ill. tökéletesedett anyagcsere-útszakaszból áll, melyek közül az első, az ősi, oxigénmegvonás esetén „önállóan", külön is működtethető, természetetsen alacsony szintű energiabevétellel. Ilyenkor pl. az eukariota élesztők az iparilag fontos alkoholos fermentációt valósítják meg, amikor terminális elektronakceptorként oxigén helyett a piroszőlősav dekarboxilálásából származó acetaldehidet használják. Az emlősök izomsejtjeiben a folyamatos igénybevétel oxigénhiányt idézhet elő. E sejtek működése ilyenkor a citrátkör kikapcsolásával, a bakteriális glikolitikus anyagcsereúton végbemenő tejsavas fermentációra alapul. A glikolízis során létrejött piroszőlősav mint terminális elektronakceptor, tejsavvá redukálódik. Az oxigéndeficiens izom tehát ősi, primitív, a reduktív légkörben szerzett, anaerob „bakteriális" anyagcserét folytat.

1.30.2. Az anyagcsereutak kiépülésének földtörténeti háttere

Az oxigéndependens anyagcsereutak fejlődésmenetét különböző biológiai molekulák szintéziséhez vezető reakciószekvenciák figyelmes nyomonkövetésével is megismerhetjük. A mai szintetikus anyagcsereutaknak azok a szakaszai, melyek feltehetően még a korai prekambriumban jöttek létre, oxigén hiányában is végbemennek. Az utak végtermékeihez közelálló lépések viszont, melyek az előzőkhöz valószínűen már csak az „új légkör" idejében csatlakoztak, általában egyre inkább oxigénigényesek. Az oxigénigényes lépések előfordulása a különböző fajok anyagcsereútjain, felvilágosítást nyújt az evolúciós ranglétrán elfoglalt helyzetükről is. Amennyiben a biokémiai vegyületek egy meghatározott csoportjának szintézisére csupán egyetlenegy út fejlődött ki, úgy feltehetően az élet primitívebb alakjaiban ennek az útnak csupán a kezdeti anaerob lépései

figyelhetők meg. A később megjelent, fejlettebb fajok viszont már a szintézis útjának fokozatosan egyre hosszabb szakaszait, és azokon az oxigéndependens lépéseket is tartalmazhatják.

Első pillanatban úgy tűnik, hogy az aerob szervezetekben oxigén valamennyi biokémiai szintézishez szükséges. Eukariota sejtekben ugyanis oxigénmentes körülmények között csak kevés szintetikus aktivitás észlelhető. Legnagyobbrészt azonban az oxigén a szintézisek ATP-igényének kielégítéséhez, az oxidatív foszforiláció működtetéséhez szükséges. Amennyiben az ATP-ellátást más források is biztosíthatják, úgy bizonyos típusú szintézisek oxigén nélkül is végbemennek.

Más típusú szintéziseknek azonban az anyagcsere energetikai szükségleteitől függetlenül is oxigénigénye van. Oxigén szükséges pl. a gerincesek epefestékeinek előállításához, a magasabb rendű növényekben a klorofill szintéziséhez, továbbá az állatokban a tirozin, a növényekben a hidroxiprolin produkciójához. Két szintetikus anyagcsereút oxigéndependenciáját különösen behatóan tanulmányozták. Ezek egyike a szterinek és a karotinoidok előállításáért felelős, míg a másikon a zsírsavak szintézise folyik (SCHOPF, 1978).

1.30.3. A légkörváltás idejének tükröződése a szterinek bioszintézisében

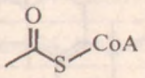
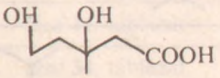
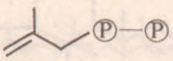
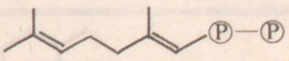
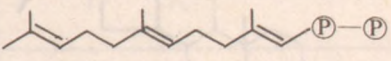
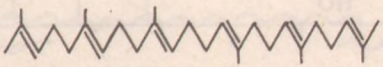
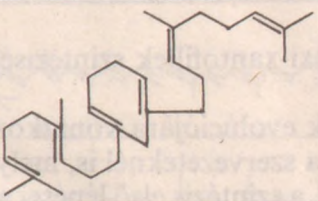
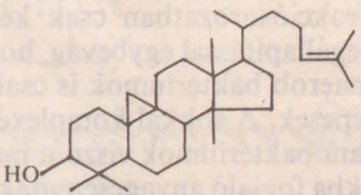
A szterinek (koleszterin, szteroid hormonok stb.) lapos, jobbára kétdimenziós molekulák, melyek a harminc szénatomos szkvalénből, míg a karotinoidok a negyven szénatomos fitoénből származnak. Az utóbbiak mint pigmentek gyakorlatilag minden fotoszintetizáló szervezetben megtalálhatók. Mindkét csoport szintézisének közös kiindulópontja az izoprén öt szénatomos molekulája, mely a szintetikus guminak is ismétlődő alegysége. A biológiai szintézisek során először két, majd egy harmadik izoprén kapcsolódásából egy tizenöt szénatomos polimer, a farnezil-pirofoszfát jön létre. Az anyagcsereút ezen a ponton elágazik. Két farnezillánc szkvalént alkothat, mely a szterinek harminc szénatomos prekurzora. Másrészről a farnezil-pirofoszfáthoz egy negyedik izoprénalegység csatlakozik, majd ezekből kettő a negyven szénatomos fitoént eredményezi. A fitoén a karotinoidok és más ezekből származó pigmentek (pl. a xantofillek) prekurzora *(34. és 35. táblázatok)*.

Eddig a lépésig e szintetikus út egyetlen reakciójához sem szükséges molekuláris oxigén. A szterinek szintézisében azonban a következő lépés, a lineáris szkvalénmolekula harminc szénatomos gyűrűrendszerré alakítása, már oxigént igényel. Hasonlóan oxigénigényes a szterinszintézis legtöbb soron következő lépése is.

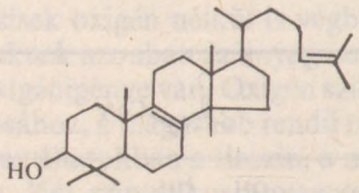
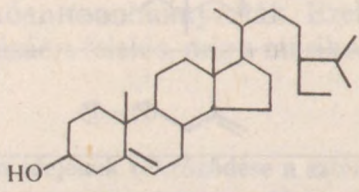
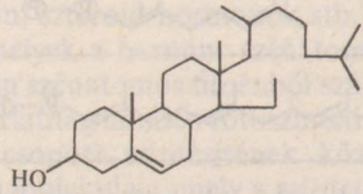
A másik ágon némileg több anaerob reakció van. A karotinoidokat fitoénből oxigén nélkül is elő lehet állítani. Számos további karotinoid-

34. táblázat

A szterinek bioszintetikus útján szereplő intermedierek és végtermékek előfordulása. (O_2): Előállításukhoz oxigénre van szükség

Vegyület	Kémiai szerkezet	Anaerob baktériumok	Anaerob, fotoszintetizáló baktériumok	Aerob baktériumok	Cianobaktériumok	Gombák	Növények és gerinctelenek	Gerincesek
Acetil-CoA		+	+	+	+	+	+	+
Mevalonsav		+	+	+	+	+	+	+
Izopentenil-pirofoszfát		+	+	+	+	+	+	+
Geranil-pirofoszfát		+	+	+	+	+	+	+
Farnezil-pirofoszfát		+	+	+	+	+	+	+
Szkvalén		+	+	+	+	+	+	+
Szkvalén		+	+	+	+	+	+	+
Cikloartenol (O_2)		–	–	+	+	–	+	–

34. táblázat folytatása

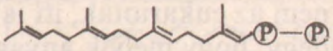
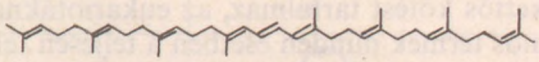
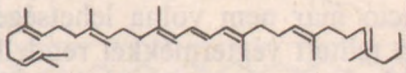
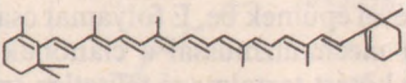
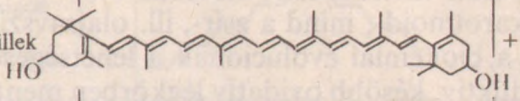
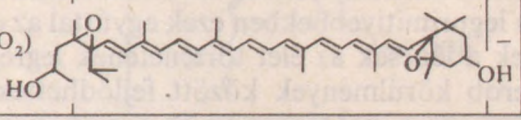
Vegyület	Kémiai szerkezet	Anaerob baktériumok	Anaerob fotoszintetizáló baktériumok	Aerob baktériumok	Cianobaktériumok	Gombák	Növények és gerinctelenek	Gerincesek
Lanoszterin (O_2)		–	–	–	–	+	–	+
Fitoszterinek (O_2)		–	–	+	+	+	+	–
Koleszterin (O_2)		–	–	+	+	+	+	+
Szteroid hormonok, epesók (O_2)		–	–	–	–	–	–	+

modifikáció, pl. az epoxi-xantofillek szintéziséhez azonban már oxigén szükséges.

E bioszintetikus utak evolúciójára vonatkozóan alapvető megállapítás, hogy még azoknál a szervezeteknél is, melyek ősei már földtörténeti korszakok óta aerobok, a szintézis első lépései az oxigénellátástól függetlenek. Az oxigén a reakciósorozatban csak későbbi lépéseknél válik szükségessé. Ezzel a megállapítással egybevág, hogy a legtöbb élő, primitív szervezet, így az anaerob baktériumok is csak az anyagcsereút első, anaerob szakaszára képesek. A sokkal komplexebb aerob baktériumok és a fotoszintetizáló cianobaktériumok viszont már hosszabb, oxigénigényes lépéseket is magukba foglaló anyagcsereutak kivitelezését valósítják meg. A fejlettebb eukarioták, így gerincesek és magasabb rendű növények, még hosszabb, elágazó, számos oxigénigényes lépést tartalmazó, szintetikus utakkal dolgoznak.

35. táblázat

A karotinoidok és rokonvegyületeik bioszintetikus útjain szereplő intermedierek és végtermékek előfordulása. (O_2): Előállításukhoz oxigénre van szükség

Vegyület	Kémiai szerkezet	Anaerob baktériumok	Anaerob, fotoszintetizáló baktériumok	Aerob baktériumok	Cianobaktériumok	Gombák	Növények és gerinctelenek	Gerincesek
Acetil-CoA	*lásd* 34. táblázat	+	+	+	+	+	+	+
Mevalonsav	*lásd* 34. táblázat	+	+	+	+	+	+	+
Izopentenil-pirofoszfát	*lásd* 34. táblázat	+	+	+	+	+	+	+
Geranil-pirofoszfát	*lásd* 34. táblázat	+	+	+	+	+	+	+
Farnezil-pirofoszfát	*lásd* 34. táblázat	+	+	+	+	+	+	+
Geranil-geranil-pirofoszfát		+	+	+	+	+	+	+
Fitoén		+	+	+	+	+	+	+
Fitoén		+	+	+	+	+	+	+
Karotinoidok		+	+	+	+	+	+	+
Nem epoxi-xantofillek		+	+	+	+	+	+	+
Epoxi-xantofillek (O_2)		–	–	–	–	–	+	–

1.30.4. A zsírsavszintézis menetének földtörténeti háttere

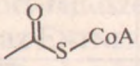
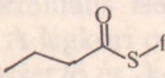
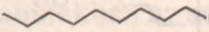
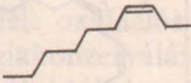
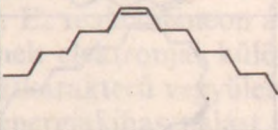
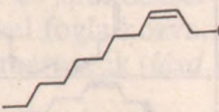
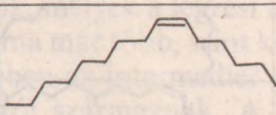
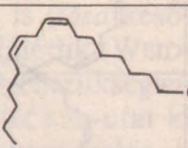
A zsírsavak szintézisének folyamatában ugyancsak felismerhető az oxigénigényes lépések későbbi csatlakozása *(36. táblázat)*. Egyszeresen telítetlen zsírsavakat a legtöbb prokariota oly módon állít elő, hogy a kettős kötést a molekulalánc hosszának növelésekor építi be. Az eukarioták és bizonyos prokarioták először egy teljesen telített molekulát, a sztearinsavat hozzák létre, majd a kettős kötéseket ebbe oxidatív deszaturációval iktatják be.

A zsírsavak alifás, telített monokarbonsavak. Telítetlen származékaikban minden egyes kettős kötés kialakításához molekulánként két hidrogénatom elvonása szükséges. Szintézisükkor a molekula két szénatomos egységek szukcesszív addíciójával hosszabbodik. A szintézis első néhány lépése valamennyi szervezetben azonos és teljesen telített zsírsavakat eredményez. Az anyagcsereút elsőnek a már nyolc szénatomos lánc esetében ágazik el. Ennél a pontnál – szemben az eukariotákkal – számos prokariota egy kettős kötés beépítésére képes. A második elágazás a következő lépésnél (a telített lánc már tíz szénatom hosszú) jelentkezik. Prokarioták, de nem az eukarioták, itt is kettős kötést építhetnek be. Ezek után már mindegy, hogy melyik anyagcsereúton folyik tovább a szintézis, a lánc meghosszabbodása a tizennyolcadik szénatomnál ugyanis végleg befejeződik. E végpontnál számos prokariota által előállított zsírsavlánc egy kettős kötést tartalmaz, az eukariotáknál azonban a tizennyolc szénatomos termék minden esetben a teljesen telített sztearinsav-molekula. Az anyagcsereút eddigi lépései sem a prokariotáknál, sem az eukariotáknál, molekuláris oxigént nem igényelnek. Amennyiben további transzformáció már nem volna lehetséges, úgy az eukariota sejtek csak a teljesen telített végtermékkel rendelkeznének. Valójában ezek részéről az oxidatív deszaturáció révén változatos átalakítások mehetnek végbe. Ezek során a kettős kötések 2-2 hidrogén elvonásával és ezek oxigénre vitelével épülnek be. E folyamat csak oxigén jelenlétében megy végbe. Ezzel a mechanizmussal a cianobaktériumok már kettő, három és négy kettős kötést tartalmazó telítetlen származékokat, míg az eukarioták sokszorosan telítetleneket állítanak elő.

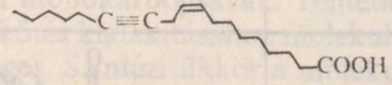
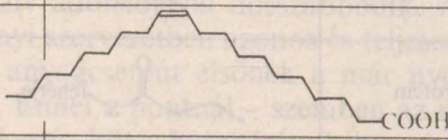
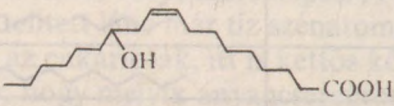
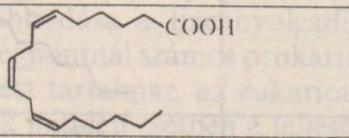
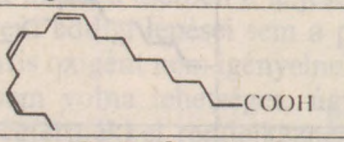
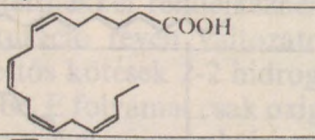
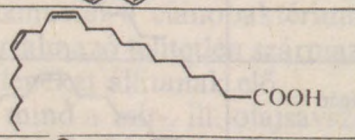
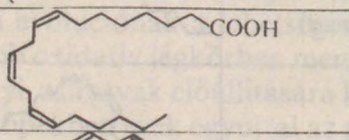
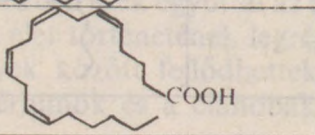
Mind a szterin-karotinoid-, mind a zsír-, ill. olajsavszintézisek tanulmányozása annak a biokémiai evolúciónak a lehetséges útját tárja fel, mely kezdetben reduktív, később oxidatív légkörben ment végbe. A szintetikus út első lépései valamennyi, zsírsavak előállítására képes szervezetben azonosak, és a legprimitívebbekben ezek egyúttal az egyedül lehetséges lépések is. Ezek a lépések az élet történetének legrégibb szakaszán még teljesen anaerob körülmények között fejlődhettek ki. A később létrejött típusok (az aerob baktériumok és a cianobaktériumok) már

36. táblázat

A zsírsavak bioszintézisének útjain szereplő intermedierek és végtermékek előfordulása. (O_2): Előállításukhoz oxigénre van szükség

Vegyület	Kémiai szerkezet	Anaerob baktériumok	Anaerob fotoszintetizáló baktériumok	Aerob baktériumok	Cianobaktériumok	Véglények, gombák, növények, állatok
Acetil-CoA		+	+	+	+	+
Butiril-acil-szállító protein		+	+	+	+	+
8 : 0 sav		+	+	+	+	+
10 : 0 sav		+	+	+	+	+
10 : 1, Δ^3 sav		+	+	+	+	–
Vakcénsav		+	+	+	+	–
Sztearinsav		–	–	+	+	+
12 : 1, Δ^3 sav		+	+	+	+	–
(12 : 1, Δ^3 savból oxigén nélkül) Olajsav (sztearinsavból oxigénnel)		+	+	+	+	+
α-Linolsav (O_2)		–	–	–	+	+

36. táblázat. Folytatás.

Vegyület	Kémiai szerkezet	Anaerob baktériumok	Anaerob fotoszintetizáló baktériumok	Aerob baktériumok	Cianobaktérimok	Véglények, gombák, növények, állatok
Krepeninsav (O_2)		–	–	–	–	+
20 : 1, Δ^{11} sav		–	–	–	–	+
Ricinolsav (O_2)		–	–	–	–	+
α-Linolénsav (O_2)		–	–	–	+	+
α-Linolénsav		–	–	–	+	+
18 : 4, $\Delta^{6,9,12,15}$ sav (O_2)		–	–	–	+	+
20 : 2 $\Delta^{11,14}$ sav (α-linolsavból oxigén nélkül)		–	–	–	–	+
(α-linolénsavból oxigénnel) 20 : 3, $\Delta^{8,11,14}$ sav (20 : 2, $\Delta^{11,14}$ savból oxigén nélkül)		–	–	–	–	+
Arahidonsav (O_2)		–	–	–	–	+

hosszabb anyagcsereutakkal rendelkeznek, melyekben oxidatív deszaturációs lépések is szerepelnek. A fejlettebb eukariotáknál már számos oxigéndependens lépés van (SCHOPF, 1978).

1.31. Az aerob anyagcsere

Az aerob anyagcsereutak kibontakozása a baktériumoknál földtörténeti időket vett igénybe, de lényegében még a mai nap is tart. Az oxidatív légkör megjelenésekor az aerob anyagcsere legfontosabb komponensei, így a citrátkör, az elektrontranszport-rendszer és az oxidatív foszforiláció elemei, a pentóz-foszfát-ciklus, az ENTNER–DOUDOROFF-út és feltehetően a glioxalát-út is már minden valószínűség szerint rendelkezésre álltak és csak az anaerob terminális elektronakceptort (pl. nitrátot) kellett az oxigénre felcserélni. A légköri oxigén megjelenése ennek folytán az anaerob légzők energiaszerző és -konzerváló mechanizmusainak csupán módosulását vonhatta maga után, és az ősi anaeroboknak semmiképpen sem kellett merőben új és a korábbiaktól teljesen eltérő anyagcsereutakat kiépíteniök. A továbbiakban az aerob anyagcsere kardinális fontosságú anyag- és energiaáramlási pályáit foglaljuk össze.

Az aerobokban nagyon sokféle oxidációs folyamat zajlik le. A szűkebb értelemben vett és energiakonzerválással összekötött „biológiai oxidáció" a különböző szubsztrátoktól elvont hidrogének vízzé oxidálása molekuláris oxigénnel. Ez reakcióláncon át történő fokozatos oxidáció, mikor is a hidrogének elektronjai különböző, részben koenzim-, enzim-, részben szubsztrátkarakterű vegyületeken át vándorolva jutnak az oxigénhez, hatékony energiakihasználást téve lehetővé. Az enzimek, koenzimek, ill. szubsztrátok ezen sorozatát aerob légzési láncnak nevezzük, melynek komponenseit és működését a légzési láncok anaerob típusaival és ezek evolúciójával foglalkozva, beleértve a mitokondriális légzési láncot is, részletesen ismertettük (*lásd* 1.15., 1.16. és 1.17. alfejezeteket).

Azok a hidrogénatomok, melyek a légzési láncra kerülnek NAD vagy NADP közvetítésével, és ma már több, mint kétszáz ismert dehidrogenáz közreműködésével, zömében az intermedier anyagcsere, mindenekelőtt a citrátkör szubsztrátjairól származnak. A baktériumokban redukált NADP az ún. HORECKER-úton is (*lásd* később) termelődik és vagy az energiaszolgáltatás céljaira oxidálódik (WEIDE és AURICH, 1979), vagy a reduktív anabolikus utak hidrogénszükségleteit elégíti ki. Vannak mikroorganizmusok, melyek a HORECKER-utat kizárólag NADPH szintézisére üzemeltetik, mely utóbbi viszont csakis az energianyeréshez oxidálódik, míg anabolikus folyamatokhoz nem, vagy csak kevéssé. Másoknál,

feltehetően a többségnél, a NADPH csakis a bioszintézisek reduktív lépéseihez áll rendelkezésre.

Szemben a prokariotákkal, ahol a légzési elektrontranszportlánc komponensei a citoplazmamembránban helyezkednek el, az eukariotáknál a légzési lánc a mitokondrium belső membránjának a része *(lásd 87., 88. és 89. ábrák)*. A citrátkör és más hidrogénszolgáltató anyagcsere-reakciók is ugyanitt, a mitokondrium belső terében zajlanak le.

1.31.1. $O_2 \rightarrow H_2O_2$ redukció

Flavoproteineket valamennyi baktérium tartalmaz (*lásd* 1.14.4. alfejezet). Ezeket a molekuláris oxigén vagy más redukálható vegyületek még nem enzimatikus úton is nagyon könnyen eloxidálják, és emiatt gyakran igen nehéz megállapítani, hogy a FpH_2-ről jövő hidrogéntranszfert enzim közvetíti-e, vagy sem. Az oxidázok (elektronátvivők) általános reakcióegyenlete a citokróm-c-oxidáz (végoxidáz), aszkorbinsav-oxidáz, *p*- és *o*-difenol-oxidázok esetében:

$$O_2 + 4e \rightarrow 2\,O^{2-} \xrightleftharpoons{+4\,H^+} 2\,H_2O$$

Ezek ugyanis négy elektront visznek egy molekula oxigénre, mikor is közvetlenül víz és nem hidrogén-peroxid képződik. Az oxidázok másik csoportjában, melyeket „két elektront vivőknek" vagy „hidrogén-peroxid-képzőknek" nevezünk, az általános reakcióegyenlet:

$$O_2 + 2e \rightarrow O_2^{2-} \xrightleftharpoons{+2\,H^+} H_2O_2$$

Az ilyen oxidázok prosztetikus csoportként flavint tartalmaznak. Közülük nem egy csak mint „fakultatív oxidáz", többségük általában mint dehidrogenáz működik. Minthogy a flavoproteineket valamennyi baktérium redukálja, a molekuláris oxigén viszont a FpH_2-t eloxidálja, ebből az következhetnék, hogy az oxigént valamennyi baktérium képes hidrogén-peroxiddá redukálni. Ez a megállapítás általánosságban helyénvaló is lenne. Tény azonban, hogy egyes mikroorganizmusok, mint pl. a szigorúan anaerob *Bacteroides* genusz tagjai, a hidrogént az oxigénhez hasonló külső akceptoroknak nem képesek átadni.

1.31.2. A sejt védelme és a szaporodás biztosítása oxigén jelenlétében

Az anaerob baktériumok nem rendelkeznek enzimekkel a hidrogén-peroxid lebontására, ezért sejtjeikben oxigéntartalmú atmoszférában, e toxikus vegyület felhalmozódása szaporodásuk döntő korlátozó tényе-

zőjének tekinthető. Egyes anaerobok, mint pl. a *Clostridium tetani*, rendkívül hidrogén-peroxid-szenzitívek, és emiatt oxigén jelenlétében szaporodásuk végtelenül csekély mérvű. Ezzel szemben a *Clostridium perfringens*, továbbá a *Streptococcus*ok és a *Lactobacillus*ok többsége erősen hidrogén-peroxid-toleráns, úgyhogy ezek szilárd tápközegek felszínén kicsiny kolóniákat is képeznek. Ez az oka, hogy sajtgyárakban a nyers tejhez nemritkán hidrogén-peroxidot adnak, ami bizonyos fokú pasztörizációnak számít, minthogy hatására számos mikroorganizmus elpusztul ugyan, de a tejet megsavanyítani képes *Streptococcus*ok és *Lactobacillus*ok életben maradnak és elszaporodhatnak.

Az aeroboknak és a fakultatív anaeroboknak több enzimük, ill. enzimrendszerük is van, melyek számukra a szaporodást oxigén jelenlétében lehetővé teszik. Az első a kataláz, mely hidrogén-peroxidra hatva azt vízre és 1/2 oxigénre bontja. A kataláz (H_2O_2:H_2O_2 oxidoreduktáz) a H_2O_2-t szimultán redukálja és oxidálja vízzé és molekuláris oxigénné. Ugyanez az enzim peroxidázként is hathat (donor: H_2O_2 oxidoreduktáz), mikor is a H_2O_2-t, bizonyos elektrondonorok segítségével vízzé redukálja. Az *E. coli*ban két katalatikus hatású enzimet is nyilvántartanak. Az egyik (HPI) 165 000 molekulasúlyú dimér, peroxidatikus aktivitású és indukálható. A másik 312 000 molekulasúlyú tetramér és konstitutív (Meir és Yagil, 1985). Így, amennyiben hidrogénszállítóként flavoprotein szerepel, úgy oxigén jelenlétében képződik ugyan hidrogén-peroxid, de ez a kataláznak mint az egyik leggyorsabb hatású enzimnek a közreműködésével gyorsan degradálódik. Ezenkívül az ún. peroxidázok szubsztrátjaikat közvetlenül hidrogén-peroxiddal oxidálják. A szuperoxid-dizmutáz a rendkívül toxikus szuperoxid (O_2^-) hatását védi ki, és a

$$2\,O_2^- + 2\,H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

reakciót katalizálja. Az itt keletkezett hidrogén-peroxidot ugyancsak a kataláz bontja. Emellett az aerob és fakultatív anaerob baktériumok az elektrontranszport citokrómrendszerével is rendelkeznek, melyek működése során az oxigén vízzé redukálódik. Ezekben a szervezetekben ez a citokrómrendszer képezi az oxigén redukciójához vezető domináns anyagcsereutat.

Napjainkban már sok indirekt bizonyítéka van annak, hogy a szuperoxid-dizmutázok (SOD), katalázok és bizonyos peroxidázok lényeges elemei a szuperoxid-gyökök (O_2^-; H_2O_2 és a nehéz O_2) elleni sejtes védekezésnek. Számos sejttípusban a SOD mennyisége lényegesen növekedik az oxigén parciális nyomásának (pO_2) a légzésintenzitásnak és a szaporodás sebességének a fokozódásával vagy a növekvő intracelluláris O_2^- termelés, ill. kitettség hatására, továbbá az anyagcserének a fermen-

tatívról az oxidatívra történő átállása alkalmával. A SOD aktivitás emelkedése O_2 - vagy O_2^--vel szemben fokozódó rezisztenciával társul. Hasonlóan pozitív korrelációt észleltek növekvő O_2 vagy H_2O_2 mennyiségek és a növekvő intracelluláris kataláz szintek között. Ilyen összefüggéseket mutattak ki az *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacteroides* etc. genuszok tagjainál (lásd VASSILYADI és ARCHIBALD, 1985). A *Streptococcus faecalis* egy SOD-deficiens törzse esetében csupán gyengén csökkenő SOD szinteket észleltek.

Az oxigénnel szembeni védelmi rendszert legalaposabban az *Escherichia coli* esetén kutatták. Ezt a mikrobát mutagenizálva és O_2-szenzitív auxotrófokra szelektálva az izolátumok két különböző csoportját állították elő. Az egyik csoport tagjai teljes mérvű kataláz- és o-dianizidin peroxidáz deficiensek voltak. A második csoportban hiányzott ugyan a kataláz, peroxidáz és a Mn-kofaktorú SOD, azonban a Fe-kofaktorú SOD még jelen volt. Jóllehet ezen izolátumokkal végzett kísérletek a kataláz és a SOD határozott védőszerepére utaltak, mindazonáltal teljesen SOD-mentes mutánsokat nem sikerült előállítani. Sajnos az ilyenfajta kísérletekhez sem az *S.faecalis* sem az *E.coli* nem tekinthető ideális teszt-mikróbának. Az első azért, mert rendkívül nagy mértékben nehéz O_2 toleráns, hem-mentes szervezet. Az utóbbi pedig SOD és hidroperoxidáz enzimeinek sokasága miatt. A továbbiak során a *Bacillus* genusz fajait egy olyan könnyen tenyészthető fakultatív törzs izolálása céljából vizsgálták, melyben a peroxidáz hiányzik és csak egyetlen indukálható SOD-t, továbbá egyetlen katalázt tartalmaz. Ilyen törzzsel azután egyszerű SOD- és kataláz-mentes mutánsok előállítását szándékoztak volna megkísérelni. E munka keretében *Bacillus* törzseket szkréneltek kataláz, diaminobenzidin-peroxidáz és szuperoxid-dizmutáz aktivitásra (VASSILYADI és ARCHIBALD, 1985). Sikerült is egy olyan *B.coagulans* törzshöz jutni, melyben hiányzott a peroxidáz aktivitás és csak egyetlen kataláz, továbbá szuperoxid-dizmutáz nyilvánult meg. Esetében a szuperoxid-dizmutáz- és a kataláz-aktivitások szintjeinek változását az oxigén parciális nyomása, a Fe- és a Mn-szintek, továbbá az aerob és a fermentatív anyagcsere hatásainak viszonylatában mérték. Összefüggést találtak a nagy endogén kataláz szintek és a nagymérvű H_2O_2 fejlődés között. E törzset mutagenizálták és oxigénnel szemben szkrénelték. Mind a 38 ennek során elkülönített oxigén-szenzitív mutáns rendkívül alacsony vagy semmi kataláz aktivitást sem mutatott és esetükben a kataláz-protein is hiányzott. Egyetlen mutánsból sem tűnt el a szuperoxid-dizmutáz jóllehet ötnél ezen enzim aktivitási szintje nagyon alacsony volt. Exogén katalázzal aerotoleranciájukat sikerült helyreállítani.

1.31.3. Az oxigén redukálásának különböző megoldásai

A szubsztrát hidrogénjének oxigénre viteléhez végső soron az evolúció során a következő megoldások jöttek létre:

1. Egyes oxidoreduktázok a szubsztrátról származó hidrogéneket, a koenzimek megkerülésével, közvetlenül a citokrómrendszer első tagjának adják át. Ebben az esetben az oxidoreduktázról származó elektronok a citokrómokon át áramlanak az oxigén felé, miközben protongradiens jön létre és nagyenergiájú foszfátkötések ($\sim$ P) szintetizálódnak. A borostyánkősav-dehidrogenáz (szukcinát-dehidrogenáz) flavoprotein, amely közvetlenül hat szubsztrátjára, a borostyánkősavra, és a hidrogént a citokróm-b-re vagy az ubikinonra juttatja. Ennek az enzimnek flavincsoportja a FAD-hoz hasonló: négy vasatomot tartalmaz flavincsoportonként. Mivel a borostyánkősav a citrátkör köztiterméke, dehidrogénezésének bekapcsolása a légzési láncba nagy jelentőségű.

2. Közvetlen oxidációról beszélünk, mikor pl. egyes aminosav-oxidoreduktázok a tápanyag hidrogénjét egy lépésben közvetlenül a molekuláris oxigénnek adják át. Ilyenkor hidrogén-peroxid keletkezik. Az oxigén ilyen redukciója alkalmával felszabaduló energia elvész, ATP szintézise nem tapasztalható. Az ilyen oxidációk katalizálásában ugyancsak flavoproteinek vesznek részt. Feltételezhetően a reakció során keletkezett oxidált vegyületeket a sejt bizonyos anyagcsereutakon használhatja fel, és az energiaveszteség ellenére is a sejtnek az ilyen oxidációs folyamatokra szüksége van. Flavoproteinek – mint láttuk – a hidrogént a $NADH_2$-tól is átvéve a következő lépésben az oxigénre juttathatják, és ilyenkor ugyancsak hidrogén-peroxid keletkezik.

3. Ez esetben a szubsztrátról származó hidrogének, ill. protonok és elektronok a komplett légzési elektrontranszportláncon *(lásd 84.* és *88. ábra)* át kerülnek az oxigénre. A redukált flavoproteinről, ill. az ubikinonról a protonok oldatba mennek, míg az elektronok a citokrómokon át haladnak az oxigén felé. A citokrómok (*lásd* 1.15.10.-13. alfejezet) redoxipotenciáljuk szerint redoxisorba állíthatók. Az aerobok nagyon változatos összetételű légzési láncában sorrendjük általában $b \rightarrow c_1 \rightarrow c \rightarrow a \rightarrow a_3$. Az elektront a molekuláris oxigénnek a-típusú citokrómok adják át. A citokróm-oxidáz (a_3) autoxidabilis elektronátadó. Szén-monoxiddal, cianiddal és aziddal inaktív komplexszé kapcsolódik. Midőn az elektronok az oxigénre kerülnek, két negatív töltésű oxigén atom keletkezik ($O_2 + 4e^- = 2\,O^{2-}$), de mivel ezek nem stabilak, a vízzel reagálva hidroxilionok jönnek létre ($O^{2-} + H_2O = 2\,OH^-$). A hidroxilionok az ubikinonnál, ill. a flavoproteinnél oldatba került protonokkal vizet alkotnak. A protonok vagy amino-, vagy $-C\begin{matrix}\diagup\!\!\!\diagup O \\ \diagdown O^-\end{matrix}$ -

csoporttal társulva jutnak az oxigénhez. Az antimicin antibiotikum a transzportot a b és c_1 között gátolja. Az amital (5-etil-5-izoamil-barbiturát), továbbá a rotenon (öt gyűrűt tartalmazó, növényi eredetű inszekticid) az elektrontranszportot a $NADH_2$ és a flavoprotein között akadályozza. A működő elektrontranszportlánc két kiinduló legfontosabb elektronforrása a $NADH_2$ és a szukcinát. Az elektronok vándorlása energialeadással kapcsolatos. Ez az energia – mint láthattuk *(lásd 84. ábra)* – protonkoncentráció-gradiens kialakításához, majd ennek révén ATP szintéziséhez használódik. A nagy energiatartalmú foszfátkötések szintézisének energetikai alapját a $NADH_2 + 1/2\ O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O$ átalakulásnak megfelelő szabadenergia-csökkenés biztosítja. A bevezető $NADH_2 \longrightarrow$ flavoprotein, majd az ezt követő flavoprotein $\longrightarrow$ citokrómrendszer és végül az utóbbiról az oxigénre irányuló elektrontranszport 1–1–1 ATP szintéziséhez elegendő szabadenergia-csökkenést képviselnek. Egy mol $NADH_2$ eloxidálása három mol ATP, egy mol szukcinát eloxidálása két mol ATP szintéziséhez szükséges számú protont juttat a citoplazmamembránon át a periplazmatikus térbe. Utóbbi azért mindössze kettőhöz elegendőt, mivel a $FADH_2$ csak a citokróm-b-nél kapcsolódik a láncba. A foszforilálás a membránba épült reverz ATPáz *(lásd 85. ábra)* révén történik. Az elektrontranszport sebességét a sejtben az ATP/ADP aránya lényegesen befolyásolja. A foszforilációt a zavartalanul tovább folyó elektrontranszporttól a már említett 2,4-dinitro-fenolon kívül a dikumarol, arzenát és néhány hosszú szénláncú zsírsav is lekapcsolhatja.

1.31.4. A légzési elektrontranszport komponensei

A biológiai elektrontranszportokban különböző enzimek, ill. proteinek, hidrogén- és elektronszállítók szerepelnek:

1. Flavinenzim. Koenzimként FAD-ot vagy FMN-t tartalmaz, néha vasionnal, még ritkábban fémporfirinnel kapcsolódik. Ilyenek a NADH-dehidrogenáz, szukcinát-dehidrogenáz, malát-, laktát- stb. dehidrogenázok.

2. Porfirinenzimek vagy citokrómok. Koenzimként fémporfirint viselnek, melynek struktúrája, vagy kötődése a fehérjéhez eltérő lehet. Ez utóbbi folytán a citokrómok optikai tulajdonságai is különbözőek. Az a-csoportba tartozó citokrómoknál formiloldalláncot viselő hem-a a koenzim. Autoxidábilisak, redukált alakjukat az oxigén közvetlenül visszaoxidálja. Szén-monoxiddal gátolhatók. A b-csoport citokrómjainak protohem-koenzime van, mely a proteinhez nem kovalens kötéssel csatlakozik. Nem autoxidábilisak (legfeljebb a bizonytalan csoportbeosztású citokróm-o és P 450). A részletesen tárgyalt citokróm-c-csoport

tagjainál a hem-koenzim a polipeptidlánchoz kovalensen kötődik (*lásd* 1.15.10.–1.15.13. alfejezeteket és a 77., 78. és 79. ábrákat). A d-csoport esetében a koenzim részlegesen hidratált porfirinszármazék. A citokróm-d autoxidábilis és szén-monoxiddal gátolható. A citokrómok a különböző baktériumokban eltérő kombinációkban szerepelnek, míg sok anaerob baktériumban egyáltalán nem fordulnak elő.

3. Redukálható diszulfidcsoportokat viselő enzimek. Így pl. a lipoát, mely koenzimként szerepel. A szorosabb értelemben vett légzési láncban nem vesz részt.

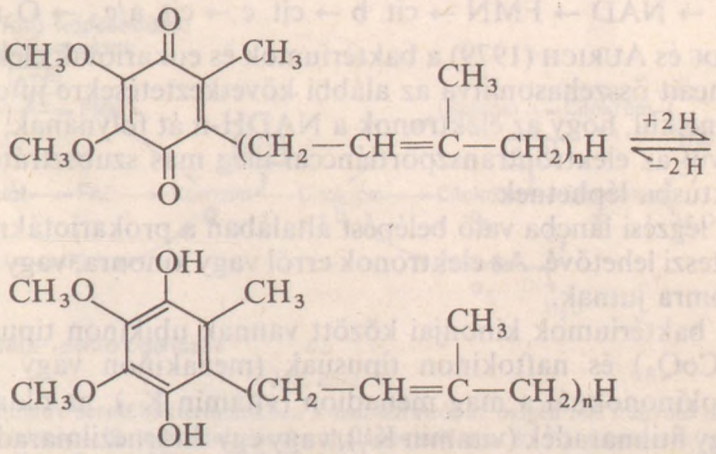
4. Vas–kén proteinek. Ezek nem hem-vas proteinek. Kénkötésben vasionokat tartalmaznak. Csekély molekulasúlyúak, és mint elektrontranszport-proteinek szerepelnek. Az ide tartozó ferredoxin vasat és savlabilis ként 1 : 1 arányban tartalmaz, míg a rubredoxinban savlabilis kén nincs. Csakis bizonyos elektrontranszportokban szerepelnek.

5. Fémproteidek. Kofaktorként nehézfémionokat pl. rezet vagy molibdént tartalmaznak. Ilyen fémproteid a légzési lánc ún. citokróm-oxidáza (citokróm a/a_3), a fotoszintetikus elektrontranszport plasztocianinja vagy a nitrát-reduktáz-rendszer.

6. Szemben a citokrómokkal és a vas–kén proteinekkel, melyek elektronszállítók, a flavoproteineken kívül a koenzim-Q (ubikinon) és a menakinon hidrogénszállítók. A redukció során esetükben két hidrogénatom kerül egy szállító molekulára:

$$\text{szállító} + 2\,\text{H} \rightleftharpoons \text{szállító} - \text{H}_2$$

Az oxidált és redukált ubikinont itt mutatjuk be (az izoprenoidegységek száma az oldalláncban 6–10 között változhat):

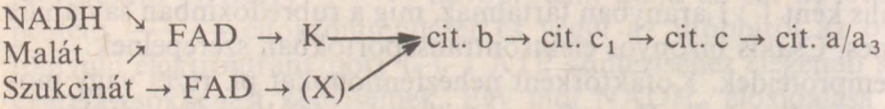


Az eukariotáknál a mitokondriális légzési lánc nagyon egységes: négy enzim, ill. enzimkomplex kapcsolódásából áll. Kettő flavinenzim, me-

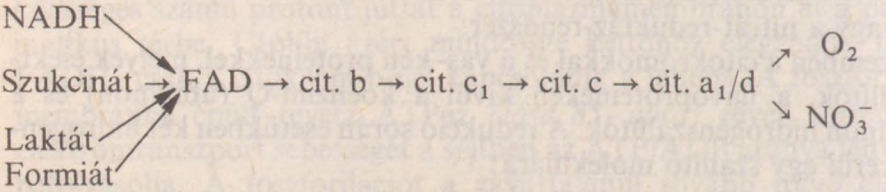
lyek az elektronokat, ill. a hidrogént a NADH-tól, ill. a szukcináttól veszik át és ubikinonnak adják tovább. Ez utóbbi a citokróm-c elektrondonorja. Itt az elektronátadást katalizáló enzimkomplex citokróm-b koenzimmel működik. A citokróm-c-ről az elektronok a citokróm-oxidázon mint terminális oxidázon át oxigénre jutnak.

1.31.5. A légzési elektrontranszport változatai

A prokarioták légzési lánca rendkívül változatos, a körülményektől függően még azonos faj sejtjeiben is módosulhat, és sok esetben ezeket nem is ismerjük. A *Mycobacterium phlei*nél pl. a következő sablon szerint alakul:



A *Hemophilus parainfluenzae* felderített légzési lánca:



A *Nitrobacter* légzési lánca:

$$NO_2^- \rightarrow \text{cit. c} \rightarrow \text{cit. } a_1 \rightarrow \text{cit. } a/a_3 \rightarrow O_2$$

A *Hydrogenomonas* légzési lánca:

$$H_2 \rightarrow NAD \rightarrow FMN \rightarrow \text{cit. b} \rightarrow \text{cit. c} \rightarrow \text{cit. } a/a_3 \rightarrow O_2(NO_3^-)$$

WEIDE és AURICH (1979) a baktériumok és eukarioták elektrontranszportláncait összehasonlítva az alábbi következtetésekre jutottak:

1. Anélkül, hogy az elektronok a NADH-n át folynának, a szukcináton kívül az elektrontranszportlánccal még más szubsztrátok is direkt kontaktusba léphetnek.

2. A légzési láncba való belépést általában a prokariotáknál is flavinenzim teszi lehetővé. Az elektronok erről vagy kinonra, vagy közvetlenül citokrómra jutnak.

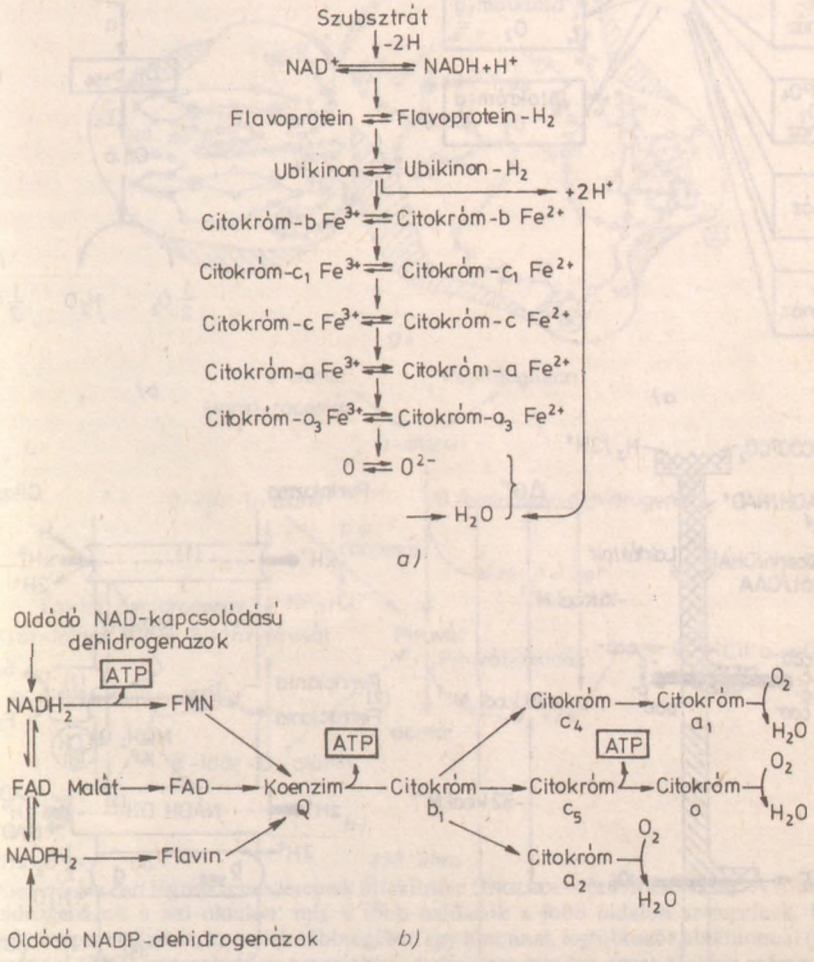
3. A baktériumok kinonjai között vannak ubikinon típusúak (többnyire CoQ_8) és naftokinon típusúak (menakinon vagy K-vitamin). A naftokinonoknál a mag menadion (vitamin K_3), az oldallánc pedig vagy egy fitilmaradék (vitamin K_1), vagy egy difarnezilmaradék (vitamin K_2). A GRAM-negatív baktériumok általában kevés naftokinont és sok ubikinont tartalmaznak, a GRAM-pozitívak ezzel szemben, amennyiben

aerobok, fordítva. A GRAM-pozitív anaerobok mindkettőből csak igen keveset.

4. A citokrómok a baktériumoknál nagyon eltérő kombinációkban fordulnak elő. Terminális oxidázként citokróm a/a_3, citokróm-d és citokróm-o szerepelnek.

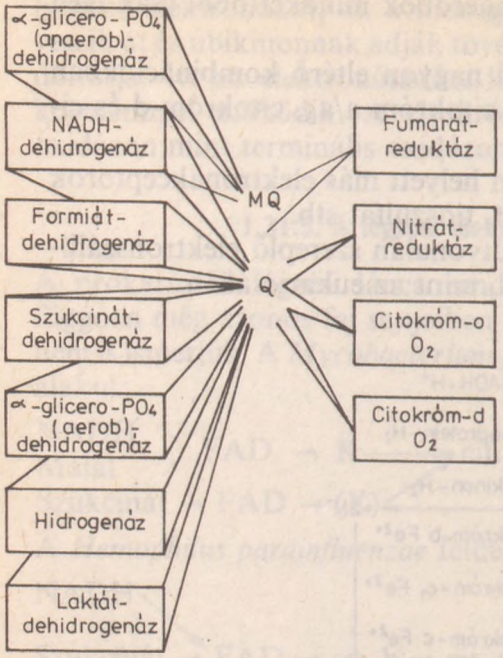
5. A fakultatív anaeroboknál oxigén helyett más elektronakceptorok is szerepelnek: pl. nitrát, nitrit, szulfát, tioszulfát stb.

6. A prokarioták légzési láncának útvonalán szereplő elektronszállítók nagyobb variációban jelentkeznek, mint az eukariotákén.

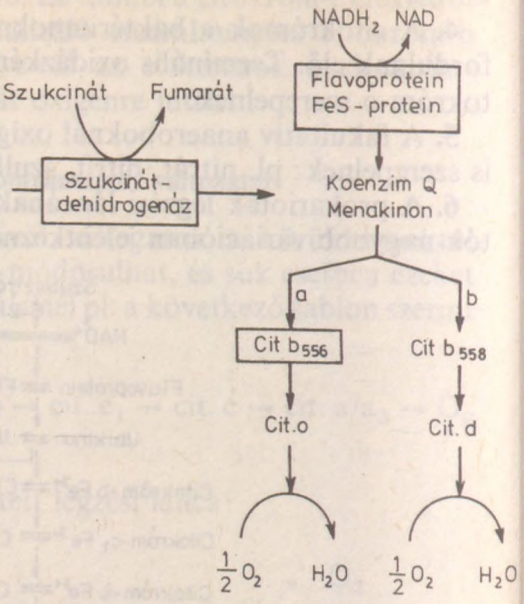


137. ábra

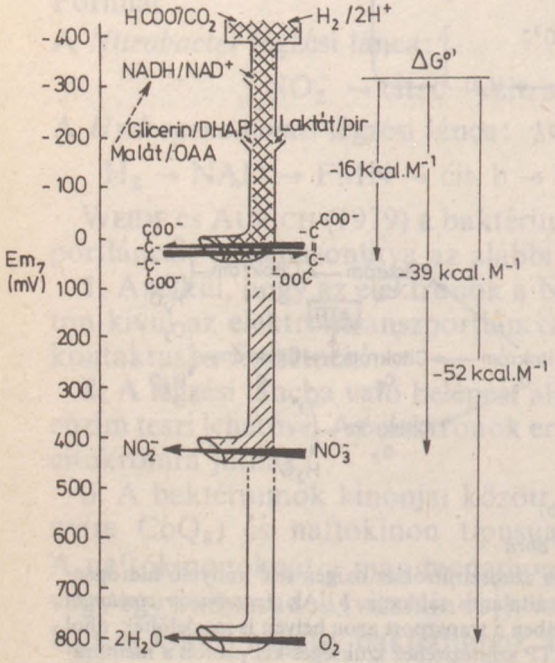
Az aerob, ill. fakultatív aerob baktériumokban a szubsztrátról az oxigén felé irányuló hidrogéntranszfer. *a)* Az elektron-, ill. hidrogéntranszfer általános sablonja. *b)* Az *Azotobacter vinelandii* elektrontranszportlánca ROSE (1976) után. Ez esetben a transzport azon helyeit is megjelölték, ahol elegendő energia szabadul fel ahhoz, hogy egy ATP szintéziséhez szükséges két proton a membránon át a citoplazmából a periplazmába távozzon


∝-glicero-PO4 (anaerob)-dehidrogenáz
NADH-dehidrogenáz
Formiát-dehidrogenáz
Szukcinát-dehidrogenáz
∝-glicero-PO4 (aerob)-dehidrogenáz
Hidrogenáz
Laktát-dehidrogenáz
MQ
Q
Fumarát-reduktáz
Nitrát-reduktáz
Citokróm-o O2
Citokróm-d O2

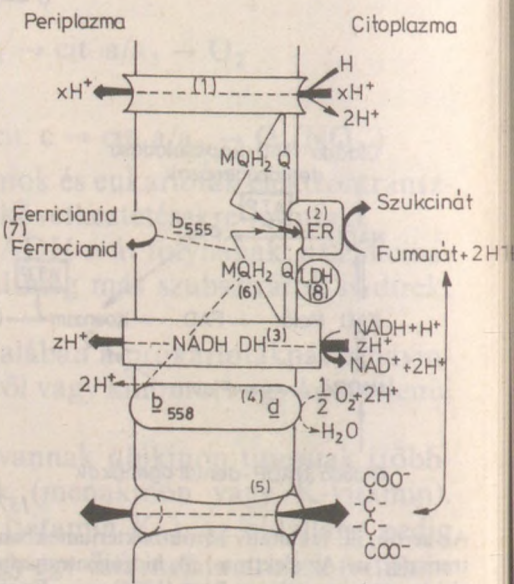
a)


NADH2 NAD
Flavoprotein FeS-protein
Szukcinát Fumarát
Szukcinát-dehidrogenáz
Koenzim Q Menakinon
a
b
Cit b556
Cit b558
Cit.o
Cit.d
½ O2 H2O
½ O2 H2O

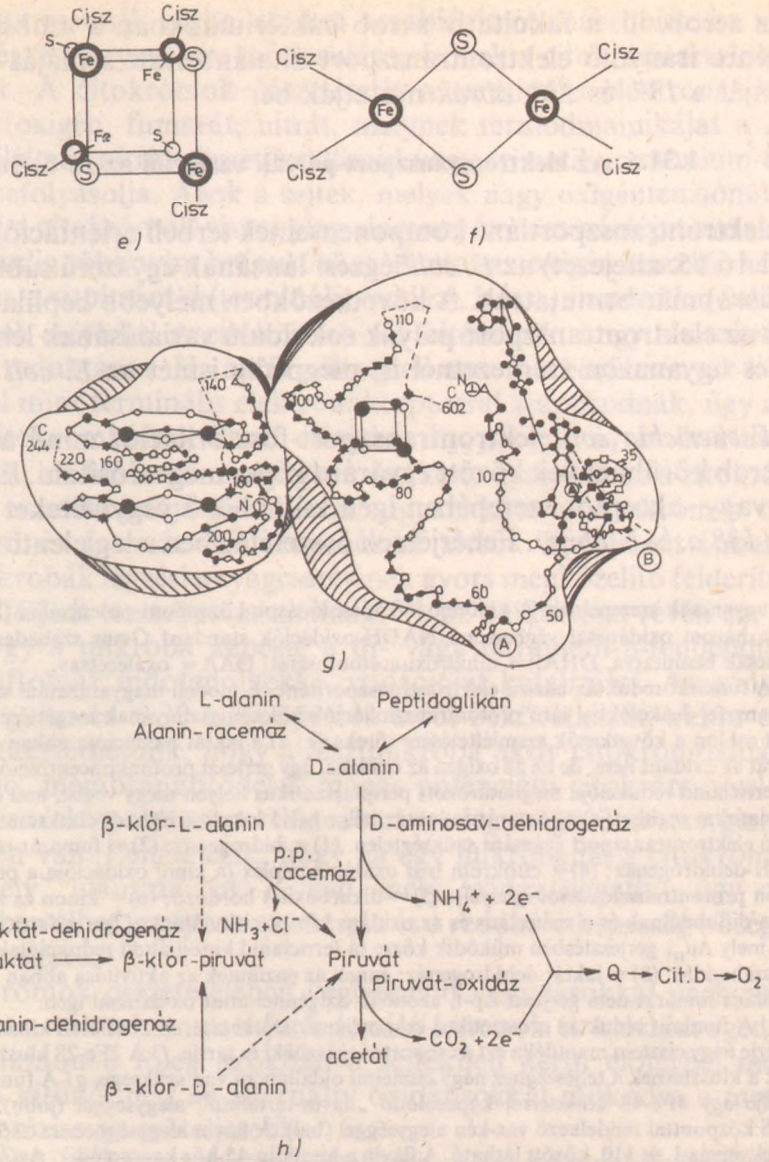
b)


HCOO⁻/CO2
H2/2H+
ΔG°'
NADH/NAD+
Glicerin/DHAP
Malát/OAA
Laktát/pir
-16 kcal.M⁻¹
-39 kcal.M⁻¹
-52 kcal.M⁻¹
Em7 (mV)
-400
-300
-200
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
800
NO2⁻
NO3⁻
2H2O
O2

c)


Periplazma
Citoplazma
xH+
[1]
H
xH+
2H+
MQH2 Q
Ferricianid
Ferrocianid
(7)
b555
(2)
F:R
Szukcinát
Fumarát+2H+
MQH2 Q
(6)
LDH
(8)
zH+
NADH DH
(3)
NADH+H+
zH+
NAD+ +2H+
2H+
b558
(4)
d
½ O2+2H+
H2O
(5)

d)



◄ *138. ábra*

a) Az *Escherichia coli* légzési rendszereinek áttekintése (INGLEDEW és POOLE, 1984). A főbb elsődleges dehidrogenázok a bal oldalon, míg a főbb oxidázok a jobb oldalon szerepelnek. Ezek, az elektrontranszport céljából, az esetek többségében egy kinonnal, legtöbbször ubikinonnal (Q), néha menakinonnal (MQ) kapcsolódnak egymáshoz. A diagram minden egyes blokkja számos légzési-lánc-komponenst (flavinok, vas-kén centrumok, citokrómok vagy molibdén) tartalmaz. Nincs valamennyi rendszer jelen bármely sejttípusban; a különböző légzési komplexek jelenlétét és koncentrációit a szaporodási körülmények szabályozzák. *b)* Az *Escherichia coli* légzési lánca GOTTSCHALK (1979) után. Az a-ág aerob körülmények között növekedő sejtekben kerül előtérbe, a b-ág oxigénre korlátozott sejtekben. *c)* Az *Escherichia coli* légzési láncainak termodinamikai profilja. Az ábrán e mikroba három alapvető légzési lánca kerül bemutatásra: a fumarát-, a nitrát- és az oxigén-alapú. A főbb katabolikus dehidrogenázok, mind az elsődleges, mind a NAD^+-hoz kapcso-

Az aerob, ill. a fakultatív aerob baktériumokban a szubsztrátról az oxigénre irányuló elektrontranszport általánosított sémáját és néhány példáját a *137.* és *138. ábrák* mutatják be.

1.31.6. Az elektrontranszport-pályák variációi az *E. coli*nál

Az elektrontranszportlánc komponenseinek térbeli orientációját tárgyalva (1.16.15. alfejezet) az *E. coli* légzési láncának egyszerű sablonját (*lásd 84. ábra*) már bemutattuk. A következőkben mélyebb bepillantást nyújtunk az elektrontranszport-pályák sokoldalú variálásának lehetőségeibe egy és ugyanazon szervezetnél is, mégpedig ismét az *E. coli* példájával élve.

Az *Escherichia coli* elektrontranszport-foszforilációt mind aerob mind anaerob körülmények között egyaránt képes megvalósítani. Elektrondonor vagy -akceptor szerepében igen különböző vegyületeket hasznosíthat *(138.a.* és *b. ábra)*. Fehérjéinek összetételében a legjelentősebb válto-

lódó, ugyancsak szerepelnek. A különböző kapcsolódások középpont-potenciáljai (Em_7) csakúgy, mint a három oxidánssal végbemenő NADH-oxidációk standard GIBBS szabadenergiái ($\Delta G^{0'}$) ugyancsak bemutatva. DHAP = dihidroxi-acetonfoszfát; OAA = oxálecetsav.

d) A fumarát reduktáz bázisú elektrontranszportlánc. E modell magyarázatául szolgál az elektrontranszfer-reakciókkal járó protontranszlokációk kölcsönviszonyának megértéséhez. Az ábrán közölt sablon a következők szemléltetésére törekszik: a) a laktát oxidációja abban az esetben, ha fumarát az oxidáns nem, de ha az oxigén az oxidáns, úgy gerjeszt protonkoncentrációs különbséget. b) a ferricianid redukciója meghatározott periplazmatikus helyen megy végbe, ami energiaigényes folyamatokat segíthet. c) a fumarát-reduktáz helye belső lokalizációjú. d) citokróm b a fumarátra haladó elektrontranszport számára szükségtelen. (1) = hidrogenáz; (2) = fumarát-reduktáz; (3) = NADH-dehidrogenáz; (4) = citokróm b–d oxidáz komplex (a kinol oxidációja a periplazmatikus oldalon protontranszlokációt igényel); (5) = dikarboxilát hordozó; (6) = kinon és kinol a membránban diffundálnak és a reduktáns és az oxidáns között cirkulálnak; (7) = a ferricianid redukció helye, mely $\Delta\mu_{H^+}$ gerjesztésben működik közre (a ferricianid kinon általi redukciójakor egy proton válik szabaddá); (8) = laktát-dehidrogenáz: ennek az enzimnek az aktivitása abban az esetben, ha az oxidáns fumarát nem gerjeszt Δp-t, azonban oxigénnel mint oxidánssal igen.

e–g) A fumarát reduktáz prosztetikus csoportjának szerkezete. *e)* A 4Fe-4S kluszter szerkezete. A fehérje négy cisztein maradéka ezt a csoportot egészíti ki és tartja. *f)* A 2Fe-2S kluszter szerkezete. Ennek a kluszternek a teljességhez négy ciszteinil oldalláncra van szüksége. *g)* A fumarát reduktáz modellje egy 4Fe-4S kluszterrel kapcsolódó „flavin-tartalmú" alegységgel (jobb), továbbá két 2Fe-2S központtal rendelkező vas-kén alegységgel (bal). A flavin alegységben az elsődleges aminosav szekvencia 1. és 110. között látható. A flavin a hisztidin-45-höz kapcsolódik. Az Ⓐ-val megjelölt két pont közötti szekvencia az emlős szukcinát-dehidrogenáz megfelelő helyével homológ. A Ⓑ-vel jelölt régió csupán pozitív töltésű aminosavmaradékokat hordoz, melyek neutrális aminosavmaradékokhoz kapcsolódnak. Ez a flavinhoz közeli pozitív szekvencia képezheti a fumarátkötő helyet. A vas-kén alegységben, a 140. és a 220. aminosavak közötti szekvencia látható. A két kluszter ciszteinekhez kapcsolódik. Szimbólumok a flavin részben: ⊕ = nitrogén; ◑ = oxigén; ⊙ = foszfor; a fehérjében: (✱) = cisztin; (+) = aszpartát; (◖) = aszparagin; (◆) = glutamat; (●) = glutamin; (■) = arginin; (▲) = hisztidin; (▟) = lizin; (⬮) = szerin: (▙) = treonin; (□) = tirozin; (○) = glicin; (◗) = alanin; (◆) = valin; (◇) = leucin; (□) = izoleucin; (△) = metionin; (▢) = fenilalanin; (○) = triptofán; (⌂) = prolin.

h) Az alanin és analógjainak metabolikus átalakítása továbbá az oxidáció feltételezett kapcsolata a légzési lánccal. A p. p. racemáz piridoxálfoszfát-dependens enzim. *c)–h)* INGLEDEW és POOLE, 1984, után

zások akkor mennek végbe, amikor aerobiózisról anaerobiózisra tér át. Ekkor a légzési anyagcsere módosulása elsőnek a citokrómtartalomban jelentkezik. A citokrómok összetételét a terminális elektronakceptor minősége (oxigén, fumarát, nitrát, melynek termodinamikáját a *138c. ábra* szemlélteti, nitrit, dimetilszulfoxid vagy trimetil-ammonium-oxid) döntően befolyásolja. Azok a sejtek, melyek nagy oxigéntenziónál szaporodnak, a citokrómok viszonylag alacsony koncentrációját tartalmazzák, mégpedig többnyire b típusúakat. Amint az oxigén hozzáférhetősége csökken, a citokróm-d (terminális oxidáz), b és a_1 (ismeretlen funkciójú) kerülnek előtérbe. A citokróm-b-ről feltételezik, hogy a citokróm-d közvetlen reduktánsa. Ha az *E. coli* sejtek anaerob körülmények között fumaráttal mint terminális elektronakceptorral szaporodnak, úgy a következő citokrómkészlet kerül előtérbe: b_{555}, b_{558}, a_1 és d. Nitráttal szaporodva, ezt hasonló minőségben értékesítve, sejtjeiben a citokróm-d spektrális modifikációja jelentkezik, ugyanakkor a citokróm-b nitrát reduktázzal és formiát dehidrogenázzal társul. Egyébként ismeretes, hogy a mikrobák légzési anyagcseréjének gyors megközelítő felderítésére szélesen elterjedt teszteket használnak. Pl. az oxidázteszt révén azt mérjük le, hogy a mikroba képes-e a di- vagy tetrametil-p-feniléndiamin plusz α-naftolnak indofenolkékké oxidációját katalizálni. Amennyiben a reakció gyors és ≈ 30 másodpercen belül bekövetkezik, akkor ebből arra következtethetünk, hogy a tesztmikroba aktív citokrómoxidázhoz kapcsolódó, membránkötődésű, magas potenciálú citokróm-c-vel rendelkezik, és elektrontranszportláncában esetleg még a 3-as energiakötőhely is jelen van. Feltételezik, hogy ha egy mikrobánál a citokróm-c és a „3-as hely" hiányzik (pl. *E. coli*, mely oxidáz negatív), úgy olyan környezetben élhet, melyben az energia és a redukáló képesség bőségesen áll rendelkezésre.

A citokrómok összetételében végbemenő változásokkal párhuzamosan a sejtben változhatnak a funkcionáló kinonok és a dehidrogenázok is. Az ubikinon–8 főleg azokban a sejtekben kerül előtérbe, melyek légellátása kitűnő, míg az alternatív oxidánsokkal működve a menakinon–8 szintézise az erőteljesebb.

Az *E. coli*, miként több más baktérium is, anaerob körülmények között, ha a közeghez a légzési lánc oxidánsának minőségében fumarátot adnak, úgy nem fermentálható szénforráson is szaporodik. A fumarát, az oxigénhez hasonlóan, a katabolizmusból származó redukáló ekvivalensek süllyesztőjeként szerepel, biztosítva a redukált piridinnukleotidok reoxidációját és ezáltal a metabolitok folyamatos turnoverét. Ezenkívül az elektrontranszportlánc megfelelő felállása esetén a szubsztrát-pár és a szukcinát-fumarát-pár között rendelkezésre álló redox energia oxidatív foszforiláció útján nagy energiájú foszfátkötésben mint kémiai energia

válik konzerválhatóvá *(138.c., d. ábrák)*. Az *E. coli* respirációs láncán a szukcinát-fumarát-pár akár oxidáns akár reduktáns minőségében egyaránt szerepelhet *(138.c. ábra)*. A két reakciót két különböző enzim katalizálja: a szukcinát dehidrogenáz és a fumarát reduktáz, melyek egyébként jelentős szerkezeti hasonlóságot mutatnak (*lásd* még az 1.17.6. alfejezetet).

A fumarát reduktáz molekula szerkezetének felderítésére jelentős kutatómunka összpontosult, ennek ellenére felépítéséről csak munkahipotézissel rendelkezünk. Az *E. coli* fumarát reduktáza membránhoz kötődik és két polipeptidből épül fel. A natív enzim dimér *(138.g. ábra)*. A fumarát reduktáz az enzim moljára számítva 4–5 mol nem hem vasat és savlabilis szulfidot tartalmaz. Feltételezik, hogy a kisebbik alegységhez összesen kettő „két vas–két kén" (2Fe–2S) típusú vas–kén centrum kapcsolódik *(138.e–g. ábra)*. A két 2Fe–2S típusú csoport 8 ciszteinhez kötődhet. A nagyobbik (flavoprotein) alegység összesen 10 ciszteinil maradékot tartalmaz és valószínűen ezek közül 4 egy 4Fe–4S klusztert köt le.

A D-aminosavak, így elsősorban is a D-alanin és a D-glutamát a peptidoglikán sejtfal fontos alkotói: A D-aminosavak degradációját a membránnal társuló D-aminosav dehidrogenázok katalizálják. Az oxidáció a megfelelő iminosavakat hozza létre, melyek hidrolízise ketosavat és NH_3-t eredményez *(138.h. ábra)*. A D-aminosav dehidrogenáz elsődleges dehidrogenáz, mégpedig abban az értelemben, hogy az oxidációs reakcióból származó elektronokat közvetlenül juttatja a protontranszlokáló légzési láncra. Ennek folytán a D-aminosav oxidáció az oldott anyagok aktív transzportját energizálhatja.

1.31.7. Az aerob anyagcsere energetikai hatékonysága

A pH 7-re vonatkoztatva, voltokban megadott standard- vagy normálpotenciál-értékek (E_0') az egyes oxidációs-redukciós folyamatok „hajtóerejének" mértékét is kifejezésre juttatják, mégpedig a következőknek megfelelően:

$$-\Delta G_0 = \Delta E \cdot n \cdot F$$

(ΔG_0: szabadentalpia; ΔE: a két rendszer potenciálkülönbsége; n: a szállított elektronok száma; F: FARADAY-konstans = 96,5 kJ).

A hidrogén vízzé oxidálásánál (pl. a légzési láncban) a ΔG_0-t könnyen kiszámíthatjuk:

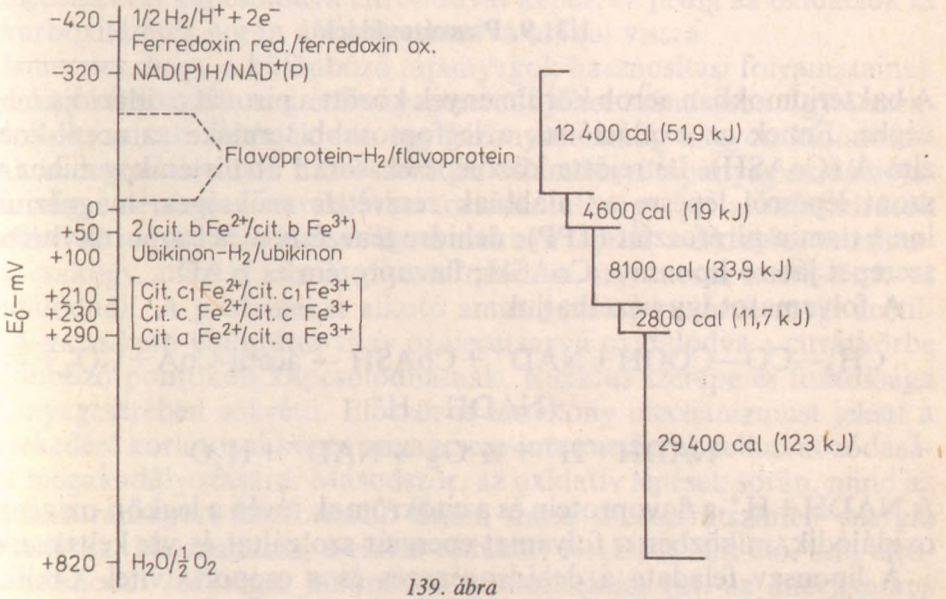
A $H_2/2\,H^+$ hidrogénrendszer redoxipotenciálja: $-0{,}42$ V
Az $O^{2-}/\frac{1}{2}\,O_2$ oxigénrendszer redoxipotenciálja: $+0{,}81$ V
ΔE: 1,23 V, $n=2$

Ennek megfelelően a $H_2+\frac{1}{2}\,O_2 = H_2O$ reakció szabadentalpiája:

$$-\Delta G_0 = 1{,}23 \cdot 2 \cdot 96{,}5 = 237{,}39 \text{ kJ/mol} = 56{,}5 \text{ kcal/mol}$$

A hidrogénről az oxigénre irányuló elektrontranszportot tehát jelentős mérvű szabadentalpia-csökkenés kíséri. A légzési lánc során az energia felszabadítása nem egyszerre, de nem is folyamatosan, hanem lépésenként megy végbe, mikor is az energiának nagyobb része hő alakjában vész el és csak mintegy 40–45%-a konvertálódhat kémiai energiává (*lásd* 1.15.7. alfejezet). Ez a konverzió sem közvetlenül történik, hanem az elektronok leadott energiája átmenetileg protonkoncentráció-gradiens alakjában jelenik meg. Mint láthattuk (1.15.1. alfejezet.), az elektrondonor és -akceptor között csaknem 200 mV potenciálkülönbségnek kell lennie ahhoz, hogy a nagy energiájú foszfátkötéshez szükséges energia felszabadulhasson. Ez a komplett légzési láncban háromszor valósul meg.

Az oxigénre haladó elektrontranszportlánc tagjainak redoxipotenciálját a *139. ábra* mutatja be.



139. ábra

Az elektrontranszportlánc tagjainak redoxipotenciálja. Minthogy a citokrómok egyidejűleg csak egyetlen elektront vesznek fel, ezért 2–2 mol citokróm együttes hatása folytán 100 mV potenciálkülönbség, 19,26 kJ, ill. 4600 cal energiával egyenértékű

1.31.8. Az aerob légzési kontroll

Az eukarioták mitokondriumaiban a légzési lánc *(lásd 87., 88.* és *89. ábrákat)* és a foszforiláció zavartalan együttműködését szigorú légzési kontroll biztosítja. Az elektrontranszport csak akkor funkcionál, ha egyidejűleg ADP és anorganikus foszfát is jelen van. Nagy ATP-

koncentrációnál nemcsak a légzés áll le, hanem az elektrontranszport visszafelé fordulhat. Így pl. szukcináttal NAD^+-redukciót lehet kiváltani, ha ugyanakkor az ATP nagy mennyisége van jelen. Élettani körülmények között a légzést a rendelkezésre álló ADP mennyisége szabályozza. Csak mérgekkel „szétkapcsolt" állapotban hatástalan az ADP. Ilyen összefüggések a prokariotáknál általában nem ismerhetők fel. Nyilvánvalóan akkor, amikor a sejteket a vizsgálatok céljaira feltárják, és a zárt membránzsák tönkremegy, a kapcsolódások elvesznek. E szabályozást legfeljebb egyes baktériumok intakt sejtjeivel, éspedig indirekt módon lehet bizonyítani. Így a durranógáz-baktériumoknál, melyek szénforrásként szén-dioxidot, elektrondonorként hidrogént hasznosítanak, a légzés, ha a kultúrfolyadékból a szén-dioxidot eltávolítják, jelentősen csökken. A szén-dioxid elvonása ATP-felhalmozódáshoz vezet, ami ADP-hiányt idéz elő. Mindebből a légzési kontroll létére lehet következtetni.

1.31.9. Piruvátoxidáció

A baktériumokban aerob körülmények között a piruvát oxidációja megy végbe. Ennek az oxidációnak a legfontosabb terméke az acetil-koenzim-A (CoASH). Létrejötte köztilépések során át történik, amihez viszont lépésről lépésre az alábbiak részvétele szükséges: magnéziumion + tiamin-pirofoszfát (TPP); dehidrogénezésben és csoportátvitelben szerepet játszó liponsav; CoASH; flavoprotein és NAD.

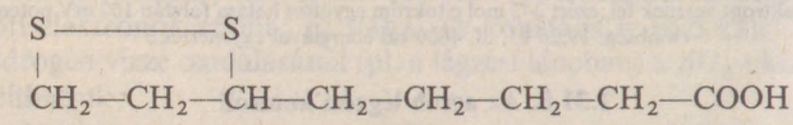
A folyamatot így vázolhatjuk:

$$CH_3—CO—COOH + NAD^+ + CoASH \rightarrow \text{acetil-CoA} + CO_2 + NADH + H^+$$

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}\, O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$$

A $NADH + H^+$ a flavoprotein és a citokrómok révén a légköri oxigénnel oxidálódik, miközben a folyamat energiát szolgáltat és víz keletkezik.

A liponsav feladata a dehidrogénezés és a csoportátvitel. Ciklikus diszulfid, mely oldalláncában karboxilcsoportot tartalmaz.



A liponsav a primer dekarboxilezési terméknek, egy aktív aldehidnek aktív savvá való átalakulásában működik közre.

A piroszőlősav az enzim felületén a tiamin-pirofoszfát (TPP) koenzimmel kondenzál, mikor is szén-dioxid hasad le és az enzimen acetaldehid-

tiamin-pirofoszfát komplex jön létre. Ez utóbbi hidrogénjét a liponsavnak adja át, mely azután NAD-dal visszaoxidálódik. Az enzimhez kapcsolódó acetil-tiamin-pirofoszfát CoA-val reagál és acetil-CoA keletkezik. E reakciók során átmenetileg két szulfhidrilcsoportot tartalmazó dihidroliponsav keletkezik. Az *E. coli*nál a piroszőlősav anorganikus foszfát felvételével acetil-foszfátra és hangyasavra bomlik. Az acetil-foszfát foszfotranszacetiláz közreműködésével acetil-CoA-vá és anorganikus foszfáttá alakul.

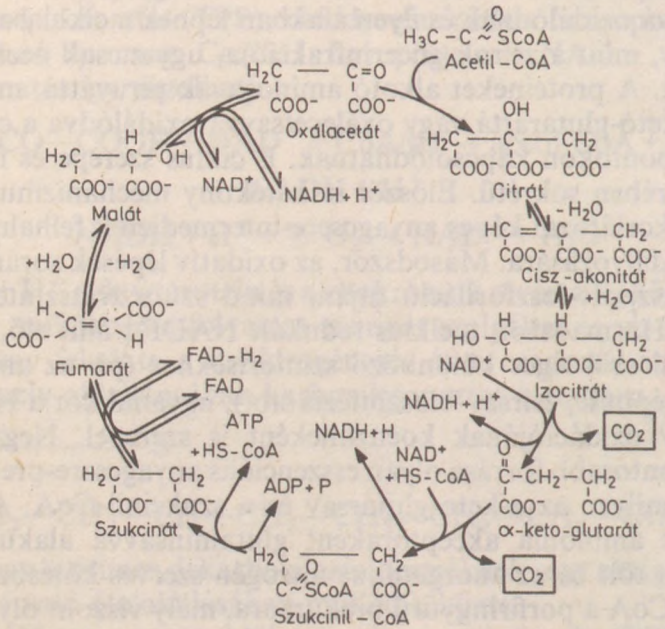
1.31.10. Citrátkör

A ma már általában trikarbonsavkörnek, trikarboxilsav-ciklusnak *(tricarboxylic acid cycle)* nevezett folyamatot több más néven is ismerjük: „citrátkör", „citromsav-ciklus", „SZENT-GYÖRGYI–KREBS-ciklus" vagy csak röviden „KREBS-ciklus" stb. Ebben a folyamatban az acetil-CoA oxálecetsavval kapcsolódva citromsavat képez, ez pedig az oxidációk és dekarboxilezések során át oxálecetsavvá alakul vissza.

Ismeretes, hogy a különböző tápanyagok hasznosítási folyamatainak első lépéseinél számos eltérő anyagcsereút jöhet számításba. Így a szénhidrátok, zsírok, fehérjék stb. egy bizonyos szintig nagyon különböző utakon degradálódnak. Ezzel szemben valamennyi tápanyag oxidációjának végső lépései a citrátkörbe torkollanak. Így pl. a szénhidrátok acetil-CoA-vá oxidálódnak és ilyen alakban lépnek a ciklusba. A zsírsavak csakúgy, mint a zsírok glicerinfrakciója, ugyancsak acetil-CoA-vá oxidálódnak. A proteineket alkotó aminosavak piruváttá, majd acetil-CoA-vá, α-keto-glutaráttá vagy oxálecetsavvá oxidálódva a citrátkörbe különböző pontokon kapcsolódhatnak. E ciklus szerepe és fontossága az anyagcserében sokrétű. Először is hatékony mechanizmust jelent a növekedést korlátozni képes anyagcsere-intermedierek felhalmozódásának megakadályozására. Másodszor, az oxidatív lépések során, mind az elektrontranszport-foszforiláció útján, mind szubsztrátszinten energia termelődik. Harmadszor, e ciklus redukált NADP-t állít elő, ami elengedhetetlenül szükséges különböző szintézisekhez (pl. az anorganikus ammónia beépítése, zsírsav-bioszintézis stb.), ugyanakkor a $NADP^+$ az izocitromsav oxidációjának koenzimeként is szerepel. Negyedszer, e ciklus a legfontosabb forrása olyan esszenciális anyagcsere-prekurzoroknak, mint amilyen az α-keto-glutársav és a szukcinil-CoA. Az α-keto-glutársav az ammónia akceptoraként glutaminsavvá alakul és ezzel kulcspozíciót tölt be az anorganikus nitrogén szerves kötésbe vitelénél. A szukcinil-CoA a porfiringyűrű prekurzora, mely viszont olyan vegyületek struktúrájának alkotja alapját, mint a kataláz, citokróm, klorofill vagy a B_{12}-vitamin. Egyes baktériumokban az e ciklus tagjaként szerep-

lő oxálacetát ugyancsak az anorganikus ammónia akceptora lehet, mikor is aszpartát képződik. Aszpartát létrejöhet oxálacetátból glutamáttal történő transzamináció révén is. Amint a CO_2-fixáció tárgyalásánál látni fogjuk, az oxálacetát foszfoenol-piruváttá (PEP) is átalakítható. Ennek révén viszont a zsírok és a fehérjék degradációs termékei, belépve a citrát-ciklusba, PEP-vé alakulhatnak, majd az EMBDEN–MEYERHOF-úton visszafelé haladva a glikogénszintézishez használódhatnak el. A PEP a mureinszintézisben, az aromás vegyületek előállításában és a glükóz membrántranszportjában ugyancsak fontos intermedier.

A sejtben folyó bioszintézisek prekurzorellátásán kívül a citrát-ciklus a szintézisek energiaszükségletének biztosításában is döntő fontosságú. Mint láttuk, 1 mol glükóznak szén-dioxiddá és vízzé oxidálása alkalmával a szabadenergia-változás, a legalábbis teoretikusan hasznos munkára felhasználható energia 2 871 kJ (686 000 cal). A valóságban a biológiai oxidációk nem annyira hatékonyak és ebből az energiából jelentős mennyiség hő alakjában vész el. Így pl. a foszfoenol-piruvát nagy energiájú foszfátkötésének hidrolitikus szabadenergiája 54,4 kJ (13 000 cal)/mol. Amikor ez a foszfát ADP-re kerül és ATP szintetizálódik, 25,1 kJ (6000 cal) vész el hő alakjában, minthogy az ATP harmadik ~P-ának hidrolitikus szabadenergiája csak 29,3 kJ (7000 cal). Az ATP nagy energiájú foszfátkötésének előállítását célzó reakciónak tehát feltétlenül 7000 cal-t



140. ábra
A citrátkör

37. táblázat

Az aerob baktérium energianyeresége, midőn a glükózt az EMBDEN–MEYERHOF-út és a citrát-ciklus segítségével szén-dioxiddá és vízzé égeti el

Folyamatok	Nettó változás ~P-ben	
	–	+
(1) glükóz + ATP → glükóz-6-P + ADP	1	
(2) fruktóz-6-P + ATP → fruktóz-1,6-P_2 + ADP		
(Az ezután következő energiabevételek kettővel szorzandók [a])	1	
(3) glicerinaldehid-3-foszfát + $NAD^+ \rightleftharpoons$ 1,3-difoszfoglicerinsav +		
+ NADH + H^+		1
$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \rightleftharpoons NAD^+ + H_2O$ [b]		3
(4) 2-foszfoglicerinsav $\overset{-H_2O}{\rightleftharpoons}$ enolpiroszőlősav-foszfát		1
(5) piroszőlősav + CoASH + $NAD^+ \rightleftharpoons$		
acetil-CoA + NADH + H^+ + CO_2		
$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \rightleftharpoons NAD^+ + H_2O$		3
(6) izocitromsav + $NADP^+ \rightleftharpoons$ oxálborostyánkősav + NADPH + H^+ [c]		
$NADPH + H^+ + 1/2\ O_2 \rightleftharpoons NADP^+ + H_2O$		3
(7) α-keto-glutársav + CoASH + $NAD^+ \rightleftharpoons$		
szukcinil-CoA + NADH + H^+ + CO_2		
szukcinil-CoA + ADP + Pi $\rightleftharpoons$ borostyánkősav + ATP		1
$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \rightleftharpoons NAD^+ + H_2O$		3
(8) borostyánkősav + Fp $\rightleftharpoons$ fumársav + FpH_2 [d]		
$FpH_2 + 1/2\ O_2 \rightleftharpoons Fp + H_2O$		2
(9) Almasav + $NAD^+ \rightleftharpoons$ oxálecetsav + NADH + H^+		
$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \rightleftharpoons NAD^+ + H_2O$		3
Totál	2	20
Totál × 2	2	40
Nettó		38
7000 cal/~P	266 000 cal/mol	

Megjegyzések a *37. táblázat*hoz.

[a] Minthogy minden egyes glükózmolekulából két trióz származik, ezért a triózszinten végbemenő minden energiaváltozást a végső kalkuláció alkalmával, kettővel kell szorozni. [b] Feltételezhető, hogy mint az állati szövetek esetében, a NADH + H^+ molekuláris oxigénnel oxidálva az oxidatív foszforiláció útján 3 ~ P-t eredményez. [c] Feltételezhetően a NADPH hidrogénje a legtöbb élő baktériumban nem vesz részt az oxigénnek energiaelőállítással kapcsolatos redukciójában. Ezzel szemben hidrogénforrást igénylő fontos reakciókhoz, szintézisekhez (pl. az ammónia beépülése) használódik el. Ennek ellenére a táblázat reakcióinak összeállításánál úgy szerepel, mintha bioszintézis nem folyna. [d] A borostyánkősav oxidációjában NAD nem vesz részt, míg a FpH_2 (redukált flavoprotein) hidrogénje oxigénre vitelének lépései az oxidatív foszforiláció során csupán 2 ~ P-t eredményeznek.

meghaladó energiát kell szolgáltatnia, de ekkor 29,3 kJ (7000 cal)-án felül bármilyen nagy legyen is az energiatöbblet, minden plusz energia hő alakjában vész el. A csökkent energiakihasználási hatékonyság egy másik típusát az oxálborostyánkősav dekarboxilációja szemlélteti. E folyamat során 20,93 kJ (5000 cal) mol energia szabadul fel. Mivel ez a mennyiség nem elegendő egy nagy energiájú foszfátkötés előállításához, ezért teljes egészében elvész.

A *140. ábra* a citrátkört vagyis az acetil-CoA eloxidálásának folyamatát mutatja be. A *37. táblázat* a glükóznak az aerob baktériumokban az EMBDEN–MEYERHOF-út, a citrátkör és az oxidatív foszforiláció bevonásával, szén-dioxiddá és vízzé történő oxidálásának energiamérlegét közli.

1.31.11. Az acetil-CoA oxidálása a citrát-ciklusban

A citrát-ciklusban az acetil-CoA oxálecetsavval reagálva szabad koenzim-A-t és citromsavat eredményez. A citromsav egy körfolyamat során lényegében oxálecetsavvá oxidálódik vissza. Citromsavból akonitsavon át izo-citromsav lesz, mely az izocitrát-dehidrogenáz részvételével két hidrogént a NADP-nek ad át és egyidejű dekarboxilációval α-keto-glutársavvá alakul.

Az izocitromsav két hidrogént vesztett oxidált alakja az oxálborostyánkősav. Valójában ez dekarboxilálódik. Az α-keto-glutársav dekarboxilációja és oxidációja alkalmával szubsztrátszinten termelődik energia. Ennek során egyidejűleg CO_2-vesztéssel redukált NAD, továbbá szukcinil-CoA jön létre. A nagy energiájú szukcinil-CoA kötés ATP szintézisében vehet részt, mely borostyánkősav megjelenéséhez vezet. Ez a borostyánkősav-dehidrogenáz hatására fumársavvá oxidálódik. A résztvevő enzim koenzime flavinszármazék (FAD), mely $FADH_2$-vé redukálódik. A fumársav vízfelvétellel almasavvá alakul, mely NAD közbelépésével és redukciójával oxálecetsavat eredményez és a ciklust zárja. A folyamat során tehát két molekula szén-dioxid távozott, két NAD, egy NADP és egy FAD redukálódott, és egy ATP (ADP-ből) vagy más nagy energiájú kötés keletkezett.*

* A bakterológiai gyakorlatban egyszerű citokémiai tesztet alkalmaznak a szukcinát-dehidrogenáz jelenlétének kimutatására a citoplazmamembránban (DREWS, 1983). A tanulmányozott baktérium fiatal, néhány órás peptonagar tenyészetéről a sejteket foszfátpufferrel (1 mM, pH 7,2) vagy Tris-pufferrel (0,05 M, pH 7,4) távolítják el, pufferrel még egyszer átmossák és 30 °C-on 30 percig a következő összetételű közegben inkubálják: Tris-puffer 50 ml pH 7,2; Na-szukcinát 50 mM; MTT [3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)2,5-difenil-tetrazolium-bromid], M_r 414,3, 2,5 mM (≈1 mg/ml); $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 5 mM. A szuszpenzióból, mely 60 percen belül kékre festődik, egy kacsnyit fedő- és tárgylemezek közé zárunk, majd olajimmerziós objektívvel mikroszkópban vizsgáljuk. A citoplazmamembránban, szabályos távközökben kékszínű, szemcsés lerakódások figyelhetők meg. A szuk-

1.31.12. A citrát-ciklus intermedierjeinek elvonása és ennek következményei

A ciklus vegyületei egymással egyensúlyban és csupán katalitikus mennyiségben vannak jelen. Következésképpen, ha az anyagcsere a ciklus egyes intermedierjeit elvonja, vagy mennyiségét csökkenti, úgy ennek kihatásaként valamennyinek csökken a mennyisége. Ilyen veszteségek léphetnek fel a sejtbioszintézis alkalmával az α-keto-glutarát és a szukcinil-CoA tekintetében, melyek makromolekulák szintéziséhez prekurzorként használódhatnak el. Ezenkívül, az oxálacetát molekulája viszonylag instabil és még bioszintézisre képtelen szövetkészítményekben is piruvátra és szén-dioxidra bomlik le. Ez a tény képezi SZENT-GYÖRGYI azon régi megfigyelésének alapját is, hogy az idővel oxidatív aktivitásukat vesztett szövetek e képességüket katalitikus mennyiségű dikarboxilsavak hozzáadására visszanyerhetik. A négyszénatomos vegyületek utánpótlásának szükségessége különben, azért merül fel különösen nyomatékkal, mivel az EMBDEN–MEYERHOF-út egy hatszénatomos vegyületet kettő, három szénatomosra bont, majd ezek tovább oxidálódnak kettő + egyre. Vagyis négyszénatomos vegyületek nem képződnek.

1.31.13. A légzési lánc és a citrát-ciklus kapcsolata

A citrát-ciklus és a légzési lánc a legszorosabban kapcsolódnak egymással. Az eukariotákban mindkettő a mitokondriumokban lokalizált, mégpedig a légzési lánc enzimei a mitokondrium membránjában, míg maga a citrát-ciklus a mitokondrium belső terében. A szukcinát-dehidrogenáz az egyetlen membránkötődésű ciklusenzim. A prokariotáknál az elektrontranszport enzimei ugyancsak membránkötődésűek. A szukcinát-dehidrogenáz kivételével a citromsav-ciklus összes enzime a citoplazmában foglal helyet.

Jóllehet a citrát-ciklus oxigént közvetlenül nem igényel, katabolikus lefutása mégis az oxigén jelenlététől függ. Anaerobiózisnál a ciklus a kivételektől eltekintve leáll. Eszerint mindazok a tényezők, melyek a légzési láncot befolyásolják, közvetve a citromsav-ciklusra is hatnak. Ezenkívül a ciklus metabolitjai maguk is mint a légzési lánc szubsztrátjai hatnak. Ismeretes, hogy a sejtben normális körülmények között, a ciklus egyes di- és trikarboxilsavainak koncentrációja rendkívül alacsony (pl. az izocitrát, szukcinil-CoA, oxálacetát esetében), úgyhogy ezek a citrát-

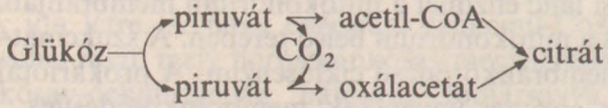
cinát-dehidrogenáz a szubsztrátjáról a hidrogént ubikinonra viszi át. A színtelen tetrazoliumsó elektronakceptor minőségében szerepelhet és erősen színezett, vízben nem oldódó termékké redukálódik, miközben finomszemcséjű kobaltkomplexet képez.

ciklus szabályozásában szignálmetabolitként jöhetnek számításba. A ciklus szabályozásában az alábbiak játszhatnak szerepet:

1. A sejt energiatöltése, ill. az adenilátrendszer állapota
2. A NADH koncentrációja, ill. a sejtben a NAD^+/NADH arány
3. A ciklus bizonyos savainak koncentrációi

A ciklusban részt vevő egyes enzimek szignálreceptorok lehetnek. Így pl. a citrát-szintáz, izocitrát-dehidrogenáz stb. Mindkettőt az ATP gátolja. A NADH is szignálmetabolit. A sejtben magas NADH-szintnél (pl. nem működő légzési lánc esetében) a ciklus leáll. Könnyen belátható viszont, hogy az anaeroboknál a citromsav-ciklus szabályozása más elvek szerint történhet. Ezeknél a ciklus elsősorban is anabolikus, vagy legalábbis csak részben katabolikus funkciójú és egyes szakaszokon visszafelé is haladhat. Ezekben az esetekben viszont a ciklus többé már nem ciklus, hanem különböző hosszúságú egyenes vagy elágazó reakciólánc. Így viszont a NADH mint domináns szabályozófaktor már feleslegessé válik. Anaerob körülmények között az oxálacetát, ezenkívül az α-keto-glutarát és a szukcinil-CoA szignálmetabolitok lehetnek.

A ciklus egyes szerves savainak fokozott produkcióját lehet elérni, ha pl. valamely ciklusenzimet blokád alá helyeznek. Az akonitát-hidratáz csökkent aktivitása pl. olyan nagymérvű intracelluláris citrátfelhalmozódást idéz elő, hogy a citrát a tápközegben is megjelenik, amit iparilag is kihasználhatunk. Amennyiben a tápközeg pH-értéke alacsony, vagyis savanyú közegben, a citromsav túlprodukciója különösen fokozódik. Glükóz esetében ennek anyagcsereútja a következő



A sejt itt energiát az EMP-úton, továbbá a piruvát acetil-CoA-vá történő oxidatív dekarboxilezésekor nyer.

1.31.14. Heterotróf CO_2-fixáció

Propionibaktériumok glicerinfermentációját tanulmányozva tapasztalták, hogy a fermentáció végén a termékekben visszakapott szén súlya nagyobb volt, mint amennyi a felhasznált kiindulási glicerin szenének súlya volt. Ebből arra következtettek, hogy a plusz szénmennyiség a közegben pufferként alkalmazott kalcium-karbonátból származott. Megállapítást nyert, hogy a CO_2-fixáció a piroszőlősav karboxilációjával ment végbe, melynek során oxálecetsavon át borostyánkősav termelődött. Azt, hogy e szintézishez valamilyen energiaforrás használódott volna el, nem sikerült kimutatni.

Később tapasztalták, hogy ez a „három szén + egy szén"-típusú CO_2-fixáció valamennyi heterotróf szervezetnek, növényeknek és állatoknak közös jellemvonása. Ez az általános típusú reakció a citromsav-ciklus vegyületeinek szintézisét teszi lehetővé a szénhidrát-anyagcsere termékeiből.

A heterotróf baktériumokban a CO_2-fixálási reakciók több típusa fordul elő és teszik lehetővé a szén-dioxid nettó beépülését. Az egyik mechanizmus szerint a reakció kivitelezéséhez szükséges energia magában a szubsztrátban van jelen. Ez a szubsztrát a foszfoenol-piruvát (PEP):

$$PEP + CO_2 \xrightarrow{\text{PEP-karboxiláz}} \text{oxálacetát} + Pi \text{ (anorganikus foszfát)}$$

Ez a lényegében irreverzíbilis reakció igen sok baktériumban előfordul. Ismeretes a reakciónak olyan változata is, melyhez viszont ADP is szükséges, és amit a PEP-karboxikináz katalizál:

$$PEP + ADP + CO_2 \underset{Mg^{++}}{\overset{\text{PEP-karboxikináz}}{\rightleftharpoons}} \text{oxálacetát} + ATP$$

Jóllehet ez a reakció fontosnak tekinthető a négy szénatomos vegyületek szintézise szempontjából, de ugyanolyan fontos lehet az oxálacetáttá vagy α-keto-glutaráttá oxidált aminosavakból történő foszfoenol-piruvát előállításában is.

A CO_2-fixáció reakcióinak egy másik típusa elsősorban is a zsírsav-bioszintézissel kapcsolatos és aktivitásához biotint igényel.

$$ATP + \text{piruvát} + CO_2 \underset{\text{biotin, } Mg^{++}}{\overset{\text{piruvát-karboxiláz}}{\rightleftharpoons}} \text{oxálacetát} + ADP + Pi$$

A piruvát karboxilációját előidézni képes enzim–biotin–szén-dioxid komplex létrejötte ATP-t igényel.

Weide és Aurich (1979) a heterotrófok szén-dioxid-kötési reakcióit az alábbiak szerint csoportosítják:

1. CO_2-fixáció egyidejű redukcióval.
   Malátenzim: $CO_2 + \text{piruvát} + NADPH \rightarrow \text{malát} + NADP^+$
2. CO_2-fixáció ATP-felhasználással
   A) Karboxibiotin kialakítása (ATP-felhasználással) és karboxil-transzfer révén:
   propionil-CoA-ra, miközben metilmalonil-CoA jön létre
   acetil CoA-ra, ami malonil-CoA-t eredményez
   piruvátra oxálacetát-képződéssel
   B) Karbamil-foszfát képzésével
   Karbamát-kináz:
   $CO_2 + NH_3 + ATP \rightarrow$ karbamil-foszfát + ADP

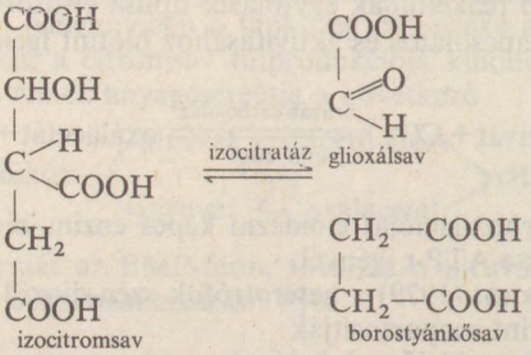
3. CO_2-fixáció PEP-felhasználással
PEP-karboxikináz:
$CO_2 + PEP + ADP \rightarrow$ oxálacetát + ATP

1.31.15. A glioxalát-ciklus

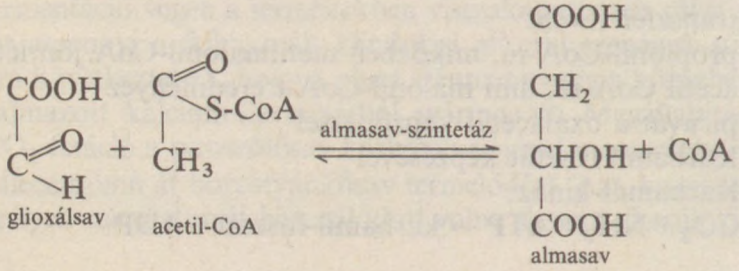
E ciklust *(141. ábra)* gyakran mint „glioxalát-hidat" is említik, mivel a citrát-ciklust áthidaló, azt lerövidítő útnak fogható fel. Lényege, hogy megkerüli a citromsav-ciklus azon lépéseit, melyek szén-dioxid-vesztéssel járnak és így ez az út takarékos, szénkonzerváló folyamatként kezelhető, szemben a teljes ciklus energiatermelő, de szénfogyasztó mechanizmusával.

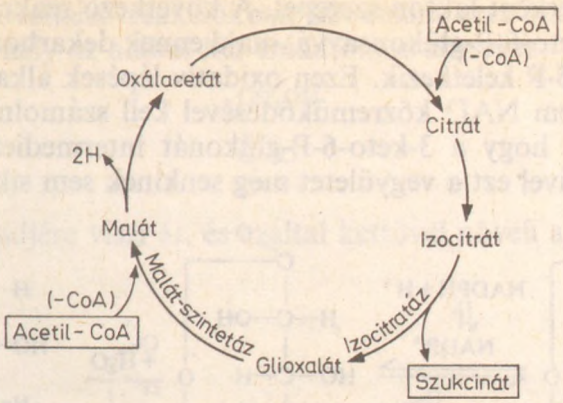
Számos aerob baktériumban két enzim jelenlétét mutatták ki, melyek számukra lehetővé teszik, hogy acetáton mint egyedüli szénforráson (mely különben a citrát-ciklusban egészében szén-dioxiddá oxidálódik) növekedjenek és a kétszénatomos vegyületekből (így két molekula acetátból, acetil-CoA alakjában aktiválva) négyszénatomost (egy molekula borostyánkősavat) állítsanak elő.

Ez a két enzim az izocitratáz és az almasav-szintetáz. Az első az izocitromsavat borostyánkősavra és glioxálsavra hasítja



Ezután a borostyánkősav a citromsav-ciklus soron következő átalakulásain megy át, míg a glioxálsav acetil-CoA-val kapcsolódva, a második enzim, az almasav-szintetáz segítségével almasavat eredményez:





141. ábra
A glioxalát-ciklus

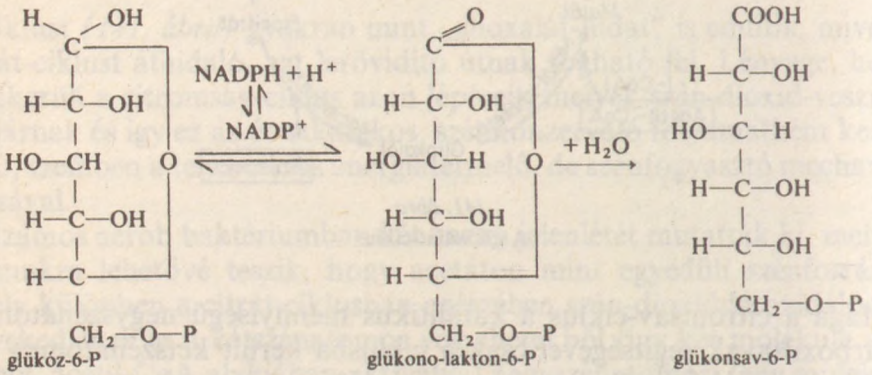
Maga a citromsav-ciklus a katalitikus mennyiségű négyszénatomos dikarboxilsavak segítségével csak a ciklusba került kétszénatomos vegyület eloxidálására alkalmas, és a reakciók során ennek szénatomjai a termelt szén-dioxiddal távoznak. A glioxalát-ciklus révén a szervezetnek lehetősége nyílik a citromsav-ciklus intermedierjei készleteinek feltöltésére anélkül, hogy CO_2-fixációhoz kellene folyamodnia. Mint ismeretes, a négyszénatomos dikarboxilsavakat a bioszintézisek folyamatosan elvonják a ciklusból.

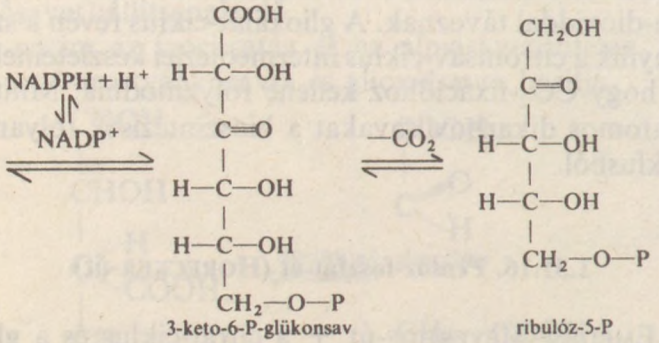
1.31.16. Pentóz-foszfát-út (HORECKER-út)

Jóllehet az EMBDEN–MEYERHOF-út + a citrát-ciklus és a glioxalát-híd sokféle módon szolgálják a baktériumsejtet, mégis a szénhidrát-anyagcsere néhány lényeges funkciójának betöltésére képtelennek bizonyulnak. Így pl. nem állítanak elő a nukleinsavak bioszintéziséhez nélkülözhetetlen ötszénatomos cukrokat és a négyszénatomos cukornak, az eritróz-4-foszfátnak a szintézisét sem képesek megvalósítani, mely pedig az aromás vegyületeknek, így a triptofán, tirozin és fenil-alanin aminosavaknak az előállításához ugyancsak elengedhetetlen. Ezenkívül számos obligát aerob baktériumban hiányzik a működő EMBDEN–MEYERHOF-út és ezért ezeknek a glükóztól piruvátig megfelelő alternatív útra van szükségük. Az a reakciósorozat, melyre mindezen hiányosságok jóvátétele hárul, az az ún. pentóz-foszfát-út, mely mind az aerob, mind a fakultatív baktériumokban jelen van.

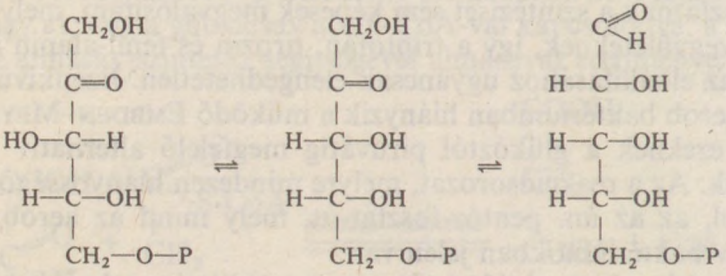
Ennek az útnak egy oxidatív és egy nem oxidatív szakaszát különböztethetjük meg. A glükóz-6-P-nak glükonsav-6-P-tá oxidálásával kezdő-

dik, intermedierként lakton szerepel. A következő reakció a glükonsav oxidációja 3-keto-6-P-glükonsavvá, majd ennek dekarboxilálása. Ennek során ribulóz-5-P keletkezik. Ezen oxidatív lépések alkalmával inkább NADP, mintsem NAD közreműködésével kell számolnunk. Megjegyzésre érdemes, hogy a 3-keto-6-P-glükonát intermedier létezése csak feltételezett, mivel ezt a vegyületet még senkinek sem sikerült izolálnia.





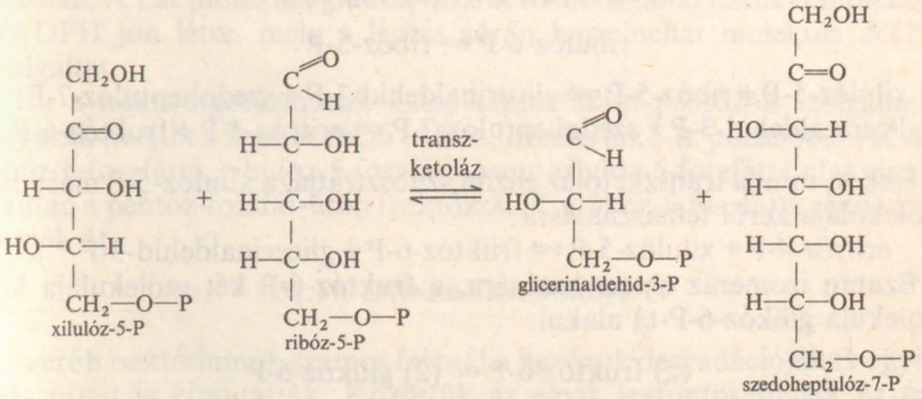
Ezen oxidatív lépéseket követően nem oxidatív jellegű reakciók sorozata következik, amit a ribulóz-5-P-nak két másik pentózzá alakulása vezet be.



Az ezután következő reakciókban két enzim vesz részt: az első egy transzketoláz, mely az alábbi két szénatomos egységet

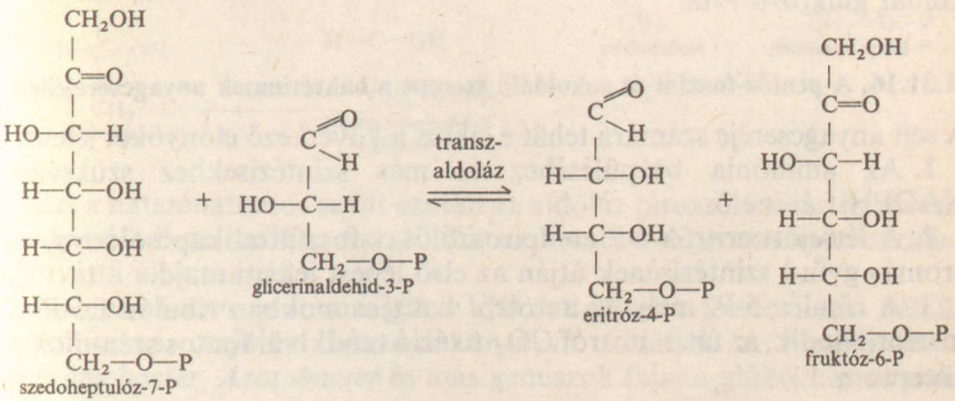


egy aldol aldehidjére viszi át, és ezáltal kettővel növeli a lánc hosszát.



Ez az enzim aktivitásához tiamin-pirofoszfátot és két vegyértékű kationt igényel.

A második enzim a transzaldoláz, mely azokról a szénhidrátokról, melyek a 3. és 4. szénatomokon (pl. a szedoheptulóz-7-P esetében a C3 és a C4) transzhidroxil-csoportokkal rendelkeznek, egy három szénatomos egységet, a dihidroxiacetont viszi át. Ez utóbbi aldóz akceptorra kerül (egy aldehidcukorra), ami ennek három szénatomos láncmeghosszabbodását idézi elő. A hétszénatomos szedoheptulóz-7-P esetében a négyszénatomos maradvány az eritróz-4-P lesz.



Amennyiben e ciklust a maga teljességében szándékozzuk áttekinteni, úgy a soron következő egyenletek felírását három molekula glükóz-6-P-tal kell kezdenünk.

(3) glükóz-6-P + (3) $NADP^+ \rightleftharpoons$ (3) glükonsav-6-P + (3) NADPH + (3) H^+

(3) glükonsav-6-P + (3) $NADP^+ \rightleftharpoons$ (3) ribulóz-5-P + (3) CO_2 + + (3) NADPH + (3) H^+

(2) ribulóz-5-P $\rightleftharpoons$ (2) xilulóz-5-P

ribulóz-5-P $\rightleftharpoons$ ribóz-5-P

xilulóz-5-P + ribóz-5-P $\rightleftharpoons$ glicerinaldehid-3-P + szedoheptulóz-7-P
glicerinaldehid-3-P + szedoheptulóz-7-P $\rightleftharpoons$ eritróz-4-P + fruktóz-6-P

Ekkor, mint a transzketoláz enzim szubsztrátja, a xilulóz-5-P második molekulája kerül felhasználásra:

eritróz-4-P + xilulóz-5-P $\rightleftharpoons$ fruktóz-6-P + glicerinaldehid-3-P

Ezután izomeráz enzim hatására, a fruktóz-6-P két molekulája két molekula glükóz-6-P-tá alakul.

(2) fruktóz-6-P $\rightleftharpoons$ (2) glükóz-6-P

Nettó:

(3) glükóz-6-P + (6) $NADP^+ \rightarrow$ (6) NADPH + (6) H^+ + (3) CO_2 + + (2) glükóz-6-P + (1) glicerinaldehid-3-P vagy,
glükóz-6-P + (6) $NADP^+ \rightarrow$ (6) NADPH + (6) H^+ + (3) CO_2 + + (1) glicerinaldehid-3-P

Ezek szerint a teljessé vált ciklus NADPH-t és glicerinaldehid-3-P-ot állít elő. Utóbbit az EMBDEN–MEYERHOF-út enzimei enolpiroszőlősav-foszfáttá és piruváttá alakíthatják, vagy még egy molekula glicerinaldehid-3-foszfáttal összekapcsolva, az EMBDEN–MEYERHOF-úton visszaalakulhat glükóz-6-P-tá.

1.31.16. A pentóz-foszfát-út sokoldalú szerepe a baktériumok anyagcseréjében

A sejt anyagcseréje számára tehát e ciklus a következő előnyöket jelenti:

1. Az ammónia beépüléséhez és más szintézisekhez szükséges NADPH-t állít elő.

2. A létrejött eritróz-4-P enolpiroszőlősav-foszfáttal kapcsolódva, az aromás gyűrű szintézisének útján az első lépést jelenti majd.

3. A ribulóz-5-P, mely az autotróf baktériumokban ribulóz-1,5-P-tá foszforilálódik, az ún. autotróf CO_2-fixáció rendkívül fontos szén-dioxid akceptora.

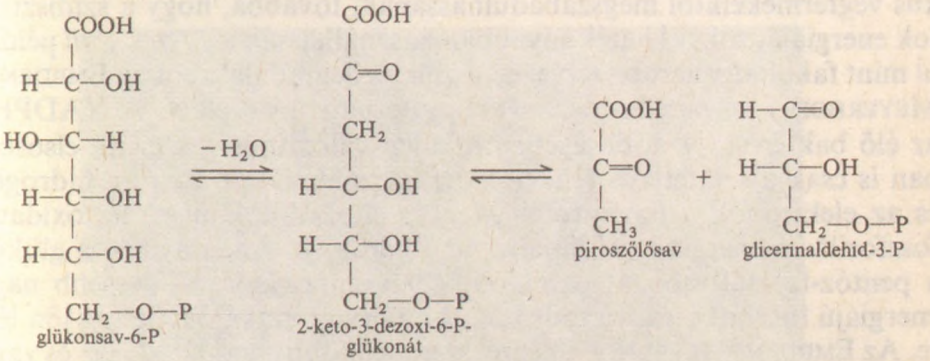
4. A ribóz-5-P nukleotidok, mint amilyen az adenilsav, szintéziséhez kerül felhasználásra.

Vannak mikroorganizmusok, melyeknél a pentóz-foszfát-út legfontosabb rendeltetése NADPH szintézise, mely viszont ezeknél elsősorban is az energianyerés céljait szolgálja. Itt az egyensúly úgy alakul, hogy hat glükóz-foszfát molekulából egy molekula teljes egészében szén-dioxiddá oxidálódik. Pontosabban mind a hatból egy szénatom mint szén-dioxid lehasad, majd a létrejött hat molekula pentóz visszaalakul öt molekula hexózzá. A hat molekula glükóz-foszfát oxidációjánál tizenkét molekula NADPH jön létre, mely a légzés során harminchat molekula ATP-t szolgáltat.

Ha a mikroorganizmusok külső tápforrásául pentózok szolgálnak, úgy ezek a sejtben izomerizáció és foszforilálás (az 5-ik pozícióban) révén ribóz-5-foszfáttá, ribulóz-5-foszfáttá vagy xilulóz-5-foszfáttá alakulnak. Ezután a pentóz-foszfát-úton fruktózzá, ill. glükóz-6-foszfáttá rendeződhetnek át.

1.31.17. Entner–Doudoroff-út

Az aerob baktériumok számos fajánál a hexózok degradációjának egyéb más útjait is kimutatták. Közöttük az egyik legfontosabbnak az ún. Entner–Doudoroff-út bizonyult, mely a sablonos pentóz-foszfát-úttól a glükonsav-6-foszfátnál tér el. Az Entner–Doudoroff-úton glükonsav-6-P-ból egy molekula víz elvonásával 2-keto-3-dezoxi-6-foszfoglükonát jön létre:



Ezt a hatszénatomos savat ezután az aldoláz piroszőlősavra és glicerinaldehid-3-P-ra hasítja. Az utóbbit az Embden–Meyerhof-út enzimei piruváttá alakíthatják.

Az *Acetobacter* genusz tagjai a glükózt előzetes foszforiláció nélkül glükonsavvá, majd ezt 5-ketoglükonsavvá oxidálják. A *Pseudomonas, Achromobacter, Azotobacter* és más genuszok fajai a glükózhasznosítás

némileg hasonló mechanizmusával élve, a glükonsavat 2-ketoglükonáttá oxidálják. Ezek a ketosavak a 6. szénatomon foszforilálódhatnak, majd ezt követően a keton redukálódik és glükonsav-6-P jön létre. A hexózanyagcsere ezen alternatív útjai feltehetően az energiaáram és a sejtszintézis ellenőrzésében játszanak fontos szerepet.

Azoknál a törzseknél, melyek energianyerés céljaira kizárólag az ENTNER–DOUDOROFF-utat használják, az EMBDEN–MEYERHOF-út első szakaszainak az enzimei, így pl. a foszfofruktokináz, hiányoznak. Az ENTNER–DOUDOROFF-út az energianyerésen kívül szerepet játszik a glükonát hasznosításában is.

Az *E. coli* a glükóz lebontására az EMBDEN–MEYERHOF-utat, a glükonát asszimilációjára viszont az ENTNER-DOUDOROFF-utat használja.

1.31.18. Az aerob anyagcsere előnyei az anaerobbal szemben

Végső soron megállapíthatjuk, hogy az anaerobokkal szemben az aerob baktériumok számos biokémiai előnnyel rendelkeznek és az evolúciós ranglétrán már jelentősen magasabb fokra jutottak el. Rendelkezésükre áll a pentóz-foszfát-út minden előnye, valamint a citromsav-ciklus, és feltehetően a glioxalát-híd is. Citokrómokkal és katalázzal rendelkeznek, oxidatív foszforilációra és CO_2-fixációra képesek. A hexózok oxidációjának különböző alternatív útjait valósítják meg. Ez az enzimgazdagság számukra táplálkozási függetlenséget biztosít. Lehetővé teszi, hogy toxikus végtermékeiktől megszabadulhassanak, továbbá, hogy a szubsztrátok energiáját sokkal hatékonyabban használhassák ki. Az *E. coli* például mint fakultatív aerob szervezet, a glükóz degradálásakor az EMBDEN–MEYERHOF- és a pentóz-foszfát-utak alternatíváival élhet. A $NADPH_2$ az élő baktériumok többségében minden valószínűség szerint, elsősorban is csak a szintetikus reakciókhoz használódik el. Erről a hidrogén és az elektronok a flavoproteineken és citokrómokon át, az oxidatív foszforiláció energianyerő útjaira nem kerülnek. Amennyiben a glükóz a pentóz-foszfát-úton át oxidálódik, úgy ennek során kevesebb nagy energiájú foszfátkötés, viszont jelentős mérvű redukálóképesség jön létre. Az EMBDEN–MEYERHOF-út ezzel szemben több energiát, de kevés vagy nulla redukálóképességet eredményez. A két út között általában egyensúly alakul ki, melynek aránya normális körülmények között 2:1 az EMBDEN–MEYERHOF-út javára. Ezen egyensúly ellenőrzésében feltehetően a fruktóz-6-P-ot foszforiláló enzim játssza a fő szerepet. Amennyiben energiatúltermelés következne be (amit az ATP-nek az ADP-hez és az anorganikus foszfát mennyiségéhez viszonyított aránya jelez), úgy a fruktóz-6-P foszforilációja korlátozódik és a szén a pentóz-foszfát-útra

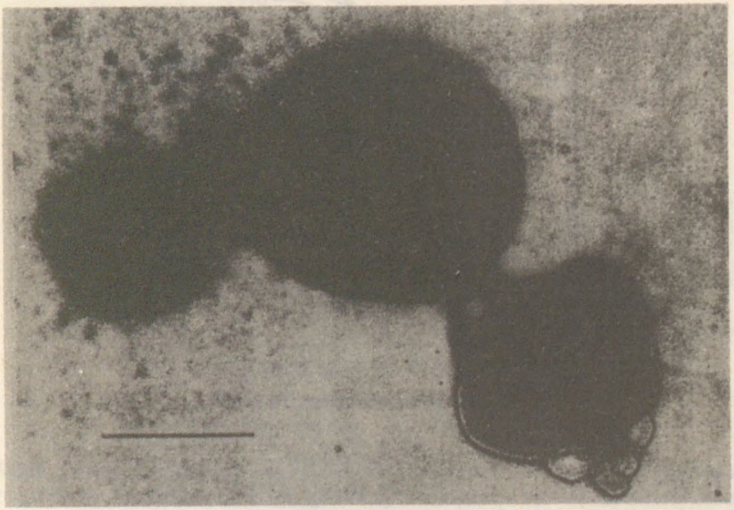
áramlik. Azt a jelenséget, hogy aerob körülmények között az EMBDEN–MEYERHOF-út aktivitása visszaszorul, PASTEUR-effektusnak nevezik. Ez a jelenség különben a glükózhasznosítás intenzitásának csökkenésével és e szénforrásnak a bioszintézisek céljaira megnövekedett hatékonyságú felhasználásával jellemezhető.

1.32. Thermoplasma acidophilum

Az előzőekben láthattuk, hogy a prokarioták túlnyomó többségénél az aerob anyagcsere milyen útvonalakon bontakozott ki. Léteznek azonban olyan mikrobák is, melyek az anaerobiózisból a többségétől független, sajátos ösvényeken, különleges „egyéni" utakon érkeztek el a mai, náluk is aerobnak vagy fakultatív anaerobnak megjelölhető anyagcseréjükhöz. Ezeknek egy tipikus példáját mutatjuk be.

1.32.1. A csodaszervezet

Ez a mérsékelten termofil, de nem hévízi mikroba, melyet először „csodaszervezet"-nek neveztek el, a modern bioszférában sok szempontból különös, „ásatag", ősi baktériumnak tűnik, mely abból az időből maradt vissza, amikor az archaikus baktériumoknak még sejtfala sem volt. Ha ez a vélekedés nem is teljesen helytálló, minthogy a *Thermoplasma* a

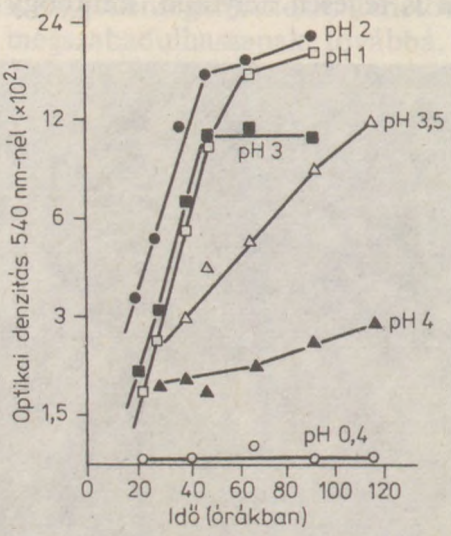


142. ábra

Fal nélküli, szférikus *Thermoplasma*-sejtek. Negatív festés. A vonás 1 μm-t jelöl. (BROCK, 1978)

maga milliárd éveket kitevő egyedülálló evolúciós útján már az oxigénhez mint terminális elektronakceptor felhasználásához is alkalmazkodott, mégis ősiségéhez nem férhet kétség és itt e szervezet behatóbb szemügyre vétele mindenképpen hasznos kitérésnek ígérkezik az élet eredetére vonatkozó ismereteink tárgyalása közepette. Izolátumai pleomorf gömböcskék alakjában szaporodnak, melyek hasadással osztódnak. Fiatal tenyészetekben ezek a gömbök fonalakká nyúlhatnak. A kokkoidális alakok *(142. ábra)* átmérője 0,3–2 μm. Egyszerű prokariota struktúrájuk van. A nukleáris anyag a sejtben diszpergálva fordul elő. Belső, membránfelépítésű sejtszervecskék hiányoznak. A sejteknek nincs fala, azokat csupán membrán veszi körül. Nátrium-lauril-szulfát jelenlétében gyorsan lizálnak. Ezzel szemben a sejtfalszintézist gátló vankomicin iránt még 5 mg/ml koncentrációban sem érzékenyek. A novobiocin, mely a mikoplazmákat gátolja, hatásos inhibitora a *Thermoplasmá*nak is. A cikloheximid iránt, mely az eukarioták specifikus inhibitora, nem érzékeny. Szaporodásának optimális hőmérséklete 59 °C körül van, amikor is megkettőződési (generációs) ideje 4 óra. 65 °C-on és 37 °C-on szaporodása nem tapasztalható.

A közeg pH-jának a 122-1B2 számjelzésű izolátumra gyakorolt hatását a *143. ábra* mutatja be (DARLAND és munkatársai, 1970). pH 0,35-nél nincs szaporodás, míg pH 4,0-nél csak nagyon lassú. Ezzel szemben jó szaporulat figyelhető meg pH 0,96 és 3,0 között. Az optimum pH 1 és



143. ábra

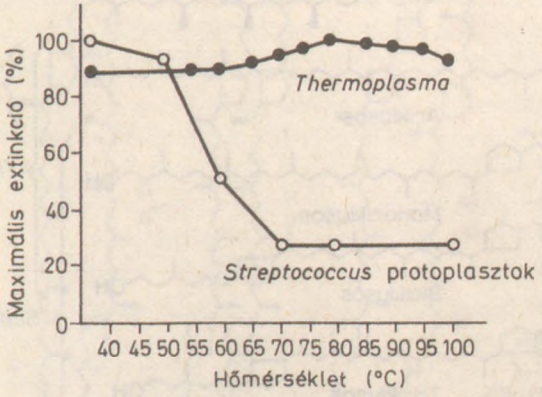
A pH hatása a 122-1B2 jelzésű *Thermoplasma*-izolátumra. A tenyésztés 55 °C-on, standard közegben történt. A szaporodás mértékét az optikai denzitás (540 nm-nél) alapján határozták meg (DARLAND és munkatársai, 1970)

pH 2 között van. A *143. ábrán* bemutatott kísérlet ideje alatt a tenyészközeg pH-ja nem változott. A *Thermoplasma* guanin- + citozintartalma: 46%. Amikor a tenyészetek maximális denzitásukat elérik, a sejtek gyorsan lizálódnak és a maximum után már egy nappal csupán 0,1%-uk marad életben, míg a második nap után az életképes sejtek frakciója mindössze 10^{-8}-ig csökken.

A *Thermoplasma* genommérete 10^9 dalton (4×10^3 kbp, DOOLITTLE, 1985). Ezen érték bizonyos ingadozásával kell azonban számolnunk, mivel $8{,}4 \times 10^8$-t is mértek. Ez utóbbi adat viszont azt mutatja, hogy a *Thermoplasma*-DNS genom-mérete a legkisebb az eddig tanulmányozott, nem parazita szervezetekéi között!

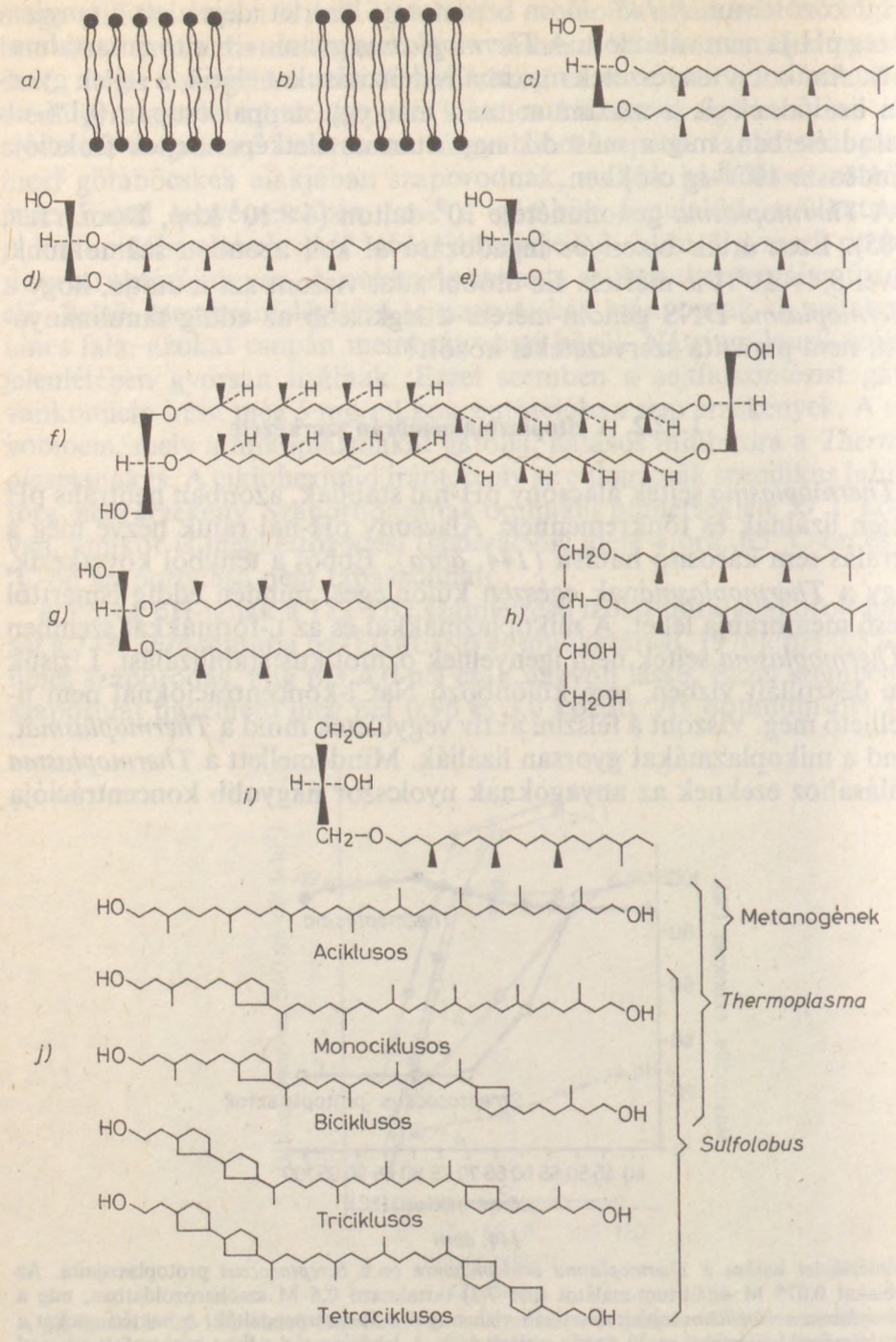
1.32.2. A citoplazmamembrán szerkezete

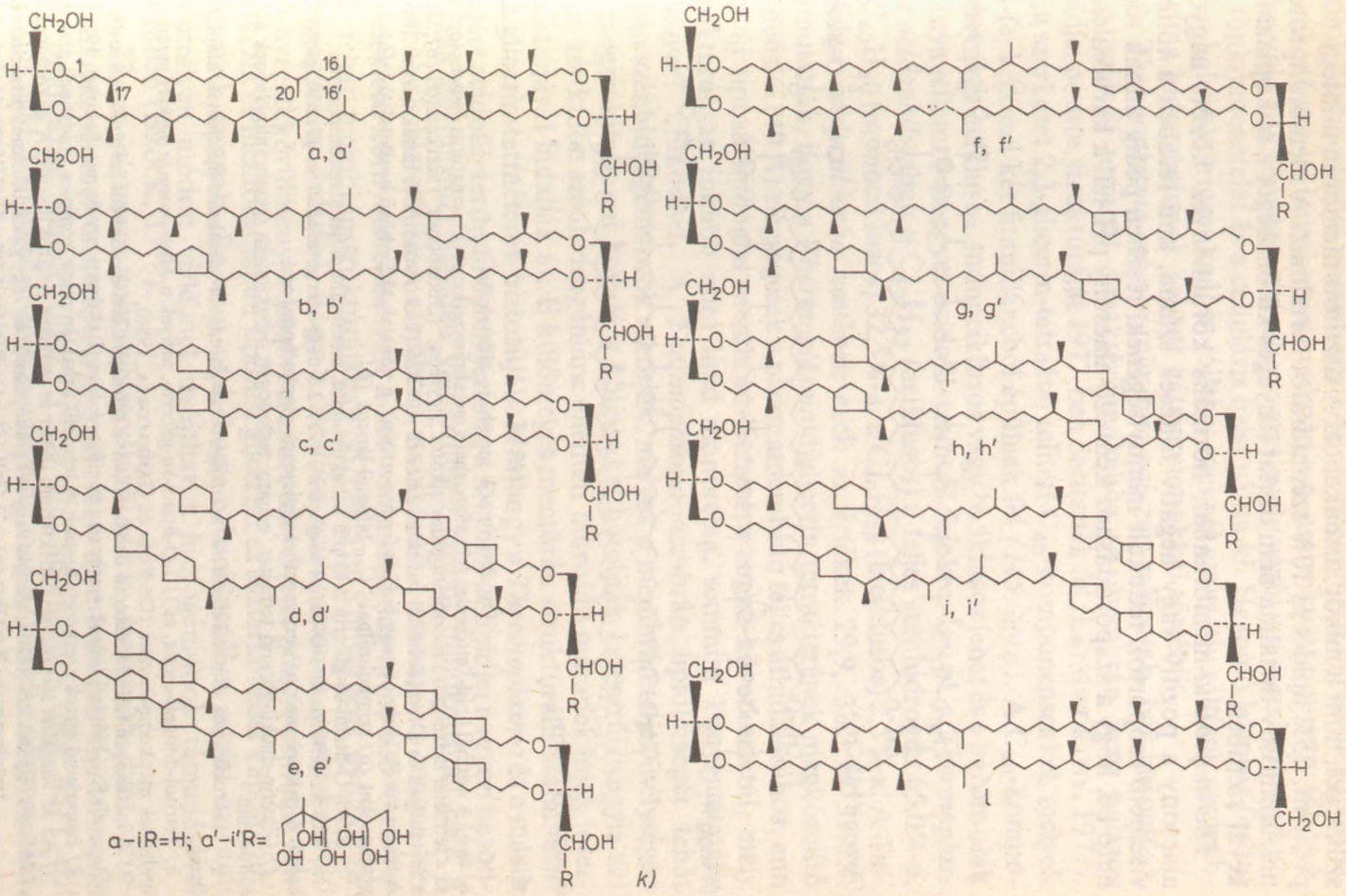
A *Thermoplasma* sejtek alacsony pH-nál stabilak, azonban neutrális pH esetén lizálnak és tönkremennek. Alacsony pH-nál rájuk nézve még a forralás sem károsító hatású *(144. ábra)*. Ebből a tényből következik, hogy a *Thermoplasmá*nak egészen különleges, minden eddig ismerttől eltérő membránja lehet. A mikoplazmákkal és az L-formákkal szemben a *Thermoplasma* sejtek nem igényelnek ozmotikus stabilizálást. Lízisük sem desztillált vízben, sem különböző NaCl-koncentrációknál nem figyelhető meg. Viszont a felszíni aktív vegyületek mind a *Thermoplasmát*, mind a mikoplazmákat gyorsan lizálják. Mindemellett a *Thermoplasma* lizálásához ezeknek az anyagoknak nyolcszor nagyobb koncentrációja



144. ábra

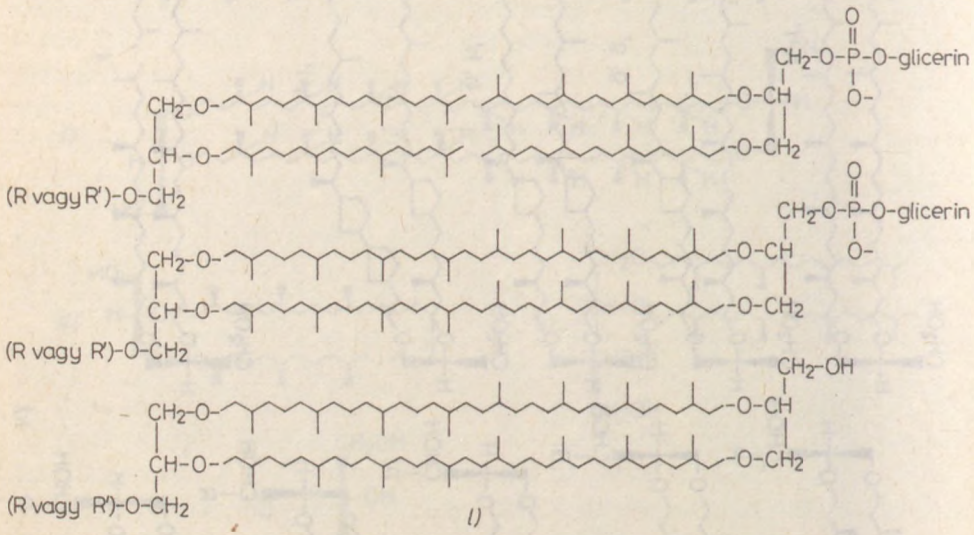
A hőmérséklet hatása a *Thermoplasma acidophilum*ra és a *Streptococcus* protoplasztjaira. Az utóbbiakat 0,075 M dinátrium-malátot (pH 7,3) tartalmazó 0,6 M szacharózoldatban, míg a *Thermoplasma acidophilum* sejtjeit desztillált vízben (pH 5,5) szuszpendálták. A baktériumokat a jelzett hőmérsékleti értékeken 30 percig melegítették. A lehűtés után a lízist spektrofotométerrel mérték (BELLY és BROCK, 1972)


a)
b)
c)
d)
e)
f)
g)
h)
i)
j)
Aciklusos
Monociklusos
Biciklusos
Triciklusos
Tetraciklusos
Metanogének
Thermoplasma
Sulfolobus


CH2OH
H
O
1
16
17
20
16'
a, a'
CHOH
R
b, b'
c, c'
d, d'
e, e'
a–iR=H; a'–i'R=
OH
f, f'
g, g'
h, h'
i, i'
l
k)

szükséges, mint a mikoplazmákéhoz. A tisztított membrán mintegy 60% proteint, 25% lipidet és 10% szénhidrátot tartalmaz. A membránproteinek aminosav-tartalma nem mutat lényeges különbséget a mikoplazmákéval szemben.

Thermoplasma-membránban normális körülmények között nagyon alacsony a pozitív vagy negatív töltések száma, ami részben a töltést viselhető csoportok redukált mennyiségének, részben pedig annak tudható be, hogy a szaporodáshoz kedvező alacsony pH-nál a karboxilcso-



l)

◄ *145. ábra*

Ősbaktériumok membrán-alkatelemei

a) és *b)* A normál lipid-kettősréteggel jellemezhető membránszerkezet (a) sematikus összehasonlítása a tetraéter származású membránlipidek alkotta „egyréteg" („monolayer") szerkezettel *(b)*, mely a metanogén és a termoacidofil ősbaktériumokra jellemző (LANGWORTHY és munkatársai, 1982). A fekete körök glicerint vagy poláris fejcsoportokat; a vonalak különböző hosszúságú szénhidrogénláncokat *(a)* szimbolizálnak; C_{40}-bifitanil-láncok *(b)*.

c) 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerin a halofil ősbaktériumok membránlipidjei alapkomponense.

d) 2-O-szterterterpanil-3-O-fitanil-sn-glicerin, és *e)* 2,3-di-O-szterterterpanil-sn-glicerin, melyek a halofil ősbaktériumok néhány membránlipidjének alapkomponensei.

f) Glicerin-dialkil-glicerin tetraéter, néhány metanogén ősbaktérium membránlipidjeinek alapépítőeleme.

g) Makrociklusos difitanil-diéter, a *Methanococcus jannaschii* membrán lipidjeinek alapépítő eleme.

h) Tetritol-difitanil-diéter, és *i)* 3-O-fitanil-sn-glicerin, melyek a *Methanosaria barkeri* membrán lipidjeinek alapkomponensei. (DE ROSA és GAMBACORTA, 1986).

j) A metanogén és termoacidofil ősbaktériumok tetraétereiben diolokként szereplő aciklusos és ciklopentil C_{40}-bifitanil láncok szerkezete és előfordulása (LANGWORTHY és munkatársai, 1982).

k) Izoprenoid éterek szerkezeti típusai. A termofil ősbaktériumok komplex lipidjeinek gerince.

l) Az *M. hungatei* metanogén ősbaktérium diéter és tetraéter poláros lipidjei. A glikolipidek és a foszfoglikolipidek keverékek, melyek vagy két glükopiranóz és/vagy galaktofuranóz diszacharidot tartalmaznak. R = Glcp (α1→2) Galf (β1→1); R' = Galf (β1→6) Galf (β1–1)

portok disszociációja visszaszorul. Az emelkedő pH a karboxilcsoportok növekedő mérvű ionizációját eredményezi, ami viszont a negatív töltések fokozódó kölcsönös taszításához vezet, mely végül is a membránstruktúra tönkremenetelét és a celluláris lízist váltja ki. Hasonló jelenség fordul elő a halobaktériumoknál is, jóllehet ezeknél a negatív töltések neutralizációja hidrogénionok helyett nátriumionokkal történik.

A *Thermoplasma* membránlipidjei egészen sajátosak, bár hasonlóak más acidofil–termofil ősbaktériumokéhoz. A membrán nem poláros lipidjei pontos struktúráját 1977-ben derítették fel (LANGWORTHY, 1977). Ez a szerkezet 2,3-glicerin-tetraéter telített C_{40}-komponensekkel, melyek fej-fej kötéssel két fitanillláncból épülnek fel *(145. ábra)*. A C_{40}-komponens maga aciklusos, monociklusos vagy biciklusos lehet és e három alak aránya jellemző az egyes acidofil–termofil fajokra. Így pl. a *Thermoplasma acidophilum*ban a $C_{40}H_{82}$ (aciklusos) a teljes szénhidrogén 65,0%-a, a $C_{40}H_{80}$ (monociklusos) 32,5%-a, a $C_{40}H_{78}$ (biciklusos) 2,5%-a. A *Sulfolobus acidocaldarius* esetében ezek az értékek 29,9, 32,3 és 37,8%. Kimutatták, hogy a *Thermoplasma* diglicerin-tetraéterének megközelítő dimenziói (40 Å) elégségesek a plazmamembrán teljes áthidalásához, ami egy új típusú biológiai membrán létezésére enged következtetni, mely strukturálisan inkább mint lipid monoréteg, semmint konvencionális *„bilayer"* működhet. A *Thermoplasma*-membrán lipidtérségét tehát olyan szénhidrogénláncok alkotják, melyek a membrán teljes mélységén át megszakítatlanul kovalens kötésekkel hatolnak keresztül, vagyis azt nem két külön szénhidrogénlánc ellentett hidrofób maradékainak interkalációjával hidalják át. E különleges membrán strukturális stabilitását a diglicerin-tetraéterek biztosítják. Minthogy a *Thermoplasma* és a másik ismert acidofil–termofil ősbaktérium, a *Sulfolobus* lipidjei nagyon hasonlítanak egymáshoz, minden valószínűség szerint mindkettőnél ezek a struktúrák biztosítják a membrán stabilitását a savanyú és magas hőmérsékletű környezetekben. Ez a két – rokonságilag távol álló – szervezet tehát membránstruktúrájában jó példa a konvergens evolúcióra. Megjegyzésre érdemes, hogy a *Bacillus acidocaldarius*, mely hasonló környezeti körülmények között szaporodik, GRAM-pozitív sejtfallal rendelkezik és membránjában tipikus, glicerinhez észterkötéssel kapcsolódó zsírsavak vannak. Ez arra utal, hogy e bacillusnál a sejtfal az, ami valamilyen módon védelmet nyújthat a hidrogénionok támadásával szemben (BROCK, 1978).

A *Thermoplasma* membránja rendkívül merev, merevebb, mint a *Halobacterium*é, melyet azelőtt a legmerevebb membránnak minősítettek. Két lipid fázisátmenetét (*lásd* 1.13.30. alf.) állapították meg: 45 °C-nál és 60 °C-nál. Feltehetően ezek határozzák meg e szervezet szaporodásának hőmérsékleti határértékeit.

A *Thermoplasma* intracelluláris pH-értéke pH 6,5 körül van (HSUNG és HAUG, 1975). Ez a neutrálishoz közelálló érték annak tulajdonítható, hogy a plazmamembrán a hidrogénionok számára impermeábilis lehet. A *145. ábra* az ősbaktériumok membránalkatelemeinek változatosságáról általános áttekintést nyújt.

1.32.3. Intracelluláris ionkoncentráció

Minthogy a *Thermoplasma* nagyon hígított tenyészközegben is szaporodik, ezért celluláris stabilitása fenntartása céljából, az ozmotikus egyensúly elérésére, az anorganikus ionok koncentrációját alacsony szinten kell tartania, ami miatt sejtjeiben közelebbről még nem ismert, ozmotikusan aktív anyagokat (enzimet, aminosavakat stb.) tartalmazhat. Tekintettel arra, hogy a sejtekben a kálium a legközönségesebb ellenion, ezért különböző ozmolaritásoknál sejtjei káliumkoncentrációját mérték (SEARCY, 1976). A leghígabb oldatban szaporodva (kb. 50 mM Osm) az intracelluláris káliumion-koncentráció csupán 17 mM volt, ami egyúttal a legkisebb intracelluláris koncentráció, amit erre az ionra vonatkozóan eddig közöltek. Az *E. coli*nál és sok más baktériumnál a káliumion-koncentráció 100–600 mM. Amint a közeg ozmolaritását szacharózzal vagy szorbittal növelték, úgy nőtt a káliumion intracelluláris koncentrációja is egészen 150 mM értékig. Mivel nátriumion a tenyészközegben nem volt jelen, az egyetlen fő kation, mely még szerepet játszhatott a magnéziumion volt, és ezt kb. 30 mM mennyiségben észlelték is (ennek többsége azonban a sejtalkotó-elemekhez kötődve lehetett jelen). A *Thermoplasmá*ban ennek az alacsony intracelluláris ionkoncentrációnak kapcsolata lehet egy, a DNS-sel társuló hisztonszerű fehérjével. Feltehetően ez a protein, mely normális körülmények között a sejtnukleinsavon a negatív töltések neutralizációjában vehet részt, az ozmotikusan aktív kationok egy részét helyettesíti.

1.32.4. Rokonság, eredet, előfordulás

Ma már nyilvánvaló, hogy a *Thermoplasma* egyedülálló különlegességű szervezet és nem tekinthető valamely pálcika alakú baktérium L-formájának. Finom struktúrája és telepmorfológiája bizonyos hasonlóságra enged következtetni a mikoplazmacsoport tagjaival, de membránja és lipidjeinek biokémiája ez utóbbiakétól, melyek nem ősbaktériumok, lényegesen eltérő. Az egyetlen ismert mikroorganizmus, melyet rokonságba hoztak vele, a *Bacillus acidocaldarius,* mely azonos hőmérsékleti

és pH-körletben szaporodik. A *B. acidocaldarius* lipidjei azonban normál zsírsavészterek (unit membránnal rendelkezik), és nehéz volna elképzelni, hogy a *Thermoplasma* egyidejűleg vesztette el sejtfalát és szerezte meg izoprenoid-éter lipidjeit. A *B. acidocaldarius* klasszikus baktérium.

A *Thermoplasma* eredetét kutatva természeti előfordulásával is foglalkoznunk kell. Amilyen különös és titokzatos ennek a szervezetnek a viselkedése, olyan nehezen érthető meg előfordulása is. Az eddigiek szerint csak az ember által létrehozott és a szénbányák körül található önmelegedő, füstölgő, gőzölgő, savanyú szénhulladékhalmokban fordul elő! Sehol máshol! Honnan kerül ide ez a szervezet? Vajon az ember megjelenése előtt is létezett ilyen biotóp a Földön? Lehetséges, hiszen széntelepeket a hegyképző erők gyakran emelnek magasba és exponálnak az atmoszféra felé. Ilyenekben jöhetett létre a *Thermoplasma?* Nem tudjuk. És mi lesz, ha egykoron majd a szénbányák megszűnnek? Menynyire korlátozza ez majd e faj elterjedését?

A *Thermoplasma* a DARLAND-féle alap sóközegen pH 2,0-nél 1 225 μg/ml vankomicin jelenlétében tenyészthető ki. Ennek a tápközegnek azonban más baktériumokra L-forma indukáló hatása van, melyek így, ilyen alakban ugyancsak kinőhetnek. Egy másik, vízmintákra alkalmazott eljárásnál a vizet először 0,45 μm-es membránszűrőn, majd a szűrletet újabb 0,22 μm-es szűrőn engedik át. A tápközeget az így kapott szűrlettel oltják, 4–6 hétig 55 °C-on inkubálnak és a *Thermoplasma* jelenlétét a látható zavarosodás, ill. mikroszkópos vizsgálat alapján derítik fel. A tisztítás a folyékony tenyészet hígításával történik, mivel az agar felületén reprodukálható telepképződés nem érhető el. Az izolátumok élesztőkivonat nélkül nem szaporodnak. Ha ennek mennyiségét 0,025%-ra csökkentjük, úgy cukrok adagolásával serkentés érhető el. A tenyészetekben c-típusú citokróm jelenlétét észlelték, de a- és b-típusúét nem. A *Thermoplasmá*ban naftokinont is kimutattak, ami arra enged következtetni, hogy teljes légzési lánca van (LANGWORTHY és munkatársa, 1982). A *Thermoplasma* fakultatív anaerob, ha 1% glükózzal és 0,1% élesztőkivonattal szaporodik (SMITH és munkatársai, 1973). Nitrogénatmoszférában is nő, de levegőn jobban, sőt a fokozott aeráció stimulálja. Mind a *Thermoplasma,* mind a *Sulfolobus,* mind a *Halobacterium* – ezek az ősi típusú szervezetek – jelentős egymás közötti hasonlóságot mutatnak 16 S riboszómális RNS-ük struktúráját illetően. E tekintetben közel állnak a metanogén baktériumokhoz és valamennyien az archaikus baktériumok képviselői. Vajon a *Thermoplasmá*nak, ennek az ősi szervezetnek hol lehet az igazi előfordulási helye a modern bioszférában?

38. táblázat

Néhány fontosabb kemolitotróf mikroorganizmus összehasonlítása

Név	Faj (ill. genusz)-leírás
Nitrobacter winogradskyi	GRAM-negatív, rövid pálcikák. Ha mozognak, úgy egyetlen szubterminális flagellummal. A sejtek nyálkás mátrixba vannak ágyazva. E faj bimbózással szaporodik. Spórája, nyugvó állapota nincs. Citokrómokban gazdag, ezért sejtjei sárgák. Más pigmentje nincs. Egyes törzsei obligát kemolitotrófok: ezek nitritet nitráttá oxidálnak és szén-dioxidot fixálnak. Szerves növekedési faktorokat nem igényel. Egyes törzsek heterotróf módon növekednek, de ezek szaporodási sebessége nagyon lassú. Szigorúan aerob, terminális elektronakceptora a légköri oxigén. Növekedési pH-körzete: 6,5–8,5; 5–40 °C hőmérsékleti értékeken szaporodik, de az optimum 25–30 °C között van. Glikogént, poli-β-hidroxibutirátot és polifoszfátokat tárol. Talajokban gyakori.
Nitrosomonas europaea	GRAM-negatív, rövid pálcikák. E faj sejtjeinek ún. citomembránja van, mely a citoplazma perifériális régióiban lapos hólyagocskák alakjában fordul elő. A sejtek nyálkás mátrixba lehetnek beágyazva. Sejtjei gazdagok citokrómokban, emiatt szuszpenziójuk sárgás vagy vöröses. Más pigment nincs. Obligát kemolitotróf. Az ammóniát és a hidroxil-amint nitritté oxidálja. Szén-dioxidot fixál. Szerves növekedési faktort nem igényel. Ammónia jelenlétében növekedik, de hidroxil-aminnal nem. Szigorúan aerob. A légköri oxigén a terminális elektronakceptora. Az ammóniát redukált oxigéntenziónál is oxidálja. A növekedés optimumai: 25–30 °C, pH: 7,5–8,0. Polifoszfátokat tárol. Talajokban elterjedt.
Thiobacillus thiooxidans	GRAM-negatív, rövid pálcikák. Kitartó állapota (spóra stb.) nem ismert. Szigorúan aerob. Ammóniumsókat hasznosít nitrogénforrásként. Szigorúan kemolitotróf, autotróf. Az elemi kén energiaszükségletének fedezésére gyorsan oxidálja. Más, részben redukált kénvegyületeket is hasznosít. Szén-dioxidot fixál. Szaporodásának optimális hőmérséklete 28–30 °C között van, míg 10 °C és a 37 °C a két szélső érték. pH-optimum: 2,0–3,5. A pH-érték felső határa 6,0, alsó határa pH 0,5. Savanyú bányavizekben gyakori.
Pseudomonas (Hydrogenomonas) facilis	Polárisan flagellált, GRAM-negatív pálcika. Kemoorganotróf és fakultatív kemolitotróf. Autotróf növekedésének energiaigényét a molekuláris hidrogén oxidációjából nyeri. Szerves növekedési faktorokat nem igényel. Autotróf módon nő hidrogén-, szén-dioxid- és oxigéntartalmú atmoszférában. Szigorúan aerob, a légköri oxigén a terminális elektronakceptor. Heterotróf növekedéséhez legalább 36 különböző szénforrást hasznosít. Optimális hőmérséklet: 28 °C. Sohasem fermentatív. A légköri nitrogént nem köti meg. Talajban él.
Paracoccus denitrificans	GRAM-negatív kokkus. Mozdulatlan. Spórát nem képez. Kemoorganotróf és fakultatív kemolitotróf. Autotróf életmódjának energiaszükségletét a molekuláris hidrogén oxidálásával fedezi. Elektronakceptorként mind a molekuláris oxigént, mind a nitrátokat felhasználja. Utóbbiakat anaerob körülmények között molekuláris nitrogénné redukálja. Szerves növekedési faktorokat sem aerob, sem anaerob szaporodásához nem igényel. Anorganikus közegben hidrogén-, oxigén- és szén-dioxid-tartalmú atmoszférában autotróf módon szaporodik. Ugyanilyen közegben anaerob körülmények között $H_2 + CO_2$ atmoszférában már élesztőkivonatot is igényel. Legalább 64 különböző szerves vegyületet hasznosít egyedüli szénforrásként. Mind ammóniumsókat, mind nitrátokat hasznosít nitrogénforrásként. Aerob, kivéve, ha szerves anyagokat és nitrátokat tartalmazó közegben szaporodik. A talajban él, ahonnan mint „hidrogénbaktérium"-ot izolálták.

38. táblázat folytatása

Név	Faj (ill. genusz)-leírás
Desulfovibrio	GRAM-negatív, görbült pálcikák. Polárisan flagelláltak. Endospórát nem képeznek. Kemoorganotrófok, energiát anaerob légzéssel nyernek, miközben szulfátokat vagy más redukálható kénvegyületeket kén-hidrogénné redukálnak. A laktátot, piruvátot és malátot acetáttá és szén-dioxiddá oxidálják. Szénhidrátokat ritkán hasznosítanak. A sejtek citokróm c_3-at és deszulfoviridint tartalmaznak. Az utóbbinak köszönhető a sejtek jellegzetes vörös fluoreszcenciája. Ezt 365 nm fényben figyelhetjük meg, ha a sejttömeghez néhány csepp 2,0 N NaOH-t adunk. Ez a reakció a pigment kromoforját szabaddá teszi. Szigorúan anaerobok. Sejtjeikben hidrogenáz általában jelen van. A molekuláris hidrogént szulfátokkal vízzé oxidálják, miközben energiát nyernek, de e folyamatot csak anyagcseréjük energiaigényének részleges kiegészítésére képesek felhasználni. A *Bergey's Manual* 1975-ös kiadása ezt meg sem említi.
Methanosarcina	Nagy, GRAM-pozitív, gömbölyű sejtek. Mozdulatlanok. Acetátból és bizonyos esetekben metanolból, szén-monoxidból és butirátból metánt állítanak elő, eközben ATP-t szintetizálnak. Szigorúan anaerobok. A *M. barkeri* a szén-dioxidot a molekuláris hidrogénnel metánná redukálja. A metanol és az acetát metilcsoportját viszont anélkül redukálja metánná, hogy köztilépésben szén-dioxid jönne létre. Szaporodnak olyan közegben, melyben metanol vagy acetát az egyedüli szerves anyag, ammónia a nitrogénforrás és szulfid a kénforrás. Iszapokban és anaerob szennyvízderítőkben fordulnak elő.
Gallionella	A sejtek vese alakúak vagy lekerekítettek, hosszú fonalszerű „nyél" végén helyezkednek el. A sejt tengelye a nyél tengelyét keresztezi. A „nyél" lazán összefonódott finom fonalak kötegéből áll, melyeket vas-hidroxid borít (*373. ábra*). A finom fonalak vagy fibrillumok elágazhatnak. A szaporodás sejtosztódással történik. A leánysejtek egy ideig a fonal végén maradnak, később mint rajzó sejtek válnak szabaddá. Utóbbiak 1–2 poláris flagellummal mozognak. GRAM-negatívak. Feltehetően kemolitotrófok, minthogy a ferroinokat ferrivé oxidálják, mialatt kísérleti viszonyok között $^{14}CO_2$-t fixálnak. Anorganikus tápközegekben szaporodnak. Oligotróf vizekben élnek. A sejttömeg szárazsúlyának 90%-át vas-hidroxid teszi ki. Mikroaerofilek, pH-optimumuk pH 6–7. Szaporodásukkal a vízművekben zavarokat idéznek elő. A fonal végén ülő lehorgonyzott sejt a vízmozgás következtében (folyókban, vízvezetékekben, csatornákban) újabb és újabb tápanyagokhoz és ferroionokhoz jut. A rajzó sejtek új területeket hódíthatnak meg.

1.33. Aerob kemolitotróf baktériumok

Az aerob légkör kialakulása az energiaszerzés és az autotróf életmód új mechanizmusainak evolúcióját kezdeményezte. Az aerob miliők természetes méregtelenítési folyamatait ma többek között azok a kemolito-autotróf szervezetek valósítják meg, melyek az anaerob és aerob életterek határain élve, az anaerobok redukált, szervetlen, mérgező anyagcsere-végtermékeit (kén-hidrogén, ammónia stb.) molekuláris oxigénnel oxidálják (szulfátokká, nitrátokká stb.) és ennek a kémiai oxidációs energiának a segítségével nagy energiájú foszfátkötéseket szintetizálnak.

Az így szerzett ATP-vel, fordított elektrontranszport útján, redukálóképességet állítanak elő és a CALVIN-ciklus keretében autotróf életmódjukhoz szén-dioxidot fixálnak. Ezek a kemolito-autotrófok ma már számtalan változatra, fajra és genuszra differenciáltak *(38. táblázat)*. Egyesek közülük a kén-, mások a nitrogén- vagy a vaskörforgalomban játszanak fontos szerepet (*lásd* a 14. táblázatot is).

1.33.1. A kemolitotróf életmód változatai

A *Nitrosomonas* és a *Nitrobacter* fajok az ammóniának nitráttá oxidálásával szereznek energiát (*lásd* 4.19. alf.). A redukált kénvegyületek szulfáttá oxidálásában a *Thiobacillus*ok a legfőbb biológiai hatótényezők (*lásd* 5.10. alfejezetet). Számos baktérium hidrogéngázt oxidál. Ilyenek az ún. durranógáz-baktériumok is. Nagyrészt mixotrófok, minthogy a hidrogénnek vízzé oxidálásával szerzett energiával szén-dioxidot autotróf módon fixálnak, ugyanakkor szerves anyagokon is növekednek. A durranógáz-baktériumok között a fakultatív anaerob *Paracoccus denitrificans* a hidrogénről az elektronokat nem csupán oxigénre, hanem nitrátra is képes átvinni, miközben molekuláris nitrogén jön létre. Ez is fakultatív autotróf, mivel nemcsak CALVIN-ciklust üzemeltet, hanem szerves anyagokat is asszimilál. A ferrovas oxidálásával is lehetőség van energianyerésre és autotróf életmódra (*lásd* 6.7. alf.). Közismert ilyen kemolito-autotróf mikroba a *Thiobacillus ferrooxidans* (*lásd* 6.12.2. alf.). Egyes *Pseudomonas*ok a szén-monoxidot oxigénnel oxidálják. A *Pseudomonas oxalaticus* pedig ugyancsak kemolitotróf autotróf, mivel a hangyasavat oxigénnel szén-dioxiddá és vízzé oxidálja, és ezt a szén-dioxidot autotróf módon hasznosítja. Autotrófiára sem mind képes, így elsősorban is azok nem, melyeknél hiányzik vagy sérült a funkcióképes CALVIN-ciklus. Általában nagyon sajátos környezeti igényekkel rendelkeznek. Így pl. az oxigén + kénhidrogén vagy ammónia, ill. ammóniumionok egyidejű jelenlétét, mégpedig meghatározott koncentrációban igénylik. Az irodalomban obligát és fakultatív kemolitotróf autotrófok is szerepelnek, míg egyes fajokat kifejezetten mint mixotrófokat jelölnek meg.

1.33.2. Az obligát kemolitotrófia problémái

Ami az obligát kemolitotrófokat illeti, rájuk nézve a szó valódi értelmében ez a megjelölés kétségbe vonható, minthogy RITTENBERG (1972) szerint nem valószínű, hogy ezek szénanyagcseréje kizárólag csak szén-dioxidra alapulna, ugyanis szénvegyületeket más forrásokból is haszno-

sítanak. Ezeknél az „obligát autotróf" megnevezés inkább arra utal, hogy elsősorban is litotróf energiaforrásra szorulnak. Mindemellett tény, hogy számos fajuknál a szén-dioxidot mint szénforrást semmiféle szerves vegyülettel vagy ezek keverékével nem helyettesíthetjük. MATIN (1978) az ilyen szervezeteket obligát kemolito-autotrófnak vagy röviden obligát kemolitotrófoknak jelöli meg.

Az az obligát kemolitotrófokra vonatkozóan hosszú időn át terjesztett hiedelem, miszerint számukra a szerves anyagok toxikusak és ezek jelenlétében szaporodásképtelenek, nem felel meg a valóságnak. Legfeljebb azt mondhatjuk, hogy számos olyan szerves vegyületet ismerünk, melyek növekedésüket már 10^{-4}–10^{-3}M koncentrációban is gátolják. Ezek között vannak cukrok, szerves savak és aminosavak. Az érzékenység mértéke faj-, ill. törzsspecifikus. mM-ban kifejezve pl. a *Thiobacillus ferrooxidans* érzékeny a piruváttal (2–10), acetáttal (10), szukcináttal (2–10), fumaráttal (10), maláttal (10), oxálacetáttal (10), formiáttal (10), propionáttal (10), butiráttal (10), valeráttal (10) és a hexanoáttal (10) szemben. A *Thiobacillus denitrificans*nál ezek az értékek így alakulnak: laktát (10–50), acetát (10–25), citrát (10–50), α-ketoglutarát (1), oxálacetát (20), formiát (5–25) stb. (MATIN, 1978). A gátlás mechanizmusáról még keveset tudunk. Úgy tűnik pl., hogy az aminosavak kiváltotta gátló hatás ugyanazon mechanizmus szerint nyilvánul meg, mint a heterotrófok esetében: a lényeg az aminosav-egyensúly felborulása. Ezt az is bizonyítja, hogy egyes aminosavak toxicitását más aminosavakkal ki lehetett védeni. A piruvát, bár nem minden obligát kemolitotrófra toxikus, az acidofil *Thiobacillus*okra kétségtelenül igen. 10^{-3}M piruvát a *T. thiooxidans*nál a kén oxidációját és a CO_2-fixációt pH 2,5-nél vagy ez alatt teljesen meggátolja, pH 7,0-nél azonban nem. A piruvát alacsony pH-értékeknél ugyanis behatolhat a sejtbe, ahol savhatása szabadon érvényesülhet. Az acidofil *T. thiooxidans* citoplazmájának kémhatása közel neutrális. A piruvát mint sav rá nagyon toxikusan hat.

Az obligát autotrófok képtelenek szerves szénforrásokon növekedni, ill. szignifikáns mennyiségű szerves eredetű szenet beépíteni. Ezt a jelenséget néhány obligát autotróf *Thiobacillus* esetében behatóan tanulmányozták. Kiderült, hogy sejtjeikben működésképes citromsav-ciklus nincs jelen, mivel az α-ketoglutarát-dehidrogenáz enzimük elveszett. A ciklus többi enzimei az aminosavak szintéziséhez szükséges szénváz ellátásának megfelelő szintetikus kapacitást még biztosíthatnák, azonban az oxidatív kapacitás elveszett. Acetát úgy többé már nem léphet be a ciklusba, hogy mint normális körülmények között 2 molekula szén-dioxiddá bomoljon, miközben redukált NAD jön létre. Az oxidatív kapacitásnak ez az elvesztése a redukált NAD visszaoxidálásának hiányával társul. Feltételezik, hogy mivel a szén-dioxid fixációjához NADH

szükséges, ezt viszont e szervezeteknél ATP-dependens redukcióval lehet szintetizálni, nem lenne előnyös a NADH-t ATP előállítására elpazarolni. A NADH-t ezért védeni kell a citokróm-rendszeren át végbemenő oxidációtól, és ez az oka annak, hogy hiányoznak a NADH-oxidáz enzimek. Ennek az okoskodásnak ellene szól, hogy nem minden obligát autotrófból hiányzik a NADH-oxidáz. Valószínű, hogy ezekben a szervezetekben az oxidázrendszer nagyon szoros ellenőrzés alatt áll. Ez teszi azután lehetővé, hogy a redukálóképesség megmaradjon arra az időre, amikor a szén-dioxid redukciójához ténylegesen szükségessé válik.

Igen valószínű, hogy az obligát autotrófia jelenségének nem csupán egyetlen biokémiai bázisa van. Így pl. a GRAM-negatív *Nitrosococcus oceanus* szigorúan aerob, obligát autotróf, (kemolitotróf, mely az ammóniát nitritté oxidálja és szén-dioxidot fixál), NADH-oxidázzal rendelkezik és ezenkívül még a citromsav-ciklus valamennyi enzimével is, bár nála a borostyánkősav-dehidrogenáz mennyisége jóval a normális szint alatt van. Ezzel szemben sejtjeinek a szerves anyagokra vonatkoztatott permeabilitása rendkívül alacsony. Nyilvánvalónak tűnik, hogy ez az alacsony mérvű permeabilitás, továbbá a rosszul funkcionáló citromsavciklus együttes hatásának eredménye a sejtek „pszeudoautotróf" állapota.

1.33.3. A redukálóképesség (NADH) előállítása kemolitotróf autotrófoknál

Fentebb már említettük, hogy az obligát kemolitotrófok anyagcseréjében a redukált NAD előállítása központi szerepet játszik. Anyagcseréjük tanulmányozásánál különösen nagy figyelmet szenteltek a NADH-oxidáznak. Minthogy az általuk energiaforrásként hasznosításra kerülő redukált anorganikus vegyületek (pl. kén-hidrogén) a NAD-ot közvetlenül nem redukálják, ezért ennek előállítása energiaigényes (ATP-t fogyasztó), fordított elektrontranszporttal történik. Mivel ez nagyon sok energiát fogyaszt, ezért ezek a mikrobák a NADH reoxidációját a légzési láncon át valamilyen módon feltétlenül meg kell hogy akadályozzák. Normális körülmények között e mikrobáknál a NADH jelentős mérvű oxidációja a légzési láncon át nem megy végbe és már önmagában ez is obligát autotróf természetükre utal. Ennek ellenére az ATP-szintézissel járó NADH-oxidációhoz megvan a kapacitásuk és ezzel a lehetőséggel adott környezeti körülmények között élnek is. Sejtmentes kivonataiknak mérhető NADH-oxidáz-aktivitása van, mely kimutathatóan foszforilációhoz kapcsolt. Az a tény, hogy anyagcseréjükben a szén-dioxid mint legfontosabb szénforrás más szénvegyülettel nem helyettesíthető, világosan elárulja, hogy náluk a szerves vegyületek metabolizmusában alapve-

tő deficienciák vannak, és ezek mélyrehatóbbak annál, mintsem hogy azokból az energianyerés lenne csak akadályozott. Citrátkörük nem teljes és e ciklus meglévő kulcsenzimeinek aktivitása is csekély, ami kétségtelenül útjában áll annak, hogy a ciklus intermedierjeit akadálytalanul metabolizálhassák és feltehetően ezzel okolható, hogy azokat sem energia-, sem szénforrásként nem hasznosítják. Bár egyes obligát kemolitotróf fajoknál nagyfokú glükózdisszimilációs potenciál jelentkezik, mégis növekedésüket a glükóz nem segíti elő, ami feltehetően elégtelen transzportképességüknek is tulajdonítható. A szerves vegyületek kiterjedt hasznosításának e szervezeteknél még az is útjában állhat, hogy főbb anyagcsereútjaikon a szerves vegyületekből előállított katabolitok könnyen zavarokat idéznek elő. A szén-dioxidnak mint egyetlen szénforrásnak a hasznosítása az energiaáramlás nagyon finom ellenőrzését igényelheti, ami viszont könnyen felborul, ha szelektíven éppen olyan metabolittartalékok szintje növekedik, melyek bizonyos szerves vegyületek disszimilációjakor jönnek létre.

1.33.4. A kemolitotrófok szervesanyag-hasznosításának problémái

Az obligát kemolitotrófokban mint már említettük a citrátkör enzimei közül az α-keto-glutarát-dehidrogenáz hiányzik. Ez visszatükröződik náluk pl. abban a sajátos módban, ahogyan az acetátot sejtaminosavakká építik át. Az acetát beépülésének korlátozottsága egyébként ezekben a baktériumokban a glioxalát-ciklust is szükségtelenné teszi. Az obligát kemolitotrófokban a szukcinát- és a malát-dehidrogenázok aktivitása is sokkal alacsonyabb, mint a fakultatívakban. A citrátkör ezekben az obligátokban tisztán bioszintetikus szerepet játszik, ugyanúgy, mint a heterotrófokban anaerob viszonyok között. Náluk a C_4-egységek előállításának egyedüli útja a C_3-egységek karboxilezése. Izotópjelzéses és sejtmentes kivonattanulmányok igazolják, hogy a reakció során a foszfoenol-piruvát karboxilezése megy végbe. Azt is igazolni lehetett, hogy ezekből a baktériumokból a piruvát-karboxiláz és a foszfoenol-piruvát-szintetáz hiányoznak (MATIN, 1978).

Nagyon érdekes tény, hogy ha ezeknek a szervezeteknek a környezetében, a közegben, szerves vegyületek vannak jelen, úgy ezek enzimösszetételükre csaknem semmi vagy minimális hatást, ha kifejtenek. Ez természetesen semmi esetre sem jelenti azt, hogy az obligátokban az enzimszintézis transzkripciós ellenőrzése hiányozna. Megfigyelték pl., hogy a *Thiobacillus neapolitanus*nál a korlátozott CO_2-ellátás következtében, a ribulóz-difoszfát-karboxiláz aktivitás jelentősen derepresszálódott (KUENEN és VELDKAMP, 1973).

1.33.5. A membrántranszport sajátosságai a kemolitotrófoknál

Az obligát kemolitotrófok szerves szénhasznosításának korlátozott volta a transzportfolyamatokra irányította a figyelmet. Az acetátot ezek viszonylag jobban hasznosítják, mint számos egyéb más vegyületet. Az acetát azonban a sejtbe náluk is és a heterotrófoknál is egyszerű diffúzióval nyer felvételt. Az aminosavtranszportot azonban éppen úgy elektrokémiai gradienssel energizálják, mint a heterotrófok, bár e két csoport között a transzport specificitásának mértékét illetően különbségek vannak. Így pl., amíg az *E. coli*ban és a *B. subtilis*ben, az aminosav-transzportot 9–12 különböző transzportrendszer közvetíti, melyek mindegyike aminosavaknak egy bizonyos strukturálisan rokon csoportjára specifikus, addig pl. a *T. neapolitanus*nál csupán két nagyobb transzportrendszer működik. Az „I-es permeázcsoport" a glicin, szerin, alanin, valin, leucin, izoleucin, triptofán, tirozin, fenil-alanin, hisztidin, treonin és metionin transzportjában vesz részt. A „II-es permeázcsoport" az aszpartát, glutamát, lizin, arginin és a cisztein transzportját közvetíti. Az ilyen nem specifikus transzportrendszerek feltehetően a szokatlan szénanyagcseréhez vezető gyors adaptáció eredményének tekinthetők. A *T. neapolitanus* környezete alacsony koncentrációban számos aminosavat tartalmazhat. Ilyen körülmények között a nem specifikus transzportrendszerek átengedik ugyan a különböző aminosavak kicsiny mennyiségeit, de azt mégis megakadályozzák, hogy ezek a vegyületek a sejtbe nagy, potenciálisan már gátló hatású koncentrációkban hatolhassanak be.

1.33.6. Korlátozott heterotróf szaporodás

A fentebb ecsetelt korlátozások ellenére az obligátoknak bizonyos fokú heterotróf szaporodását már többen is kimutatták. Így pl. a *Tiobacillus ferrooxidans* és a *Nitrobacter agilis* eseteiben is. Az első faj törzseinek többsége képtelen heterotróf módon szaporodni, mégis állítólag a TM-törzs és a KG-4-törzs rendelkeznek ilyen potenciállal. Mindkettő vas–glükóz tápközegben folyamatos továbbtenyésztést igényel ahhoz, hogy szervesanyag-értékesítésük kimutatható legyen. Ugyanakkor a visszafelé úthoz is adaptáltatás szükséges, mégpedig a vas oxidációjára csak vastartalmú közegben megvalósított folyamatos továbbtenyésztéssel válnak újra képessé (Shafia és munkatársai, 1972; Tabita és Lundgren, 1971). Érdekes, hogy a KG-4-törzs glükózhoz adaptált sejtjei a vason növekedő sejtektől alakban, méretben, festhetőségben, antigén-összetételben különböztek és a P-amino-benzoesavat már obligát módon igényelték. Utóbb ezeknek a vizsgálatoknak a megbízhatóságát kétségbe vonták.

A *T. ferrooxidans* törzsei gyakran fertőzöttek a *T. acidophilus* acidofil, fakultatív tiobacillussal, mely a folyamatos tenyésztés során elszaporodhat (MATIN, 1978).

A *Nitrobacter agilis* számos törzse heterotróf módon egyáltalán nem tenyészthető. Végül is úgy látszik, csak sikerült ilyen törzset izolálni (SMITH és HOARE, 1968), bár kétségeink e körül is bőven vannak. E szerzők a *N. agilis*t fakultatív kemolitotrófnak tartják. Szerintük komplett citromsav-ciklussal rendelkezik és nitrit hiányában exogén szerves anyagokat asszimilál. Szerintük acetát-kazein hidrolizátumközegben rendkívül lassú növekedésre képes és autotróf potenciálját heterotróf közegben számos továbboltás után is megtartja.

1.33.7. A poliglükóz mint a *Thiobacillus*ok szén- és energiatartaléka

Az obligát kemolitotróf *Thiobacillus neapolitanus* sejtjeiben, kemosztátban nitrogénnel korlátozott növekedési viszonyok között, intracelluláris poliglükóz jelenik meg. A poliglükóz mint tartalék szén- és energiaforrás, számos heterotrófban kimutatható. A *T. neapolitanus* képtelen exogén glükózt energiaforrásként hasznosítani és szénforrásként is csak alig (SMITH és HOARE, 1977; MATIN, 1978). A sejtjeiben felhalmozott poliglükóz azonban tartalékanyag lehet, minthogy mennyisége fölös energia és szén-dioxid jelenlétében növekedik, míg éheztetéskor e polimer gyorsan lebomlik (BEUDEKER és munkatársai, 1981). Hasznosítását a poliglükózdependens proteinszintézis is igazolja, továbbá az a megfigyelés, hogy az ezt tartalmazó *T. neapolitanus*-sejtek az energiaéheztetés alatt életképességüket nem vesztik el.

1.33.8. Valódi mixotrófia

A kemolitotrófoknak létezik azonban több olyan faja is, melyeknél a mixotrófia ténylegesen igazolható és a heterotróf szaporodás bizonyított, kétségbevonhatatlan tény. A *Thiobacillus* A2-törzsről ismeretes pl., hogy szén- és energiaforrásként hexózokat, pentózokat, szerves savakat, α-kapcsolódású diszacharidokat és aromás vegyületeket egyaránt képes hasznosítani. A *Thiobacillus novellus* e tekintetben már sokkal egyoldalúbb. Számára a glutamát igen jó szubsztrát. E szervezetben glutamáttranszportrendszert, továbbá NAD- és NADP-kapcsolódású glutamátdehidrogenáz-aktivitást sikerült kimutatni (HOBAN és LYRIC, 1977). Ugyanakkor glükózt, szacharózt, laktózt, acetátot, malátot és szukcinátot nem hasznosít.

A hexózon szaporodó fakultatív kemolitotrófoknál – a *T. novellus* kivételével – az EMBDEN–MEYERHOF-, az ENTNER–DOUDOROFF- és a pentóz-foszfát-utak egyaránt kimutathatóak voltak (MATIN, 1978). A fakultatívakban a komplett citromsav-ciklus valamennyi enzimje jelen van, és ezek az autotróf módon kultivált sejtekben a heterotróf tenyésztésre való áttérésnél még fokozottabban aktívvá válnak. A NAD- és a NADP-kapcsolódású izocitrát-dehidrogenázt csaknem valamennyi fakultatívban megtalálták. A glioxalát-ciklus enzimeit pl. olyan fakultatívakban is sikerült demonstrálni, mint a *Pseudomonas (Hydrogenomonas) facilis, Paracoccus denitrificans, Thiobacillus novellus, Thiobacillus* spp. vagy az *Alcaligenes eutropha*. Ugyanezekből az elektrontranszport és az oxidatív foszforiláció számos komponensét is kimutathatták. Több vizsgálat is igazolja, hogy a fakultatív kemolitotrófokban a heterotróf tenyésztés alatt az autotróf energiaelőállítás és CO_2-fixáció kulcsenzimei aktivitásukban jelentősen csökkennek. Ez az aktivitásszűkülés legtöbbször az enzimek szintézisének hiányára vezethető vissza. Az ilyen baktériumok tehát auto- és heterotróf energiahasznosításra egyaránt képesek, vagyis mixotrófok, ami számukra igen nagy ökológiai előnyöket jelenthet.

A *Thiobacillus intermedius* tipikusan ilyen mixotróf baktérium. Ennek szaporodási sebessége és sejthozama troszulfát–élesztőkivonat közegben nagyobb, mint kizárólagosan akár csak autotróf, vagy akár csak heterotróf tenyészfeltételeket nyújtó környezetben a megfelelő szubsztrátkoncentrációknál. Mixotróf körülmények között nála az energiaelőállításhoz mind a tioszulfát, mind az élesztőkivonat egyaránt hozzájárul. E baktérium sejtjeinek kivonata a tioszulfát és az élesztőkivonat oxidációját az endogén citokróm redukciójával mindkét esetben összekapcsolhatja. Mixotrófiát biztosító kísérletes körülmények között azonban csaknem valamennyi „sejtszene" az élesztőkivonatból származott, minthogy a ribulóz–difoszfát-karboxiláz aktivitása és a $^{14}CO_2$-fixáció erősen redukálódtak. A mixotrófia a hidrogénbaktériumoknál is kimutatható. Az *Alcaligenes eutropha* mint hidrogénbaktérium, durranógáz + CO_2 atmoszférában, hasznosítható szénforrás jelenlétében, mixotróf módon szaporodik. Sejthozama triptofánon, hisztidinen vagy alaninon autotrófiáját biztosító atmoszférában nagyobb volt, mint levegőn (DECICCO és STUKUS, 1968). Szervesanyag-hasznosítása mixotróf környezetben, ugyanolyan sebességgel történik, mint heterotróf úton. Minthogy mixotróf körülmények között észlelt szaporodásának nagyságrendje nem azonos az autotrófnak és a heterotrófnak az összegével, feltételezik, hogy mixotróf körülmények között autotróf anyagcseréje parciálisan represszálva van. Mixotrófiát biztosító miliőben valamivel több triptofánt használ el, mint amennyit sejtanyaga szintézisére fordít, ezért a többletet feltehetően energia előállításához hasznosítja. Mixotróf növe-

kedése alatt a hidrogenáz és a ribulóz-difoszfát-karboxiláz enzimek szintézise folyamatos lehet.

GÜDE és munkatársai (1981) a *Beggiatoa alba* B18LD-jelzésű törzsét folyamatosan fenntartott kultúrában acetáton vagy acetát + aszparaginát jelenlétében heterotrófiát biztosító körülmények között, továbbá acetát + lmM nátrium-szulfid vagy lmM nátrium-tioszulfát jelenlétében mixotrófiát lehetővé tevő körülmények között tenyésztették. Mind a sejttömeg-produkciót, mind a sejtek összetételét tekintve igen nagy különbségek mutatkoztak. Az acetát grammjára számított sejtszárazanyag-hozam az acetát-szulfid mixotróf kultúrában megközelítően háromszor volt nagyobb, mint az acetát heterotróf kultúrában. Ezzel szemben a heterotróf tenyészetek sejtjeiben sokkal nagyobb volt a poli-β-hidroxivajsav- és a szénhidráttartalom. A mixotróf kultúrákban nyert nagy hozam azt mutatja, hogy az acetát többnyire a bioszintézishez használódott el. Az energiát a szulfid oxidációja szolgáltatta.

1.33.9. A kemolitotrófok származásának kérdése

Az aerob kemolito-autotrófok minden bizonnyal az oxidatív légkör megjelenése után differenciálódtak. Azt azonban nem tudjuk, hogy deficiens fotolitotrófokból vagy kemoorganotrófokból jöttek-e létre. Tény, hogy náluk a CALVIN-ciklus jelenléte már eredendően autotróf eredetet gyanít. Könnyebben elképzelhető a heterotróf, ill. mixotróf élethez való alkalmazkodásuk, mint a teljes CALVIN-ciklus megszerzése. Ez utóbbi birtokában és a bakterioklorofillek hiányában elsősorban is a szervetlen elektrondonorhoz mint energiaforráshoz kellett alkalmazkodniok.

Amennyiben a hangyasavat inkább anorganikusnak, mintsem szervesnek tekintjük, úgy a ma még elégtelenül ismert, bizonytalan rendszertani helyzetű *Pseudomonas oxalaticus*t litotrófként kezelhetjük, mivel a formiátot oxidálja:

$$HCOOH + 0{,}5\ O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$$

A *P. oxaliticus* autotróf, minthogy a szén-dioxidot hasznosítja szénforrásként. Az ATP előállítása és a NAD redukciója a formiát oxidációjához kapcsolt.

E szervezet nevét onnan kapta, hogy oxaláton mint egyedüli szén- és energiaforráson is növekedik.

$$\text{Oxalát} + \text{szukcinil-CoA} \rightarrow \text{oxalil-CoA} + \text{szukcinát}$$
$$\text{oxalil-CoA} \rightarrow \text{formil-CoA} + CO_2$$
$$\text{Szukcinát} + \text{formil-CoA} \rightarrow \text{formiát} + \text{szukcinil-CoA}$$
$$\text{Formiát} + \text{NAD} \rightarrow CO_2 + NADH_2$$
$$\textit{Összegezve:}\ \text{Oxalát} + \text{NAD} \rightarrow 2CO_2 + NADH_2$$

Az oxalil-CoA, szukcinil-CoA közreműködésével transzferáz reakció révén jön létre. Ezután dekarboxilálódik. Az eredmény szén-dioxid és formil-CoA. A dekarboxilázt a difoszfotiamin és a magnéziumion aktiválja. Egy következő transzferáz reakció szukcinátból és formil-CoA-ból a szukcinil-CoA-t regenerálja. Az utolsó lépés a formiát oxidálása szén-dioxiddá formiát-dehidrogenázzal, mely kofaktorként NAD-ot igényel. A *P. oxaliticus* valószínűleg az oxalát-anyagcsere egy alternatív útjával is rendelkezik. Kivonataiban ugyanis egy enzim van jelen, mely NADPH-val az oxalil-CoA-t glioxaláttá és szabad CoA-vá redukálja. A glioxalát átalakítását gliceráttá is kimutatták, ebben valószínűen glioxalát-karboligáz működik közre.

A *Nitrobacter*, mely mint láttuk nitritet oxidál, formiátot is oxidál. Lehetséges, hogy az olyan litotróf autotrófok, mint amilyen a *Nitrobacter*, formiátoxidáló köztes fajokon át a heterotrófoktól származnak.

1.34. A baktériumgenom és működése

Az öröklődés és a változékonyság fizikai alapjait mind a mikroorganizmusok és a növények, mind pedig az állatok sejtjeiben a gének képezik. A gének a sejtmag kromoszómájában vagy kromoszómáiban gyöngyfüzérhez hasonlóan vannak sorba kapcsolva. A kromoszómában a sejtosztódást megelőzően duplikációnak vagy replikációnak nevezett megkettőződési folyamat megy végbe (*lásd* 1.13.42.-44. alf.). Ha ez a folyamat hibátlan, úgy a két leánysejt teljesen azonos genommal, öröklődési anyaggal rendelkezik. Az öröklődésért felelős anyag, mind az eukariotákban, mind a prokariotákban a DNS. Csak a vírusok egy csoportjában szerepel RNS az örökletes tulajdonságok kizárólagos hordozójaként.

1.34.1. Az öröklődési mechanizmus eltérései a pro- és eukarioták viszonylatában

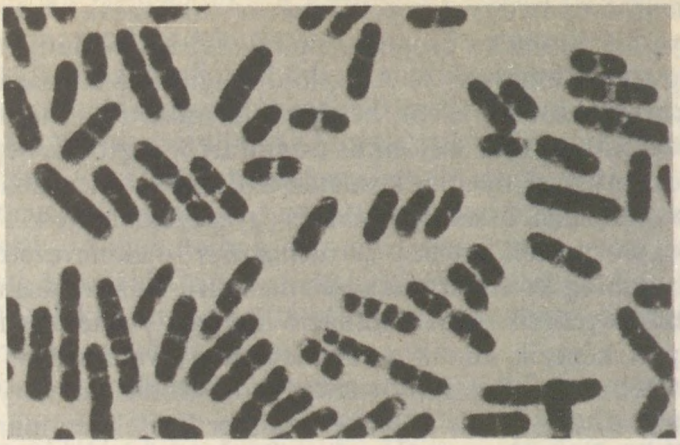
Az eukarioták öröklődési mechanizmusa néhány jellemvonásában eltér az alábbiakban ismertetésre kerülő prokariotákétól. Ezek: *a)* Az eukarioták sejtmagvában több különböző kromoszóma és azok mindegyikéből egy (haploid) vagy egy pár (diploid) van jelen. A kromoszómák megkettőződését követően a mag osztódása mitózissal megy végbe. Ennek során mindkét leánysejt nukleuszába valamennyi kromoszómának egy-egy példánya, ill. párja jut. *b)* Az eukarioták szexuális folyamatai keretében végső soron két haploid magvú sejtnek sejt- és ezt követően magfúziója megy végbe. A haploid sejtmagvak a kromoszómáknak nem

párjait, hanem csupán egy-egy példányát tartalmazzák. A haploid sejtmagvak egyesülése minden kromoszómából két-két példányt tartalmazó diploid magvat eredményez. *c)* A diploid magból az ún. meiózis során, mely redukciós osztódást jelent, két haploid nukleusz jöhet létre, majd ezekből az ezt követő már mitotikus (számtartó) osztódás négy haploid magvat eredményez. A meiózis kezdetén a diploid nukleuszban a homológ kromoszómapárok összetapadnak és egyes szegmentjeiket kicserélik. Az eukariota szervezetekben ez a *„crossing over"*-nek nevezett folyamat, továbbá a homológ kromoszómák véletlenszerű elosztódása a leánysejtekbe, képezik a genetikai rekombináció alapjait. A meiózis folyamatai viszont alapját képezik annak a ténynek, hogy valamennyi eukariota szervezet esetében a klasszikus MENDELI öröklődés törvényszerűségei érvényesülnek. *d)* A meiózis az eukariota szervezetekben már közvetlenül a magfúziót követően végbemehet. Következésképpen, a szervezet életciklusa nagy részének tartamára haploid marad. Egyes eukariotákban a meiózis megtörténte hosszú sejtgenerációkon keresztül késhet, és így a szervezet életciklusának nagyobb részén át diploid marad. Sok gombánál például a növekedés haploid és diploid fázisait különíthetjük el. A növényeknél az ivartalan nemzedék diploid. Eltekintve az ivarsejtektől, az emberi és az állati szervezet diploid.

1.34.2. A baktériumok részlegesen diploid, ill. heterozigóta állapota

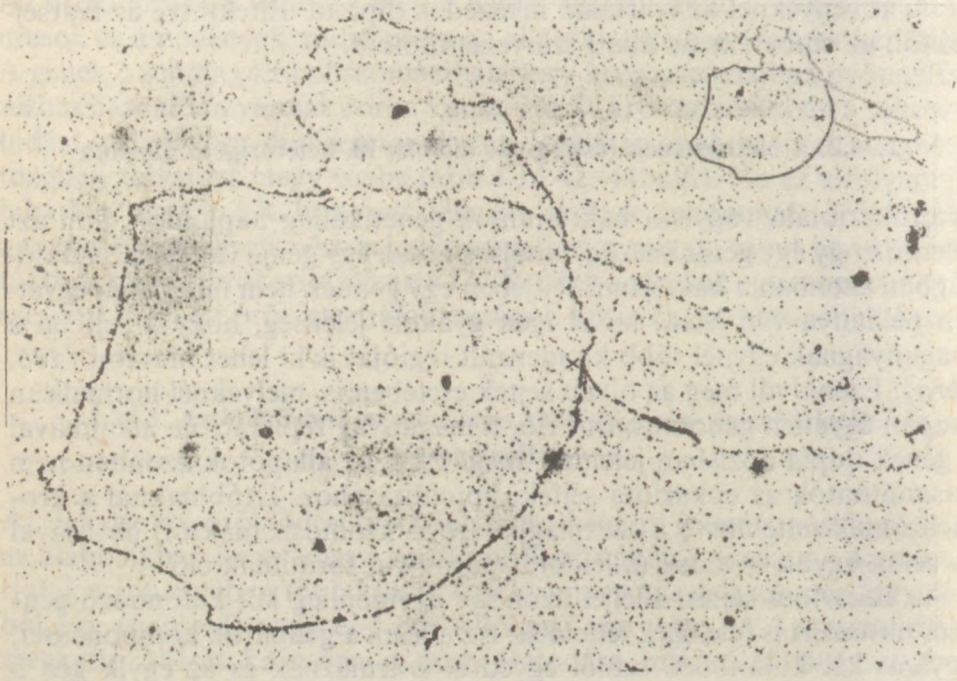
A prokarioták, vagyis a baktériumok genetikailag haploidok, ami azt jelenti, hogy egy génlokusznak a sejtben csak egy génje van jelen. A valóságban azonban a baktérium sejtjében egy génnek nem feltétlenül egyetlen példánya van jelen, mivel igen gyakori jelenség, hogy a sejtben a maganyagnak egynél több kondenzált régióját is ki lehet mutatni *(146. ábra)*. Ezenkívül még az olyan sejtek esetében is, melyeknél normálisan csupán egyetlen genom fordul elő, a maganyag replikációja alkalmával a gének dupla dózisban jelennek meg. Ezek az állapotok azonban nem hasonlíthatók az eukariota sejtek diploiditásához. Utóbbiaknál a kromoszómák (eltekintve a szexmeghatározó kromoszómáktól) párosával és velük együtt a gének (allélek) is párosával fordulnak elő.

Az eukariota sejtek alléljei azonban egyidejűleg két különböző génproduktumért is felelősek lehetnek. Az allélek a génpárok komponensei, ugyanis két különböző szülői egyedtől származnak és az egyik gén a másikkal szemben domináns lehet. Az olyan egyedeket, melyek egy vagy több nem tökéletesen azonos génpárt (alléleket) tartalmaznak, heterozigótának nevezzük. A baktériumokra jellemző haploid állapot elvileg kizárja az ilyen géndominanciák létezésének lehetőségét. Ezek a szerve-



146. ábra

A *Proteus mirabilis* magfestéssel kezelt sejtjei. Mint látható, az egyes sejtekben több sötét magrégió is kimutatható. Fénymikroszkópos felvétel



147. ábra

Az *Escherichia coli* K-12 Hfr-törzs, két generáción keresztül triciumot tartalmazó timidinnel jelölt és lizozimmal extrahált kromoszómájának autoradiográfja. Két hónapos expozíciós idővel dolgoztak. A jobb felső sarok ábrája ugyanezt a struktúrát vázolja fel, három szekciót jelezve (A, B, C), melyek a két (X és Y) replikációs villától indulnak (CAIRNS, 1963)

zetek normális körülmények között homozigóták. Igaz, az átmeneti diploiditás állapota a sokmagvú baktériumsejtekben pl. spontán mutáció vagy valamilyen más genetikai változás következtében mégiscsak felléphet.

Az ilyen mutáció általában a genom másolatának csak egyikében jelenik meg. Ilyenkor a sejt részlegesen diploiddá, illetve heterozigótává válik. Az ivadékok azonban legfeljebb néhány sejtosztódás után ismét haploidok lesznek, mégpedig vagy a mutánsnak, vagy az eredeti, változatlan, „vad" típusnak megfelelően. Egy időben feltételezték, hogy a többmagvú sejtek eltérő (nem azonos) kromoszómákat tartalmazhatnak. A gének térképezésére irányuló vizsgálatok azonban bebizonyították, hogy a sejt genetikai jellemvonásaiért felelős valamennyi gén egyetlen kromoszómában kapcsolódik össze *(147. ábra)*. Ekkor derült fény a genom cirkularitására, körkörös voltára is.

1.34.3. Az *Escherichia coli* K-12-törzs genetikai térképének szerkesztése

Napjainkban az *E. coli* K-12-törzs genetikai térképén már több mint 800 lokuszt ismerünk. Az egyes gének helyzetére és sorrendjére vonatkozó információk az alábbi forrásokból származnak:

1. Megszakított konjugációk

2. Pl-fággal végrehajtott generalizált transzdukciók

3. Plazmidokon elhelyezkedő, kielégítően meghatározott DNS-szegmentek fizikai mérései

4. Hfr × F^- keresztezések genetikai következményeinek analízise

5. Komplementáció vagy rekombináció

a) F′-faktorokkal

b) Specializált transzdukáló fágokkal

6. Törléselemzés

a) Spontán mutánsok segítségével

b) Indukált lizogének túlélésekor

c) Kivezetéssel

d) Az F′-faktorok transzdukciós megrövidítésével

7. Transzformációk segítségével végrehajtott rekombinációk analízisei

8. Kromoszomális géneket viselő plazmidok géntermékeinek *in vivo* és *in vitro* kimutatása.

Jóllehet igen fontos lenne valamennyi gén helyzetét fizikai mérésekkel is meghatározni, sajnos ez a jelen körülmények között, a legtöbb génnel kapcsolatban még lehetetlen. Az esetek túlnyomó többségében a gének helyzetét először Hfr-keresztezésekkel közelítették meg, amit nem ritkán

viszonylag gyorsan végre lehetett hajtani, majd Pl-fágot használva, kotranszdukcióval a sokkal pontosabb helymeghatározás következett. A BACHMANN és munkatársai alapján (1976) itt bemutatott genetikai térkép összeállítása főleg az irodalomban közzétett, pl. kotranszdukciós gyakoriságok térképi távolságokra való átültetése, majd az így összegezett, továbbá a megszakításos konjugációs kísérletek alkalmával kapott távolságok összehasonlítása révén történt.
Az *E. coli* térképezésénél használt mértékegység a perc, melyet 37 °C-on kivitelezett, megszakításos konjugációkkal végzett kísérletek során az egyes markerek átvitele között eltelt időtartam mérésével határoznak meg. A folyamatos térkép teljes hosszúsága 100 ± 2 perc.

1.34.4. Génkapcsolódási csoportok

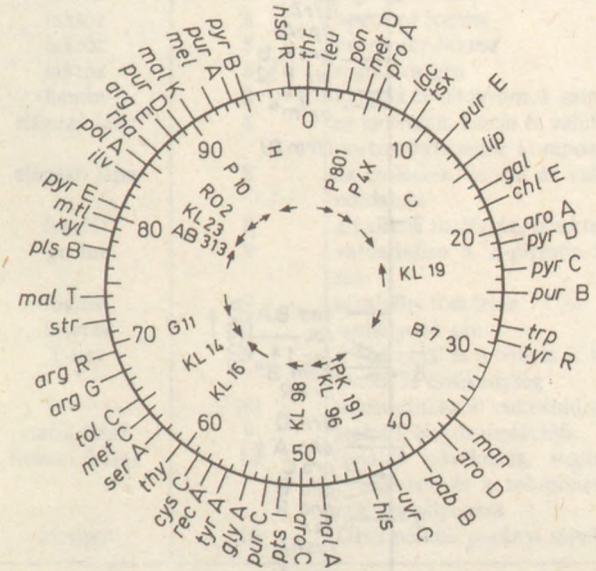
Egy korábbi megállapítás szerint az *E. coli* valamennyi térképezett génjét mintegy 10 transzdukciós „génkapcsolódási csoportba" lehet besorolni. Ez azt jelenti, hogy mindegyik csoport egy sor gént tartalmaz, melyek a Pl-fág transzdukáló részecskéin folytonos sorrendben kapcsolódnak egymáshoz. A jelenleg rendelkezésünkre álló adatok szerint, a Pl kotranszdukciók alkalmával az *E. coli*nál pontosan térképezett csaknem valamennyi (> 800) gén folyamatosan kapcsolódik, és egy vagy két nagy transzdukciós „génkapcsolódási csoportba" sorolható. A géntérképen azt a két rést, mely e két csoportot egymástól elválasztja, a 28,5-től a 35,5 percig, továbbá a 95-től a 98,5 percig terjedő szakaszok képezik.

1.34.5. Távolságok a genetikai térképen

BACHMANN és munkatársai a térképen szereplő, percekben megadott távolságokat a Wu-féle egyenlet segítségével a génkotranszdukciós (együttes génátvitel transzdukció útján) gyakorisági adatokból számolták ki: a kotranszdukció gyakorisága = $(1-d/L)^3$, ahol d a markerek közötti percekben megadott távolság, míg L a transzdukáló fragment percekben megadott hossza. *Wu* eredetileg az L numerikus értékét 2,0 percre becsülte. Későbbi kalkulációk szerint a genetikai térképen 1 perc molekuláris hossza megközelítően 41 kilobázissal („kb" a 10^3 DNS-bázispárnak megfelelő hosszúsági egység) egyenlő. A Pl-fág DNS-ének (és így egy transzdukáló fragmentnek is) a molekuláris hossza, a jelenleg legjobban elfogadott becslések szerint, mintegy 97 kb, mely a genetikai térkép hosszán 2,3 percnek felel meg. Mennél nagyobb a térképen két gén között a távolság, annál alacsonyabb a kotranszdukciós gyakoriságuk.

1.34.6. A géntérkép

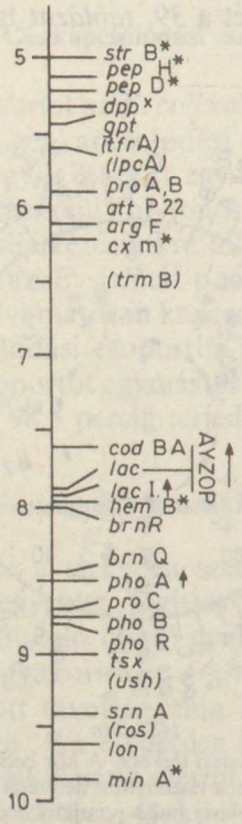
A *148. ábra* az *E. coli* körkörös génkapcsolódási térképét mutatja be. Az ábrán csak az általános orientációt biztosító 52 szelektált lokusz szerepel. E térképpel kapcsolatban hangsúlyozni kell, hogy a markerek helyének kijelölésénél elég sok a hibaforrás, és hogy e térkép véglegesnek semmiképpen sem tekinthető. A *149. ábra* az *E. coli* teljes részletességű géntérképének egy önkényesen kiragadott szakaszát tárja elénk. Ez a szakasz a *thr*-lokusztól (*thr*A = aszpartokináz I-homoszerin-dehidrogenáz I; 0 perc) számított 5. perctől a 10. percig terjedő ívnek felel meg, mely többek között a *lac*-operont is tartalmazza. A *149. ábrán* az egyes lokuszok a nemzetközileg elfogadott génszimbólumokkal vannak megjelölve. E jelzések értelmezését a *39. táblázat* tartalmazza.



148. ábra

Az *E. coli* K–12 körkörös génkapcsolódási térképe. A kör belső oldalán feltüntetett nagy számok a térkép egyes pontjainak a thr-lokuszhoz viszonyított helyzetét percekben adják meg. A térkép 100 perces időskálája önkényesen a thr-lokusz nulla pontjától indul ki. Ez az időskála a kísérletes, megszakításos konjugációk eredményeire alapul. A feltüntetett genetikai szimbólumokat a *39. táblázat* tárgyalja. E térképen nem szerepel valamennyi feltüntethető lokusz, hanem azok közül bemutatásra mindössze 52 került. Ez a szelekció a térképezési helymeghatározás legnagyobb pontosságú adatainak figyelembevételével történt és e lokuszok az *E. coli* K–12 genetikai térképén a további kutatások számára is mérföldköveket jelentenek. A körnek két vékonyan kihúzott ívszakasza is van, melyek azt a két térképközt jelzik, ahol még hiányzik a P1 kontraszdukciós kapcsolódások folyamatos sorozata. A körön belül Hfr-törzsek átviteli régióit tüntették fel (BACHMANN és munkatársai, 1976)

A bemutatott géntérkép *(lásd 148. ábra)* szerkesztésénél már néhány esetben a markerek koordinátáit nem pusztán genetikai technikákkal, hanem fizikai módszerekkel határozták meg. Így pl. a 16 S és a 23 S riboszómális RNS strukturális géncsoportjaiból hármat (*rrn*A, *rrn*B és *rrn*C, a 83–88. percek közötti szakaszon) és a velük társuló 5S RNS-géneket (*cqs*A és *cqs*B: az első a 85., a második a 83. percnél; az első UCUCCUCAUG a második CCUUAG szekvenciákat kódol) már különböző fizikokémiai technikákkal térképezték. Az ismert genetikai összetételű heteroduplex DNS-molekulák elektronmikroszkópos analízistechnikájának a legutóbbi időkben elért fejlődése már lehetővé teszi, hogy a kilobázisokban kifejezett fizikai távolságokat közvetlenül párhu-



149. ábra

Részlet az *E. coli* K–12 kromoszómatérképéből. Az ábrán a körkörös kettős DNS-fonal egy 5 percnyi hosszú szakaszának (a *thr* lokusztól számított 5–10 perc közötti távolságának) génjei lineáris sorrendben vannak feltüntetve. Amennyiben a gén jelzése zárójelben van, úgy az arra utal, hogy a kérdéses *marker* lokációja nem teljesen ismert és helyét a térképen csak megközelítően lehet megadni. A csillag feltüntetése viszont azt jelenti, hogy a kérdéses *marker* térképezése már pontosabban megtörtént, de a szomszédos *markerek*hez viszonyított relatív helyzete még nem ismert. A gének és az operonok feletti nyilak az ezekről a lokuszokról történő mRNS-átírás irányát jelzik

39. táblázat

Az *E. coli* K-12 kromoszómatérképén a thr-lokusztól számított 5–10 perc közötti szakasz *(lásd 148–149. ábrák)* genetikai markereinek listája

A gén szimbóluma	Amire a szimbólum utal	Pozíció a térképen (percben)	Fenotípusos tulajdonság
strB	sztreptomicin	5	alacsony szintű sztreptomicin-rezisztencia
pepH	peptidek	5	karnozináz
pepD	peptidek	5	dipeptidekre specifikus peptidáz
dpp	dipeptidek	5	dipeptidek transzportja
gpt		5	guanin-xantin foszforibozil-transzferáz
proA,B	prolin	6	az l-glutamát-szemialdehidet megelőző blokk
att P22	kapcsolódás	6	a P22-profág integrálódásának helye
argF	arginin	6	ornitin karbamoil-transzferáz (kettős gén)
cxm		6	metil-glioxál-szintézis
codBA		8	citozintranszport
lacA	laktóz	8	tiogalaktozid-transzacetiláz
lacY	laktóz	8	galaktozid-permeáz (M protein)
lacZ	laktóz	8	β-galaktozidáz
lacO	laktóz	8	operátor lokusz
lacP	laktóz	8	promotor lokusz
lacI	laktóz	8	regulátor gén
hemB	hemin	8	kataláz és citokrómok szintézise
brnR	elágazó lánc	8	az izoleucin, leucin és valin 1-es és 2-es transzportrendszereinek komponense
brnO	elágazó lánc	8	az izoleucin, leucin és valin 1-es transzportrendszere
phoA	foszfát	8	alkalikus foszfatáz, strukturális gén
proC	prolin	9	valószínűen a Δ-pirrolin-5-karboxilát-reduktáz
phoB	foszfát	9	alkalikus foszfatáz
phoR	foszfát	9	szabályozó gén
tsx	T-hat	9	a T6 fággal és a colicin K-val szembeni rezisztencia és érzékenység
(ush)		(9)	uridin-difoszfát cukorhidroláz
srnA	stabil RNS	9	stabil RNS degradációja
lon	hosszú forma	10	fonalas növekedés, sugárzásérzékenység, a gal-operon és a tok-poliszacharid szintézisének szabályozása
minA	minisejt	10	DNS nélküli parányi sejtek képzése

zamba állíthassuk a genetikai térkép percekben kifejezett távolságaival. Így pl. megállapítást nyert, hogy az *ilv*D (83,2 perc) és a *met*B (87,1 perc) továbbá a *met*B és az *arg*C (87,75 perc) közötti DNS-szekvenciák molekuláris hossza 161, ill. 25,5 kb. Ezek esetében a megfelelő genetikai távolság 3,9 perc, ill. 0,65 perc. Az *ilv*D-től az *arg*C-ig terjedő szakasz adatainak egybevetése eredményeként a térkép egy percnyi hosszát 41 kb-ra becsülhetjük. Ezen az alapon a 100 perces genom teljes molekuláris hosszát $4{,}1 \times 10^6$ bázispárra kalkulálhatjuk, ami $2{,}7 \times 10^9$ molekulasúlynak felel meg. Ez a számítás és a kapott eredmények kielégítő

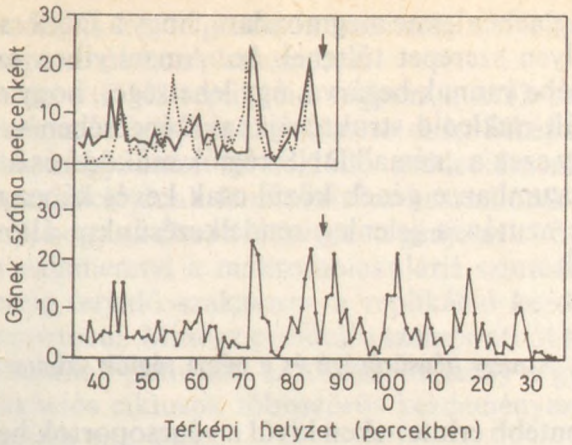
megegyezést mutatnak az *E. coli* genomméreteire vonatkozó, más alapokon nyugvó, korábbi becslésekkel. Végül megjegyezzük, hogy a szóban forgó *ilv*D-gén dehidrázt, a *met*B cisztationin-szintetázt és az *arg*C N-acetil-γ-glutamil-foszfát-reduktázt kódol.

1.34.7. A térkép hiányosságai

A *149. ábrán* bemutatott részletes géntérképszakasz gyengéi közé tartozik, hogy a szomszédos gének alkotta csoportok helyzete a térképen egy-egy ponton van csak feltüntetve. Így pl. a lac-operon több tagja a 8 perces térképpozíciónál szerepel. Hasonló problémák, a teljes géntérképet is figyelembe véve, nagy számban jelentkeznek. Jóllehet ez a megoldás leegyszerűsíti a genetikai térképezések eredményeinek bejegyzését, hátránya azonban, hogy a géncsoportok tényleges fizikai dimenzióit nem tükrözi vissza. Feltételezhető, hogy már a közeljövőben a géntérkép e pontatlanul felmért szakaszainak olyan értelmű korrekcióját tudják majd végrehajtani, amely a térképen mind a reális sorrend, mind az egyes gének lineáris dimenzióinak méretarányosan hű szemléltetését eredményezheti.

1.34.8. A gének megoszlása a kromoszómán

Itt röviden még a génlokuszok csoportosulásairól is szólni kell. Az *E. coli* géntérképének alapos tanulmányozása azt a benyomást kelti, hogy a térképezett gének a kromoszómán nem véletlenszerű megoszlásban fordulnak elő. Ezt a megállapítást a *150. ábra* határozottan megerősíti. Ezen az ábrán a térkép teljes hosszában előforduló gének számát tényleges lokációjuknak megfelelően, percnyi intervallumokra kalkulálva tüntették fel. A számításba vett gének száma csak 606 volt, mivel a promoter helyeket, a profág kapcsolódási helyeket, továbbá a bizonytalan helyzetű markerek génjeit figyelmen kívül hagyták. A görbén a génsűrűség csúcsértékeit a 43–45, 72, 84, 89, 2, 17 és 28 perceknél, míg a legalacsonyabb denzitási értékeket 65, 77, 86, 97, 12, 24 és 30–35 perceknél találjuk. A nem véletlenszerű megoszlás statisztikailag szignifikáns. A csúcsértékek többsége élesen kiugró, ami arra utal, hogy a genom nagyon zsúfolt részeit mindkét oldalon viszonylag „néma" régiók veszik körül. Elképzelhető, hogy a genetikailag zsúfolt és üres régiók váltakozása mind topológiailag, mind funkcionálisan relációban van a tömörült, bakteriális nukleoid hajtogatott (gyűrt) struktúrájával. Így pl. lehetséges, hogy a nagyobb géncsoportok mint a DNS fiziológiailag aktív szegmentjei, az RNS^- és proteinszintetizáló komponensek számára azért hozzáférhe-



150. ábra

Az ismert génlokuszok megoszlása az *E. coli* K–12 genetikai térképén. A térkép hosszában 1 perces intervallumonként a térképezett gének összes mennyisége (kivéve a profág-kapcsolódási, a promoteriniciátor és a bizonytalannak minősített helyeket) a térképen elfoglalt helyzetüknek megfelelően van feltüntetve: kiindulás a 35 perces ponttól, haladási irány az óramutató járásának megfelelően. A 87. percnél látható nyilak a kromoszómán elhelyezkedő géncsoportok szimmetriatengelyét mutatják. A bal felső sarokban a folyamatos vonal a gének számának percenkénti megoszlását mutatja a 36–86 perces térképszakaszon az óramutató járásának megfelelően balról jobbra. A pontozott vonal ugyancsak a gének percenkénti számát mutatja a 37.-től a 87. percig terjedő térképrészen, azonban már az óramutató járásával ellenkező irányban (BACHMANN és munkatársai, 1976)

többek, mert a gyűrt DNS-„gombolyag", vagyis a nukleoid felületén helyezkednek el. Ennek megfelelően a „néma", ill. kevés gént tartalmazó régiók a nukleoid belsejébe kerülnek. Ezt az elképzelést látszik alátámasztani, hogy ténylegesen a génsűrűségi csúcsok tartalmazzák azoknak a géneknek a többségét, melyek a kiegyensúlyozott makromolekuláris szintézishez szükségesek. Így a 72 percnél lokalizált géncsoport tartalmazza a 30 S és az 50 S riboszomális alegységproteineknek, az RNS polimeráz α alegységének, a G- és Tu-fehérje meghosszabbodási faktoroknak és a ciklusos adenozin-5-monofoszfát receptorproteinjének génjeit. A 84 perces csoport génjei felelősek a riboszomális RNS speciesekért, az adenil-ciklázért, a DNS-polimeráz I-ért, a DNS replikációja kezdeményezéséért és az oxidatív foszforilációért. A 89 perces csoport génjei az 50 S riboszómális alegység proteinjeit, a riboszomális RNS-t, a Tu meghosszabbodási faktort, az RNS polimeráz β és β' alegységeit és még számos, a struktúrát és a működést érintő enzimet kódolnak. A 2 perc körüli csoport génjei között több a sejttakaró struktúrájával és működésével kapcsolatos, ezenkívül a nukleozid-katabolizmus, a riboszomális proteinek modifikációja, a DNS-meghosszabbodás és végül a DNS-polimeráz II és III felelősei.

Pillanatnyilag nehéz lenne megmondani, hogy a DNS csekély génsűrűségű régiói milyen szerepet töltenek be. Amennyiben ezek a régiók a nukleoid belsejébe vannak bezárva, úgy lehetséges, hogy e DNS-nek egy része a tömörült nukleoid struktúrájának képzésében vesz részt. Az is lehetséges, hogy ezek a „néma" DNS-régiók működő és átírható géneket tartalmaznak, azonban e gének közül csak kevés képez mutáns fenotípust, melyeket azután a jelenleg rendelkezésünkre álló módszerekkel felismerhetnénk.

1.34.9. A nagy génsűrűségű és a néma régiók szimmetriája

A *150. ábra* a fentebb érintetteken kívül a géncsoportok helyzetének még bizonyos fokú szimmetriáját is elárulja. A 84. és 89., a 72. és 2., a 43–45. és a 28. csúcspárok, továbbá a 77 és 97 perces két nagyobb hullámvölgy megközelítően egyenlő távolságra helyezkednek el a 87 percnél felismerhető szimmetriatengelytől. Ha a gének megoszlási térképét a 87 percnél két félre osztjuk és a két felet az ábra bal felső sarkában látható módon fedésbe hozzuk, úgy a nagyobb csúcsok és hullámvölgyek nagyfokú egybevágását fedezhetjük fel. Ettől a látszólagos szimmetriától a legkomolyabb eltérést a jobb fél 17 percénél láthatjuk, minthogy ennek a kiemelkedő csúcsnak nincs meg a tükörképe a bal fél 56 percénél. Ennek ellenére mégis azt mondhatjuk, hogy a 87 perctől jobbra és balra a genom két fele topológiailag komplementer módon szervezett.

1.34.10. A kromoszóma szimmetriatengelye

A hetvenes években több laboratóriumban is kimutatták, hogy az *E. coli* K-12- és B/r-törzseiben a DNS replikációja az *ilv*-gén szomszédságában levő replikációs kezdettől kiindulóan két irányban megy végbe. Így azt tapasztalták, hogy szinkron tenyészetekben a 83 percnél lokalizált *ilv*- és a 86 percnél előforduló *rha*-gének a legelsőnek replikálódó lokuszok közé tartoznak. A genetikai térképen a replikáció kezdő és befejező pontjának meghatározásához szinkronizált sejteknél a specifikus génlokuszok szekvenciális mutagenezisének módszerét alkalmazták. Az adatok szerint a kiinduló- és a végpont a 86, ill. a 32 percnyi lokuszoknak felel meg. Eszerint a kétirányú replikáció kiindulási pontjának meghatározásakor talált szimmetriatengely közel helyezkedik el ahhoz a szimmetriatengelyhez, melyet a géncsoportoknak a térképen elfoglalt helyzete alapján spekulatív úton állapítottak meg. Ennek a két egymástól független paraméternek az egybevágása még inkább megerősíti, hogy az

E. coli kromoszómája két félgenomra osztható, melyek funkcionális és topológiai szempontból komplementerek.

Érdekes módon a DNS-replikáció végpontja a 32 percnél a térkép leghosszabb, „néma" régiójának területére esik. Elképzelhető, hogy e régió DNS-ének nagy része az osztódó nukleoidmembrán komplex strukturális organizációjának fenntartására használódik el. Az is figyelemre méltó tény, hogy az *E. coli* térképezett génjeinek közel a fele (47%), de ténylegesen valamennyi a makromolekuláris szintézishez szükséges gén a 72–5 percig terjedő szakaszon, a replikáció kezdőpontjának 86 perce körül csoportosul. Mindez evolúciós szempontból teljesen érthető, minthogy a genomnak pontosan ez a része az, mely a gyors növekedés és a DNS-replikációs ciklusok többszörös kezdeményezése alkalmával legtöbb másolatban van jelen.

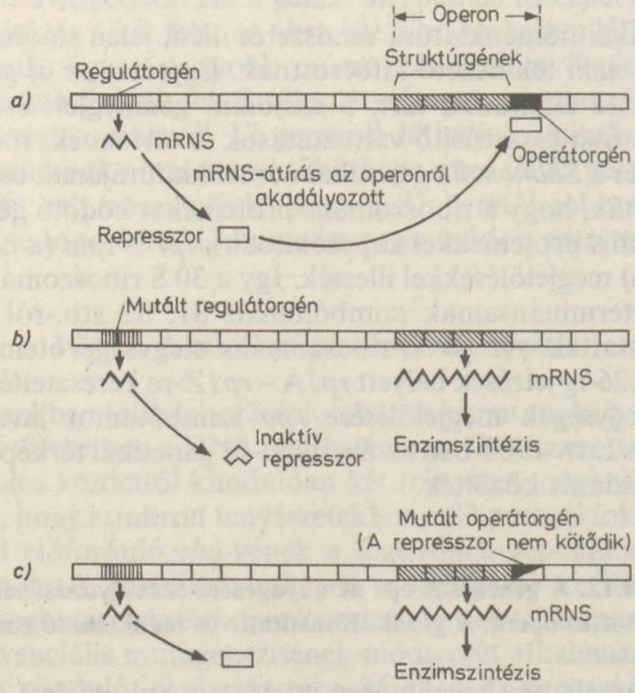
1.34.11. A gének nevezéktana

Ami a genetikai nómenklatúra rendszerét illeti, jelen stádiumában még egyáltalában nem tekinthető kiforrottnak. Egyrészt az új génszimbólumok bevezetése állandóan tart, a szinonim génmegjelölések száma is tetemes, másrészt ésszerűsítő változtatások is történnek, többek között pl. az *E. coli* és a *Salmonella* genetikai nómenklatúrájának összehangolására. Javasolták, hogy a riboszomális proteineket kódoló géneket *rps* (a kis riboszomális proteinekkel kapcsolatban), *rpl* és *rpm* (a nagyobbakra vonatkozóan) megjelölésekkel illessék. Így a 30 S riboszomális alegységproteinek determinánsainak szimbólumait S1, S2 stb.-ről *rps*A, *rps*B stb.-re változtatták. Az 50 S riboszomális alegységproteinek determinánsait L1–L26-ig jelzések helyett *rpl*A – *rplZ*-re keresztelték. Az RNS-polimeráz-alegységek megjelölésére *rpo* szimbólumot javasoltak stb. BACHMANN és LOW 1980-ban az *E. coli* K-12 genetikai térképének további javított kiadását közölték.

1.34.12. A gének szerepe az anyagcsere szabályozásában. Regulátor és operátor gének. Konstitutív és indukálható enzimek

Azt a gént, amely egy meghatározott protein (pl. enzim) struktúráját determinálja, struktúrgénnek nevezzük. A struktúrgén működése az enzimszintézist lehetővé tevő mRNS produkcióján át nyilvánul meg, és szoros szabályozásnak van alávetve. A DNS-en, a struktúrgének alkotta kisebb csoportok közvetlen szomszédságában, a működtetésükért felelős specifikus lokuszokat találhatjuk. Ez utóbbiak között egy ilyennek ope-

rátor a neve. Bizonyos körülmények között a sejtben citoplazmatikus anyagok, ún. represszorok jelennek meg. Ha az operátorgén a ránézve specifikus represszorokat megköti, úgy a vele szomszédos struktúrgének inaktívvá válnak és róluk mRNS átírása nem megy végbe. Számos esetben azok a strukturális gének, melyek koordinált enzimek sorát (pl. egy bizonyos anyagcsereút enzimeit) determinálják, a DNS-en összefüggő szekvenciát alkotnak és egyetlen velük szomszédos operátorgén ellenőrzése alatt állanak. Az ilyen operátorral összekötött génszekvenciát operonnak nevezzük. A sejt minden egyes represszormolekula-típusát egy megfelelő struktúrgén determinálja. A represszor anyagok produkciójáért felelős gének a regulátorgének. Az operátor- és a regulátorgének kimutatása mutáns alakokban válik lehetővé. Így pl. a mutált operátorgén olyan állapotba mehet át, melyben represszorát már képtelen lesz megkötni. Következésképpen az operon „derepresszálttá" válik és folyamatosan, minden körülmények között működni fog.



151. ábra

Az enzimszintézis genetikai szabályozása. A regulátorgén terméke a represszor, hozzákötődik az operátorgénhez és megakadályozza az operon működését. Mutáció mind az operátor, mind a regulátorgénben a represzsió felfüggesztését eredményezi és enzimszintézishez vezet. Az enzimtermelés induktorai általában azzal indíják el a szintézis folyamatát, hogy a represszorokat inaktiválják. A bioszintetikus enzimek visszacsatolásos repressziója esetében viszont a represszor normális körülmények között inaktív, de a bioszintetikus végtermékek aktiválják

A regulátorgén mutációi gyakorta olyan fenotípusokat eredményeznek, melyek a megfelelő operátorgén mutációihoz hasonlítanak. A mutált regulátorgén ugyanis képtelenné válhat a specifikus represszor produkciójára. Ebből kifolyólag a szakadatlanul derepresszált fenotípus jelenik meg. A regulátor- és az operátorgén mutációit azonban a normál és a mutált gént együttesen viselő diploid sejtek viselkedését tanulmányozva meg lehet különböztetni. Ilyen diploidokban ugyanis mindig a derepresszált állapot a domináns akkor, ha a mutáció az operátorgént változtatta meg. Amennyiben a mutáció a regulátorgént inaktiválta, úgy a derepresszált állapot recesszív lesz. A *151.a.-c. ábra* a fentebb közöltekről áttekintő képet nyújt.

A mikroorganizmusok sejtjei normális körülmények között intermediereket vagy ezek alegységeit feleslegben nem termelnek, ezek felhalmozódása a sejtben nem észlelhető, minthogy az anyagcsere-folyamatok útjai koordináltak és szabályozottak. Az anyagcsere egyes reakcióinak szabályozása nemcsak a sejt teljes reakcióhálózatának, hanem a környezet egyes tápanyagai koncentrációjának relációjában is megtörténik. Így pl. ha egy, a környezetben csak nyomokban előforduló szénforrás mennyisége hirtelen megnövekedik, úgy fokozódik azoknak az enzimeknek a mennyisége és aktivitása is, melyek a kérdéses anyag katabolizmusához szükségesek. Ugyanakkor viszont, ha bizonyos építőelemek, pl. aminosavak mennyisége hasonlóan megnövekedik, úgy az ezek bioszintéziséhez szükséges enzimek mennyisége és aktivitása már érthető módon csökkenni fog. Az enzimszintézis és -aktivitás szabályozása az anyagcsereutak durvább és finomabb szintű ellenőrzését biztosítja. Így pl. az enzimaktivitás gátlása az anyagcsereút végtermékével az ellenőrzés finom mechanizmusának számít, mivel ennek révén a kérdéses úton a szén áramlásának kontrollálása gyors és pontos. Ezzel szemben ugyanazzal a végtermékkel az enzimszintézis gátlása már az aktivitás ellenőrzésének durva mechanizmusa. Ez esetben ugyanis a már meglevő enzimmolekulák működésüket mindaddig tovább folytatják, mígnem a további osztódások folyamán sejtkoncentrációjuk teljesen fel nem hígul. Igaz ugyan, hogy a szükségtelen enzimszintézis már közvetlenül és az első lépésben leáll.

Gyakorlatilag azok a mikroorganizmusok rendelkeznek a leggazdagabb enzimkészlettel, melyek csupán a legfontosabb sókat, így nitrogénforrásként ammónium-szulfátot, szénforrásként egyszerű cukrokat igényelnek, vagy anorganikus szénforrást tartalmazó tápközegekben is képesek szaporodni. E mikrobák szervezetük valamennyi sejtfrakcióját a legegyszerűbb tápforrásokból építik fel. Mindamellett a baktériumsejt, éppen parányi méretei következtében, csak korlátozott számú, kb. 10^6 enzimmolekulát tartalmazhat. E számon belül az egyes enzimtípusok

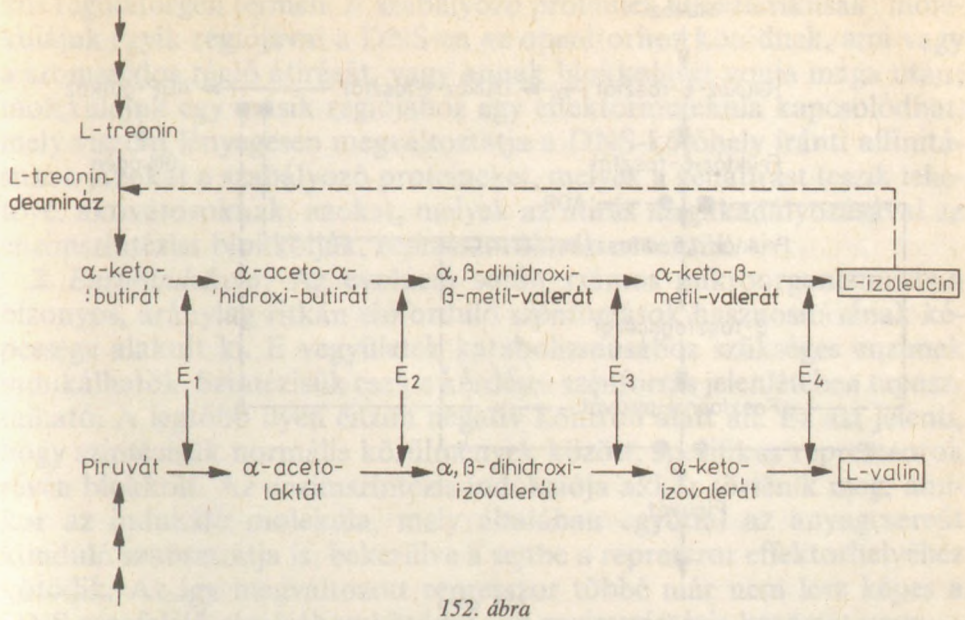
akár több ezer azonos molekulával is képviseltethetik magukat. Egy másik kalkuláció szerint az átlagsejt százezer enzimmolekulát tartalmazhat és ezek ezerötszáz-kétezer különböző reakciót katalizálnak. Átlag ötventől száz enzimmolekula jut egy-egy katalitikus folyamatra és az egyes enzimmolekulák percenként ezertől egymillió azonos reakcióban vehetnek részt. Az enzimek egy része nem marad a sejt belső terében, hanem mint pl. sok hidroláz (proteázok, észterázok, foszfatázok, amilázok és ribonukleázok), a membránon és a falon keresztül a sejt környezetébe kerül, ahol mint extracelluláris enzim fejti ki aktivitását. Szintézisük részben a membránon vagy a mezoszómán történik, s innen közvetlenül jutnak az extracelluláris térbe. Az enzimek egy része a periplazmában foglal helyet, de a legtöbb a sejt belsejében, ahol az anyagcsere-folyamatokat katalizálják. Ezek együttesen az ún. intracelluláris enzimek. A sejtet frakcionálva utóbbiak vagy a membránhoz kötődve maradnak, vagy a citoplazmából szabad állapotban mutathatók ki (oldott enzimek).

A sejt által termelt egyes enzimek egy vagy több gén produktumai. Valamennyi baktériumfaj sejtjei, a környezeti feltételektől függetlenül, állandóan termelnek bizonyos enzimeket. Ezek a konstitutív enzimek. Másokat csak meghatározott környezeti viszonyok között produkálnak. Ezek az indukálható és represszálható enzimek, melyek a sejt környezeti viszonyaitól függő szabályozásnak és ellenőrzésnek vannak alávetve. Az indukálható (az induktor a represszort inaktiválja) enzimek termelését általában bizonyos tápanyagok jelenléte indukálja, és aktivitásuk az induktor katabolizmusával kapcsolatos. Így pl. az *E. coli* β-galaktozidázt csak laktóz (ill. ennek néhány strukturanalogonja) jelenlétében termel. Ez az enzim hasítja a laktózt és a konstitutív lélegző vagy fermetatív anyagcsereutakra tereli. Az ún. (visszacsatolással) represszálható enzimek a sejtalkotóelemek bioszintézisében vesznek részt, és szintézisüket a kérdéses anyagcsereút végtermékeinek akkumulációja gátolja.

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a baktériumok enzimatikusan nem tekinthetők stabilaknak: enzimkészletük állandó mennyiségi és minőségi változáson megy keresztül. Ezzel szemben a baktériumsejt enzimatikus potenciálját már relatíve stabilnak ítélhetjük, minthogy ezt az általános potenciált maga a sejt fajra jellemző öröklődési anyaga szabja meg.

1.34.13. Az enzimaktivitás szabályozása

1. *Az enzimek mint alloszterikus proteinek:* Számos esetben annak az enzimnek az aktivitását, mely valamely anyagcsereút egy kezdeti lépését katalizálja, az út végtermékei gátolják. Az ilyen gátlás nem az enzim szubsztrátkötő helyéért folyó versengéssel kapcsolatos, mivel általában

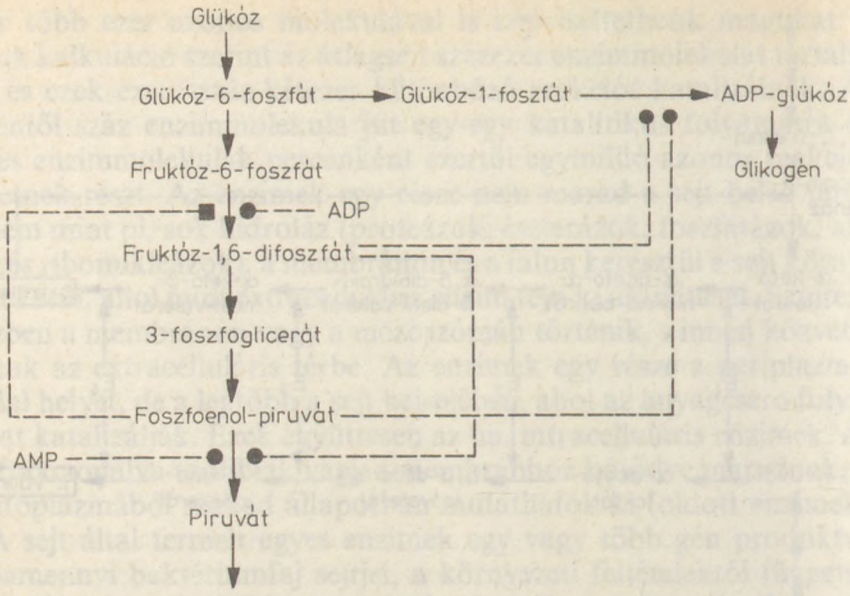


152. ábra

Az L-treonin-deamináz visszacsatolásos gátlása L-izoleucin révén (szaggatott vonal). Mint látható, az izoleucin és a valin bioszintézisének útjain négy közös enzim működik közre

a végtermék és a korai intermedierek (mint szubsztrátok) strukturálisan igen különbözők. Az ilyen gátlás inkább azt a tényt tükrözi, hogy az így szabályozott enzimek alloszterikusak: az enzim nem csupán a szubsztrátkötésre alkalmas katalitikus hellyel rendelkezik, hanem még egy vagy több más olyan hellyel is, ahol kicsiny szabályozó molekulák vagy effektorok megkötése válik lehetségessé. Az effektor megfelelő helyen kötődve az enzim komformáció-változását idézi elő és ezáltal a katalitikus hely szubsztrátra vonatkoztatott affinitása vagy csökken (alloszterikus gátlás), vagy éppen megnő (alloszterikus aktiválás). Az alloszterikus fehérjék általában polimerek. Bizonyos esetekben a felépítésben részt vevő alegységek egyformák, amikor is valamennyinek van egy katalitikus és egy effektor helye. Más esetekben az alegységek különbözőek. Ilyenkor az egyik típusú alegységnek csupán katalitikus, a másiknak csupán effektor helye van.

2. *Visszacsatolásos („feed back") gátlás.* A mikroorganizmusok evolúciója során a bioszintetikus utakon végbemenő szénáramlás szabályozásának a lehető legprecízebben működő mechanizmusa jött létre. A végproduktum alloszterikusan gátolja az út első, de csakis az első enzimét. Például az izoleucin bioszintézisének első lépése az L-treonin átalakítása α-keto-butiráttá *(152. ábra)*. Ezt a lépést a treonin-deamináz katalizálja, amit csakis az L-izoleucin (más vegyület nem) képes allosz-



153. ábra

Glükózhasznosítás szabályozása az alloszterikus aktiváció (– – – ●) és az alloszterikus gátlás (– – – ■) kombinációja révén (STANIER és munkatársai, 1976)

rikusan és specifikusan gátolni. A végtermék az út többi négy enzimét nem befolyásolja.

3. *Alloszterikus aktiválás:* Bizonyos esetekben a sejt számára előnyösebb egy vég- vagy köztitermékre aktiválni, mintsem egy enzimet gátolni. Az *E. coli*nál, például a glükózlebontás során, a glükóz-6-foszfát és a foszfoenol-piruvát intermedierek túltermelése a glükóz egy részének a glikogénszintézis útjára terelését eredményezi. Ez együtt jár annak az enzimnek az alloszterikus aktiválásával, mely a glükóz-l-foszfátot ADP-glükózzá *(153. ábra)* alakítja.

4. *Kooperativitás:* Számos polimer enzim egynél több szubsztrátkötő hellyel rendelkezik. Ezek az enzimek a szubsztrátmolekulákkal kooperatív kölcsönhatásokat mutatnak. Mit jelent ez? Ha az egyik katalitikus helyhez szubsztrátmolekula kapcsolódott, akkor ez a kötés megnöveli a többi katalitikus hely affinitását a további szubsztrátmolekulákhoz. E kölcsönhatás eredményeként a szubsztrátkoncentráció aritmetikus növelésével a katalitikus aktivitás exponenciális növekedése tart párhuzamot.

1.34.14. Az enzimszintézis szabályozása

1. *Szabályozó proteinek:* Mint a bevezetőben láthattuk, az enzimszintézis szabályozó proteinek ellenőrzése alatt áll, melyek mindegyikét specifi-

kus regulátorgén termeli. A szabályozó proteinek alloszterikusak: molekulájuk egyik régiójával a DNS-en az operátorhoz kötődnek, ami vagy a szomszédos régió átírását, vagy annak blokkolását vonja maga után; molekulájuk egy másik régiójához egy effektormolekula kapcsolódhat, mely viszont lényegesen megváltoztatja a DNS-kötőhely iránti affinitásukat. Azokat a szabályozó proteineket, melyek a génátírást teszik lehetővé, aktivátoroknak, azokat, melyek az átírás megakadályozásával az enzimszintézist blokkolják, represszoroknak nevezzük.

2. *Enzimindukció:* Az evolúció során számos mikroorganizmusban bizonyos, aránylag ritkán előforduló szénforrások hasznosításának képessége alakult ki. E vegyületek katabolizmusához szükséges enzimek indukálhatók. Szintézisük csak a kérdéses szénforrás jelenlétében tapasztalható. A legtöbb ilyen enzim negatív kontroll alatt áll. Ez azt jelenti, hogy szintézisük normális körülmények között, specifikus represszorok révén blokkolt. Az enzimszintézis indukciója akkor történik meg, amikor az indukáló molekula, mely általában egyúttal az anyagcsereút kiinduló szubsztrátja is, bekerülve a sejtbe a represszor effektorhelyéhez kötődik. Az így megváltozott represszor többé már nem lesz képes a DNS megfelelő régiójához kötődni: az enzimszintézis kezdetét veszi.

Néhány esetben az indukálható enzimek pozitív kontroll alatt állnak. Ilyenkor a DNS-hez nem represszor, hanem aktivátor protein kötődik. Magát az aktivátort az indukáló molekula az effektorhelyhez kapcsolódva aktiválja. Ezután az átírás végbemehet.

3. *Végtermék-represszió:* A bioszintetikus utak szabályozása a katabolikus utak szabályozásától lényegesen eltér. Szemben azzal a mechanizmussal, amikor az enzimszintézis gerjesztését az anyagcsereúthoz szükséges kiinduló szubsztrát jelenléte váltja ki, itt az enzimszintézis represszálódik akkor, amikor az anyagcsereút végterméke feleslegben termelődik, vagy mint tápanyag felhasználhatóvá válik. Így normális körülmények között a bioszintetikus enzimek represszorai nem képesek a DNS operátorhelyeihez kötődni csupán akkor, ha specifikus effektorukat, vagyis a kérdéses anyagcsereút végtermékét már megkötötték.

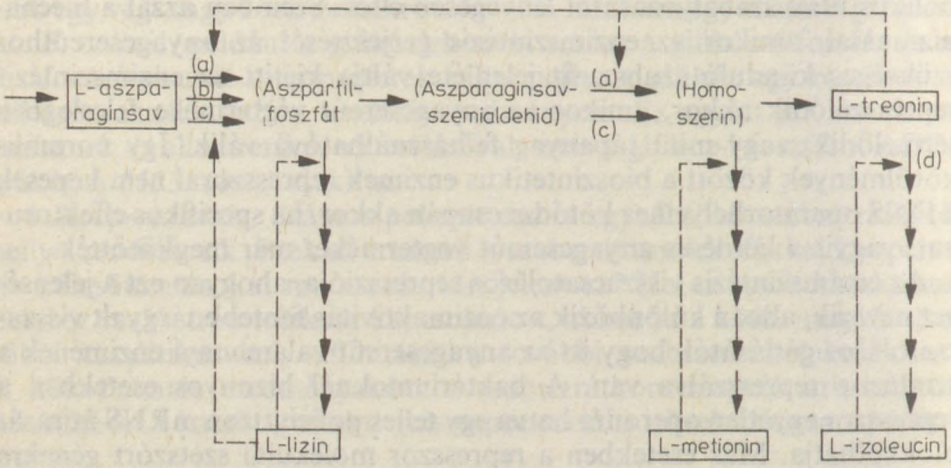
Az enzimszintézis visszacsatolásos represszója, ahogyan ezt a jelenséget nevezik, abban különbözik az enzimaktivitás fentebb tárgyalt visszacsatolásos gátlásától, hogy itt az anyagcsereút valamennyi enzimének a szintézise represszálva van. A baktériumoknál bizonyos esetekben a represszor egyetlen operonra hatva egy teljes policisztron mRNS átírását blokkolhatja. Más esetekben a represszor molekulái szétszórt génekre hatnak, melyek mindegyikének megvan a maga saját (azonban azonos) operátorhelye.

4. *Katabolitrepresszió:* A katabolikus utak számos enzime katabolitrepressziónak nevezett szabályozási folyamatnak van alávetve. Ha a

sejtet gyorsan metabolizálható energiaforrással pl. glükózzal látjuk el, úgy megszűnik azoknak az enzimeknek a szintézise, melyek alternatív energiaforrások degradációjában vesznek részt. Így a β-galaktozidáz (mely a laktóz hidrolíziséhez szükséges) szintézise megszűnik, ha glükóz van jelen. Valamennyi katabolitrepressziónak alávetett enzim szintézise egy protein, a CAP (*„catabolite activator protein"*) pozitív kontrollja alatt áll. A CAP (= CRP) a katabolitrepresszálható enzimeket irányító gének szomszédságában a DNS-hez kötődik és aktiválja a gének átírását. Magát a CAP-ot viszont a 3′,5′-ciklusos AMP aktiválja. Amikor egy gyorsan metabolizálható szubsztrát, mint amilyen a glükóz, a sejtmembránhoz kötődik, a ciklusos AMP belső koncentrációja csökken és a sejtben már szükségtelenné vált katabolitrepresszálható enzimek szintézise megáll.

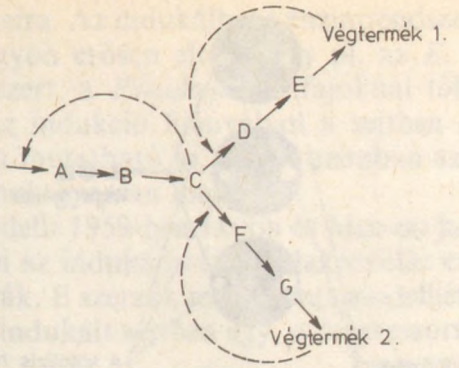
1.34.15. Az elágazó bioszintetikus utak szabályozásának módjai

Számos bioszintetikus út elágazik, mikor is mindegyik ág különböző nélkülözhetetlen végtermékekhez vezet. Az aszparaginsav például kiindulópontja annak az útnak, mely elágazva a lizin, a metionin, a treonin és az izoleucin szintézisét eredményezi *(154. ábra)*. Nyilvánvalóan végzetes lehetne, ha ezen végtermékek egyike vagy másika feleslegben felhalmozódva az aszpartáttal kiinduló teljes utat kikapcsolná. A sejtnek e



154. ábra

Egy elágazó anyagcsereút szabályozása visszacsatolásos gátlással (szaggatott vonal). (a), (b), és (c) izofunkcionális aszpartokinázok. Az (a) és (c) az út harmadik lépését is katalizálják. A (d) L-treonin-deamináz. Az enzimszintézis visszacsatolásos represszió az ábrán nem szerepel (STANIER és munkatársai, 1976)



155. ábra

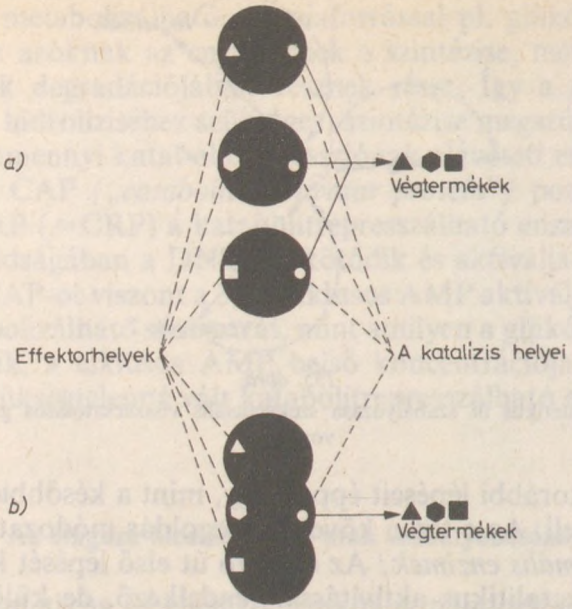
Egy elágazó bioszintetikus út szabályozása szekvenciális visszacsatolásos gátlással (szaggatott vonalak)

szintetikus út korábbi lépéseit éppen úgy, mint a későbbieket, egyaránt szabályoznia kell. Az e téren követett megoldás módozatai:

1. *Izofunkcionális enzimek:* Az elágazó út első lépését két vagy több, ugyanazzal a katalitikus aktivitással rendelkező, de különböző enzim katalizálja. Például az *E. coli*ban 3 aszpartokináz is jelen van. Ezeket a *154. ábrán a, b* és *c* betűk jelzik. Az *a* és *c* enzimek az út harmadik lépését is katalizálják, vagyis az aszparaginsav-szemialdehidet homoszerinné redukálják. Az *a* enzimet a treonin mind gátolja, mind represszálja. A *b* enzimet a metionin represszálja. A *c* enzimet a lizin mind gátolja, mind represszálja. Így, ha az elágazó út három végtermékének egyike már megjelenik, úgy a szénáram a közös úton arányosan csökken. A *154. ábrá*val kapcsolatban meg kell jegyezni, hogy az út egyes elágazásait a megfelelő végproduktumok külön-külön ellenőrzik.

2. *Szekvenciális visszacsatolásos gátlás:* Az elágazó utak korai lépéseinek egy második szabályozási lehetőségét a *155. ábra* mutatja be. Itt két (**1** és **2**) végtermék a saját anyagcsereút leágazásának első lépéseit gátolja, melynek következtében egy közös intermedier halmozódik fel. Az utóbbi vegyület azután mint *„feed back inhibitor"* szerepel a közös út első lépésének gátlásában.

3. *Összhangba hozott és kumulált visszacsatolásos gátlás:* Ismét más esetekben az az enzim, amely az elágazó út első lépését katalizálja, két vagy több effektorhellyel rendelkezik *(156. ábra)*, melyek mindegyike más-más végproduktumot köt meg. Az összehangolt visszacsatolásos gátlás esetében ahhoz, hogy az enzim egyáltalán gátolva legyen, valamennyi effektorhely elfoglalása szükséges. A kumulatív visszacsatolásos gátlásnál már egy effektorhely elfoglalása is valamelyik végtermékkel részleges gátlást idéz elő: egynél több végtermék kötődésének hatása additív. A két mechanizmus közül az utóbbi a hatékonyabb.



156. ábra

Az enzimműködés visszacsatolásos gátlásánál szerepet játszó kompenzáló faktorok lehetséges modelljei. *a)* Izoenzimek. E modell esetében a végtermékek szintéziséhez vezető út első lépését három különböző enzim molekulái katalizálják. Mindhárom enzimnek azonban különböző végtermékekkel reagáló effektorhelye van. *b)* Kooperatív (kumulatív) gátlás. Ennek a modellnek megfelelően már egyetlen enzimmolekulán is három effektorhely van és a teljes gátlás mindaddig nem következik be, amíg a három végtermék feleslegben nincs jelen

A mikrobiális szabályozási rendszerek diverzitása: A mikrobák különböző csoportjaiban ugyanazon út szabályozására is különböző mechanizmusok alakultak ki. A *154. ábrán* bemutatott aszpartát-úton például, a bélbaktériumok esetében az aszpartokináz szabályozása külön-külön gátolható izofunkcionális enzimek révén valósul meg. Ezzel szemben a *Pseudomonas*oknál összhangba hozott visszacsatolásos gátlással. Mindez azt mutatja, hogy maguk a szabályozó rendszerek a mikrobák evolúciója későbbi szakaszában fejlődhettek ki.

A fenti rövid, rendszeres áttekintés után a bakteriális anyagcsere szabályozásának néhány mechanizmusát közelebbről is szemügyre vesszük.

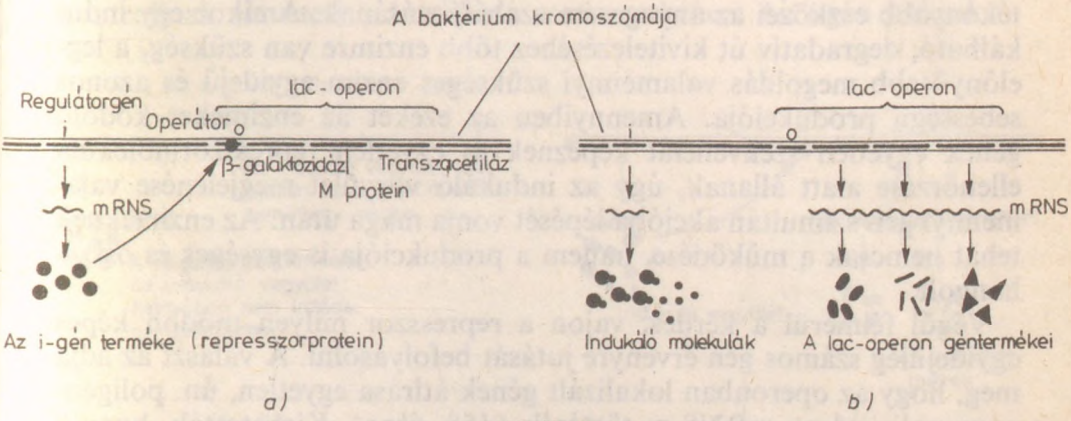
1.34.16. A lac-operon működése. A katabolitrepresszió

A baktériumokban kimutatott indukálható enzimrendszerek túlnyomó többsége a környezetben viszonylag ritkán előforduló szénforrásokra hat és olyan közti termékeket eredményez, melyek már bevonhatók a sejt

más anyagcsereútjaira. Az indukálható enzimrendszerek száma a különböző fajoknál nagyon erősen eltérő. Így pl. az *E. coli*nál mintegy 30 indukálható rendszert, a *Pseudomonas* fajoknál több százat észleltek. Számos esetben az indukció hiányában a sejtben csak nagyon kevés indukálható enzim mutatható ki, amint azonban az indukáló anyagok megjelennek, számuk gyorsan megnő.

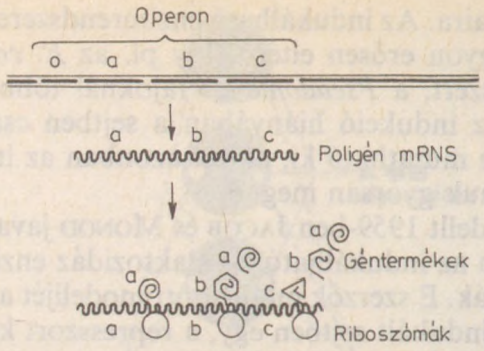
A represszormodellt 1959-ben JACOB és MONOD javasolták. Alkalmazását az *E. coli*ban az indukálható β-galaktozidáz enzimmel kapcsolatban tanulmányozták. E szerzők módosított modelljét a *157. ábra* mutatja be. Eszerint az indukált sejtben egy, a represszort kódoló gén fordul elő.

A represszorgén térbelileg nem szükségszerűen kapcsolódik az általa kontrollált génekhez. Kifejtheti hatását akkor is, ha egy episzómán, így pl. az F′-faktoron helyezkedik el. Az *E. coli*nál a β-galaktozidáz-szintézis gátlásáért egy regulátorgén a felelős. Ez a gén, az ún. *i*-gén, a represszorprotein szintézisét indukálja. Indukálható rendszerekben állandóan folyik represszorproteinek szintézise, és az indukáló vegyületek ezekhez alloszterikusan kötődnek. A represszor és az induktor kapcsolódása konfigurációs változásokkal jár, aminek következtében a represszor az enzimszintézist többé már nem lesz képes megakadályozni. A β-galaktozidáz represszorának molekulasúlya 150 000 és 200 000 között van. Ez az anyag a DNS-fonalon szelektíven a β-galaktozidáz, pontosabban a *lac*-operon operátorlokuszához (*O*-lokuszhoz) kötődik. Az operátorlokuszok általában és térbelileg, mindig szorosan az ellenőrzésük alatt álló



157. ábra

a) Az indukáló anyag hiányában az i-gén termékei az operátorlokuszhoz kapcsolódnak és ezzel megakadályozzák, hogy a teljes operon genetikai információja mRNS-re íródhasson át. *b)* Az indukáló anyag jelenlétében az i-gén termékei már nem képesek az operátorlokuszhoz kötődni, minthogy az indukáló anyaggal kapcsolódva alloszterikusan megváltoztak. Következésképpen a lac-operon nincs többé represszálva, így a gének átírása és lefordítása már végbemehet

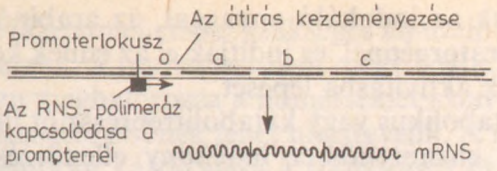


158. ábra

A poligén mRNS átírása és lefordítása. Az a, b és c génproduktumokért felelős gének genetikai információja egyetlen mRNS-fonalra íródik át. E poligén mRNS-információja a transzláció során három különböző, egymástól szeparált polipeptid szintézisét teszi lehetővé

génekhez kapcsolódnak. Az indukálható β-galaktozidázzal végzett megfigyelések már korán kimutatták, hogy a laktóz vagy a megfelelő analogonok, nem csupán a β-galaktozidáz, hanem két másik protein, az *M*-protein vagy laktóz-permeáz és a β-galaktozid-transzacetiláz (melynek a laktóz hasznosításában nincs közvetlen szerepe) indukciójáért is felelősek. A géntérképezés során derült ki, hogy az ezeket kódoló gének szorosan kapcsolódnak, és végső soron valamennyien a lac-represszor ellenőrzése alatt állanak. Ezek a gének az operátorgénnel együtt egyetlen koordinált egységet (operon) alkotnak. Később más rendszerek különböző operonjait sikerült kimutatni. Az operonok nyilvánvalóan a leghatékonyabb eszközei az anyagcsere szabályozásának. Amikor egy indukálható, degradatív út kivitelezéséhez több enzimre van szükség, a legelőnyösebb megoldás valamennyi szükséges enzim egyidejű és azonos sebességű produkciója. Amennyiben az ezeket az enzimeket kódoló gének egyetlen szekvenciát képeznek és egyetlen represszormolekula ellenőrzése alatt állanak, úgy az indukáló vegyület megjelenése valamennyi gén szimultán akcióba lépését vonja maga után. Az enzimeknek tehát nemcsak a működése, hanem a produkciója is egységes és összehangolt.

Végül felmerül a kérdés, vajon a represszor milyen módon képes egyidejűleg számos gén érvényre jutását befolyásolni. A választ az adja meg, hogy az operonban lokalizált gének átírása egyetlen, ún. poligén- vagy policisztron mRNS-re történik *(158. ábra)*. Kimutatták, hogy a genomban a *lac*-operon mRNS-e szintézisének kezdeményezését kódoló hely mind a represszor-, mind az operátorgének lokuszaitól elkülönülő régiót képez. Ezt a lokuszt *„promoter"* vagy *P*-génnek nevezték el. Géntérképezési tanulmányok szerint a *P*-gén a represszor (regulátor) és az

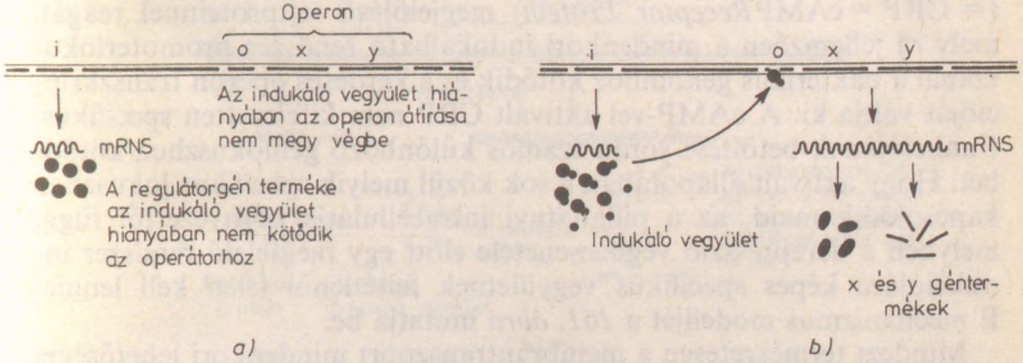


159. ábra

A promoterlokusznak mint az RNS-polimeráz kapcsolódási helyének modellszerű ábrázolása. Jóllehet az enzim ezen a ponton kötődik, mégis a genetikai üzenet leolvasása az operon teljes hosszában végbemegy

operátorlokuszok között helyezkedik el. A *P*-génben bekövetkezett mutációk redukálják a *lac*-operonról leváló poligén mRNS-ek számát és szintézisének sebességét. A promotergén sajátos lokációja arra utal, hogy a *lac*-operon transzkripciója az operátor *(O)*-gén előtt kezdődik. Feltételezik, hogy a genomban *O*-gén mellett két különálló hely van, mégpedig egyrészt a promotergén, mely az átírás kezdeményezésének és a DNS-től függő RNS-polimeráz kötődésének is a helye, másrészt az *O*-gén másik oldalán is van egy hely, mely viszont a riboszomális szinten történő transzláció kezdeményezését irányítja. A *159. ábra* ezt a modellt szemlélteti. Számos bizonyítékunk van arra vonatkozóan, hogy a genetikai szinten végbemenő ellenőrzésnek ez a megoldása szélesen elterjedt lehet.

A katabolikus utak „pozitív kontroll" alatt álló indukciójának *(160. ábra)* jó példája az arabinóz degradálásának útja az *E. coli*ban. E vegyület lebontásában szerepet játszó enzimek szintézise hasonló a negatív kontrollnak alávetett indukálható rendszerekéhez. Az *i*-gén produktu-



160. ábra

A pozitív kontroll bemutatása. Az indukáló anyag hiányában az i-gén termékei nem kötődhetnek az operátorlokuszhoz és ilyen körülmények között az operon represszálva marad. Ha viszont az i-gén produktumai az indukáló anyaggal reakcióba lépnek, úgy már kapcsolódásuk az operátorral is lehetővé válik és az *x*- és *y*-gének átírásának és lefordításának indukciója megtörténik

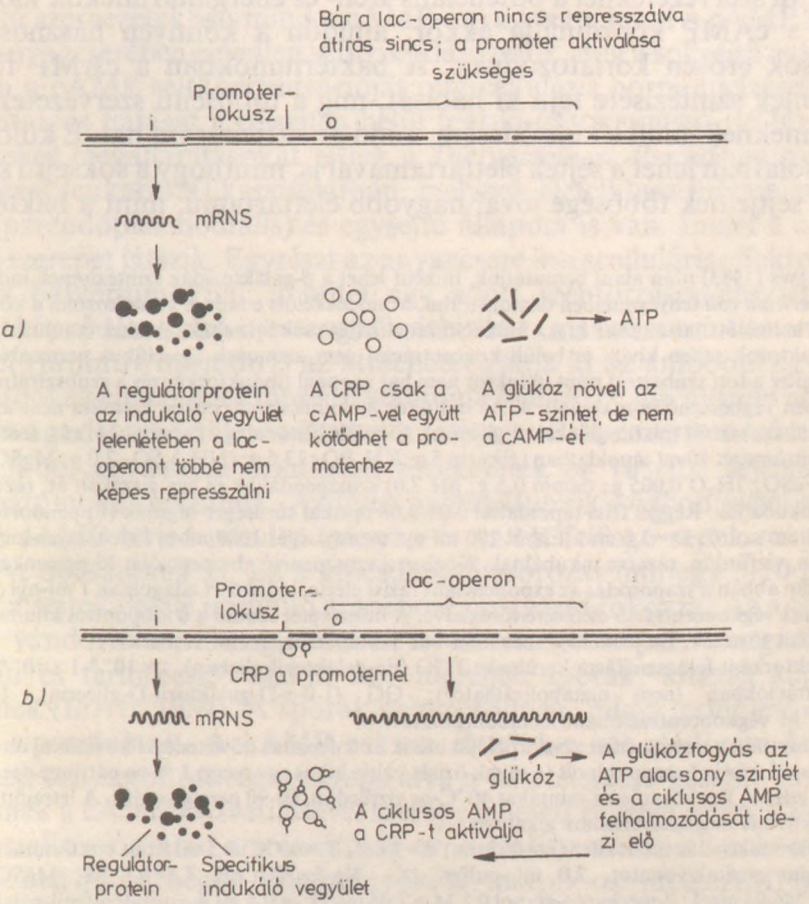
mai azonban csak az indukáló anyaggal, az arabinózzal kapcsolódva reagálnak az operátorgénnel, és indítják el az ennek kontrollja alatt álló strukturális gének aktivitásba lépését.

Ami az ún. katabolikus vagy katabolitrepressziót illeti, ez a baktériumokban számos enzimrendszer hatékony ellenőrzési mechanizmusa. Mint láthattuk, ha az *E. coli* olyan tápközegben szaporodik, mely mind glükózt, mind laktózt egyaránt tartalmaz (az utóbbi a β-galaktozidáz induktora), úgy a glükóz megakadályozza a β-galaktozidáz produkcióját. Ezt a jelenséget nemcsak a glükóz, hanem számos más szénforrás esetében is megfigyelték. Úgy látszik, hogy az egyes szénforrások attól függően, hogy moláris mennyiségük milyen mértékű sejtszaporodást tesz lehetővé, közvetett, indirekt módon katabolikus represszorként hathatnak. Más szóval, ha a sejt egy adott szénforrást igen nagy hatékonysággal képes felhasználni, úgy ez a vegyület az indukálható rendszerek hatékony represszoraként is szerepel.

Az anyagcsere-rendszerek katabolikus represszió ja kapcsolatban van a sejtekben végbemenő ATP akkumulációjával, mely viszont összefügg a felhasználásra kerülő szénforrások hozzáférhetőségével és értékesítésük hatékonyságával. Ezt a jelenséget a fenti példával, vagyis azzal az esettel magyarázhatjuk meg, amikor a glükóz még a laktóz jelenlétében is képes a β-galaktozidáz szintézisét represszálni. A mikroba szaporodó tenyészetében a glükóz felhasználásával jelentős mennyiségű ATP keletkezik. A glükózutánpótlás kimerülésének pillanatától kezdve az ATP-szint csökkenni kezd és 3′5′-ciklusos AMP akkumulálódik. Ilyen körülmények között – amennyiben a laktóz jelen van – a cAMP, közvetve, a pozitív kontroll-mechanizmusnak megfelelően az indukálható β-galaktozidáz derepresszióját váltja ki. Ennek során a ciklusos AMP a CAP (= CRP = cAMP *Receptor Protein*) megjelölésű sejtproteinnel reagál, mely rá jellemzően a mindenkori indukálható rendszer promoterlokuszánál a bakteriális genomhoz kötődik és a kérdéses operon transzkripcióját váltja ki. A cAMP-vel aktivált CRP nem kifejezetten specifikus. Funkciójának betöltése során számos különböző génlokuszhoz kötődhet. Hogy aktivált állapotában a sok közül melyik specifikus lokuszhoz kapcsolódik majd, az a pillanatnyi intracelluláris környezettől függ, melyben a derepresszió végbemenetele előtt egy megfelelő rendszer indukciójára képes specifikus vegyületnek feltétlenül jelen kell lennie. E mechanizmus modelljét a *161. ábra* mutatja be.

Mindezt természetesen a membrántranszport mindenkori lehetőségei is mélységesen befolyásolják. A laktóz transzportját, melyről már megemlékeztünk (lásd 175. old.) pl. a hőmérséklet is módosítja. A laktóz-operon *y*-génje révén kódolt és a laktóz transzportjáért felelős *M* protein a belső membránban helyezkedik el. Az olyan sejtekben, melyeket a

membránlipidjeik fázisátmenetéhez szükséges kiinduló hőmérséklet alatti hőfokon inkubálnak, a transzport nem megy végbe. A sejtek zsírsavösszetétele döntően meghatározza a hőmérséklet azon értékét, amelynél a transzport csökkenését elsőnek lehet megfigyelni. A membránszintézis hiánya vagy a membrán károsodása a transzport- és a β-galaktozidáz indukciójában egyenlőtlen mérvű eltolódást idéz elő. A laktóz-transzportrendszer működése a membránlipidek rendezett–rendezetlenségi állapotától függ. Feltételezhetően a membrántörténések mind a transz-



161. ábra

A katabolikus represszió modellje. *a)* Jóllehet az i-génnek a lac-operonhoz adresszált termékét az indukáló vegyület (mely már jelen van) inaktiválja, mégis – glükóz egyidejű jelenlétében – a lac-operonról transzkripció alig megy végbe, mivel ATP állandóan és magas szinten szintetizálódik, és ennek következtében a ciklusos AMP-felhalmozódása, továbbá a CAP (CRP) aktiválása elmarad. *b)* Amint a glükóztartalék kimerült, a ciklusos AMP akkumulálódni kezd. Ekkor a CAP (CRP) aktiválódik, majd a promoterlokuszhoz kötődik és megindítja a lac-operon transzkripcióját

portrendszer szubsztrátkötő, ill. transzlokációs, mind az energetikailag kapcsolt reakciók lépéseit egyaránt érintik.*

1.34.17. A ciklusos AMP jelentősége a prokariotáknál és eukariotáknál

cAMP egyaránt előfordul prokariotáknál és eukariotáknál, a magasabb rendű növényeknél és az állatoknál. E szervezeteknél e ciklusos nukleotid hatásmechanizmusát és működését tanulmányozva hasonlóságokat és eltéréseket találhatunk. Úgy tűnik, mind a baktériumoknál, mind a soksejtű szervezeteknél a potenciális szén- és energiatartalékok mozgósítását a cAMP koordinálja akkor, amidőn a könnyen hasznosítható források erősen korlátozódnak. A baktériumokban a cAMP főleg a proteinek szintézisére fejti ki hatását, míg a többsejtű szervezetekben a proteineknek mind a képződésére, mind az aktivitására hat. E különbség kapcsolatban lehet a sejtek élettartamával is, minthogy a soksejtű szervezetek sejtjeinek többsége jóval nagyobb élettartamú, mint a baktérium-

*Drews (1983) után alant bemutatjuk, miként lehet a β-galaktozidáz szintézisének indukcióját az *Escherichia coli* tenyészeteiben demonstrálni. Mindenekelőtt e tesztre vonatkozóan a következőket kell szemelőtt tartanunk: 1. Az indukció kinetikáját csak ép sejtekkel lehet tanulmányozni. 2. Az induktorok sejten kívüli és belüli koncentrációi nem azonosak (specifikus permeabilitás). 3. A közeghez adott szubsztrát mint induktor nem hat azonnal (induktorképzés a szubsztrátnak a sejt belsejében végbemenő bontásával). 4. Az induktor az indukálandó enzim számára nem feltétlenül megfelelő szubsztrát (pl. tio-galaktozil-glicerin). *E. coli* K12-törzs egy kacsnyi, 24 órás, ferdeagarról nyert sejttömegét 10 ml tápoldatban (glicerin 5 g; KH_2PO_4 13,6 g; $(NH_4)_2SO_4$ 2,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005 g; tiamin 0,5 g; pH 7,0) szuszpendálják és egy éjszakán át, ráztatva, 37 °C-on inkubálják. Reggel friss tápoldattal 0,05-0,08 optikai sűrűségre higítják (Eppendorf-fotométer; 578 nm szürő; D = 1,0 cm). Ebből 100 ml-nyi mennyiségét 1000 ml-es Erlenmeyer-lombikban, 37 °C-on, vízfürdőn, rázatva inkubálnak. Közben a szuszpenzió abszorpcióját 15 percenként mérik és, miután abban a szaporodás az exponenciális fázist elérte, induktort adagolnak 1 ml-nyi oldatban százszoros végkoncentráció elérésére törekedve. A mintavétel ezután a 0 időponttól kiindulva 5-10 percenként történik. Esetenként a reakciótérből 5-5 ml szuszpenziót vesznek.

Induktorként felhasználásra kerülnek: TGG (tio-galaktozil-glicerin), 1×10^{-4}-1×10^{-6} M végkoncentrációkban (nem metabolizálható!); GG (1-0-α-D-galaktozil-D-glicerin), 1×10^{-3}-1×10^{-4}M végkoncentrációban (metabolizálható!).

Egy mintában a szaporulat abszorpcióját mérik és a denzitás növekedését követik nyomon. Egy másikba először is 1 csepp toluolt (a sejtek lízisét váltja ki) és egy csepp 1 %-os nátrium-dezoxikolát oldatot adnak. Ezt követően a mintákat 40 °C-os vízfürdőn, 60-90 percig tartják. A létrejött lizátum enzimaktivitás meghatározáshoz alkalmas.

Az enzimaktivitás tesztekhez ($\lambda = 405$ nm; d = 1 cm; T = 40 °C) 0,5 ml lizált baktériumszuszpenziót, mint enzimkivonatot; 2,0 ml puffert (K-, Na-foszfát pH 7,5 0,1 M; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1mM = 246,05 mg/l; 2-merkapto-etanol 0,1 M = 7,05 ml/l); és 0,5 ml β-ortonitro-fenil-galaktozidot (5 mg/ml) alkalmaznak. A merkapto-etanolt közvetlenül a teszteljárás kezdete előtt adagolják. Miután az oldatokat a küvettában elegyítették az extinkciót 3 percen át 10-20 másodpercenként olvassák le (vakérték: deszt. víz). A β-galaktozidáz egy egységének az az enzimmennyiség felel meg, mely az adott feltételek között percenként 1nmol O-nitrofenolt szabadít fel. Az O-nitrofenol meghatározása fotometriás úton történik. Az eredmények értékelésénél, koordináta rendszerben, ordinátára az enzimaktivitás adatokat, abszcisszára a baktérium szaporulat denzitás mérési eredményeit viszik fel.

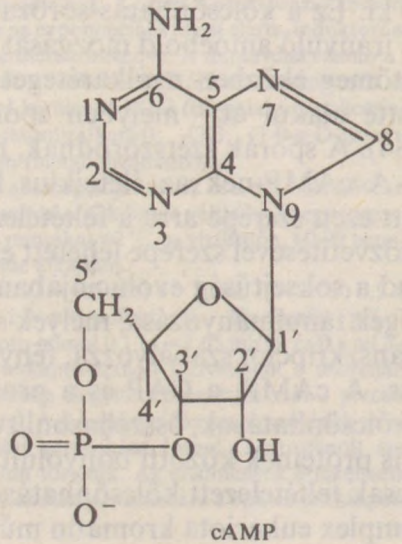
sejtek. Ezenfelül az egysejtű prokariotákban más a cAMP-anyagcsere ellenőrzése is, mivel itt hiányzik a szupercelluláris szabályozás és az integrált ellenőrzések sokasága. A baktériumokban a cAMP sejtkoncentrációját a sejt energetikai szükségletei szabályozzák. Ennek megfelelően szintje alacsony, ha az energiatermelés mértéke meghaladja a bioszintézisek energiaszükségletét. Ugyanakkor megfordítva, a cAMP szintje emelkedik, ha a baktérium szénhiányban szenved. Ezzel szemben a soksejtű szervezetekben a cAMP-szintek ellenőrzése elsősorban is intercelluláris, szervezetszintű és hormonálisan szabályozott. Ezeknél a cAMP a hormonális jelzésekre „második küldöncként" reagál. Következésképpen az egysejtű szervezetekben mind a cAMP-anyagcsere, mind a cAMP szerepe az anyagcserében egyetlen sejtre korlátozódik, míg a soksejtű eukariotákban a cAMP sejtkoncentrációját intercelluláris hormonjelzések szabályozzák és hatását a célsejten belül fejti ki (RICKENBERG, 1974).

Érdekes megállapításokat tettek a *Dictyostelium discoideum* nyálkagombával (eukariota) kapcsolatban, melynek életciklusa folyamán soksejtű (pszeudoplazmodiális) és egysejtű állapota is van. Ennél a cAMP kettős szerepet játszik. Egyrészt az anyagcsere intracelluláris effektora és, mint a baktériumoknál, a sejtet egy adott szénforrásra éheztetve, a cAMP képződése „első messenger"-ként hat; másrészt mint intercelluláris jel (primitív hormon?) az átmenetet váltja ki az amőboid egysejtű állapotból az életciklus többsejtű stádiuma felé. A *D. discoideum* néhány órán át agarlemez felületen éheztetett sejtjei, véletlenszerűen szórt megoszlásukból egymással érintkezni törekednek és 10^3-10^5 sejtből álló aggregátumokat alkotnak. Az ilyen aggregátumok központjából vonzó hatású cAMP terjed minden irányba és az ezt felfogó sejtek maguk is cAMP-t bocsátanak ki. Ez a kölcsönhatás-sorozat mintegy 5-10 percig tart és a sejtek befelé irányuló amoeboid mozgását fokozza. Az aggregálódott vándorló sejttömeg eközben nyálkaréteget képez, mozgását beszünteti és termőtestté alakul át, melyben spórák, kitartó képletek fejlődnek (BOYD, 1984). A spórák szétszóródnak, míg a termőtest egyéb sejtjei elpusztulnak. A cAMP-nek az életciklus két stádiuma közötti átmenetében betöltött ezen szerepe arra a feltételezésre késztet, hogy az éhezésnek a cAMP közvetítésével szerepe lehetett és lehet mind a celluláris specializáció, mind a soksejtűség evolúciójában. Azon mechanizmusok közötti különbségek tanulmányozása, melyek szerint a cAMP a pro- és eukariotáknál a transzkripciót szabályozza, fényt vethet az öröklődési anyag evolúciójára is. A cAMP, a CAP és a prokariota DNS közötti viszonylag egyszerű kölcsönhatások, összehasonlítva a cAMP, a proteinkinázok és a nukleáris proteinek közötti bonyolult és részleteiben mindmáig nem ismert és csak feltételezett kölcsönhatásokkal, a csupasz prokariota-DNS és a komplex eukariota kromatin működése közötti lényeges különbségekre engednek következtetni.

Napjaink molekuláris biológiájának egyik legfontosabb törekvése a génaktivitás ellenőrzésének felderítése. E téren a legnagyobb méretű kutatómunka az *Escherichia coli*ra és néhány rokon szervezetre összpontosult. Az *E. coli gal-* és *lac*-operonjainak működése a legintenzívebb tanulmányok tárgyát képezte, és ezek egyúttal prototípusai azoknak az operonoknak, melyeket a ciklusos AMP aktivál, mégpedig esetükben mindkettőt ugyanazon mechanizmus szerint. A ciklusos adenozin-5′-monofoszfát szerepével, az *E. coli*nál, a következő alfejezetekben részletesen is foglalkozunk.

1.34.18. A cAMP szerepe az *E. coli* anyagcseréjében

Fentebb már tárgyaltuk a *lac*-gének és a *lac*-operon működését. Az a tény, hogy a glükóz jelenléte csökkenti a sejtben a ciklusos AMP szintjét, és hogy a glükóz represszálni képes a laktózdegradáló β-galaktozidáz és számos más indukálható katabolikus enzim szintézisét, nyilvánvalóvá teszi, hogy a glükóz represszív hatása éppen a ciklusos AMP szintjének redukciójával kapcsolatos. Amikor az *E. coli* glükózon tenyésztett kultúrájába cAMP-t juttattak, ez felfüggesztette a glükóznak a β-galaktozidáz és a triptofanáz szintézisére gyakorolt represszív hatását. Ebből azt a következtetést vonhatták le, hogy ezen enzimek szintézisét maga a cAMP tartja ellenőrzés alatt. Ezenkívül úgy találták, hogy a cAMP számos más indukálható és katabolikus enzim és a flagellumok szintézisét is ellenőrzi, továbbá néhány bakteriális vírus „életciklusának" szabá-



cAMP

lyozásában is részt vesz. A β-galaktozidáz szintézise 20-szorosára növekedett, ha a lac-DNS-t tartalmazó nyers sejtmentes rendszerhez cAMP-t adtak. Más kísérletekben a galaktokináz szintézise bizonyult a cAMP-től függőnek.

1.34.19. Az enzimszintézis cAMP-ellenőrzésének feltételei és zavarai. A „glükózeffektus"

Azokat a mutánsokat, melyekben az enzimszintézis cAMP-ellenőrzése erősen csökkent, két nagy csoportba sorolhatjuk (PERLMAN és PASTAN, 1969). Az egyik csoport tagjai adenilát-cikláz-defektívek (*cya*). Az ilyen sejtek β-galaktozidázt, ill. más glükózrepresszálható enzimeket csak abban az esetben termelnek, ha tápközegükhöz cAMP-t adnak. A mutánsok második csoportjában (*crp*) az a protein (CAP), melyhez a cAMP kötődik, hiányzik. Azok a mutáns sejtek, melyekben ez a cAMP receptorprotein (CRP = CAP) nincs jelen, β-galaktozidázt vagy ezzel relációba hozható enzimeket még akkor sem állítanak elő, ha a tápközegükhöz cAMP-t adnak. Az ilyen mutánsok sejtmentes kivonatai β-galaktozidázt vagy galaktokinázt csakis cAMP-vel és CRP-vel kiegészítve szintetizálnak.

A *lac*-gén megnyilvánulását sejtmentes rendszerekben csupán a következő alkotóelemek jelenlétében, ill. kombinációjában tapasztalhatták: lac-DNS, cAMP, CRP, RNS-polimeráz és nukleozid-trifoszfatáz. Megállapítást nyert, hogy sejtkivonatokban a cAMP a *lac*-mRNS szintézisét is serkenti. A *lac*-represszor viszont a *lac*-mRNS szintézisének kezdeményezését közvetlenül gátolja (PASTAN és ADHYA, 1976).

A glükóznak az enzimek indukciójára gyakorolt specifikus gátlását „glükózeffektusnak" nevezik. Ez az effektus nem csupán a cukorkatabolizmus enzimeire korlátozódik, hanem kiterjed más degradatív enzimek, sőt néhány strukturális protein szintézisének repressziójára is. A *40. táblázat* példákkal mutatja be, hogy az *E coli*nál mely gének vannak

40. táblázat

Az *E. coli*-sejtekben tipikusan a ciklusos AMP ellenőrzése alatt álló gének, ill. operonok (PASTAN és ADHYA, 1976)

lac-operon	szorbithasznosítás génjei
gal-operon	a kemotaxisban részt vevő fehérjék génjei
ara-operon	mal-operonok
gly-regulon	a triptofanázra kódoló gén
csillófehérjék génjei	D-szerin-deaminázra kódoló gén
mannithasznosítás génjei	a β-glukuronidázra kódoló gén
	a kloramfenikol acetil-transzferázra kódoló gén

glükózrepresszionak alávetve. A táblázat nem teljes. E gének termékeinek szintézise indukálható. Jelenlétük a glükózzal kiegészített közegben tenyésztett mikroba számára a sejt túlélése és növekedése szempontjából nem esszenciális fontosságú. Valamennyi esetében a cAMP a glükózrepressziót feloldja.

A derepresszáló hatás specifikus: ATP, ADP, 5'-AMP és 3'-AMP hatástalanok. A ciklusos AMP tehát a gének megnyilvánulásának szabályozásában központi szerepet tölt be. E szabályozás mechanizmusát tárgyalva néhány tényt kell előrebocsátanunk: először is, a β-galaktozidáz szintézisének glükóz jelenlétével előidézett gátlása független a *lac*-represszor által kiváltott specifikus gátlástól, minthogy a *lac*-represszor defektív mutánsokban a β-galaktozidázt azért glükózzal még represszálni lehet. Másodszor, a ciklusos AMP intracelluláris koncentrációjának csökkentéséhez csakúgy, mint az átmeneti vagy akár a permanens represszió előidézéséhez, a glükóz extenzív metabolizálására nincs szükség. Azok a sejtek, melyek képtelenek a glükóz hasznosítására (pl. nincsen hexóz-foszfát-izomerázuk) még nem rezisztensek a glükózrepresszióval szemben. Foszforilált, azonban tovább már nem metabolizált glükózanalógok, így pl. 2-dezoxiglükóz vagy az α-metil-glükozid a glükózt hatásában utánozhatják. Az α-metil-glükozid hatékonyan csökkenti az intracelluláris cAMP-szintet.

1.34.20. A cAMP szerepének kutatása *cya*- és *crp*-mutánsok segítségével

A cAMP élettani szerepét és fontosságát az *E. coli* adenilát-cikláz defektív mutánsain végzett vizsgálatok erősítették meg. Ez az enzim katalizálja az ATP átalakítását cAMP-vé. Az adenilát-cikláz-defektív, ún. *cya*-mutánsok nem értékesítenek laktózt, galaktózt, szorbitot, maltózt, arabinózt, mannitot és glicerint. Ezeknek a szénforrásoknak az értékesítéséhez olyan enzimek indukciójára van szükség, melyek különben glükózrepressziónak vannak alávetve. E defektív mutánsok csillóproteineket sem képesek előállítani. A *cya*-mutánsokban cAMP-adagolás segítségével e fehérjék szintézisének kapacitását helyre lehet állítani. Minthogy a cAMP-adagolás a vad típusú sejteknél nem stimulálja a total RNS, a fehérje vagy az anabolikus és amfibolikus enzimek szintézisét, közöttük a glikolitikus enzimekét sem, nem meglepő, hogy a *cya*-mutánsok a glükózt még fermentálni képesek és hogy a mutáció maga nem letális. Ez is arra utal, hogy a cAMP nem esszenciális a sejt túlélése és növekedése szempontjából.

Azok között a mutánsok között, melyek több cukor katabolizmusában részt vevő enzimek indukciójában defektíveknek bizonyultak, volt

egy csoport, melynek tagjai megtartották magas adenilát-cikláz-aktivitásukat. Ezekre jellemző a cAMP-túlprodukció. E mutánsok CRP (CAP)-defektívek, vagyis a cAMP-t specifikusan megkötni képes fehérjét nem tartalmazzák. A *crp*-mutánsok fenotípusa a *cya*-mutánsokéval azonos, azonban az adagolt külső cAMP-re nem reagálnak, mely utóbbi a *cya*-mutánsoknál a vad típusú fenotípus restaurálását teszi lehetővé.

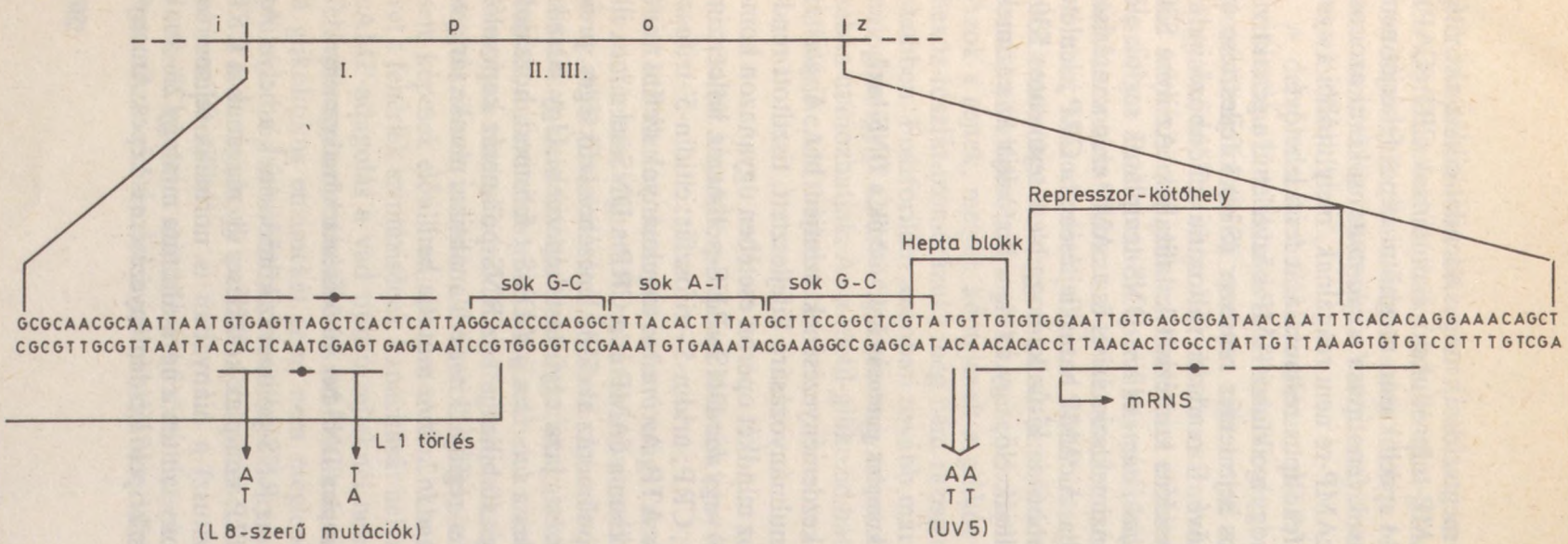
Annak demonstrálását, hogy a ciklusos AMP közvetlenül a génaktivitás szintjén hat, egy sajátos sejtmentes rendszer (S30) kifejlesztése és tanulmányozása tette lehetővé. E rendszer változatai különböző indukálható enzimek DNS-dependens szintézisét katalizálják. Az ilyen S30 típusú rendszerekben *lac-*, *gal-*, *cam-* és *ara*-DNS-templátok segítik elő a Lac-, Gal-, Cam- és Ara-enzimek szintézisét és a cAMP ezen szintéziseket minden esetben stimulálja. A cAMP hatáskiejtéséhez a CRP jelenléte feltétlenül szükséges, ami abból is kitűnik, hogy ha a sejtmentes S30-rendszert *crp*-mutánsból állítják elő, úgy az nem biztosítja az enzimek *in vitro* szintézisét.

1.34.21. A cAMP-CRP komplex pontosan hol kötődik a DNS-hez?

A cAMP a transzkripció kezdeményezésének szintjén hat. A *gal-* és *lac*-operonok átírásának tanulmányozására kifejlesztett, tisztított rendszerekben a transzkripcióhoz mindkét operon esetében ugyanazon komponensek szükségesek: *gal-* vagy *lac*-DNS; RNS-polimeráz holoenzim (enzim + σ-faktor): cAMP; CRP; uridin-5′-trifoszfát; citidin-5′-trifoszfát; guanozin-5′-trifoszfát és ATP. Az *in vitro* tanulmányok szerint mind a *lac-*, mind a *gal*-rendszerekben a cAMP és a CRP a DNS-sel a *lac-*, ill. a *gal*-promoternél az RNS-polimeráz akcióba lépéséhez szükséges, preiniciációs komplexnek nevezett, laza együttest képeznek. Úgy látszik, hogy a cAMP–CRP-komplex a *lac-* és a *gal*-DNS-t felismeri, hozzájuk kötődik és ott „segíti" vagy „stabilizálja" az RNS-polimeráz kapcsolódását. A *lac*-operon promoter-régióját kiterjedt analitikai munka tárgyává tették. Az eredményeket a *162. ábra* mutatja be.

1.34.22. A cAMP-CRP komplex DNS-hez kötődésének következményei

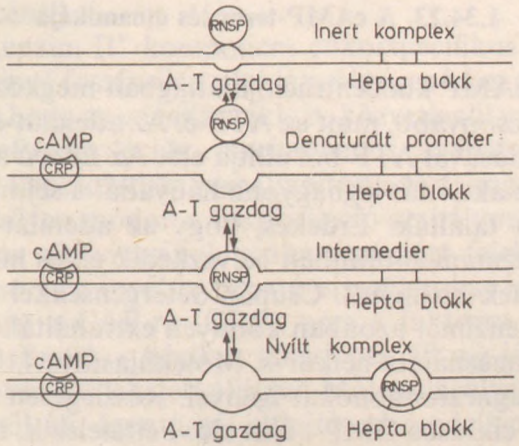
Feltehetően a II-III-as hely az RNS-polimeráz kötődésének a helye. Az RNS-polimeráz a cAMP-CRP komplex kötődése, ill. magának a CRP felismerési helynek (I-es szitusz) a hiányában is normális felismerési helyéhez kötődhet, és alacsony szinten a normális ráta mintegy 2%-ának megfelelő mértékben a transzkripció kezdeményezésére is képes. Ameny-



162. ábra

A *lac*-operon promoter-operátor régiójának genetikai térképe és nukleotidszekvenciája. A promoterlokusz (p) a *lac*-represszorgén (i) és az operátor (o) között helyezkedik el és három szituszra, ill. helyre (I, II és III) oszható. Az I-es szitusz a cAMP és CRP felismerési régiója. Ez a szitusz két, vízszintes vonalakkal jelölt szimmetriaelemet tartalmaz. Azok a pontmutációk, mint pl. az L8, melyek a cAMP és CRP felismerését befolyásolják, a szimmetriaelemek valamelyikén következnek be és minden esetben két szimmetrikus helyzetben lokalizált GC-nukleotidpár valamelyikének A–T-párra cserélődésével kapcsolatosak. Ez arra utal, hogy a cAMP–CRP-komplex mintegy „meglátja" ezt a DNS-szimmetriát. A promoter II-es és III-as szituszai lényegében egy A–T gazdag blokkot, mely két G–C gazdag blokkot hidal át és egy heptanukleotid-blokkot tartalmaznak. Utóbbi szerepével kapcsolatban *lásd* a *163. ábrát*. Az UV 5-jelzésű és az átírást a cAMP–CRP-komplex jelenlététől függetlenül is lehetővé tevő promotermutáció a hepta blokkban következik be. Az operátorlokusz, a represszor-kötőhely, ugyancsak tartalmaz egy részlegesen kétszeres szimmetriát, amit horizontális szaggatott vonalak tüntetnek fel. A vízszintes nyíl a lac-transzkripció kiindulását jelzi (Dickson és munkatársai, 1975)

nyiben az RNS-polimeráz felismerési régióját III-as típusú mutáció változtatja meg, úgy az enzim a *lac*-operont akkor is képes hatékonyan átírni, ha a cAMP és CRP kölcsönhatása az I-es szitusszal teljesen elmarad. Ezek szerint a cAMP-CRP komplex szerepe abban rejlik, hogy fokozzák az RNS-polimeráz II-es, III-as szituszról történő átírási kezdeményezésének (eredetileg alacsony) szintjét. Következésképpen úgy tekinthetők, mint az operon megnyilvánulásának pozitív effektorszabályozói. A feltevések szerint az RNS-polimeráz a DNS számos, nem specifikus szituszával ütközhet és azokhoz kötődhet is. Az RNS-polimeráz és a DNS reaktív csoportjai közötti ilyen kölcsönhatások gyengék és gyors egyensúlyi változásokat mutatnak. Az RNS-polimeráz a promoterlokuszhoz már szelektíven kötődik. Az így létrejött komplexet inaktív, vagy tétlen (inert) komplexnek tekintik. Az a lépés, mely a transzkripció kezdeményezését jelzi, az ennek a tétlen komplexnek nyílt vagy preiniciációs komplexszé alakulása. Ez a komplex már stabil. Kialakulását segíti a növekvő hőmérséklet és az alacsony ionerősség (pl. magnéziumionok hiánya). Azt is feltételezik, hogy a nyílt komplex anélkül jön létre, hogy a DNS-polimeráznak a tétlen komplexből disszociálnia kellene. A nyílt komplex képződését a kettős hélix körüli rendezett struktúrát megszüntetni képes körülmények, így dimetil-szulfoxid vagy glicerin jelenléte, magasabb hőmérséklet vagy a magnéziumionok hiánya jelentősen elősegítik. Valójában a *lac*-promoter másodlagos struktúrájának lokalizált



163. ábra

A *lac*-operon átírási kezdeményezésének modellje. Az RNS-polimeráz az A–T gazdag blokknál kezdeményezési (inert) komplexet alkot. A cAMP–CRP-komplex egy másik hellyel (mely megfelel a *162. ábrán* a promoter I-es régiójának) lép kölcsönhatásba, miáltal megkönnyíti a két G–C gazdag blokkot áthidaló A–T gazdag blokk „oldását", és a heptanukleotid-blokkot tartalmazó régiónál elősegíti a polimeráznak a DNS-sel alkotott inert komplexe átalakulását nyílt komplexszé (PASTAN és ADHYA, 1976)

megváltoztatása, ill. „oldása" előfeltétele a nyílt komplex képződésének. A cAMP és a CRP a komplexképződés során a promoter konformációját oly módon alakítják át, hogy a tétlen (inert) RNS-polimeráz–DNS komplex gyorsan kezdeményező nyílt komplexszé alakul át.

A *lac*-operon teljes promoter-operátor régiójának nukleotidszekvenciáját már felderítették *(lásd 162. ábra)*. Ez a régió mintegy 122 nukleotidpárt tartalmaz, és a lac-represszor felismerési és kötődési helyét, vagyis az operátort, az RNS-polimeráz felismerési és kötődési helyét (II-es és III-as szituszok) és végül a cAMP-CRP komplex felismerési és kötődési helyét (I-es szitusz) foglalja magába.

A feltételezések szerint a cAMP és a CRP szerepe a kettős hélix A–T blokk *(lásd 162. ábrát)* körüli destabilizálása. A cAMP és CRP a tétlen komplex nyílttá alakulását az I-es szitusszal kölcsönhatásban gyorsítják meg *(163. ábra)*. A heptablokk viszont az a hely, amelynél a nyílt komplexet találták. Normális körülmények között a vad típusú *lac*-promoterrel és a cAMP–CRP komplex hiányában az inert komplexnek nyílt komplexszé alakulása csupán 2%-os gyakoriságú. A nyílt komplex létrejöttét egyrészt a cAMP és CRP kötődése, másrészt azok a bázisváltozások segíthetik elő, melyek az UV5-mutációban a heptablokk módosulásához vezetnek. Mindkettő megnöveli az RNS-polimeráz affinitását a heptablokk régiója iránt.

1.34.23. A cAMP-termelés dinamikája

Az *E. coli*ban a cAMP koncentrációja átlagban megközelítően 10^{-6}M, vagyis sokkal alacsonyabb, mint az ATP-é. Az adenilát-cikláz a cAMP-t pirofoszfát lehasításával ATP-ből állítja elő. Az *E. coli* sejtkivonataiban az adenilát-cikláz-aktivitás legnagyobb hányadát a sejtmembránt tartalmazó frakcióban találták. Érdekes, hogy az adenilát-cikláz az állati sejtekben is a plazmamembránban helyezkedik el, és miként az *E. coli*-ban, lipoproteinnek bizonyult. Csupán detergensekkel lehetett oldatba vinni. Az *E. coli*-enzimet azonban könnyen extrahálták oldható formában detergensek használata nélkül is. Molekulasúlya 110 000 körül van. Aktivitásához magnéziumionokat igényel. Részlegesen tisztított preparátuma GTP-ből ciklusos GMP-t állít elő. Feltételezik, hogy a sejtekben mind a cAMP-t, mind a cGMP-t ugyanaz az enzim képezi. Az *E. coli*ból vas(II)ionokkal aktiválható mintegy 28 000 molekulasúlyú ciklusos AMP-foszfodiészteráz enzimet is kimutattak. Ennek az enzimnek a jelenléte feltehetően közrejátszik a glükóz és más cukrok által kiváltott cAMP-szint csökkentésében. Növekedő sejtekben a glükóz jelenléte nem vezet cAMP kiválasztásához a külvilágba, hanem csupán sejten belüli

szintézisének gátlását idézi elő. A sejtekben e nukleotid intracelluláris szintjét szintézisének mértéke szabályozza és a sejt nem manipulál kiválasztással. Midőn intakt sejtekben a cAMP szintézisét oly módon mérték, hogy [^{3}H]-adenozin ATP-be és ezt követően cAMP-be épülésének mértékét követték nyomon, miközben a sejt specifikus ATP- és cAMP-radioaktivitását külön-külön határozták meg, azt találták, hogy: **1.** Azok a sejtek, melyek a közeg glükózkészletének kimerülése következtében növekedésük stacioner fázisába léptek, sokkal magasabb szinten állítottak elő cAMP-t, mint növekedésük logaritmikus fázisában. **2.** Ha a stacioner fázisban lévő sejtekhez glükózt adnak, úgy a cAMP szintézise rohamosan csökken. A glükóz adagolása a cAMP-szintézist a logaritmikus fázisban növekedő sejteknél is akadályozza. **3.** A cAMP-szintézis gátlásához a glükóz extenzív metabolizálása nem szükséges. **4.** A glükóz a cAMP szintézisét olyan *E. coli* sejtekben is megakadályozza, melyekben hiányzik a cAMP-foszfodiészteráz. Az *E. coli*ban a glükóznak és számos más cukornak a transzportját a foszfotranszferáz-rendszer katalizálja (KUNDIG és munkatársai, 1964):

$$\text{Foszfoenol-piruvát} + \text{enzim I} \rightarrow \text{enzim I-P} + \text{piruvát}$$

$$\text{Enzim I-P} + \text{HPr} \rightarrow \text{P-HPr} + \text{enzim I}$$

$$\text{P-HPr} + \text{enzim IIA} \rightarrow \text{enzim IIA-P} + \text{HPr}$$

$$\text{Enzim IIA-P} + \text{cukor} \xrightarrow{\text{enzim IIB}} \text{cukor-P} + \text{enzim IIA}$$

(HPr–foszfotranszferáz-rendszer: protein kofaktor; a *pts*H-gén kódolja a térkép 52 percénél).

Valamennyi „enzim II" komponens cukorspecifikus. Jelenleg úgy tűnik, hogy az enzim I foszforilált alakja szükséges lehet az adenilát-cikláz aktiválásához és hogy az adenilát-ciklázt, közvetlenül vagy közvetve, egy foszforilációs–defoszforilációs mechanizmus szabályozhatja. Az *S. typhimurium*mal kapcsolatban megállapítást nyert, hogy a cAMP-szintézis rátáját valamilyen módon a foszforiláció szabályozza. Mindenesetre az adenilát-cikláz aktivitásának szabályozásáért felelős mechanizmus pontos felderítése még további beható vizsgálatokat igényel.

Térjünk ki még a CAP-ra (CRP), arra a faktorra, mely a cAMP-t megkötni képes. Ennek a bázikus fehérjének 50 mg-ját 1 kg *E. coli*ból viszonylag könnyen elő lehetett állítani. Molekulasúlya 45 000 körül van és két alegységből áll. Igen nagy affinitással rendelkezik a DNS iránt. Magas izoelektromos pontja (pI 9,12) nagy glutamin- és aszparagintartalmának tulajdonítható. Lizin- és arginintartalma nem különösen magas. cAMP hatására konformációváltozáson megy keresztül. A cAMP–CAP-komplex ammónium-szulfáttal kicsapható. A CAP különböző típusú DNS-ekhez, így szintetikus polinukleotidokhoz is kötődhet. A CAP, ill. a DNS nagy koncentrációi esetében a CAP akkor is a

DNS-hez kötődik, ha cAMP nincs jelen. Ezek koncentrációinak csökkentésekor viszont a kötődés már a cAMP jelenlététől függőnek bizonyul. A CAP a DNS-hez kovalensen kötődhet. Azt, hogy vajon a CAP molekulájában mely aminosavak kapcsolódhatnak a promoterlokusz specifikus bázisaival, ma még nem tudjuk.

SCHROEDER és DOBROGOSZ (1986) nagyfokú DNS-szekvencia homológiát mutattak ki az *E. coli* és a *S. typhimurium crp*-génjei között. Feltehetően a CAP mint géntermék jelentős szerkezeti hasonlósággal jellemezhető a legkülönbözőbb baktériumcsoportokban.

1.34.24. A cAMP-kutatás megoldatlan kérdései

A cAMP-nak az *E. coli* anyagcseréjében vitt szerepére vonatkozóan ma már sok információ birtokában vagyunk. Ennek ellenére sok kérdés még megválaszolatlan. Egyrészt még mindig nem világos, hogy a glükóz hogyan gátolja az adenilát-cikláz aktivitását. Másrészt kevés fogalmunk van arról, hogy a cAMP–CRP komplex miként változtatja meg bizonyos helyeken a DNS struktúráját és teszi lehetővé, hogy az RNS-polimeráz az átírást kezdeményezhesse. Érdekes kérdés az is, hogy a cAMP-deficiens *E. coli* miért növekedik gyengén még a nagymértékben gazdagított közegben is. Elképzelhető, hogy a sejt növekedési folyamatában van még néhány lényeges fontosságú lépés, melyet ugyancsak a cAMP szabályoz. Ami pedig a cGMP szerepét illeti, arról rendkívül keveset tudunk.

A cAMP–CAP-komplex az átírás kezdeményezésével számos különböző katabolit-szenzitív operon hatékony megnyilvánulását segíti elő (DE CROMBRUGGHE és munkatársai, 1984), ugyanakkor az átírás (transzkripció) befejezésénél is szerepet játszhat, minthogy bizonyos operonok polaritását modulálni képes. Az átírás terminációs faktora az Rho, mely az RNS-polimeráz transzkripciós tevékenységének a bakteriális DNS meghatározott specifikus helyénél vet véget, mint kimutatták, ugyancsak részt vesz a policisztron-operonok polaritásában (GUIDI-RONTANI és munkatársai, 1984). Ezen Rho és a cAMP–CAP-komplex között funkcionális kölcsönhatás áll fenn, és mindkettő központi szerepet játszik az *E. coli* K-12-törzs gén-megnyilvánulásának (*gene expression*) ellenőrzésében. Hasonló lehet a helyzet számos más GRAM-negatív baktériumban is (BIVILLE és GUISO, 1985).

Az a kutatómunka, mely elsősorban is arra a kérdésre szándékozott választ adni, hogy vajon az alacsony cAMP-szint miként válthatja ki a represszív „glükózeffektus"-t, végső soron olyan sejtmentes rendszerek kifejlesztéséhez vezetett, melyekben már enzimeket lehetett előállítani. Ez viszont lehetővé tette, hogy első alkalommal laboratóriumi körülmé-

nyek között, homogén proteinek felhasználásával a bakteriális gén átírását is ellenőrizhessük. E munkálatok során három tiszta protein, az RNS-polimeráz, a cAMP-receptor és a *lac*-represszor, továbbá két kis szabályozó molekula, a cAMP és az indukáló hatású izopropil-tiogalaktozid került felhasználásra. Az először a *lac*-, majd később a *gal*-represszorokkal kivitelezett vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a negatív kontroll a génaktivitás szabályozásának csak az egyik módja. A cAMP-vel és a CRP-vel végzett kísérletek ugyanis igazolták, hogy a génaktivitás szabályozása pozitív módon is végbemegy. Valószínűnek látszik, hogy a cAMP felfedezése és tanulmányozása nélkül a bakteriális génaktivitás szabályozásának mechanizmusa még ma is nehezen áttekinthető lenne.

1.34.25. A ppGpp és a pppGpp szabályozó szerepéről

A baktériumok sejtjeiben a környezeti tényezők szelekciós nyomásának hatására szakadatlanul folyik az enzimek által katalizált biokémiai reakciók mindenkori legmegfelelőbb mederbe terelése, szabályozása. Ezek a szabályozó mechanizmusok éppen úgy működnek a növekedés logaritmikus fázisában, mint a táplálkozási viszonyok drasztikus változásai idején, és végeredményben a sejt összetételének viszonylagos állandóságát biztosítják. Jóllehet a sejtalkotóelemek szintézisének és degradációjának integrációját megszámlálhatatlanul sok anyagcsere-kölcsönhatás alakítja, a következőkben egy viszonylag egyszerű szabályozó mechanizmust mutatunk be, mely egyszerűsége ellenére is a fehérjeszintézis és több más sejtaktivitás meglehetősen pontos és gyors koordinálásában vesz részt. Ebben a szabályozásban a guanozin 5'-difoszfát,3'-difoszfát (ppGpp), továbbá az analóg pirofoszforilált GTP-származék (pppGpp) kulcsszerepet játszanak (CASHEL, 1975).

A sejtanyagcserét a proteinszintézissel összehangoló szabályozó mechanizmusok létezése és működése akkor válik nyilvánvalóvá, ha a proteinszintézishez szükséges aminosavakat a mikrobától megvonjuk. Ezt többféle módon is elérhetjük: célt érhetünk pl. azzal, ha egy aminosav-auxotrófot fosztunk meg a szükségelt aminosavtól, vagy az aminosav-bioszintézis inhibitorait adjuk a tenyészethez, ill., ha az amino-acil-tRNS-szintetáz aktivitását korlátozzuk stb. E beavatkozások eredményeként meglehetősen hirtelen, számos anyagcsereút működése leáll, vagy nagyon korlátozódik. A fehérjeszintézis gátlásával egyidejűleg áll le az RNS-, a szénhidrát-, a foszfolipid- és a lipidszintézis, a nukleobázisok és a glükozidok membrántranszportja, a glikolitikus intermedierek foszforilációja, a *de novo* nukleotidszintézis, a poliaminok és az energia-

gazdag vegyületek előállítása stb. Egyidejűleg viszont a proteolízis mértéke megnövekedik. Ha ilyen szabályozó mechanizmusok nem léteznének és bizonyos szintézisek még tovább folynának, úgy az éhező sejtek feltételezhetően olyan sajátos összetételű „torz" sejtekké válhatnának, melyekben a proteinek és a DNS kivételével, számos más sejtalkotóelem egyoldalúan halmozódna fel. Találtak is egy (később több) ilyen *E. coli* mutánst. Ez aminosav-éheztetés esetén összetételében csakugyan a feltételezett torzulásokat mutatta. Ez a mutáns, mely egyúttal metioninauxotróf volt, metioninéheztetés alkalmával sejtjeiben RNS-t szintetizált és halmozott fel. Az RNS kontroll fenotípusának genetikai determinánsát az *E. coli* kromoszómáján már feltérképezték. Azt a mutánst, melyben aminosav-éheztetés alkalmával az RNS-szintézis tovább folyik, mint meggyengült „laza" RNS-ellenőrzésűt *(relaxed RNA control)* jelölték meg, szemben a vad típusú törzsekre jellemző „szoros" *(stringent control of RNA)* ellenőrzéssel. A „szorosak" a *rel*A^+-, a „lazák" a *rel*A-törzsek. A *rel*A-gén a térkép 59 percénél található és az RNS-szintézis szabályozásáért felelős. A *rel*A-gén által közvetített RNS-ellenőrzés fenotípusos megnyilvánulását az *E. coli* genom más génjei is befolyásolják. Az RNS-kontroll lazulása a *rel*A-mutánsok között változó mértékű. A *rel*A^+-allél a *rel*A felett domináns.

1.34.26. A tetra- és a pentafoszfátok termelése a „szoros" és a „laza" ellenőrzésű törzsekben

A *rel*A-mutánsok viselkedését korlátozott proteinszintézis alkalmával tanulmányozva és összehasonlítva az egyébként izogén törzsekével, a szabályozás számos rejtélyére derült már fény. Úgy tűnik, hogy ez esetben a legkülönbözőbb biokémiai aktivitások összehangolásában lényegében egyetlen regulációs mechanizmus vesz részt, melynek keretében egy, a *rel*A-géntermék szabályozása alatt álló közös, diffúzíbilis, pleiotrop inhibitor működésével állunk szemben.

A szoros sejtekben aminosav-éheztetés alkalmával a ppGpp és a pppGpp mennyiségének *rel*-géndependens növekedését számos különböző genetikai hátterű *E. coli* K-12-törzsben lehetett már megfigyelni. A sejtben az MS-nukleotidok (a tetra- és pentafoszfátokat az irodalomban gyakran MS-nukleotidként jelölik, minthogy még mielőtt kémiai azonosításuk megtörtént volna, a *„magic spots"*, MS I és MS II. nevet kapták) ezen számbeli gyarapodása éppen úgy, mint az RNS-szabályozási válasz maga, nem specifikus egyetlen aminosavra sem, mivel számos különböző aminosavra éheztetéssel egyaránt ki lehetett váltani. Ha aminosavra éheztetett, szoros ellenőrzésű törzsek sejtjeit aminosavakkal újra ellátták, úgy legtöbbjükben a ppGpp és pppGpp igen gyorsan eltűnt.

Izotóppal jelzett tenyészetek sejtjeiben az aminosav-éheztetés alkalmával képződött ppGpp-molekulák mennyiségét 10 nmol ppGpp/10^9 sejtre becsülték (LUND és KJELDGAARD, 1972). Ez a szint megközelíti a sejt ATP-tartalmát. 20–30 másodperces fél életidővel számítva ez megfelel 50 000 molekula/másodperc turnover sebességnek, mely exponenciálisan növekedő kultúrában megközelíti a sejtenként és másodpercenként kialakított peptidkötések számát (150 000). Különböző törzsekkel kísérletezve azt tapasztalták, hogy a ppGpp koncentrációja mintegy 5–20-szorosára növekedhet a változó alapszint fölé és a GTP gyakoriságának mintegy kétszeresét érheti el. A sejtvolumenre vonatkozó becslések alapján úgy számítható, hogy a sejt ATP-koncentrációja 10–12 mM; GTP-koncentrációja a szoros szabályozási válasz esetében felére csökken (4-ről 2 mM-ra), ugyanakkor a ppGpp koncentrációja mintegy 4 mM-re emelkedik. Az egyensúlyi érték kialakulásához kb. 5 percre van szükség. Természetesen ezek az értékek a különböző törzseknél némileg variálnak. Az *E. coli* törzsekben a pppGpp szintje átlagban egyharmada a ppGpp-ének, azonban a *spot*-lokusz mutánsaiban elenyészően kevés pppGpp van jelen. A *Bacillus subtilis*ben a pppGpp akkumulációja nagyobb, mint a ppGpp-é. Az *E. coli* szoros szabályozású törzséből nyert S-30 kivonatot a sejtmentes DNS-dependens proteinszintézis körülményei között inkubálva (azzal a lényeges különbséggel, hogy mind a 20 aminosavat elhagyták), ppGpp és pppGpp szintézisét figyelték meg. A „laza" szabályozású törzsből előállított hasonló kivonat, hasonló körülmények között csak csekély mennyiségű MS-nukleotid szintézisét eredményezte. A „szoros" extraktumának nukleotid-szintetizáló aktivitását a proteinszintézist lehetővé tevő 20 aminosav hozzáadása felfüggesztette. Ugyanezt az eredményt aminosavak helyett adott „laza" S-30 kivonattal már nem lehetett elérni, ami a *rel*A^+-extraktum *in vitro* dominanciáját demonstrálta. Centrifugálást alkalmazva állapították meg, hogy a szintetikus aktivitás a „szoros"-kivonat riboszomális frakciójára lokalizálódik. A továbbiakban 18 „laza" mutánsból nyers riboszómapreparátumot állítottak elő és ezekkel *in vitro* a csaknem kimutathatatlanul alacsony szinttől egészen a vadtípus szintjéig, változó nagyságú MS-nukleotid-szintetikus aktivitást értek el.

1.34.27. A „szoros" faktor

A „szoros faktor"-t az *E. coli* riboszómáinak 0,5 M ammónium-kloriddal nyert eluátumából tisztítva állították elő (COCHRAN és BYRNE, 1974). Ezen enzimkészítmény aktivitásának meghatározását 35 °C-on, 10 per-

ces időtartammal, ammónium-kloridban mosott 70S riboszómákkal, 1 mM ATP és 1 mM GTP jelenlétében végezték. Maga a reakció széles pH-optimumot mutatott, az aktivitás azonban pH 9 felett élesen csökkent. Ezenkívül legalább 12 mM magnéziumiont igényelt. Az aktivitás mértéke akár GDP-t, akár GTP-t használtak pirofoszfátakceptorként, megközelítően ekvivalensnek mutatkozott. A pirofoszfátdonorok nukleotidspecificitását kifejezettnek találták. E tekintetben csak az ATP bizonyult aktívnak.

Az MS-nukleotidok riboszómadependens szintéziséhez szükség van mind a 30S, mind az 50S alegységekre. A „szoros faktor" aktivitása azonban elsősorban is az 50S alegységgel kapcsolatos.

Kondicionális tRNS-szintetáz-mutánsokkal végzett vizsgálatok során tapasztalták, hogy a szoros RNS-kontroll válaszműködése, vagyis az MS-nukleotidok termelése 20 szabad aminosav jelenlétében is felléphet, ha a tRNS amino-acilációja magas hőmérsékletre korlátozódik. A *rel*A-gén megnyilvánulása lényegében a korlátozott tRNS amino-aciláció néhány következményére volt visszavezethető. A terheletlen (töltetlen) tRNS kötődése úgy látszik, az MS-termelés szignáljának tekinthető. Az amino-acil-tRNS nem stimulálja az MS-nukleotidok szintézisét. A „szoros faktor" riboszomális aktivitásához feltétlenül szükséges, hogy a terheletlen tRNS kodonjához az „A" (aminosav)-helyen kötődjék (Haseltine és Block, 1973).

A ppGpp és pppGpp nem riboszomális szintézisét is kimutatták. Azt tanulmányozva, hogy a riboszóma–mRNS–tRNS komplex miként teszi lehetővé, hogy a „szoros faktor" ATP-ből és GTP-ből a ppGpp és a pppGpp szintézisét katalizálhassa, az MS-nukleotidok alacsony mérvű szintézisét nyers riboszomális kivonat jelenlétében riboszómák nélkül is észlelhették. Ez a szintézis azonban sokkal kevéssé aktív, mint ekvivalens mennyiségű enzimmel riboszómák jelenlétében. Feltételezik, hogy proteinszintézis hiányában a ppGpp riboszomális szintézisének megindulása, az enzim konformációs megváltozásával kapcsolatos.

1.34.28. Tetra- és pentafoszfát termelés különböző kritikus anyagcserezavarok alkalmával

Adataink vannak az energiaforrásra éheztetés alkalmával feilépő relA-független ppGpp és pppGpp akkumulációjára vonatkozóan is (Cashel, 1975). Az első megfigyelések szerint olyan *rel*A-mutánsok, melyek aminosav-éheztetés alkalmával a stabil RNS-szintézis folytatódását képtelenek voltak megakadályozni, mégis teljesen hasonlóan a „szoros törzsekhez", képeseknek bizonyultak valamely jó szénforrás kimerülése után

egy gyengébb hasznosításához vezető átmenetnek a sejtösszetétel torzulása nélküli áthidalására. Ez a megfigyelés más átmenetekkel kapcsolatban is megerősítést nyert, kivéve azt az állapotot, amikor az aminosavakat vonták meg. A karbonfogyás alkalmával a stabil RNS-szintézist mind a szoros, mind a laza ellenőrzésű törzsek meglehetősen hirtelen függesztik fel, ami egyaránt kapcsolatos mind az RNS-szintézis korlátozásával, mind az RNS degradációjával. Ebből következik, hogy a stabil RNS-szintézis szabályozásának más, a *rel*A-géntől független módja is van. A szabályozásnak ez a módja mind a *rel*A$^+$-, mind a *rel*A-törzsekben ugyancsak ppGpp-felhalmozódással függ össze. A ppGpp előállításának a *rel*A-géntől független folyamatát egy sor más, nem csupán a karbonforrás cseréjével (melyet úgy tekinthetünk, mint az energiagazdag intermedierek kimerülésének felismerését) kapcsolatos sejtkezelés alkalmával is tapasztalták. Így pl., ha plazmolízist váltottak ki hipertonikus NaCl-oldatban, vagy az aerációt szakították meg, ill. cianiddal kezelték a sejteket stb.

A *rel*A-független ppGpp akkumulációjával kapcsolatban számos kérdés merül fel: vajon a szénforrás-éheztetés által kiváltott ppGpp-szintézis egy külön enzim tevékenységére vezethető-e vissza vagy ugyanarra az enzimre, mely valamiképpen módosulva, érzékenységében is eltérővé válik. Hasonlóan a ppGpp és a pppGpp degradációjának útjai is kevéssé ismertek, és az is kérdéses, hogy vajon ezek a nukleotidok a fentebb tárgyalt szabályozásokban milyen mechanizmus szerint működnek közre és más szabályozási folyamatokban is részt vesznek-e?

A ppGpp és a pppGpp szabályozó szerepet tölt be *Rhodospirillum* és *Rhodopseudomonas* fajok sejtjeiben is. Az előbbi szabályozza a foszfolipid szintézist (CAMPBELL és LEUKING, 1983). Sejtszintjei a *Rhodopseudomonas pallustris*nál a sejt általános nitrogén-anyagcsere állapotát tükrözik. Ezenkívül a nitrogenáz rendszerért felelős *nif*-gének megnyilvánulását is szabályozzák (ZUMFT és NEUMANN, 1983). MICHALSKI és NICHOLAS szerint (1985) a ppGpp a *Rhodopseudomonas sphaeroides*ben szerepet játszik még a denitrifikációs állapotokhoz történő adaptálásban is.

1.35. A genetikai információ változásainak, inter- és intraspecifikus átvitelének mechanizmusai a recens prokarioták világában. A bakteriális genom evolúciójának problémái

E fejezetben elsősorban is a baktériumok változékonysága legalapvetőbb mechanizmusait tárgyaljuk azokat, amelyek a baktériumsejt genetikai anyagának permanens kémiai megváltozásával kapcsolatosak. Ezek az ún. genotípusos változások. Hangsúlyozni kell azonban, hogy a kör-

nyezeti viszonyok változásai is a sejtek fiziológiai–kulturális tulajdonságainak több-kevesebb átmeneti jellegű megváltozását vonják maguk után, ez azonban már nem jár együtt a genom kémiai módosulásával. Tény az is, hogy az ilyen adaptív jellegű fenotípusos változásoknak a hátterében is a gének megnyilvánulásának, repressziójának és derepresszziójának bonyolult szabályozási mechanizmusai rejlenek.

A fenotípusos flexibilitás, vagy más szóval a nagyfokú alkalmazkodási (adaptációs) képesség valójában a genom információkészletének igen flexibilis és energetikai szempontból nagyon takarékos (ökonomikus) felhasználását, ill. működtetését tükrözi, melyre a különböző mikrobák nem egyforma mértékben képesek.

A genetikai háttér változása nélküli fenotípusos eltérések azonban nem mindig alkalmazkodást, hanem a környezet hatására bekövetkezett, túlélést biztosító, kényszerű módosulásokat tárnak elénk. Ilyenek jelentkezhetnek morfológiai–kulturális bélyegekben, mint amilyen pl. a *Leuconostoc mesenteroides* tokképzése szacharózban gazdag táptalajokon, a csillózat hiányában pl. a *typhus* baktériumoknál fenoltartalmú tápközegen vagy lizozimkezelés után a már többször tárgyalt fal nélküli L-formák megjelenésében a falképzésre vonatkozó genetikai információ teljes érintetlenségének megtartásával.

Tényleges alkalmazkodást tükröző fenotípusos módosulásnak számít a különböző sókoncentrációkhoz, antibiotikumok, mérgek magas dózisaihoz, alacsony és magas pH-értékekhez stb. történő adaptáció. Ilyenkor a szélsőséges értékek tolerálására képes szervezeteket a számukra eredetileg optimális vagy elviselhető miliőbe visszavive, már néhány generáció eltelte után is, ezek toleranciaskálájának újonnani beszűkülését tapasztalhatjuk a kiindulási intervallumra. Ugyancsak fenotípusos eltérés maga az ún. „adaptív enzimképzés" is. Pl. az ún. indukálható enzimek jelenléte, ill. szintézise esetenként bizonyos anyagok megjelenésének vagy éppen a hiányának lehet a következménye. Az *E. coli*ban pl. intenzív alkalikus foszfatázenzim termelése folyik, ha a közegben anorganikus foszfát nincs jelen. Az alkalikus foszfatáz lehetővé teszi a szerves kötésű foszfor hasznosítását. Anorganikus foszfát megjelenésekor szintézise leáll, represszió alá kerül. A sejt az anyag- és energiaigényes enzimszintézist így megspórolja stb.

Minthogy a baktériumok öröklődése alapjában véve ugyanazon mechanizmus szerint történik mint az eukariotáké, az utóbbi évtizedekben egyre inkább általános molekuláris genetikai kutatások alanyaivá váltak. Ez különösen három ténynek köszönhető: először is csekély a testméretük (ami nagy sűrűségű populációik gyors előállítását és szelekcióját teszi lehetővé), rövid a generációs időtartamuk (evégett genomjuk változásainak következményeit időben viszonylag könnyen nyomon kö-

vethetjük) és végül hogy sűrű populációikban az egyes sejtekre igen erős „szelekciós nyomás" nehezedik.

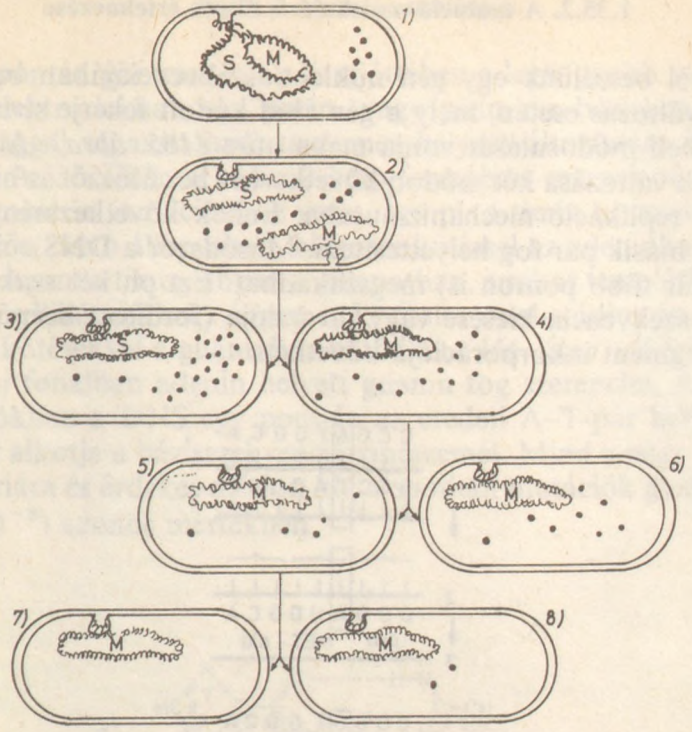
1.35.1. A baktériumgenetika kísérleti módszereiről általánosságban

A klasszikus genetikai kutatások a fenotípusos változások megfigyelésére alapulnak, minthogy ezeket a megváltozott gén vagy gének termékeinek, ill. ezek hatásának tulajdonítják. A szülői törzsben észlelhető fenotípusos bélyeget vad típusú markerként fogják fel. Azokban az esetekben, amikor egy adott jellemvonással kapcsolatban nincs egyedüli vad típusú marker (így a faj különböző törzseinél vagy egyedeiben a tulajdonság más és más módon nyilvánul meg, pl. az embernél a szemszín), akkor az ilyen jellemvonást ellenőrző gént polimorfként kezelik. A magasabb rendű szervezetek genetikai tanulmányozásánál használt fenotípusos markerek gyakorta nem egy, hanem több különböző gén termékei, melyek ráadásul nem működnek minden esetben és következetesen együtt. Például a szem vagy a szőrszín több gén egyidejű megnyilvánulásának eredménye. A baktériumok parányi testméreteik következtében kevés olyan fenotípusos bélyeggel rendelkeznek, mint a magasabb rendű szervezetek, és ezért a velük kapcsolatos genetikai tanulmányok elsősorban is biokémiai markerek vizsgálatára szorítkoznak. Ezek gyakran csupán egyes gének megnyilvánulásai, vagyis meglétük ill. hiányuk mindössze egyetlen funkcionáló proteinféleség termelésével függ össze, miért is öröklődésmenetük tanulmányozása kétségtelenül a genetikai technika „kifinomodásához" vezetett.

A biokémiai markerek gyakran enzimek, melyek aktivitását könnyen kimutathatjuk. A mikroorganizmusok genetikája fejlődésének másik mozgatórugója éppen ezzel a ténnyel kapcsolatos. A mikrobák kémiailag definiált tápközegeken tenyészthetők. A közeg összetételének célnak megfelelő módosításaival a különböző enzimatikus aktivitással rendelkező mutációk szelekcióját viszonylag egyszerűen megvalósíthatjuk. Így pl. a laktózfermentáló sejtek, melyek ezt a cukrot fermentálható monoszacharidokra képesek hasítani, EMB (eozin-metilénkék)-lemezeken sötét bíborszínű kolóniákat fejlesztenek, míg a laktóz-negatívak kolóniái színtelenek és áttetszőek. Máskor, a vad típusú sejtek szaporodását a tápközeghez adott antibiotikumokkal gátolják, vagy ugyanezt az eredményt specifikus fágokkal érik el. Mindkét esetben viszont a kívánt mutánsok zavartalanul fejlődhetnek. A mutánsok szelekcióját telepmorfológiai bélyegek megfigyelésére is alapíthatják. A sugárgombáknál értékes tulajdonságok, mint pl. az iparilag hasznosítható antibiotikumok termelése, nem ritkán kulturális morfológiai bélyegekkel (telepszín, felü-

leti és szegélymorfológia, a környező tápagarba diffundáló, oldódó exopigment stb.) társulhatnak. Ilyenkor a lemezeken kinőtt nagyszámú telep között a megfelelő külleműekre kutatnak és ezeket izolálják. A szelekció nagyon gyakori célja olyan genetikai mutánsok izolálása, melyek valamilyen létfontosságú metabolit előállítására nem képesek (auxotrófok). A kívánt metabolitra deficiens mutánsokat a prototrófok (nem deficiensek, melyek rendszerint minimál táptalajon is növekedni képesek) sejtjeinek tömegéből alkalmas módszerekkel különíthetjük el. Egy ilyen módszer a vegyes populációból a prototrófok penicillines gyérítése. E célból a sejtek tenyésztését először a kérdéses metabolitra hiányos táptalajon végzik. Ekkor az auxotrófok nem fejlődnek, a prototrófok viszont igen. A szaporodó sejtpopulációt ezután penicillinnel kezelik. Mivel ez az antibiotikum csak a szaporodó sejtekre hat, a prototrófok elpusztulnak, az auxotrófok viszont nem. Többször megismételve a prototrófok keltetését és pusztítását, az anyagot végül a kérdéses metabolitot is tartalmazó lemezeken szélesztik. Így már az auxotrófok izolálása könnyebben lehetővé válik. Ezt a módszert általában más módszerekkel kombinálva alkalmazzák. Így pl. az ún. *„replica plating"* (lemezmásolati) technikával. Ennek az a lényege, hogy a sejteket első lépésben teljes értékű táptalajon lemezelik. Ezen mind a proto-, mind az auxotrófok kolóniát képeznek. A kolóniákat tartalmazó lemezekről hiánymetabolittól mentes tápagarból öntött lemezek segítségével másolatokat készítenek. A másolás úgy történik, hogy a petricsésze számos kolóniát viselő felületére óvatosan, korongra kifeszített, steril bársonyt érintenek, majd ugyanezzel a bársonnyal a másolatul szolgáló steril lemez felületét enyhe rányomással fertőzik. Ezután a másolati lemezt inkubálják és az azon kifejlődött kolóniákat gondosan összehasonlítva az eredeti lemezen megfigyelhetőkkel megállapítható, melyek bizonyultak a továbboltás után fejlődésképtelennek. Ezeket az eredeti lemezről mint auxotrófokat izolálják. Célravezető az ún. *„small colony technique"* (kis telep technika) is. Ebben az esetben a vegyes populációt a hiánymetabolitot csak kis mennyiségben tartalmazó táptalajokon terítik. Megfelelő ideig tartó inkubáció után kétféle kolóniatípust lehet megfigyelni: kicsiny auxotrófokat és nagy prototrófokat. Az izolálás már könnyű.

Az auxotróf mutánsok szelekciójára irányuló vizsgálatoknál az ún. genotípusos és fenotípusos „késés" jelensége sem hagyható figyelmen kívül. Minthogy a baktériumok nagyon sokszor többmagvúak, viszont a mutáció általában csak a genom egy valamelyik másolatában jön létre, ezért néhány generációnak kell eltelnie ahhoz, hogy az auxotróf mutáns valódi auxotróffá váljon. Addig ugyanis, amíg a sejtben a vad típusú genomnak legalább egy példánya jelen van, prototróf marad, és viszonylag teljesnek tekinthető enzimkészlettel rendelkezik. Ezt az állapotot



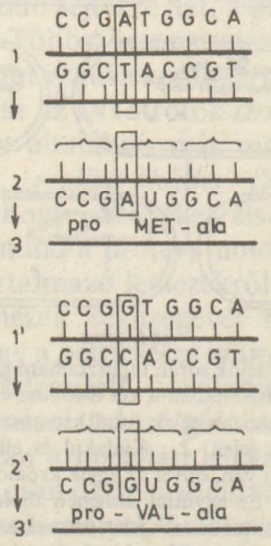
164. ábra

Az auxotróf állapothoz vezető mutációk során tapasztalható geno- és fenotípusos késés. *1)*: Sejtállapot, midőn a replikálódó kromoszómában a két S-lokusz egyikében az M-ponton mutáció jön létre, és ez majd S^--állapotúvá teszi az egyik utód kromoszómáját. E sejtben fekete pontokkal jelölve az S-gén termékei vannak jelen. *2)*: Kialakul és elkülönül a két kromoszóma. A sejt genotípusos késedelem állapotában van, mivel az egyik kromoszóma még tartalmazza az S^+-gént, mely domináns az S^--gén felett. Ez egyúttal átmeneti diploid állapot is (a sejt heterozigóta). A géntermékek produkciója folyamatos és ezek jelen vannak a citoplazmában. *3)*: Vad típusú utód. *4)*: S^--mutáns utód. E sejt fenotípusosan S^+-nak számít, mivel a géntermék a citoplazmából még kimutatható. 5) – 8): A fenotípusos késés szakaszának folyamatos megszünése és a mutáns fenotípusú sejt megjelenése

genotípusos vagy szegregációs késésnek nevezzük *(164. ábra)*. A vad típusú genom eltűnése a sejtből még mindig nem jelenti azt, hogy a sejt már nem rendelkezik többé olyan enzimekkel, melyek a mutációt szenvedett génben voltak kódolva. Az ún. fenotípusos késés *(lásd 164. ábra)* állapota mindaddig tart, amíg a további sejtosztódások során az enzim egyre jobban felhígul, majd megszületik az első enzimmentes, minden szempontból auxotróf sejt.

1.35.2. A mutáció molekuláris szintű értelmezése

Mutációról beszélünk egy gén nukleotidszekvenciájában bekövetkező bármely változás esetén, mely a gén által kódolt fehérje strukturális és működésbeli módosulását vonja maga után *(165. ábra)*. A nukleotidszekvencia változása két módon következhet be. Először is hibák csúszhatnak a replikáció mechanizmusába. Ennek következményeként egy bázispárt másik pár fog helyettesíteni. Másodszor a DNS cukorfoszfátlánca (akár több ponton is) megszakadhat. Ezt pl. két szakadási pont közé eső szekvencia kiesése vagy inverziója (fordított beépülése), vagy egy új szegment inkorporációja követheti.



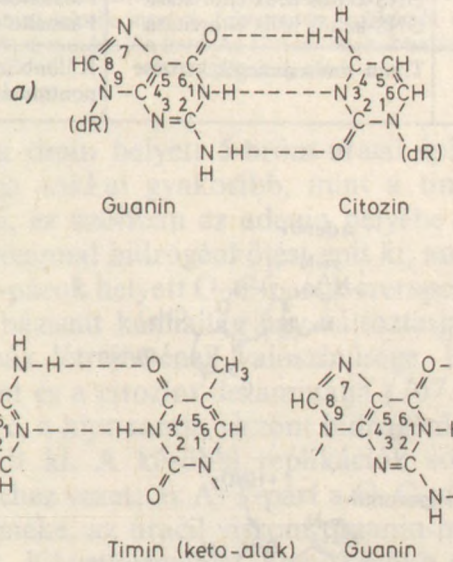
165. ábra

A DNS egy pontján bekövetkezett mutáció kihatásaként a géntermék peptidösszetételében is megváltozhat egy aminosav. Ez a változás csaknem mindig bekövetkezik, ha a pontmutáció a triplet első bázisát érinti. 1: Vad típusú DNS; 2: Vad típusú mRNS; 3: Vad típusú peptid; 1': Mutáns DNS; 2': Mutáns mRNS; 3': Mutáns peptid

Foglalkozzunk először a bázispárok kicserélődésének lehetőségeivel, a spontán és indukált mutációkkal. Ismeretes, hogy a mutációk gyakran megfordíthatók, vagyis később helyreállhat az eredeti bázisszekvencia. Ilyenkor a mutációt az esetek túlnyomó többségében replikációs hibából származó, egyetlen bázispárcsere képezte. Az ilyen, ún. „pontmutációk" helye a struktúrgénen belül mutánsok keresztezésével és a vad típusú szekvenciákat eredményező rekombinációk felderítésével pontosan térképezhető.

1.35.3. Spontán mutációk

Az ún. spontán pontmutációk létrejöttében a legnagyobb valószínűséggel, az elektronoknak egy purin- vagy pirimidin-bázisban nem nagy gyakorisággal tapasztalható tautomer helyzetváltoztatása játssza a fő szerepet. A DNS-ben a bázisok keto-formában vesznek részt. A keto-enol tautoméria mutációkhoz vezet. Így pl. a timin normális körülmények között, keto állapotban, hidrogénkötéssel az adeninhoz kapcsolódik. Ha viszont a timin, abban a pillanatban, amikor templátként szolgál a DNS replikációjához, éppen a kivételes enol-stádiumban van, úgy hidrogénkötésekkel a guaninhoz kötődhet *(166. ábra)*. Következésképpen az új fonalban adenin helyett guanin fog szerepelni, és a későbbi generációkban a DNS egy pontján az eredeti A–T-pár helyett mindig G–C-pár alkotja a bázisszekvencia láncszemét. Mind a négy bázis képes tautomériára és érdekes módon kb. a spontán mutációk gyakoriságával (10^{-6}–10^{-8}) azonos mértékben.



166. ábra

a) A guanin és a citozin normál bázispárosodása a DNS-ben. A hidrogénkötéseket szaggatott vonalak jelzik. dR: a DNS cukorfoszfátgerincének dezoxiribóza. *b)* A timin normál, vagyis keto-állapotában két hidrogénkötéssel kapcsolódik az adeninhez. *c)* A timin az elektronok ritka tautomer eltolódása eredményeként enol-állapotban is előfordulhat. Ebben az állapotában a timin a guaninnal három hidrogénkötést alakíthat ki. Ha a tautomer eltolódás a replikáció alatt fordul elő, úgy a DNS-be adenin helyett guanin épül be, és végül is a nukleotidszekvenciában az eredeti A–T-párt egy G–C-pár fogja helyettesíteni

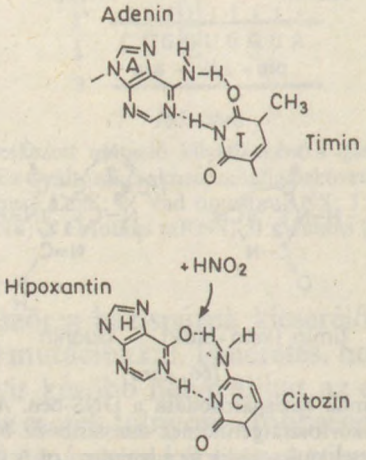
1.35.4. Indukált mutációk

Az indukált mutációkkal foglalkozva mindenekelőtt megállapítható, hogy a mutagén ágensek különböző típusai *(41. táblázat)* vagy a bázisok tautomerizációjának mértékét növelik meg, vagy valamilyen más módon idézik elő a replikáció ideje alatt „nem összeillő" bázisok közötti hidrogénkötések kialakulását.

41. táblázat

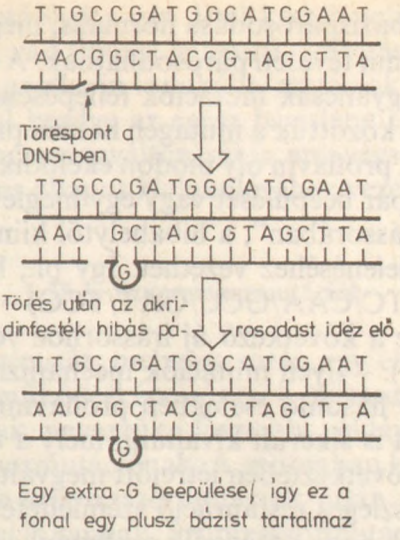
A mikroorganizmusok genetikai tanulmányozásánál alkalmazott fontosabb mutagén vegyületek és az általuk kiváltott mutációk típusai

A mutagén vegyület megnevezése	Működési sajátossága	Az előidézett mutáció típusa
5-Bróm-uracil	Bázisanalóg (timin)	Pontmutáció
2-Amino-purin	Bázisanalóg (adenin)	Pontmutáció
Salétromossav (HNO_2)	Bázisok oxidatív dezaminálása	Pontmutáció
Hidroxil-amin (NH_2OH)	Citozin modifikációja	Pontmutáció
Etil-etán-szulfonát (EES)	Alkilezőszer	Bázisok (guanin) eltávolítása
Etil-metán-szulfonát (EMS)	Alkilezőszer	Bázisok (guanin) eltávolítása
Proflavin	DNS-kettős hélix eltorzítása	Fáziseltolódású mutációk
5-Amino-akridin	DNS-kettős hélix eltorzítása	Fáziseltolódású mutációk
Ultraibolya sugárzás	Timin–timin dimerek képzése	Különböző, azonban gyakori pontmutációk



167. ábra

A salétromossav dezaminálja az adenint. Az adeninből így létrejövő hipoxantin nagyobb vonzattal párosul a citozinnal, mint a timinnel. Következésképpen a DNS-ben változások mennek végbe, melynek során az eredeti A–T-párt G–C-pár fogja helyettesíteni



168. ábra

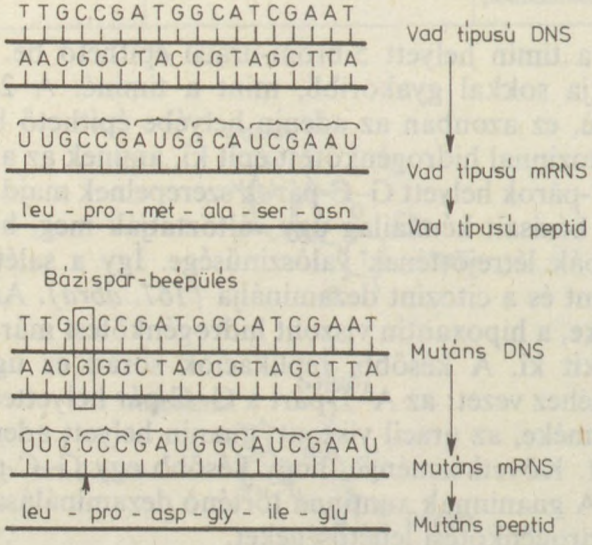
Egy új bázispár beépülésének mechanizmusa a DNS-be akridinfestékek hatására. Első lépésben a DNS egyik fonala megszakad. Ezt követően a replikáció alatt az akridinfesték a szakadási ponton hibás bázispárosodást idéz elő. Ennek nyomán a szakadást szenvedett fonalban egy extra- (plusz) bázis (az ábrán guanin) jelenik meg. A folyamatos replikációt ez drámai módon megzavarja: leolvasási fáziseltolódású mutáns jön létre. Az akridinfestékek hatásának pontos mechanizmusa ma még ismeretlen

A DNS-be a timin helyett 5-bróm-uracil építhető be. Ennek enol-tautomer alakja sokkal gyakoribb, mint a timiné. A 2-amino-purin hasonló hatású, ez azonban az adenin helyébe építhető be. Tautomer alakjában a citozinnal hidrogénkötést épít ki, aminek az a következménye, hogy A–T-párok helyett G–C-párok szerepelnek majd. Egyes mutagének a DNS bázisait kémiailag úgy változtatják meg, hogy megnő a replikációs hibák létrejöttének valószínűsége. Így a salétromossav az adenint, guanint és a citozint dezaminálja *(167. ábra)*. Az adenin dezaminált terméke, a hipoxantin viszont hidrogénkötést már timin helyett citozinnal alakít ki. A későbbi replikációk során ez ugyancsak egy bázispár cseréjéhez vezet: az A–T-párt a G–C-pár helyettesíti. A citozin dezaminált terméke, az uracil viszont, guanin helyett adeninnel épít ki hidrogénkötést. Következménye, hogy később egy G–C-párt A–T-pár vált majd fel. A guaninnak xantinná történő dezaminálása nem változtatja meg a hidrogénkötési lehetőségeket.

A leghatékonyabb mutagének között bizonyos alkilező vegyületek szerepelnek. Jó példa ezekre az etil-metán-szulfonát. Ezek a purin- és pirimidinbázisokat különböző helyeken alkilezik. Így pl. a citozinban az N-3, a guaninban az O-6 és N-7 pozíciókban. Jóllehet az N-7-es helyzet-

ben alkilezett guanin bázispárosodása normális, mégis az N^3-metil-citozin és az O^6-metil-guanin tévesen párosodhatnak. A citozin N-3 alkilezése vírusrendszerben ugyancsak mutációk fellépéséhez vezetett.

Az akridinfestékek, közöttük a mutagén hatású proflavin, más módon hatnak *(168. ábra)*. A proflavin oly módon ékelődik be a DNS bázispárjai közé, hogy egy új pár beépülését vagy egy meglevő kiesését idézi elő. Ez viszont a DNS „írássorában", a hibahelytől kiindulóan, egy teljesen új tripletsorozat megjelenéséhez vezethet. Így pl., ha a korrekt írássor megfelel a – (AGG/CTC/CAA/GCC/GAT/TCG) – tripletsornak, úgy a negyedik bázis törlése a következő új írássorhoz vezet: – (AGG/TCC/AAG/CCG/ATT/CG). – Ilyen mutációk mechanizmusának felderítését megkönnyítette, hogy hasonló esetekben proflavinnal az elsőhöz közel egy második mutációt is sikerült kiváltani, mely a tripletszekvenciának a bázissor-eltolódás következtében létrejött megváltozását az eredetijére visszafordította. A részleges restauráció szemléltetésére a fenti példával élve tételezzük most fel, hogy a második proflavinkezelés esetén a hetedik és a nyolcadik bázis közé egy G épül be. Ennek megfelelően a szekvencia most a következők szerint alakul: – (AGG/TCC/AGA/GCC/GAT/TCG). – Vagyis a korrigált írássor a vad típusú szekvenciától már csupán a második és a harmadik tripletben tér el. Amennyiben ez a két aminosav



169. ábra

Egy új bázispár beépülésének hatása a géntermék összetételére. A beépülést követően minden egyes tripletnek megváltozik a bázisszekvenciája. Ennek következtében a mutáns géntermékének aminosav-összetétele radikálisan különbözik a vad típusú gén termékétől. Az ábrán a beépülés következtében megváltozott első triplet az eredeti CCG helyett CCC lett, azonban a kód degeneráltsága következtében mindkettő prolint kódol

nem esszenciális jelentőségű a gén által kódolt teljes fehérje működése szempontjából, úgy a vad típusra jellemző aktivitás ismét helyreállítottnak tekinthető. Ha a proflavin indukálta mutációk magányosan lépnek fel, úgy a hibaponttól kezdve az egész bázislánc eltolódik, maga után vonva a tripletszekvencia megváltozását is, ami végső soron hibás fehérje szintéziséhez és mutáns állapot kialakulásához vezet (lásd még a *168.* és *169. ábrák*at is).

1.35.5. Szupresszormutációk

A mutációnak azt a típusát, melynek során egy előzetes mutáció által már inaktivált gén működésképességének restaurációja megy végbe, szupresszormutációnak nevezzük. Fentebb példáját láthattuk az ún. génen belüli szupresszormutációnak. A genomban keletkezett károsodások kiküszöbölésének szupresszormutációk útján azonban sokkal bonyolultabb megoldásai is vannak. Szupresszormutációk előfordulhatnak a kromoszómának különböző, a funkciójában helyreállítást igénylő géntől távol eső pontjain is. A génen kívüli *(„extragenic")* szupresszorlokuszok lényegében olyan gének, melyek a transzlációs rendszer alkotóelemeit, mint amilyenek a tRNS-k is, kódolják. Mutációjuk hozzájárulhat olyan változásokhoz, melyek a DNS eredeti kódolási hibáit kiegyenlíteni képesek. Így pl. egy ilyen típusú szupresszormutációval kapcsolatban mutatták ki, hogy javító hatása a szerin tRNS antikodonjának módosulására volt visszavezethető.

1.35.6. Sugárzások által kiváltott mutációk

Mutációk előállításához széles körben alkalmaznak besugárzást (röntgen, UV stb.). A sugárzás által indukált mutációk kialakulásának mechanizmusa ma még csak kevéssé ismert. Ami az UV-sugarakat illeti, azt már tudjuk, hogy ezek hatására a DNS-ben a szomszédos pirimidinek között kovalens kötések jönnek létre. Az ilyen pirimidindimerek, amennyiben a helyreállítás céljait szolgáló „kimetszésük" vagy hidrolízisük nem következik be, hiányokat idéznek elő a replikáció alkalmával előállított komplementer fonalakon. Minthogy az új duplexek az eredeti UV-károsodásnak megfelelően létrejött dimerekkel szembeni pontokon mindenütt hiányosak, működésképességük csak a folytonossági hibák korrigálása útján regenerálható. Ilyen korrekció végbemehet rekombináció útján olyan testvérduplexek között, melyeknél az UV indukálta sérülések a DNS-en különböző helyeken fordulnak elő. A károsodott kromoszómák sértetlen szegmentjei rekombinálódva, egyetlen teljes,

sértetlen kromoszómát produkálhatnak. Az UV-sugárzás DNS-re gyakorolt hatásának másik leggyakoribb terméke az egy molekula víz addíciójával létrejött, hidratált pirimidin. *In vitro* kivitelezett kísérletekben igazolták, hogy a replikáció során a hidratált pirimidinek másolási hibákat idéznek elő.

1.35.7. Visszafordíthatatlan mutációk

A kromoszóma bázisszekvenciája a cukorfoszfátkötések felszakadása révén is megváltozhat. A spontán vagy indukált mutációk nagy számát tanulmányozva azt tapasztalták, hogy sok közülük többé már nem volt megfordítható. Az ilyen megfordíthatatlan mutációkat térképezve általában tapasztalható, hogy szélesen átfednek egy sor pontmutációs helyet és a pontmutációkkal nem rekombinálódnak. Így az ilyen mutációk feltehetően egész bázisszekvenciákat, és nem magányos bázispárokat érintenek. Legvalószínűbb mechanizmusuk a DNS egyes szakaszainak teljes kiesése. Sok esetben ez a „kiesés" közvetlenül is megfigyelhetővé válik, ha a vad típusú törzs és a hiányos mutáns egyfonalú DNS-molekuláiból „heteroduplexek" képződését tesszük lehetővé. Utóbbiakat elektronmikroszkópban tanulmányozva észrevehető, hogy azokon a helyeken, ahol a mutáns DNS folytonossági hiányokkal rendelkezik, a vad típusú DNS egyfonalú hurkokat ír le.

1.35.8. A mutációk következményei celluláris szinten

A sejt által hordozott genetikai determinánsok összességét a sejt genotípusának nevezzük. A megfigyelhető tulajdonságok alkotják a fenotípust. Génmutációk csupán akkor ismerhetők fel, ha megfigyelhető fenotípusos változásokat idéznek elő. Ezek morfológiai, kulturális, fiziológiai eltérések lehetnek. Az utóbbiak közé sorolhatjuk az enzimaktivitásokban megnyilvánuló változásokat is. Mind a „nyereséggel járó" *(gain mutations)*, mind a „veszteséggel járó" *(loss mutations)* mutációk tárgyalásánál célszerű elkülöníteni az egymagvú és a többmagvú sejtek esetében észlelhető fenotípusos megnyilvánulásokat.

Az egymagvú sejtek nyereséges mutációi esetében, ha pl. a mutáció a sejtet egy aktív enzim szintézisére vonatkozó képességgel ruházza fel, úgy a mutáció fellépése és az enzim szintézisének kezdete között idővel mérhető késés nem észlelhető.

Az egymagvú sejtek veszteséges mutációi által okozott fenotípusos változások megértését az alábbi gondolatmenet szolgálja. A legtöbb

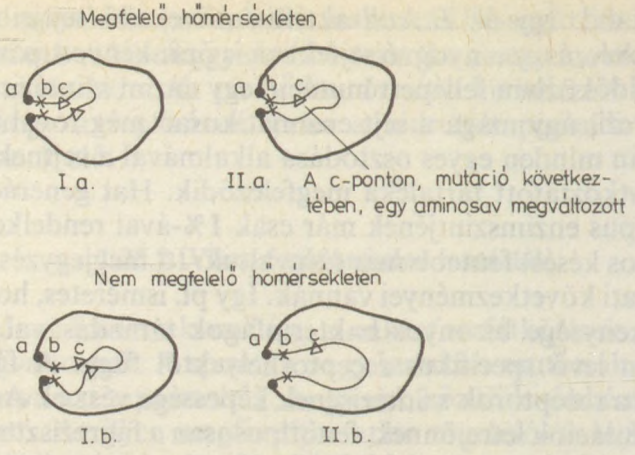
sejtprotein stabil. Így az *E. coli* aktívan növekedő sejtjeiben nincsen protein-turnover, és ez a nyugvó sejtekben is óránként csupán 5%-ot tesz ki. Így ha az időközben fellépett mutáció egy enzim szintézisének leállását eredményezi, úgy maga a sejt enzimatikusan még továbbra is aktív marad. Ezután minden egyes osztódása alkalmával a sejtnek a kérdéses enzimre vonatkoztatott tartaléka megfeleződik. Hat generáció után az utód a vad típus enzimszintjének már csak 1%-ával rendelkezik. Ezt az ún. fenotípusos késést fentebb már tárgyaltuk. Itt megjegyzésre érdemes, hogy gyakorlati következményei vannak. Így pl. ismeretes, hogy a baktériumok érzékenysége bizonyos bakteriofágok támadásával szemben a sejtfalon jelen levő specifikus receptorhelyektől függ. A fágrezisztens mutánsoknál a receptorok szintézisének képessége vész el. Amikor ilyen veszteséges mutációk létrejönnek, fenotípusosan a fágrezisztenciát mindaddig nem lehet kimutatni, amíg megfelelő számú generáció elteltével a fal felületén található receptorok felhígulásának kritikus mértéke be nem következett. Eszerint jelentős késés lehet a fenotípusos megnyilvánulásban.

Vegyük sorra most a többmagvú sejtek mutációit. Mint láttuk, sok mikroba sejtje sokmagvú. Az exponenciális növekedés során az *E. coli* sejtjei átlag négy magot tartalmaznak. Ha egy ilyen sejtben nyereségmutáció jelentkezik, úgy az a nukleusz, amelyben a mutáció történt, elindítja az új, aktív enzim szintézisét, és a fenotípusos megnyilvánulás közvetlenül észlelhető. A nyereségmutáció tehát domináns. A gén aktív alakja (allélje) jut kifejezésre, és nem az inaktív.

Ha a többmagvú sejtben veszteséges mutáció történik, úgy az enzimszintézis indukcióját csupán a mutáns nukleusz szünteti be, a többi nem. Az ilyen mutáció ezért recesszív és magában az eredeti sejtben nem nyilvánulhat meg. Néhány generáció eltelte után azonban a mutált nukleusz külön sejtbe szeparálódik és ez már genetikailag tiszta lesz. Így a veszteséges mutáció fenotípusos megnyilvánulása csak a fenotípusos késést és a magszegregációt követően tapasztalható.

1.35.9. Hőmérsékletszenzitív mutánsok

Itt kell foglalkoznunk az ún. hőmérsékletszenzitív mutánsokkal is. A baktériumok ilyen típusú mutánsainak izolálása és tanulmányozása különösen a létfontosságú bélyegek kutatása terén tett szert nagy jelentőségre. Ilyen genetikailag kódolt tulajdonságok pl. azok, melyek a sejtosztódást szabályozzák vagy nélkülözhetetlenek a sejt életképességének fenntartásában. A hőmérséklet-szenzitív mutánsok csak egy bizonyos „megengedett" hőmérsékleten növekednek normálisan és hasonlóak a



170. ábra

Egyszerű modell a hőmérsékletszenzitív mutációk ábrázolására. A mutáció által érintett gén vázlatosan bemutatott produktumán az „a" aktív hely működése két aminosav-oldallánc közelségétől függ. A vad típusú proteinben (Ia és Ib) ezeknek az oldalláncoknak a közelségét a „b" és „c" pontokon létrejövő nem kovalens kötések a korrekt konformáció kialakításával biztosítják. Ez a konformáció mind a megengedett, mind a már nem megengedett hőmérsékleten egyaránt stabil. A mutáns gén produktumában (IIa és IIb) a „c" ponton nincs kapcsolódás. Mindemellett e protein elégségesen stabil ahhoz, hogy konfigurációját legalább a megengedett hőmérsékleten megőrizze. Nem megengedett körülmények között azonban a „c" ponton hiányzó kötés olyan nagy mértékű konfigurációváltozással jár, hogy még a „b" kötés is elmarad, és a reaktív „a" hely működésképtelenné válik

vad típushoz. A megengedettnél alacsonyabb vagy magasabb, vagyis „nem megengedett" hőmérsékletnek kitéve, tenyészetükben érvényre jut a mutációnak megfelelő fenotípus, vagyis a mutáció jellegének megfelelő termikus érzékenység nyilvánul majd meg. Ha a mutáció egy nélkülözhetetlen génben van, úgy a nem megengedett hőmérsékleten végrehajtott inkubáció növekedésgátló hatású. Az ilyen mutánsok tulajdonképpen az ún. „feltételesen letális mutánsok"-nak *(„conditional lethal mutants")* egy alcsoportját képezik. Ezek képtelenek bizonyos meghatározott környezeti feltételek között (vagyis az ún. „nem megengedett" viszonyok között, mely vonatkozhat nemcsak hőmérsékletre, hanem kémiai anyagok jelenlétére, fágokra stb.) növekedni, ugyanakkor normálisan szaporodnak a környezeti tényezők más aspektusaiban.

Feltételezik, hogy a hőmérséklet-érzékenység a genomban létrejött pontmutáció eredménye. Ilyen mutációk a géntermékben csak csekély mértékű változást idéznek elő, például egy aminosavcserét a polipeptidtermékben. Ez a változás az ún. „megengedett körülmények" között még nem elegendő ahhoz, hogy az aktív termék konformációját módosítsa. Ezzel szemben a konformációváltozás a „nem megengedett" hőmérsékleten már bekövetkezhet és a polipeptid biológiai aktivitását vagy módo-

sítja, vagy teljesen meggátolja. A *170. ábra* a mutációk e típusának modelljét mutatja be.

Hőérzékeny mutánsok kitenyésztése sok lehetőséget nyújt pl. az onkogén (rákkeltő) vírusok daganatképző szerepének tanulmányozásában is. Így a *polyoma* vírus egyik mutánsa pl. csak 31 °C-on képes a sejtek malignus transzformációjára (rosszindulatú átalakítására), míg 39 °C-on már nem. Kiderült, hogy a mutált gén a vírus produktív infekciója (a vírus szaporíttatásához vezető fertőzés: a daganatképzés elmaradása) esetén, a vírus-DNS szintéziséhez szükséges. Jelenleg megkísérlik az onkogén vírusok olyan hőérzékeny mutánsait előállítani, melyekben a rosszindulatúan átalakított sejt sajátos, új anyagcsere-folyamatait és működését kódoló gének, ill. termékeik külön-külön hőérzékenyek. Így feltehetően megismerhetővé válik majd az egyes géneknek a daganatképzésben játszott specifikus szerepe.

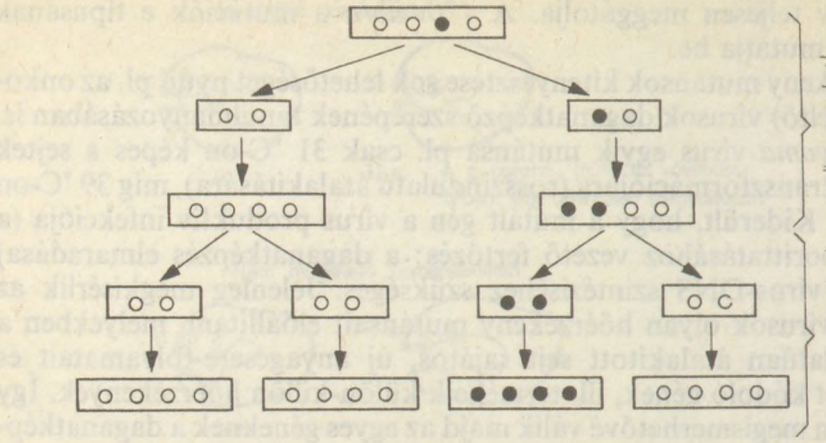
1.35.10. A mutáció következményei a sejtpopuláció szintjén

A mutáció jelenségét populációs szinten tárgyalva a mutánsgyakorisággal (*„mutant frequency"*), a mutáció rátájával (*„mutation rate"*), továbbá a szelekcióval kell foglalkoznunk.

Először is vegyük szemügyre, miként viszonyul a mutáns gyakoriság a mutáció rátájához. A mutánsok aránya egy adott sejtpopulációban a mutánsgyakoriság. Ez a gyakoriság, ha az egyes megfigyelhető fenotípusok megoszlására alapítunk, általában 1×10^{-5}–1×10^{-10}-ig terjed. Egy adott kultúrában a mutánsok gyakorisága lényegében három független paramétert tükröz: *a)* A valószínűsége annak, hogy a sejt egy meghatározott időtartamon, pl. egy generációtartamon belül mutálni fog. Ez a mutáció rátája. *b)* A mutációs történések időbeli megoszlása a tenyészet szaporodási periódusa alatt. Például kivételesen korai mutációk a mutáns utódok rendkívül nagy klónjait eredményezhetik (klón: egyetlen sejt utódainak összessége). *c)* A mutáns és a szülői típusú sejtek szaporodási sebességének differenciája.

1.35.11. A mutációs ráta fogalma

A mutáció rátája mérhető és meghatározható. Egy komplex egyenlet segítségével, mely valamennyi fenti paramétert számításba veszi, vonatkozásba hozhatjuk az átlagos mutánsgyakorisággal. Vannak azonban módszereink, melyekkel valamely tenyészetben fellépett mutációk számát (szemben a mutáns sejtek számával) közvetlenül felbecsülhetjük, és



171. ábra

A mutáns nukleusz szegregációja. Ha a mutáció (fekete pont) egy négymagvú sejtben történt úgy, mint az az ábrán látható, két generációjának kell eltelnie ahhoz, hogy tiszta mutáns sejt jelenjen meg

ezáltal a mutáció rátájának egyszerű becslése is lehetővé válik. Ezt a rátát általában a „mutációk/sejt/generáció" egységében fejezik ki, ami más szóval annak a valószínűsége, hogy a sejt egyszeri méreti megkettőződése és két sejtté válásának eseményei alkalmával egy mutáció fordul elő. Amidőn egy sejt két egymás után következő generáción át négy sejtre szaporodik, például három ilyen „sejtmegkettőződési esemény" történik *(171. ábra)*. Általánosítva azt mondhatjuk, hogy ha N_0 számú sejt N_1 számra szaporodik, úgy maguknak a megkettőződési történéseknek a száma N_1–N_0-val egyenlő. A mutációs rátát *(a)* így egyszerű formulával fejezhetjük ki:

$$a = \frac{M}{N_1 - N_0}$$

ahol M a sejtek számának N_0 értékről N_1-re emelkedése alatt történt mutációk mennyisége.

1.35.12. Relatív és abszolút szelekció

Ami a szelekciót illeti, relatív és abszolút szelekciót különböztetünk meg. Egy tenyészetben bármilyen kis számban is legyen jelen valamely mutáns, ha ennek szaporodási vagy pusztulási sebessége eltér akár igen csekély mértékben is a szülői típusétól, úgy ez az eltérés óriási populációs eltolódásokat vonhat maga után. Tegyük fel pl., hogy egy tenyészet 10^7 penicillinszenzitív és mindössze 10 penicillinrezisztens sejtet tartalmaz.

Ha a szenzitív sejtek generációs ideje 60 perc és a rezisztenseké 50 perc, úgy a szenzitívek 60 generációját kitevő 6 továbboltás után a tenyészetben már 1%-ra emelkedik a rezisztensek aránya. E fenti, a relatív szelekció példájával szemben a mikrobiológiai gyakorlatban a baktériumok tenyészeteit sokszor tudatosan vagy nem tudatosan abszolút szelekciónak vetik alá. Így, ha az említett tenyészetet penicillinnel kezelik, úgy a szenzitívek mind elpusztulnak és a rezisztensek a populáció 100%-át alkotják. Mivel a mutánsok a tenyészetekben általában csak rendkívül csekély számban vannak jelen, ezért detektálásukhoz abszolút szelekciót alkalmaznak. Gyakorlatilag ez úgy kivitelezhető, hogy a tenyészetet olyan agar-közegen lemezelik, mely csupán a keresett típusú mutánsok kolóniaképzését teszi lehetővé.

1.35.13. Irányított evolúciós kísérletek

A mutációk jelentőségét és szerepét az ún. „irányított evolúciós kísérletekben" már sokan tanulmányozták. Ezek során egy adott baktériumpopulációt valamely anyagcsere-feladat megoldására, melyre a kiinduló fenotípus képtelennek bizonyult, erős szelekciós nyomással „kényszerítenek". Az ilyen kísérleteknél abból a feltevésből indulnak ki, hogy a baktériumnak a laboratóriumban alkalmazott mutációs stratégiája hasonló lehet ahhoz a stratégiához, amely a természetes evolúció során is érvényre jut. Az ilyen kísérletektől nem várható ugyan, hogy nagyléptékű, korszakokra kiterjedő történésekbe is betekintést nyújtsanak, mégis a relatíve finom változások tendenciáit feltétlenül elárulhatják. Az eredmények (*lásd* RILEY és ANILIONIS, 1978) arra utalnak, hogy amikor a baktériumok új anyagcsere-funkciókra tesznek szert, ennek mechanizmusa csupán néhány mutációs lépést jelent, melyek vagy már meglevő enzimek produkciós sebességét befolyásolják, korábban már megvolt, nyugvó gének megnyilvánulására hatnak, az enzimek elsődleges struktúráját, ill. specificitását érintik, vagy a transzportrendszerek megnyilvánulását, ill. specificitását változtatják meg. Az ilyen mechanizmusok útján szerzett új anyagcsere-funkciók megjelenésének az alapja az, hogy a genomban már eleve olyan genetikai információk vannak jelen, melyek már csaknem megfelelnek annak a feladatnak, melynek megoldására a körülményeket a kísérletek során szelektívvé tettük.

A genetikai kódban már viszonylag kicsiny változások a szervezet anyagcsere-kapacitásának lényeges módosulását válthatják ki. Az ilyen típusú mechanizmusok a finom környezeti változásokhoz való fokozott alkalmazkodást teszik lehetővé, azonban ezekkel a nagyobb arányú evolúciós változások, melyek pl. az energiaszerzés és -konzerválás új

anyagcsereútjainak megjelenésével kapcsolatosak, már kivitelezhetetlenek.

A környezet szelektív nyomása hatására létrejött azon genetikai változásokat tanulmányozva, melyek során egy új szubsztrát hasznosításának képessége jelent meg, azt tapasztalták, hogy a létrejött változás mind a szabályozó rendszereket, mind a strukturális géneket egyaránt érintheti. Az *E. coli*ban pl. szelekció révén egy olyan mutánst különítettek el, melynél a mutáció az L-fukóz katabolizmus útján (L-fukóz-izomeráz és L-fukulokináz) az enzimindukció specificitását változtatta meg. Az ilyen mutánsban a fukóz enzimeket D-arabinóz indukálhatta, és ezeknek az enzimeknek a széles körű specificitása D-arabinózon gyenge, de mégis megfelelő növekedést tett lehetővé (LeBlanc és Mortlock, 1971). Egy másik *E. coli* mutánsban, mely a D-xilóz hasznosításának a képességét szerezte meg, egy látszólag újnak minősíthető izomerázt találtak, mely D-mannóz izomeráz lehet (Stevens és Wu, 1976). Feltehetően ez az enzim evolúciós „maradvány", mely még azokból az időkből maradt vissza, amikor a szénhidrátok katabolizmusa foszforilált intermedierek nélküli anyagcsereutakon haladhatott. Az új enzim génje a vad típusban nyugvó *(dormant)* állapotban lehet jelen, és ahhoz, hogy egyáltalán megnyilvánuljon, mutációra van szüksége. A genomban a nem megnyilvánuló genetikai kapacitás bizonyos fokú genetikai plaszticitást biztosít, mely evolucionárisan kétségtelenül előnyös lehet. Az a képesség, hogy egy vagy néhány mutációs lépéssel új anyagcsere-kapacitáshoz lehet jutni, meghaladhatja azt a hátrányt, ami abból származik, hogy a genom egy olyan frakcióját is állandóan replikálni kell, mely funkcionálisan csak tartaléknak számít.

1.35.14. Az antimutagenezis típusai

A mutagenezis a genetikai anyag megváltozása a mutációt előidéző anyagoknak, az ún. mutagéneknek a hatására. Ennek során a spontán mutáció rátája jelentősen megnövekedik. Az első történés mindig az ún. premutáció létrejötte, mely maga a DNS sérülése, megváltozása. A premutáció potenciálisan már alapját képezheti az új mutáns megjelenésének. Számos tényezőtől függ azonban, hogy ez ténylegesen meg is történik-e. Ilyen tényezők: a hibajavító rendszerek működése, továbbá a mutációs anyagcsereút kibontakozásának sokszor igen körülményes lehetősége. A mutáció maga stabil, öröklődő változás a DNS-ben. A mutáció gyakorlatilag jelen lehet a sejtben anélkül, hogy fenotípusosan megnyilvánulna. A mutáns olyan szervezet, melyben a mutáns fenotípus már meg is nyilvánul. Vegyük pl. az UV-sugárzás hatására kialakuló

sztreptomicinrezisztenciát. A pirimidindimerek premutációs sérülések. Ezt a bázispár-szekvencia változása követi. A fenotípusos megváltozás azonban késik, minthogy ehhez előbb a sejt osztódása és a megváltozott proteinek riboszomális szintézise szükséges. Mindez előfeltétele a fenotípusosan sztreptomicinrezisztens, valódi mutáns megjelenésének. Antimutagenezisről beszélünk akkor, amikor valamilyen anyag vagy hatás a mutációk számát csökkenteni képes. Számos esetben csak látszólagos antimutagenezissel állunk szemben, minthogy pl. a mutagén dózisok redukciójával elért vagy pusztuló sejttenyészettel dolgozva, az elhalási folyamatok miatt redukálódott mutációszám nem valódi antimutagenezis.

Az antimutagenezis mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagy jelentőségű, mivel mechanizmusainak felderítése az öröklődési anyag változása és konzervativizmusa sok sajátosságára is fényt derít. Másrészt a környezeti antimutagenezis hatékony eszközt adhat kezünkbe a környezeti mutagenezis ellensúlyozására.

Célszerű a fiziológiai és a genetikai antimutagenezist elkülönítve tárgyalni. Az első esetben a mutációk számának csökkenését vagy a sejtekhez adott vegyszerek és/vagy a sejt fiziológiai állapotának megváltozása, ill. megváltoztatása idézi elő. A második esetben a mutációs redukciót genetikai szinten végbemenő történések, így allélek vagy hibakiküszöbölő gének működése, vagy maga a sajátos genetikai háttér biztosítja. Hangsúlyozni kell, hogy az antimutagenezis különböző típusait sokszor igen nehéz egymástól elválasztani, sőt még a látszólagos antimutagenezis felé is számos átmeneti, nehezen kategorizálható jelenség vezet.

1.35.15. A fiziológiai antimutagenezis

1. Purinnukleozidok (adenozin és guanozin). Ezek voltak az elsőnek kimutatott antimutagén vegyületek. Megállapítást nyert, hogy az *E. coli* B/r-jelzésű törzsének folyadéktenyészetében 100 μg/ml adenozin adagolása a koffein (200 μg/ml) okozta mutabilitást teljesen megszüntette. Kemosztátban, glükózzal vagy triptofánnal korlátozott növekedésű *E. coli*-tenyészetekben a purinnukleozidok mind a spontán, mind a 2-amino-purin indukálta mutagenezissel szemben hatékony antimutagén aktivitásúnak bizonyultak. Egyidejűleg azonban az UV-kiváltotta mutagenezisre redukáló hatásukat már nem tapasztalták, ami arra utal, hogy csak azokkal a mutációkkal szemben hatékonyak, amelyek a DNS replikációja alkalmával jönnek létre.

2. Koffein. Ez a vegyület nem csupán mutagén és genetikai hibajavítás-gátló, hanem bizonyos körülmények között antimutagén is. *E. coli*

törzseknél pl. UV-sugárzás esetén számos esetben észlelték már antimutagenitását. Ha a sugárkezelés után az *E. coli*t olyan közegben tenyésztették, melyhez 1 000 μg/ml mennyiségben koffeint adtak, úgy jelentősen csökkenthették a sztreptomicin alacsony dózisával (3 μg/ml) szembeni rezisztens mutánsok számát. Ugyanilyen koncentrációban, és ugyancsak az *E. coli*nál a spontán és a 2-amino-purin indukálta $Trp^- \rightarrow Trp^+$ mutációs reverziót is csökkentette.

3. Mangánionok. Az eddig rendelkezésünkre álló adatok szerint úgy látszik, hogy a mangánionok a genetikai sérüléseket „sötétben javító rendszerek" *(lásd 595. old.)* működését befolyásolják, és ha a sejteket mangánionokkal (Mn^{2+}) előkezelik, úgy utólagos UV-sugárzás esetén antimutagén hatást érhetünk el.

4. L-metionin. Bizonyos körülmények között az UV-besugárzás és a salétromossav mutagén hatását csökkenti.

5. Spermin és más poliaminok, kinakrin és akridinek. Ezek a vegyületek számos mikroorganizmusban csökkentik a különböző antibiotikumokkal szemben spontán fellépő mutációk számát. Az *E. coli* K–12-törzsnél 150 /ug/ml spermintetrahidroklorid, továbbá 6 μg/ml kinakrinhidroklorid jelenléte mintegy negyedére csökkentette az azidszenzitív→azidrezisztens, ill. $Met^- \rightarrow Met^+$ reverziók spontán mutációs rátáját. E két vegyületről azt tartják, hogy nem specifikus antimutagének. Egyesek feltételezik, hogy a spermin antimutagenezise abban áll, hogy stimulálja a DNS-polimeráz hibajavító működését.

6. Aktinomicin-D és a bázikus fuchsin. A feltevések szerint mind a két vegyület (az első erősen, a második gyengén) a DNS-hez kötődik és ezáltal megakadályozza a DNS-ben végbemehető egyfonalú töréseket.

7. Génderepresszió. A gének represszált és derepresszált állapota elvárhatóan különböző módon befolyásolja a mutabilitást. Ezek során erősen megváltozhat a genetikai anyag hozzáférhetősége és reaktivitása mutagén ágensekkel. Ezenkívül a hibajavító rendszerek számára is változik hozzáférhetőségük. A genetikai rekombináció lehetőségei is eltérnek represszált, ill. derepresszált gének esetében. *Salmonella* HisC- és HisF-mutánsokkal kísérletezve kimutatták, hogy az UV-mutabilitás represszió–derepressziós ellenőrzés alatt áll. A $His^- \rightarrow His^+$ revertánsok gyakorisága 5–8-szor nagyobb volt derepresszált állapotban. Hasonló tapasztalatokat szereztek az *E. coli*val is: a gének represszált állapotát antimutagénnek tekinthetjük.

1.35.16. A genetikai antimutagenezis lehetőségei

a) Genetikai háttéreffektusok. Mikrobiális rendszerekben már régóta ismerjük azt a jelenséget, hogy valamely gén alléljei erősen befolyásolják

egy másik lokusz mutabilitását. Néhány olyan esetet, amikor egy második marker antimutagén hatást fejtett ki, tanulmány tárgyává tettek. Ezek egy részénél kiderült, hogy csupán tápközeghatásról volt szó: a *Bacillus subtilis* egy His^-Thr^--törzsében a His^+-revertánsok (backmutációk) nagyon alacsony száma – összehasonlítva a His^-Thr^+-törzsnél észlelt nagyobb gyakorisággal – ún. „auxotróf tápfaktorelvonásra" volt visszavezethető. A His^-Thr^+-sejtek túlsúlya elvonta a lemezeléshez használt közegből a treonint, így a His^+Thr^--sejtek nem voltak képesek látható kolóniákká szaporodni. Ez a hatás tehát elkerülhető, ha a táptalajhoz nagyobb mennyiségű treonint adnak. Ezzel szemben az *E. coli*nál a sztreptomicindependens allél abszolút antimutagén hatású az UV sugárzással indukált $Trp^- \rightarrow Trp^+$ reverzióra. Ez a jelenség feltehetően arra vezethető vissza, hogy a Trp^+ fenotípusáért felelős „ochre" (UAA-„pont" kód) szupresszorok hatékonysága a sztreptomicindependens riboszómák jelenlétében csökken.

Itt kell ismételten megjegyezni, hogy a valódi reverzióval szemben a szupresszormutáció nem az eredeti mutált pontban, hanem máshol, a génen belül vagy azon kívül következik be, és nem az eredeti genotípust, hanem a vad fenotípust állítja vissza. A génen kívüli szupressziók a genetikai kód lefordításának szintjén, mutáns tRNS-sel kivitelezett téves leolvasással, a mutált hibás kódot korrigálhatják. A genetikai kód degeneráltsága is hozzájárulhat a mutációk érvényesülésének csökkentéséhez. Ezzel kapcsolatos, hogy leginkább a fehérjékben leggyakoribb aminosavak kódjai degeneráltak, ami bizonyos fokú védelmet jelent a nem adekvát aminosavak beépülése ellen.

b) Hibajavítás-deficiens baktériumok. Az *E. coli*nál az ismert vagy feltételezett hibajavító génekben (*exr. pol*A, *rec*A stb.) bekövetkezett mutációk antimutagén hatást fejthetnek ki. Ha azoknak az Arg^--auxotróf *E. coli* törzseknek a tenyészeteit, melyek genomjában az ismert hibajavító gén a *pol*A-mutációval megsérült (ún. *pol*A^--mutáns), UV-sugárzás, nitrokinolin-oxid, röntgensugarak, nitrozo-guanidin vagy metil-metánszulfonát mutagének hatásának tették ki, úgy azokban az $Arg^- \rightarrow Arg^+$ reverzió mutációs gyakorisága minden esetben csökkent. A KORNBERG DNS-polimerázt, melyet a *pol*A-lokusz specifikál, a kimetszéssel dolgozó hibajavító rendszer integráns részének tekintik. A *pol*A^--törzsek UV-mutabilitása nagymértékben redukálódik. Ez mindenesetre arra utalhat, hogy a kivágás és a reszintézis hibára hajlamos folyamatok lehetnek, míg a javítás alkalmával maga a metszés tévedésmentes. E jelenségek helyes értelmezésére további vizsgálatokra van szükség.

c) λ-fág. A gazdasejtben észlelhető DNS-hibajavítási hiányosságok a λ-fág UV-mutagenezisére is antimutagén hatásúak. A *rec*A^--gazdasej-

tekben a λ-fág UV-indukálta c-mutációi nem fordulnak elő. Az E. coli K-12-törzsnél a hibajavító *lex*$^+$-gén működése bizonyos UV-indukálta mutációk létrejöttéhez feltétlenül szükséges. A *lex*$^-$ antimutagén hatású (a *lex*-gén a K-12-törzsben = *exr*-gén a B-törzsben).

Antimutagéneket már gyakorlatban is sikeresen használnak, elsősorban mint adjuvánsokat betegek kemoterápiás kezelésénél azzal a céllal, hogy csökkentsék a kórokozók spontán fellépő antibiotikum-rezisztens mutációinak gyakoriságát. Kísérletek folynak ezekkel az anyagokkal a rákos betegségek kemoterápiája terén is.

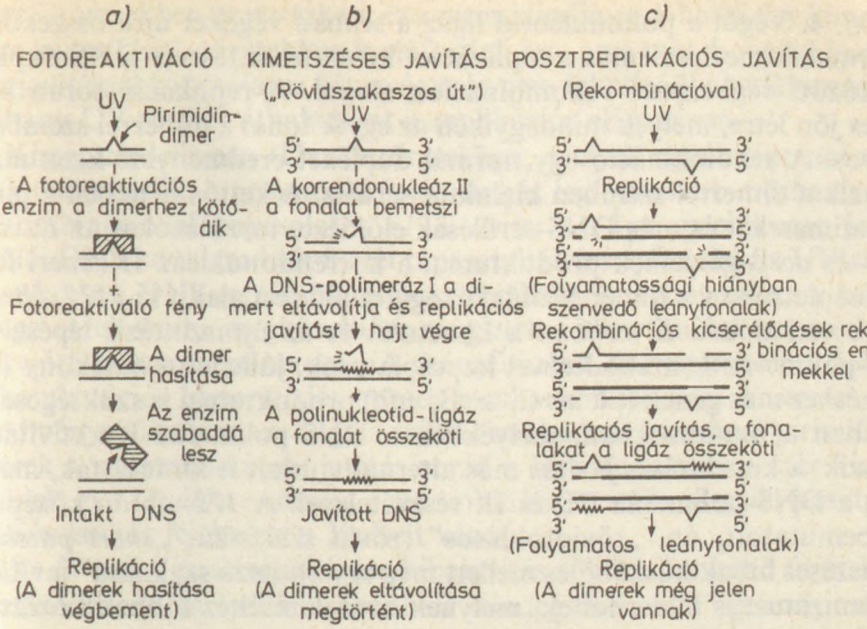
1.35.17. Az „SOS-hibakiküszöbölés" és a DNS javításának „hibamentes" mechanizmusai az *E. coli* nál

Az *E. coli* és λ-fágjának UV sugárzás inkukálta mutageneziséért – amint arra már utaltunk – elsősorban is bizonyos, nagymértékben tévesen dolgozó, DNS-hibajavító mechanizmusok a felelősek. Az SOS-hipotézis (SOS a nemzetközi segélykérés jele) ezzel a hibás korrekciós aktivitással foglalkozik. Maga az „SOS-hibakiküszöbölés" megjelölés azzal a feltevéssel kapcsolatos, hogy a DNS-ben fellépő konvencionálisan nem vagy alig javítható károsodás vagy az akadályozott DNS-replikáció (rendkívüli, segélykérő) szabályozási szignált kezdeményez, mely különböző működések szimultán derepresszióját vonja maga után. E működések azután a sejt és fágjának túlélését teszik lehetővé.

Mielőtt az SOS-hibakiküszöböléssel foglalkoznánk, tekintsük át röviden az *E. coli*nál UV-sugárzás hatására előállt hibák konvencionális, elvileg hibamentes korrekciójának mechanizmusait.

Az UV-sugárzás a DNS-ben számos különböző fotoproduktumot eredményezhet. Ezek között az ugyanazon fonalon szomszédos pirimidinek fonalközi, ciklobután típusú dimerét a legkülönbözőbb típusú élő szervezetekben mint a letális, mutagén és tumorogén hatások legfontosabb okát ismerték fel.

A DNS bázisai közül a purinok bizonyos fokú rezisztenciát mutatnak a besugárzással szemben, viszont a pirimidinek C_4–C_5 atomjaik közötti kettős kötéseik felszakadása után e helyen hidratálódnak. Ilyen körülmények között valamely timin (T) egy szomszédos másik timinmolekulával dimert alkotva a 4–5. pozícióban kovalensen kötődhet. T–T-dimerek a DNS két komplementer fonala között ritkábban jönnek létre, ilyenkor azonban ez az erős kötés megakadályozza a fonalak szétválását és gátolja a replikációt. T–T, C–C, ill. C–T bázispárok alkothatnak dimereket. Érdekes, hogy amíg a 2800 Å hullámhosszú UV-sugárzás fokozza a



172. ábra

*E. coli*ban UV-sugárzás révén előidézett DNS-károsodások enzimatikus javításának főbb útjai. Az itt bemutatott mindhárom *(a–c)* hibajavító mechanizmus elvileg tévedésmentesen dolgozik. Szimbólumok: ⌒ vagy ⌒, pirimidin-dimerek vagy más UV-fototermékek. A vastagabb vonalak a besugárzás utáni első DNS-replikáció során létrejött leányfonalakat jelzik. A vékonyabb vonalak az UV-sugárzott szülői DNS-fonalakra utalnak. A hullámos vonalak a javítási replikáció során polimerizált DNS-fonalakat szimbolizálják

dimerek képződését, addig a 2400 Å hullámhosszú UV-sugarak serkentik ezek visszaalakulását monomerekké. Az *E. coli* vad típusú törzsei a három konvencionálisnak tekinthető és hibamentesen dolgozó, alapvető enzimatikus DNS-javítási rendszerük egyikének vagy másikának segítségével akár ezer pirimidindimer letális hatását is képesek semlegesíteni. E rendszereket vázlatosan a *172. ábra* hasonlítja össze. Az ún. fotoreaktiváció mechanizmusa egy enzim működésén alapul, mely a pirimidindimereket hasítja. Ezt az enzimet a látható fény aktiválja. Ultraibolya sugarakkal „elpusztított" baktériumokat reaktiválni lehet, ha ezeket 400 nm hullámhosszú intenzív fény hatásának tesszük ki. A második mechanizmust a „sötétben javítás rendszerének" is nevezik. Ez négy enzim egymáshoz kapcsolt működésére alapított: **1.** Egy specifikus endonukleáz, mely a dimer mindkét oldalán hasítja a fonalat, és azt kivágja a DNS-ből. **2.** A DNS-fonalban létrejött rést egy 3′-exonukleáz szekvenciális emésztéssel kitágítja. **3.** A megnagyobbodott rést a DNS-polimeráz a 3′vég meghosszabbításával, az ellentétes fonalat templátként használva

tölti ki. **4.** Végül a polinukleotid ligáz a szabad végeket újra összeköti. A harmadik mechanizmus a replikációt követően a testvér DNS-duplexek között végbemenő rekombináción alapul. A replikáció során két duplex jön létre, melyek mindegyikén az egyik fonal a dimerrel szemben hiányos. A rekombináció egy normál duplexet eredményez. Ezen már hiányzik a dimerrel szemben kialakult sérülés. A kettős hélixben a pirimidindimereket és más DNS-sérülések előidézte torzulásokat az *E. coli uvr*A- és *uvr*B-génjeinek produktuma, a korrendonukleáz II ismeri fel, mely bemetszéssel a dimer 5′ oldalán egyfonalú rést alakít ki *(172. ábra: b.)*. A vad típusú *E. coli*ban a kimetszés és az újraszintézis lépései a DNS-polimeráz I. működésével kapcsolatosak, jóllehet a hatékony kimetszéshez más gének (pl. *uvr*C, *uvr*E, *mfd*) produktumai is szükségesek. Azokban a mutánsokban, melyekben a DNS-polimeráz I. aktivitása hiányzik, a kimetszéses javítás más alternatív útjait is kimutatták, mégpedig a DNS-polimeráz III. és II. részvételével. A *172. ábrán* középen *(b)* bemutatott, ún. „rövidtoldásos" (rövid szakaszú; *„short patch"*) kimetszéses hibakiüszöbölés mellett még egy „hosszú szakaszú" javítási mechanizmust is felderítettek, melynek kivitelezéséhez többek között a *rec*A$^+$ és a *lex*A$^+$-gének produktumaira is szükség van.

Azok a pirimidindimerek, melyek mind a fotoenzimatikus hasítást, mind a kimetszéses javítást egyaránt elkerülték (pl. sötétben tartott, kimetszésdeficiens mutánsok) megzavarják ugyan a DNS-replikációs komplex folyamatos munkáját, azonban azt, hogy a DNS szintézisének újrakezdeményezése egy a dimeren túli ponton mégis megtörténhessen, nem tudják megakadályozni. Amikor a templátfonalon el nem távolított pirimidindimerek vagy más javítatlan sérülések maradnak vissza, úgy a szintetizált leányfonalakat kezdetben folytonossági hiányosságaik miatt mint alacsonyabb molekulasúlyú DNS-szegmenteket mutathatjuk ki. A leányfonalak folyamatosságát ugyanis ilyenkor kb. 1000 nukleotidhosszúságú hiányok, rések szakíthatják meg, melyek számukban és helyzetükben megközelítően a szülői fonalakon javítatlanul visszamaradt dimereknek felelnek meg. Ezek a leányfonalakban fellépő rések lényegében másodlagos UV-sérülések. Létrejöttük a DNS elsődleges fotosérülései által megakadályozott replikációs bázispárosodások következménye. Az enzimatikus DNS-hibajavítás harmadik fő és még konvencionálisnak tekinthető típusa, a posztreplikációs javítás *(172. ábra: c)*, a folyamatossági hiányban szenvedő leányfonalak szegmentjeinek összekötését végzi, ami előfeltétele újabb replikációjuknak. A leányfonalak hiányzó szegmentjeinek szintézisét és bekötését az UV-sugárzott templátokon nem szabad összetévesztenünk az ún. OKAZAKI-fragmentek diszkontinuus szintézisével és sokkal gyorsabb összekötésével a normál DNS-replikációs elágazások térségében. Jóllehet a posztreplikációs javítást először

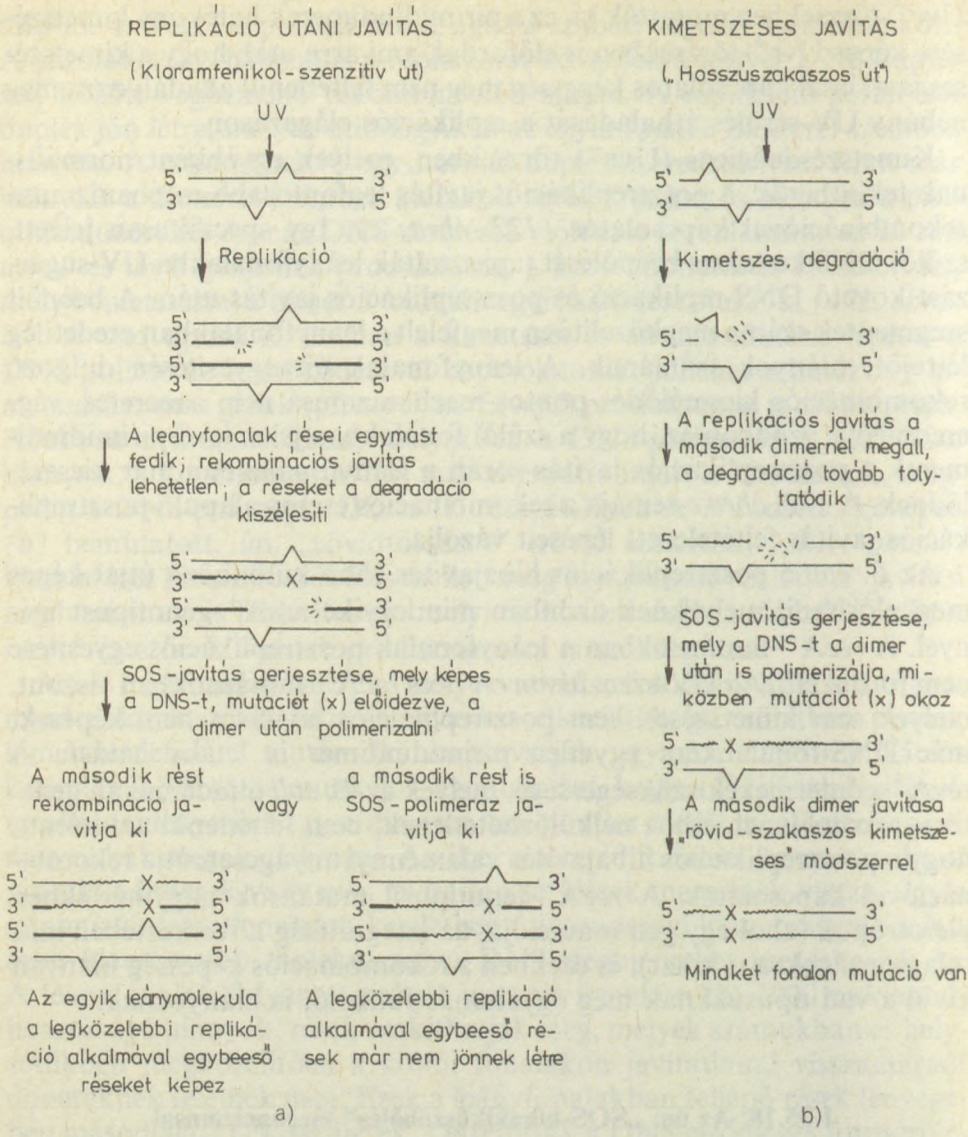
Uvr$^-$-törzsekben mutatták ki, ez a pirimidindimerek hatékony kimetszésére képes Uvr$^+$-törzsekben is előfordul, ami arra utal, hogy a kimetszéses javítással kapcsolatos képesség még nem feltétlenül akadályozza meg néhány UV-sérülés áthaladását a replikációs elágazáson.

Kimetszésdeficiens (Uvr$^-$) törzsekben, melyek egyébként normálisnak tekinthetők, a posztreplikációs javítás legfontosabb mechanizmusa rekombinációval kapcsolatos *(172. ábra: c)*. Így specifikusan jelzett, szülői DNS kovalens beépülését tapasztalták leányfonalakba UV-sugárzást követő DNS-replikáció és posztreplikációs javítás után. A beépült szegmentek száma megközelítően megfelelt a leányfonalakban eredetileg létrejött hiányok számának. A leányfonalak újraegyesítésén dolgozó rekombinációs kicserélődés pontos mechanizmusa nem ismeretes, végeredménye azonban az, hogy a szülői fonalakban jelen levő pirimidindimerek a posztreplikációs javítás során a leányfonalakban már kicserélődnek. A *172. ábra c*-sémája a rekombinációs cserén alapuló posztreplikációs javítás feltételezett lépéseit vázolja.

Az *E. coli* a posztreplikációs hibajavítás több különböző útját képes megvalósítani, melyeknek azonban mindegyike *rec*A$^+$-genotípust igényel. A *rec*A$^-$-mutánsokban a leányfonalak posztreplikációs egyesítése nem fordul elő. Az UV-szenzitív *uvr*A$^-$- és *rec*A$^-$-mutánsokban viszont, melyek sem kimetszéses, sem posztreplikációs javításra nem képesek, már DNS-fonalanként egyetlen pirimidindimer is letális hatású. A *rec*A$^+$-géntermékek szükségessége, melyek az *E. coli* mindennemű genetikai rekombinációjához nélkülözhetetlenek, nem feltétlenül azt jelenti, hogy a posztreplikációs hibajavítás valamennyi anyagcsereútja rekombinációval kapcsolatos. A *rec*A$^-$-fenotípusú mutánsok nagymértékben pleiotropok (ahol egy gén mutációja, az integráltság következtében más tulajdonságokra is kihat), és ezekben a rekombinációs képesség hiányán kívül a vad típusúaknak még egyéb más funkciói is hiányoznak.

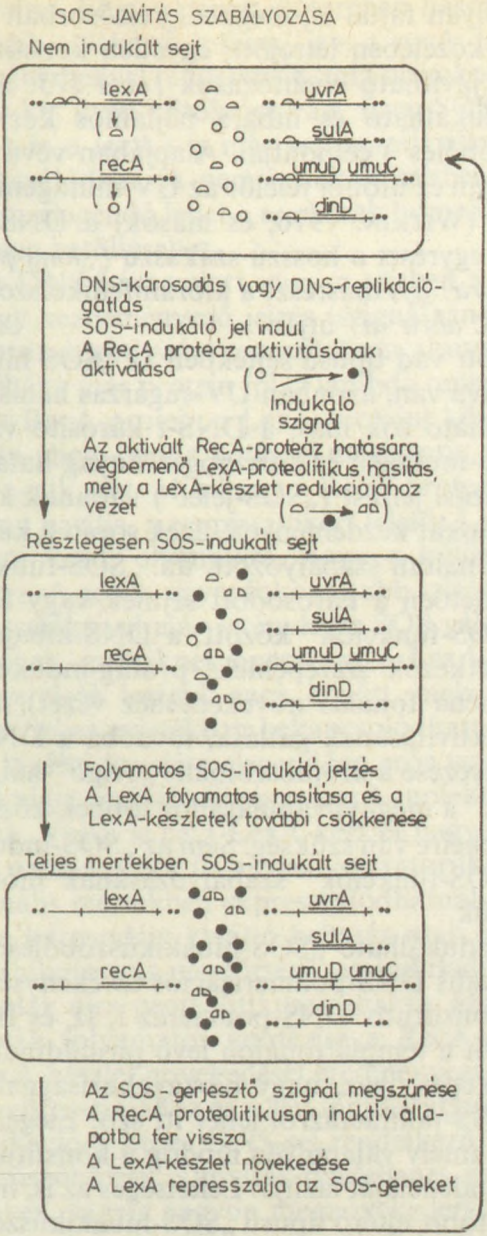
1.35.18. Az ún. „SOS-hibakiküszöbölés" mechanizmusai

Már többször hangsúlyoztuk, hogy az *E. coli*ban és néhány fágjában az UV-sugárzás által kiváltott mutációk elsődlegesen az UV-károsított DNS hibás kijavítására vezethetők vissza. A túlélő baktériumok DNS-ében létrejött UV-károsodások legtöbbjének kijavítása és kiküszöbölése azonban a fentebb tárgyalt, viszonylag „hibaálló" mechanizmusok (pl. fotoreaktiváció, rövid szakaszú kimetszéses javítás és a rekombinációs posztreplikációs javítás főbb útjai) révén történik. Ezek tehát nem járulnak lényegesen hozzá az UV-mutagenezishez. Vannak a DNS-károso-



173. ábra

a–b) Az *E. coli* DNS-ében UV-sugárzással előidézett károsodások nagy hibagyakorisággal működő javításának („SOS-hibakiküszöbölés") lehetséges útjai. Szimbólumok: —∧— vagy —∨—, pirimidindimerek vagy más UV-fototermékek. A vastagon kihúzott vonalak a besugárzást követő első DNS-replikáció során létrejött leányfonalak. A vékony vonalak az UV-sugárzott szülői DNS-fonalakat jelzik. A hullámos vonalak a javításos replikáció alatt polimerizált fonalak. X: mutáció (nem megfelelő bázisszekvencia). Megjegyzés: Az „SOS-hibakiküszöbölési" tevékenység a dimerek vagy más nem instruktív fototermékek utáni replikációt teszi igen nagy hibagyakoriságú javítással lehetővé. A lényeg, hogy akkor, amikor a nagymértékben „hibamentes" javítás során az egyik fonalban a „kimetszés" következtében hiány (rés) keletkezik és a másik fonalban egy dimer pontosan e réssel szemben helyezkedik el (*b) ábra*), akkor a konstitutív hibajavító rendszerek felmondják a további szolgálatot és a sérülés letálisnak tekinthető, hacsak a különleges „SOS-hibakiküszöbölés"



közbe nem lép. Ez általában, ha hibásan is, de mégis összeköti a fonalakat és a túlélést lehetővé teszi. Ugyanez a helyzet abban az esetben is, amikor a leányfonalakban a keletkezett rések egymást fedik (*a) ábra*). Hangsúlyozni kell, hogy annak valószínűsége, hogy két fototermék ilyen sajátos „résstruktúrát" idézhessen elő, nem csupán a fototermékek egymástól való távolságától, hanem a besugárzás utáni DNS-degradáció mértékétől is függ. *c)* Az SOS szabályozó rendszer modellje WALKER (1984) után. Az üres körök proteolitikusan inaktív RecA molekulákat, a feketék aktívakat, a félkörök LexA molekulákat szemléltetnek

dásnak azonban olyan fajtái is, mégpedig elsősorban is a két fonalon egymás közvetlen közelében létrejött, egyetlen konstitutív pontos mechanizmussal sem javítható elváltozások *(lásd 173. ábra)*, melyek viszont már az indukálható és hibára hajlamos korrekciós működés („SOS-hibakiküszöbölés") célpontjai. Alapjában véve mind az *E. coli*ban, mind λ-fágjában ez utóbbi felelős az UV-mutagenitásért. Az „SOS-hibakiküszöbölés" (WITKIN, 1976, és mások) a DNS javításában két módon vesz részt: egyrészt a hosszú szakaszú *(„long-patch")* kimetszéses javítás *(173. ábra: b)*, másrészt a kloramfenikolszenzitív posztreplikációs javítás *(173. ábra: a)* útján.

A nem károsodott vad típusú sejtekben az „SOS hibakiküszöbölési" aktivitás represszálva van, azonban UV-sugárzás hatására indukálódik. Ugyanez tapasztalható sok más, a DNS-t károsító vagy replikációját megszakítani képes mutagén és karcinogén anyag hatására is. Az ilyen kezelések szabályozási jelzést („SOS-jelet") váltanak ki, mely komplex indukciós folyamatokat kezdeményez. Ezek során a különböző, de működésükben koordináltan szabályozott, ún. „SOS-funkciók" derepreszszálódnak és feltehetően a károsodott sejtnek vagy fágjának túlélését segítik elő. Az „SOS-funkciók" között, a DNS-hibajavító aktivitáson kívül, még a következők szerepelnek: profág-indukció, sejtosztódáskésleltetés (mely néha fonalas növekedéshez vezet), az exonukleáz-V DNS-degradatív aktivitásának gátlása, továbbá a DNS-szintézis aberráns újrakezdeményezése a kromoszomális „origó"-nál. Ezeknek és más „SOS-funkcióknak" a megnyilvánulásához többek között a *rec*A$^+$- és a *lex*A$^+$-génekre van szükség. Sem az „SOS-indukciós jel" természetét, sem az „SOS-funkciók" szabályozásának módját a legutóbbi időkig nem ismertük.

Az *E. coli*ban indukálható „SOS-hibakiküszöbölési" aktivitás egyik módját olyan speciális DNS-polimerizációs tevékenységgel hozták kapcsolatba, mely a konstitutív DNS-polimeráz I, II, és III-mal szemben a DNS-polimerizációt a templátfonalon levő pirimidindimerek vagy más sérülések után is képes, igaz, nagy hibagyakorisággal, folytatni. Nem feltétlenül „új" DNS-polimerázról lehet itt szó. Elegendő lehet csupán egyetlen faktor is, amely valamilyen módon a konstitutív DNS-polimerázok templátdependenciáját lazítja. Lehetséges az is, hogy az *E. coli*ban nem is egy, hanem több, eltérő típusú „SOS-hibakiküszöbölési" aktivitás működik.

A 80-as évek elején az SOS hibakiküszöbölés mechanizmusának megértéséhez számos új adattal gazdagodtunk (WALKER, 1984). Az SOS rendszer alapvető szabályozó mechanizmusát a *173. c. ábra* mutatja be. A nem indukált sejtben a *lex*A gén terméke számos egymással nem kapcsolatos génre, közöttük a *rec*A-ra és *lex*A-ra is represszorként hat,

mégpedig oly módon, hogy e gének előterében hasonló operátor szekvenciákhoz kötődik. Néhány lokusz, így a *rec*A is csupán egyetlen LexA-t kötő operátorhellyel rendelkezik, míg másoknak, így a *lex*A-nak és az *umu*DC-nek két ilyen kötőhelye van. Ezen SOS gének közül sok, beleértve a *rec*A-t és a *lex*A-t is még represszált állapotban is jelentős mértékben expresszálódhat. A nem indukált sejtben jelen lévő RecA-protein mennyisége elegendő lehet a *rec*A-nak homológ rekombinációkban játszott szerepe betöltéséhez.

Amennyiben a DNS károsodott vagy a sejtben a replikáció valami folytán gátolt, úgy kezdeményező jelzés (szignál) indul. Ez a szignál a *rec*A-specifikus proteázaktivitást reverzíbilisen aktiválja, mely a LexA-protein és még néhány más protein (pl. a lambda represszor) hasításához vezet. Az aktivált RecA-protein a LexA-proteint közel ennek felezővonalához egy alanin-glicin-peptid kötésnél megbontja, miáltal két proteolitikus fragmentre esik szét. Minthogy a RecA-proteáz a LexA-molekulákat folyamatosan hasítja, a repressziókért felelős LexA-tartalékkészlet rohamosan fogyni kezd, olyannyira, hogy a különböző SOS-gének, közöttük maga a *rec*A gén is, egyre fokozottabb szinten nyilvánulhatnak meg és e gének termékeivel már a tényleges SOS válaszadás is kezdetét veheti. Azok a gének, melyeknek operátorai a LexA-t viszonylag gyengén kötik meg, az elsők lesznek azok között, melyek termékeikkel az SOS válaszadásba teljes mértékben bekapcsolódhatnak. Amennyiben a sejtek indukciót kiváltó kezelése elegendően erős volt, úgy a RecA-nak mind több molekulája aktiválódik és a LexA-molekulák hasítása egyre intenzívebbé válik. Végül is ha a LexA-készlet nagyon alacsony szintre süllyed, úgy még azok a gének is, melyek operátorukon a LexA-t szorosan kötik, maximális mértékben expresszálódhatnak.

Midőn a sejt a károsodást kiváltó behatás után már kezd magához térni, pl. a DNS-hibajavítás megtörtént, az indukáló jelzés megszűnik, és a recA-molekulák újra proteolitikusan inaktív állapotba süllyednek. A LexA-molekulák folyamatos szintézise a RecA-proteáz hiányában ezután már a LexA-készlet növekedését eredményezi. Ez viszont az SOS gének általános repressziójához és a sejt indukálatlan állapotához vezet.

Sértetlen, replikációra képes DNS-sel rendelkező normális sejtekben az „SOS-hibakiküszöbölési" aktivitás rendellenes gerjesztése „mutátor hatást" eredményez, vagyis nagyon megnövekedett, általános, spontán mutációs rátához vezet. Az UV-sugárzott *E. coli* nyers kivonatának „SOS"-reparatív aktivitása a nem besugárzott, szintetikus, primer, templát-DNS replikációja során, nagymértékben fokozza a bázisok hibás beépítésének gyakoriságát.

Csaknem valamennyi kimutatható UV-indukálta mutáció, a besugárzást követő második DNS-replikáció előtt lép fel. Vad típusú törzsekben

néhány UV-indukálta mutáció még a DNS replikációja előtt megjelenik. Ezek valószínűen „SOS-hibakiküszöbölés" során keletkeztek. Más mutációk a besugárzás utáni első DNS-replikáció alatt vagy azután jelentkeznek. Ezek a replikációs villán áthaladó, ki nem metszett, UV-okozta károsodások az „SOS-hibakiküszöbölés" során manifesztálódnak.

Az *E. coli rec*A-génterméke a DNS-hibajavítás fontos folyamataiban, így pl. abban is, mely feltehetően valamennyi sugárzási és néhány kémiai mutagenezisért felelős, közvetlenül részt vesz, ill. központi szabályozó szerepet tölt be (ROBERTS és ROBERTS, 1981). Közvetlen funkciója, hogy az egyfonalú DNS-t a duplex DNS homológ régiójához párosítja, vagyis egy olyan reakció kivitelezése, melyet a genetikai rekombinációban alapvetőnek tartanak. A RecA-proteinnek ez a tevékenysége feltehetően a sérült DNS-molekulák közötti rekombinációs javításban is szerepet játszik. Szabályozó funkciót is betölt, ami arra a képességére vezethető vissza, hogy proteolitikus hasítással represszorokat és feltehetően még más proteineket is inaktivál. Ez viszont bizonyos gének indukciójához vezet. A *rec*A-gén szabályozása viszont a *lex*A-géntermék révén történik. A *lex*A-géntermék feltehetően más, a DNS-hibajavításban részt vevő gének működését is szabályozza. A RecA-protein fentebb említett represszordestruáló tevékenységét *in vitro,* ATP-vel és egy egyfonalú DNS-nek megfelelő polinukleotiddal kimutatott kölcsönhatása aktiválta. Feltehetően ugyanolyan kölcsönhatás ez, mint amely a fonalpárosító reakciókat is kezdeményezi. A RecA-protein represszorok ellen *in vivo* is aktiválható, ha egyfonalú DNS-sel kölcsönhatásba léphet. Az olyan DNS-károsító kezelések, mint amilyen pl. az UV-sugárzás is, a rekombináció, a hibajavítás, a mutagenezis és a profágindukció *rec*A-dependens funkcióit riadóztathatják.

Bizonyítékok állnak rendelkezésünkre, miszerint mutagének és karcinogének emlősök sejtjeiben is DNS-javító működést váltanak ki. Nem ismeretes, hogy ez a korrekciós tevékenység mennyiben hajlamos hibára, és hogy vajon gerjesztésük összefügg-e DNS-károsodások indukálta „SOS"-szerű hibajavítási mechanizmusok akcióba lépésével. Amennyiben ez az összefüggés fennáll, úgy két ebből származó tényező, a látens vírusindukció és a hibásan működő DNS-javítás is hozzájárulhatnak a karcinogenezishez.

1.35.19. Az információcsere módjai és feltételei a prokariotáknál. A modifikáció és a restrikció

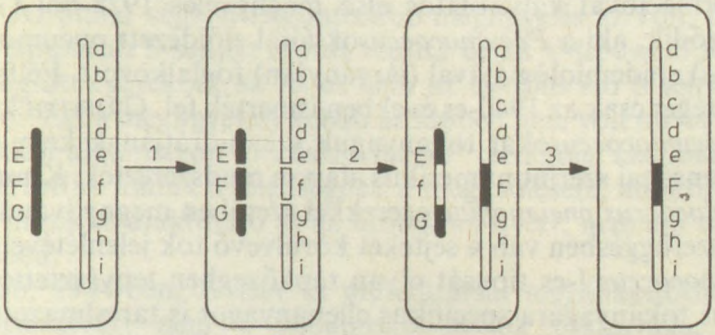
Amint arról már szó volt, az eukariotáknál a diploid sejtek két haploid szexuális sejt (a gaméták) fúziója útján jönnek létre és alkotják a zigótát. Zigóták a baktériumoknál is előfordulnak, azonban valódi sejtfúzió már

nem. Ezzel szemben egy ún. donorsejt genetikai anyagának egy része egy másik, a recipiens sejtbe kerülhet, amely így génállományának egy részére vonatkozóan diploiddá válik. Az ilyen parciális zigótában a donortól származó genetikai anyagot *exogenotá*nak, míg a recipiensét *endogenotá*nak nevezzük. Ezek általában közvetlenül a transzfer után rekombinálódnak. A rekombináció a párosodó kromoszómák széttöredezéséből és egyesüléséből áll *(174. ábra)*. A későbbi mag- és sejtosztódások alkalmával a rekombináns kromoszóma egyetlen haploid sejtbe szegregálódik. Az ilyen sejt kísérletes kimutatása abból áll, hogy a parciális zigótákat csak a rekombinánsok szaporodását biztosító szelektív tápközegen lemezeljük.

A baktériumoknál három olyan folyamatot ismerünk, melyek rekombinációt eredményezhetnek: *a)* Idegen DNS-fragmentek transzmembrán felvételére visszavezethető transzformáció; *b)* Bakteriofágok segítségével a géneknek a donorsejtből a recipiensbe történő transzdukciója és *c)* Szexuális folyamatokkal analóg és plazmidok segítségével végbemenő konjugációs géncsere. Ezek főleg a transzferfolyamatok mechanizmusa tekintetében különböznek. Mielőtt részletes tárgyalásukra kerülne sor, két fontos fogalmat, a modifikációt és a restrikciót kell megismernünk.

A baktériumok sejtjei számos faj esetében, bizonyos egymást kiegészítő, komplementer funkcióval rendelkező enzimeket, ill. enzimpárokat tartalmaznak. Az egyik enzim a sejt DNS-állományát azáltal képes módosítani *(modifikáció)*, hogy a bázisokat néhány specifikus helyen metilezi. A másik enzim viszont az ilyen helyeken a nem módosított DNS-t ugyanitt hasítani képes. Ez utóbbi folyamatot *restrikció*nak nevezzük.

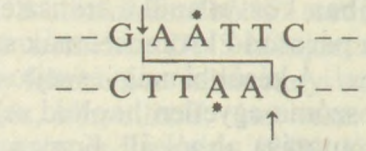
A DNS helyspecifikus metszését végző enzimek a restrikciós endonukleázok. A DNS-en egy-egy 6–8 bázispárból álló szekvencia az a hely, melyet egy ilyen specifikus restrikciós endonukleáz felismer. Ez a *palind-*



174. ábra

A széttöredezés és újraegyesülés útján végbemenő genetikai rekombináció modellje

roma: egy olyan szekvencia, mely az egyes fonalak 3′-végéről kiindulva, vagyis mindkét irányban azonosan olvasható le (fordítva ismételt DNS-szakasz). Így pl. az a szekvencia, melyet EcoR1-nek neveznek és az *E. coli* EcoR1-restrikciós endonukleáza ismeri fel, az alábbi összetételű:



Ennek hasítása a nyilakkal megjelölt szimmetrikus helyeken történik, melynek során egyfonalas komplementer végekkel rendelkező DNS-fragmentek jönnek létre. Ezek hasonló („ragadós") végű DNS-töredékekkel kapcsolódhatnak. A csillagok viszont azokat a helyeket jelzik, melyeket az *E. coli* modifikáló enzime metilez, megvédve ezáltal e báziszszakaszt (a palindromat) az endonukleáz támadásától. Amikor különböző restrikciós és modifikációs specificitású baktériumtörzsek között DNS-átvitellel zigóta jön létre, a recipiensbe behatoló DNS a sejtek többségében gyorsan degradálódik. Egy kevés sejtben azonban (10^{-7}–10^{-2}) az exogenota elkerülheti a restrikciót és a rekombináció végbemehet. Így tapasztalták, hogy bár az *E. coli* „B" és „K 12" jelzésű törzsei között rekombinánsok rendkívül alacsony gyakorisággal jönnek létre, mégis az ilyen kereszteződésekből néhány olyan izolátumhoz sikerült jutni, melyek a B-törzs génjeit modifikációra és restrikcióra elfogadni képes K-12-törzsek voltak. Ezek már igen nagy gyakorisággal rekombinálódtak az *E. coli* B-törzseivel. A restrikció és modifikáció a baktériumoknál a törzsről törzsre átvitt fágfertőzést is befolyásolja.

1.35.20. Transzformáció

A transzformációval kapcsolatos első megfigyelés 1928-ból GRIFFITH nevéhez fűződik, aki a *Pneumococcus*ok által előidézett pneumonia (tüdőgyulladás) epidemiológiájával (járványtan) foglalkozott. Felfedezésének jelentőségét csak az 1940-es években ismerték fel. GRIFFITH kísérletei idején a *Pneumococcus*okat tokanyaguk szénhidrátjának kémiai (antigén) tulajdonságai szerint numerikus alapon rendszerezték. Kimutatták, hogy a *Diplococcus pneumoniae* egerekkel szemben megnyilvánuló virulenciája összefüggésben van a sejteket körülvevő tok jelenlétével. Így pl. ha a *Pneumococcus* I-es típusát olyan tápközegben tenyésztették, mely az I-es típus tokanyagára specifikus ellenanyagot is tartalmazott, úgy a sejtek nemcsak a tokképzésre vonatkozó kapacitásukat vesztették el, hanem azt a képességüket is, hogy az egérben megbetegedést idézzenek

elő. Ma már tudjuk, hogy ennek az eljárásnak során, specifikus tokellenes antiszérumot használva, lényegében szelekció megy végbe, amikor a vad típussal szemben a nem tokos mutánsok képeznek populációt. Az ilyen mutánsokat (melyeket abban az időben variánsoknak tartottak) R-betűvel jelölték és „rögös"-nek nevezték, mivel szilárd táptalajokon a tok nélküli sejtek kolóniái szárazak, rögösek. Ha egyébként ártalmatlannak tartott R-sejteket nagy számban oltottak egérbe, úgy egyes esetekben az állatok mégis elpusztultak. Ezek hulláiból azonban már tokos (sima vagy S-típusú) *Pneumococcus*okat lehetett kitenyészteni. Ezt a jelenséget (amit ma mint „back mutation"-t és utólagos szelekciót ismerünk) tanulmányozva GRIFFITH arra a következtetésre jutott, hogy a reverzióért az R-sejtek preparátumában jelen levő tokanyag-nyomok voltak a felelősek.

Kísérletei során GRIFFITH a *Diplococcus pneumoniae* két különböző törzsének (jelöljük ezeket itt X-nek és Y-nak) preparátumaival, eltérő kombinációkban, egereket oltott a következő eredménnyel:

a) Az X-típus elölt S-sejtjei és az Y-típus egy kevés élő R-sejtje: a beoltott egerek elpusztultak.

b) Csak az X-típus elölt S-sejtjei: egy egér sem pusztult el.

c) Kizárólag az Y-típus elölt S-sejtjei: eredmény ua., mint a *b)* esetében.

d) Az X-típus élő R-sejtjeinek kis száma: pusztulás nem volt észlelhető.

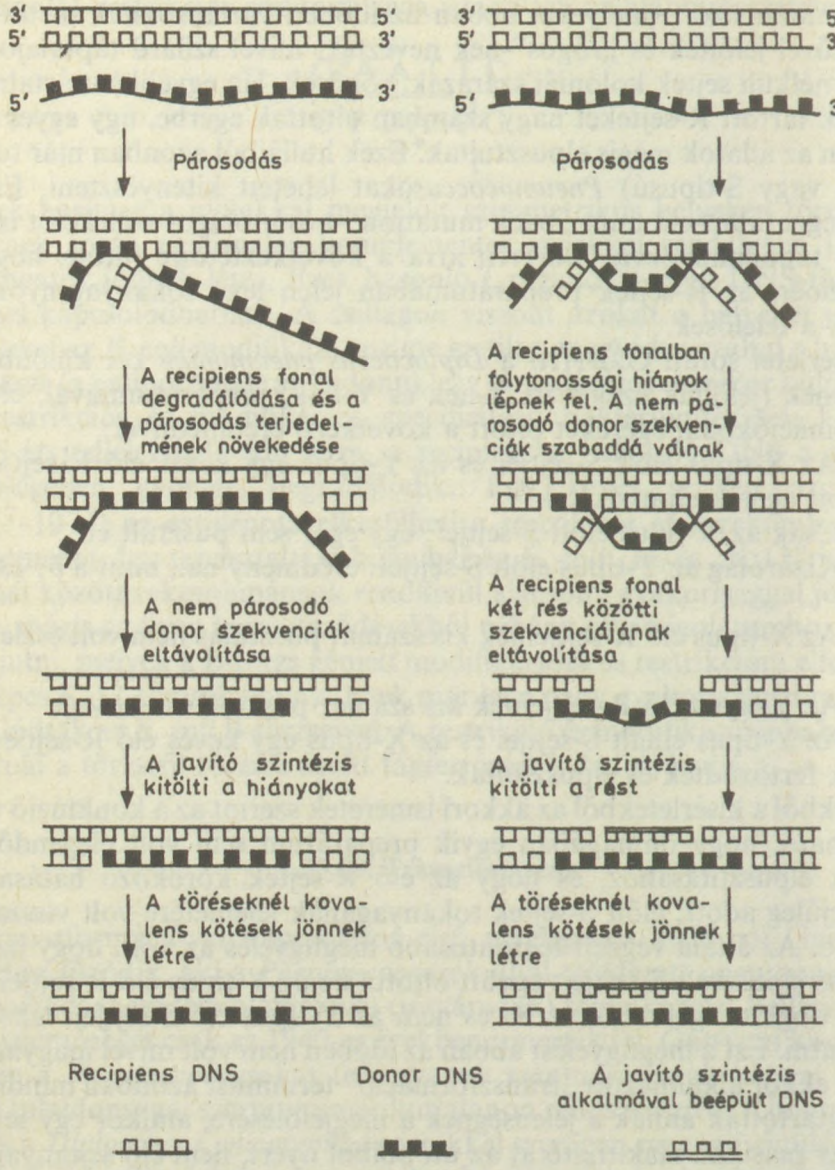
e) Az Y-típus élő R-sejtjeinek kis száma: pusztulás nem volt.

f) Az Y-típus elhalt S-sejtjei és az X-típus egy kevés élő R-sejtje: az egerek fertőződtek és elpusztultak.

Ezekből a kísérletekből az akkori ismeretek szerint az a konklúzió volt levonható, hogy önmagában egyik preparátum sem volt elegendő az egerek elpusztításához, és hogy az élő R-sejtek kórokozó hatása az egyidejűleg adott, elölt S-sejtek tokanyagának jelenlétére volt visszavezethető. Az általa végzett legfontosabb megfigyelés az volt, hogy ha az X-típus elpusztult S-sejtjeit együtt oltotta be az Y-típus élő R-sejtjeivel, úgy a döglött egerekből az X- és nem az Y-típus élő S-sejtjeit lehetett kimutatni. Ezt a megfigyelést abban az időben nem volt mivel magyarázni. Az ekkor alkalmazott „transzformáció" terminust azonban mindmáig megtartották annak a jelenségnek a megjelölésére, amikor egy sejttípus egy másikká alakítható át az utóbbiból nyert, nem élő sejtanyagok jelenlétében.

Később, 1944-ben, AVERY és munkatársai megállapították, hogy a transzformációért nem a pneumokokkuszok tokanyaga, hanem a DNS-e volt a felelős. Bebizonyították, hogy e szervezetek egyes típusait egymás DNS-extraktumain tenyésztve, egymásba át lehet alakítani. Ez

a felfedezés abban az időben korszakalkotó volt, minthogy sokan akkor még a fehérjét tekintették az örökletes tulajdonságok egyedüli hordozójának.



175. ábra

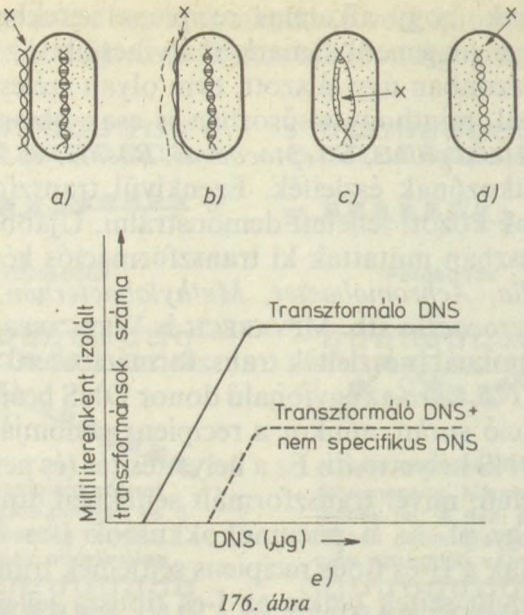
Az egyfonalú donor-DNS beépülésének lehetséges mechanizmusa a recipiens duplexbe a transzformáció alkalmával. Bal: Az egyik szakaszon végbement kezdeti párosodás után a recipiens fonal degradálódik, majd a donor fonal helyettesíti. Jobb: Kezdeti párosodás két helyen történik, majd a recipiens fonal köztes szakaszát annak degradálása után a donor fonal helyettesíti, mely viszont a komplementer recipiens fonal egy hiányzó szakaszának kiépüléséhez templátként szolgál

Ma már tudjuk, hogy alkalmas recipiens sejtekbe transzformáció segítségével bármelyik genetikai markert átvihetjük. Az információcserének ez a módja azonban úgy látszott, nem olyan széles körben elterjedt a baktériumoknál, minthogy elsősorban is csak bizonyos genuszokra, így a *Neisseria, Hemophilus, Streptococcus, Bacillus* és *Diplococcus* nemzetségekre szorítkozónak észlelték. Ezenkívül transzformációt csupán közel rokon fajok között lehetett demonstrálni. Újabban azonban már egyre több genuszban mutattak ki transzformációs készséget: *Streptomyces, Moraxella, Achromobacter, Methylobacterium, Synechococcus, Azotobacter, Micrococcus* stb. MEVARECH és WERCZBERGER (1985) pedig még ősbaktériumoknál is észleltek transzformációszerű genetikai transzfer-rendszert. A *175. ábra* az egyfonalú donor DNS beépülését szemlélteti a transzformáció során, amikor a recipiens genomjának egy részét a transzformáló DNS helyettesíti. Ez a helyettesítés (és nem addíció) annál is inkább valószínű, mivel transzformált sejtekben diploidiát még nem figyeltek meg. Így pl. ha a pneumokokkuszok I-es típusának donor DNS-ét használták a II-es típus recipiens sejtjeinek transzformálásához, úgy a transzformált sejtek csakis az I-es típusra jellemző tokanyagot (szénhidrátot) termelték. Olyan transzformált sejtet, mely mindkét típusra jellemző tokanyagot előállítani képes lenne, még nem izoláltak. Ez nyilvánvalóan igazolja, hogy az I-es típus szénhidrátjának szintézisét kódoló genetikai információ egyszerűen kicserélődött a II-es típus tokanyagait kódoló génekkel.

1.35.21. A transzformáció mechanizmusa

A transzformáció mechanizmusára (*176. a.-d. ábra*) vonatkozó kutatások eredményei arra utalnak, hogy a transzformáció gyakorisága függ a recipiens sejthez adott DNS mennyiségétől, igaz, hogy csak egy bizonyos specifikus mennyiségi intervallumon belül, minthogy a rendszer telítetté válhat *(lásd 176. e. ábra)*. Megállapítható volt, hogy maga a telítődés viszont attól a tényleges DNS-mennyiségtől függ, amit a recipiens sejt egyáltalán befogadni képes, mivel ha rokonságilag távolálló fajokból nyert, tehát nem transzformáló DNS-t transzformáló DNS-sel kevertek, úgy a kapott transzformálódottak száma arányosan csökkent *(176. ábra)*.

Érdekes adatokat kaptak a transzformáló DNS méreteit tanulmányozva. Kétségtelenül, az az eljárás, amelyet általában a donor sejtekből a DNS extrakciójához alkalmaznak, meglehetősen drasztikus, minthogy ennek során a donor DNS hosszú fonala töredékekre esik szét. A transzformáló DNS méreteire vonatkozó vizsgálatok arra utalnak, hogy ezek



176. ábra

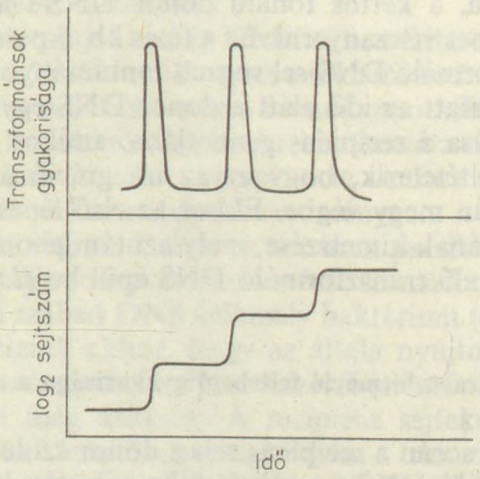
a–d) A transzformáció sematikus ábrázolása. *a)* A kettősfonalú donor-DNS a recipiens-sejt falához kötődik. *b)* Erre a donor-DNS-re endonukleáz hat, aminek eredményeként egyfonalú DNS jelenik meg. *c)* A recipiens-DNS helyi denaturációja, majd a homológ donor-DNS fonal megkötése. *d)* A recipiens-DNS egyik fonalát endonukleáz emészti el, míg a donor fonal integrálódik (módosítva BOYD után, 1984). *e)* A transzformáció telítődési kinetikájának ábrázolása. A transzformáló DNS mennyiségének növelése lineáris összefüggést mutat a kapott transzformálódott izolátumok számával egy bizonyos pontig, ahol a rendszer telítetté vált. A recipiens sejtek nyilvánvalóan nem tesznek különbséget a DNS eredetét illetően, mivel a transzformáló DNS és a nem specifikus DNS keveréke arányosan csökkenti a létrejött transzformált izolátumok mennyiségét (LEVY és munkatársai, 1973)

általában akkora fragmentek, melyek egyenként a donor genomjának mintegy 0,5%-ával egyenértékűek. A bakteriális donor genomjának átlagos molekulasúlya 10^6–10^7 között ingadozik. A transzformáló DNS preparálása során a donor genomja megközelítően kétszáz részecskére esik szét. *Hemophilus* törzsek radioaktívan jelzett donor DNS-ével végrehajtott óvatos telítési vizsgálatok eredményei szerint sejtjeik mindegyike kb. tíz ilyen transzformáló DNS-részecskét képes felvenni. A *176. ábrá*ból következik, hogy a recipiens sejtek felfognak bármilyen, tehát nemcsak a fajilag rokon DNS-t, ha azonban ezek koncentrációja a 10 részecske/sejt-et eléri, úgy telítetté válnak. Feltételezik, hogy a recipiens sejt felületén receptorhelyek vannak, melyek felismerik és felfogják a kettős fonalú DNS-fragmenteket. Ezzel ellentétben kimutatták, hogy a *H. influenzae*nál a fajspecifikus DNS specifikus szakaszai felelősek a felvételért. A *176. e. ábra* adatait SZABÓ Gábor professzor szerint (írásbeli közlés) valószínűleg a bomlott DNS nem specifikus gátló hatása magyarázza.

Transzformációk tanulmányozása lehetővé teszi az ún. kapcsolódás (szerkezeti)-analíziseket *(„linkage studies")* is. Ennek lényege, hogy a genomban megállapítják bizonyos markereknek más markerekhez viszonyított helyzetét. Így lehetővé válik a genom térképezése. Ezek során kettős transzformánsokat szelektálnak. Pl., amikor a donor DNS A^+- és B^+-génjeivel szemben a recipiens A^- és B^--génjei szerepelnek. Ezután megfelelő módszerekkel A^+B^+-transzformánsokra szelektálnak. Általában az ilyen kettős történések csak alacsony gyakorisággal fordulnak elő. Ilyenkor ugyanis ugyanazon sejtben két külön rekombinációs történésnek kellene végbemennie. Amennyiben a két gén szorosan kapcsolódik, ami előfordulhat akkor, ha helyük a sejt genomjában nagyon közel van és ugyanazon transzformálódó DNS-fragmenten foglalnak helyet, úgy már egyetlen rekombinációs történés keretében is beépülhetnek a recipiens genomjába. Ez utóbbi esetekben a kettős transzformánsok gyakorisága jelentősen megnövekedik és számuk meghaladhatja az A^+B^- és az A^-B^+ egyszeri transzformációk együttes mennyiségét.

1.35.22. A transzformáló DNS befogadásának feltételei

Megállapítást nyert, hogy az egyes fajok osztódási ciklusuk különböző szakaszaiban a donor DNS-sel szemben különböző mértékű befogadási hajlamot (kompetenciát) tanúsítanak. Ezt tapasztalták a *Diplococcus*



177. ábra

A kompetencia szakaszai a *Diplococcus pneumoniae* szinkron tenyészetében. A transzformálódott sejtek előfordulási gyakoriságának maximumait e fajnál közvetlenül a fiziológiai sejtosztódások előtt tapasztalhatjuk (Levy és munkatársai, 1973)

pneumoniae szinkron tenyészeteiben, ahol a befogadási periódus közvetlenül a fiziológiai sejtosztódás előtt van *(177. ábra)*. A *Bacillus* genusz esetében viszont a sejtek a transzformáló DNS befogadására a szaporodás exponenciális szakaszának vége felé a leghajlamosabbak. A *D. pneumoniae*ból sikerült egy ún. „kompetenciafaktor"-t is izolálni.

Ez egy protein, mely a sejtet a kompetencia tulajdonságával ruházza fel, feltételezhetően azáltal, hogy a sejt felületi struktúráját valamilyen módon megváltoztatja. Igen valószínű, hogy a periplazma enzimei, melyek a sejtfal növekedésében és a fiziológiai sejtosztódásban játszanak szerepet, részt vesznek a recipiens sejt kompetenssé tételében is. Egyébként itt kell megjegyezni, hogy a transzformációra egyáltalán alkalmas és képes fajok sejtjeinek transzformációs hajlamát a tápközeg összetétele és bizonyos kemikáliák jelenléte ugyancsak befolyásolja.

A *Streptococcus-* és a *Bacillus*-fajok kompetencia faktorai kicsiny extracelluláris proteinek, melyeket a sejtek szaporodásuk során a környező közegbe választanak ki. A kompetencia tényleges indukciója azonban csak akkor következik be, ha a tenyészet sejtsűrűsége meghaladja a 10^8 sejt/ml értéket. Ez szükséges ugyanis ahhoz, hogy a faktor koncentrációja a kritikus indukciós szintet elérje. Tisztított kompetencia-faktorral az alacsonyabb sejtsűrűségű nem kompetens tenyészetet is kompetenssé sikerült tenni. E faktor indukciós mechanizmusa ma még ismeretlen (lásd STEWART és CARLSON, 1986).

A kettősfonalúság fontos előfeltétele a transzformáló DNS behatolásának a recipiens sejtbe. A behatolás megtörténte után azonban, az ún. eklipszis fázisában, a kettős fonalú donor DNS-t a recipiens sejtből többé már nem lehet visszanyerni. Ez a fázis kb. 5 percig tart. Izotópokkal jelzett transzformáló DNS-sel végzett tanulmányok eredményei arra utalnak, hogy ez alatt az idő alatt a donor DNS egyfonalúvá lesz. Ezt követi integrálódása a recipiens genomjába, amikor a kettősfonalúság regenerálódik. Feltételezik, hogy ez az integráció a recipiens genom homológ szakaszán megy végbe. Ekkor az első lépés a recipiens DNS megfelelő szakaszának kimetszése, mely azután lebomlik. Ezt követően helyébe az egyfonalú transzformáló DNS épül be *(lásd 175. ábra)*.

1.35.23. A transzformáció feltehető gyakorisága a természetben

A transzformáció során a recipiens sejt a donor szolubilis DNS-ét veszi fel. A transzformáló DNS-t a sejtek néha spontán bocsátják ki. Ilyen DNS található bizonyos *Neisseria* fajok extracelluláris nyálkájában. Általában azonban a donor DNS-t a sejtekből kémiai módszerekkel kell extrahálni, egyidejűleg megvédve a DNázok destruktív hatásával szem-

ben. Transzformációra csupán azok a baktériumok képesek, melyek a közegből nagy molekulasúlyú DNS-t tudnak felvenni. Újabban már az *E. coli* esetében is észleltek transzformációt kálciumionok nagy koncentrációja jelenlétében. Fentebb láthattuk, hogy bizonyos fajok transzformálható sejtjei felvehetnek bármilyen forrásból származó DNS-t, genetikai rekombinációt azonban ezek is csak a közeli rokon szervezetek donor DNS-ével alakítanak ki. Ez a specificitás az endo- és exogenoták párosodásának (mely előfeltétele az információcserének) követelményeit tükrözi. A DNS-párosodás a nukleotidszekvenciák szoros homológiáját igényli. Valamely sejtpopuláció, a szaporodás bármilyen fázisában legyen is, sohasem lehet 100%-ig kompetens. A kompetencia mindig csak a populáció egy frakciójának sajátossága. A kompetens sejtek nem vesznek fel olyan DNS-molekulákat, melyek molekulasúlya kb. $4x10^5$-nél kevesebb. A kettős fonalú DNS felvétele sokkal nagyobb hatékonysággal jár, mint az egyfonalúé.

STEWART és CARLSON (1986) *mesterséges* és *természetes transzformációt* különböztetnek meg. Az első esetben a recipiens sejt laboratóriumi körülmények között végrehajtott kémiai, fizikai vagy enzimaktikus kezelések hatása alatt válik kompetenssé. A természetes transzformáció a sejt normális anyagcsere-élettanához tartozik. Szerintük ez a baktériumok géncseréjében olyan folyamat, melynek funkciói a kromoszómán kódoltak és amelyhez a kompetencia szelektív nyomásnak alávetett örökletes tulajdonság.

Ami a transzformációs géncsere természetes lehetőségeit illeti az alábbiakat kell szem előtt tartanunk:

1. Nukleinsavak talajokban és üledékekben felhalmozódhatnak. Humuszanyagokkal kölcsönhatásban az enzimatikus lebontással szemben stabilizálódhatnak. A DNS-t még a homokszemcsék is megkötik. Ilyen állapotban a nukleázokkal szembeni rezisztenciája nagyobb, mint amikor a DNS oldatban van. Ez a rezisztencia nem az enzimek talajhatásra visszavezethető inaktivációjának eredménye.

2. Bacillusokkal végzett kísérletek szerint a partikuláris kötésű DNS, jóllehet rezisztenciája fokozottabb, kevéssé transzformáló.

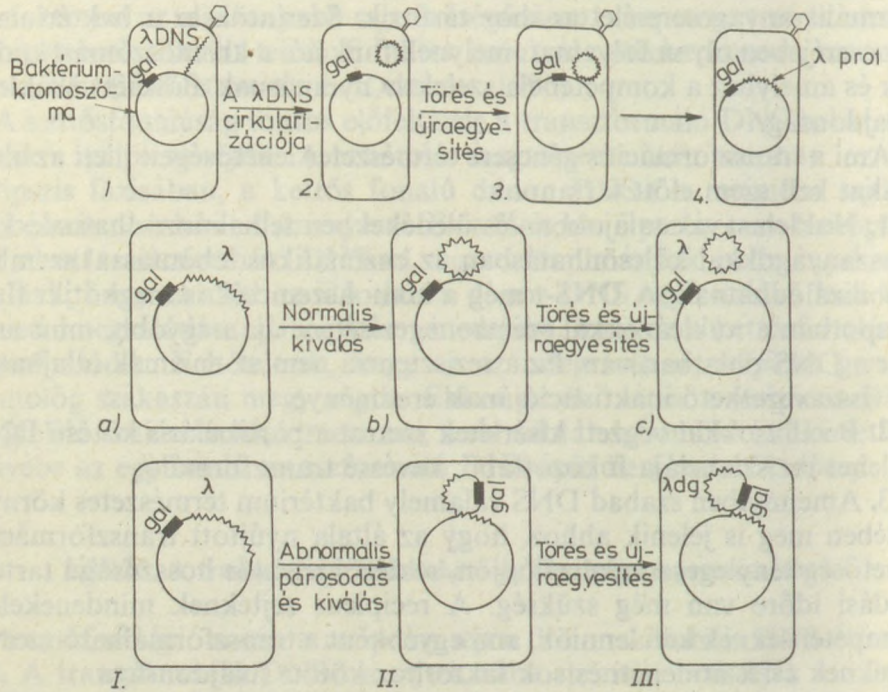
3. Amennyiben szabad DNS valamely baktérium természetes környezetében meg is jelenik ahhoz, hogy az általa nyújtott transzformációs lehetőség ténylegesen realizálódjon, részéről jelentős hosszúságú tartózkodási időre van még szükség. A recipiens sejteknek mindenekelőtt kompetenseknek kell lenniök, ami egyébként a transzformálható szervezeteknek csak átmeneti és sok faktorhoz kötött tulajdonsága.

4. A baktériumsejtből a sejtfalon át végbemenő DNS-leadás már több baktériumfaj esetében (pl. *Bacillus subtilis* stb.) is bizonyított.

1.35.24. Transzdukció

A transzdukció esetében a baktériumok vírusai, az ún. bakteriofágok viszik át a genetikai anyagot az egyik sejtből a másikba. A donor sejtben létrejött ún. temperált fág (*lásd* később) viszi a recipiens sejtbe a donor kromoszómájának egy fragmentjét. A temperált fág a recipiens sejtben profággá válik és nem szaporíttatja magát. A transzformációhoz hasonlóan a transzdukció alkalmával is a donor kromoszómájának csak kicsiny fragmentje kerül a recipiensbe. Ezt a jelenséget számos baktériumnál megfigyelték. Így GRAM-negatívaknál (*Escherichia, Shigella, Pseudomonas, Vibrio* és *Proteus*) és GRAM-pozitívaknál (*Staphylococcus* és *Bacillus*). Kétféle transzdukciót különböztetünk meg: *a)* Az ún. generalizált transzdukció esetében a donor kromoszómája bármely szegmentjének megközelítően azonos az esélye a fág közvetítette transzporthoz. *b)* A specifikus (korlátozott) transzdukció azt jelenti, hogy átvitelre csak azok a szegmentek jöhetnek számításba, amelyek a profág kromoszomális lokalizációjának megfelelő hellyel közvetlenül szomszédosak.

A *korlátozott transzdukció:* A *178. ábra* (felső sor 1–4) a profág és a



178. ábra

A profág és a gazdakromoszóma integrációja *(1–4)*; a fág újbóli, egyszerű kiválása a rendszerből *(a–c)*; ill. szabadulása transzdukáló részecske alakjában *(I–III)*. Részleteket *lásd* a szövegben

gazdasejt kromoszómájának integrációját mutatja be. Az ún. λ-fág DNS-e behatol a sejtbe **(1)**, ezután a fág-DNS végei kovalensen kötődnek és egy cirkuláris képletet alkotnak **(2)**, majd párosodás megy végbe egy a kromoszóma „*gal*" lokuszával szomszédos bázisszekvencia és a fág-DNS megfelelő homológ bázisszekvenciája között **(3)**. Végül a párosodási régióban törés és újraegyesülés *(crossing over)* révén, a két cirkuláris DNS-struktúra integrálódik **(4)**. Az integrált fág-DNS-t profágnak nevezzük. Az ábrán a λ-DNS a szemléletesség kedvéért felnagyítva szerepel. A valóságban a kromoszóma hosszának mindössze 1–2%-a. Ha a beépült λ-fág indukciója valamilyen hatásra megtörténik, úgy a fentebb ecsetelt folyamat fordítottja megy végbe *(178. ábra: a.-c.)* és a fág-DNS kiszabadul a kromoszóma kötelékéből. Ezt a fág replikációja, érése, majd a gazdasejt lízise követi. Ritka kivételként (kb. minden 10^{-6}–10^{-5} sejtnél), különböző pozíciókban, olyan kiválás is létrejöhet, amikor a λ-fág genomjában a cirkuláris DNS egy részét a gazdakromoszóma egy bizonyos szegmentje helyettesíti. *(178. ábra:* I–III). Az ilyen rekombináns, cirkuláris DNS-ekből viszont esszenciális fontosságú fággének hiányoznak, ami miatt ezek defektívek (hibásak), és replikálódni mindaddig képtelenek lesznek, mígnem a sejtet normális fág fertőzi, mely azután a hibás fágot géntermékkel látja el. Ha ez megtörténik, úgy a sejt lízisen megy keresztül és belőle mind normális fágrészecskék, mind „transzdukáló részecskék" válnak szabaddá. Utóbbiak recipiens sejtek felületén abszorbeálódva, DNS-üket a szokásos módon a gazdasejtbe injiciálják. Így a recipiensbe a donor kromoszómájának egy szegmentje is bekerül.

Generalizált transzdukció: Jóllehet a gazdasejt DNS-ének szegmentjei alkalomadtán a generalizált transzdukáló fágokba is a fentiekben leírt mechanizmusnak megfelelően épülhetnek be, mégis az ilyen fágok DNS-e a transzdukció alkalmával általában és főleg, de esetenként már kizárólag csak gazda-DNS-t tartalmaz, mégpedig nem specifikusan a gazdakromoszóma azon szűk régiójából, ahonnan a fág kiszakadt, hanem megkülönböztetés nélkül és véletlenszerűen a gazdagenom bármely szakaszából. Mi lehet ennek az oka? Először is úgy látszik, hogy a fág feji része, a DNS-t körülvevő proteinburok, mind a kondenzált fággenom, mind a kondenzált és méretében a fággenoménak megfelelő gazda-DNS-szegmentek körül egyaránt kialakulhat. Hogyan kerülhet erre egyáltalán sor? A mechanizmus, ami szerint ez végbemegy, nem ismeretes. Csupán annyit tudunk, hogy a normális feji rész proteinburkának felépítéséhez bizonyos fággének termékeire van szükség. Feltehetően ezek mint alakképző faktorok, a fág-DNS-sel komplexet alkotnak és így a fejrész proteinburka alegységeinek összekapcsolódásánál mátrixul szolgálnak. Amennyiben ezek a faktorok megfelelő méretben nem fág-DNS-

sel, hanem a gazdasejt széttöredezett DNS-ének valamely szekvenciájával alkotják véletlenszerűen a komplexet, úgy ezen a mátrixon a fág feji része ugyancsak kiépül, így azonban már transzdukáló fágrészecske jön létre. Hasonlóan a korlátozott transzdukcióhoz, e típus esetében is minden 10^5, ill. 10^6 részecske közül csupán egy a transzdukáló.

A korlátozott transzdukciónál a transzdukáló részecske fággenomjához a gazdasejt DNS-ének egy szegmentje kapcsolódik. Ha ez a recipiensbe jut, akkor mindkettő integrálódik a baktérium saját DNS-ébe. A transzdukált recipiens ezután szaporodva egy sejtklónt alakít ki, ahol a sejtek mindegyikében mind a defektív profág, mind a donor extra DNS-szegmentje jelen van. Előfordulhat, hogy a klón sejtjei ezenkívül még egy normális profágot is tartalmaznak. Ez úgy jöhet létre, hogy az eredeti kiinduló recipiens (melytől a klón származik) egyidejűleg egy normális és egy transzdukáló részecskével fertőződött. Ha az ilyen klón sejtjeit indukálják, pl. besugárzással, úgy a lizátumban kimutatható részecskéknek 50%-a transzdukáló. Ezt a jelenséget „nagy gyakoriságú transzdukció"-nak *(high-frequency transduction)* nevezzük.

Az ún. generalizált transzdukciót tanulmányozva azt találták, hogy az ilyen jellegű fág számos esetben nem képez profágot, mely a gazda DNS-ébe integrálódna. Ehelyett ez az exogenota a gazdasejtben önálló egzisztenciát alakít ki. Ez az állapot gyakran csak egyszerű perzisztenciát jelent, replikáció nélkül. Következésképpen, amikor a zigóta osztódik, a leánysejtek közül csak az egyikbe jut exogenota. Ez azután egyetlen példányban, generációkon keresztül vándorolhat sejtből sejtbe, és a klón a maga egészében mindig csupán egyetlen ilyen exogenotát viselő sejtet fog tartalmazni. Ezt az állapotot „abortív transzdukciónak" nevezzük. Az exogenota génjei azonban mindvégig normálisan funkcionálnak. Így, ha az abortív transzdukció egy gal^+/gal^- sejtet eredményez, melyben a gal^+-gént a nem replikálódó exogenota viseli, úgy e sejtben galaktózfermentáló enzim termelése megy végbe. Minthogy a sejt további osztódása folyamán létrejött klón sejtjei egy kivételével gal^--ak lesznek, az enzim rendkívül nagy mértékben felhígul. Ha a gal^+/gal^- abortív transzduktánst olyan médiumon lemezeljük (agarlemezeken szélesztjük), mely egyedüli szén- és energiaforrásként galaktózt tartalmaz, úgy négynapos inkubáció után csupán egyetlen parányi kolóniát figyelhetünk meg. Ez a kolónia, mely kb. 10^6 sejtet tartalmaz, a benne levő egyetlen gal^+-sejtnek és az ezáltal termelt enzimeknek köszönheti létét. Normális körülmények között a gal^+-sejtek ugyanis már kétnapos inkubáció után is nagy, több mint 10^9 sejtből álló telepeket fejlesztenek. Igaz meg kell jegyezni, hogy az exogenotát már nem tartalmazó, genotípusosan gal^--sejtek még egy ideig fenotípusosan gal^+-ak lehetnek, azonban a pozitivitásukat

biztosító géntermékek az előrehaladó sejtszaporodással párhuzamosan folyamatosan felhígulnak.

A transzdukcióval átvihető DNS mennyiségét a bakteriális genom 1–2%-ára becsülik. Ennek megfelelően főleg az egymáshoz közel kapcsolt markerek együttes átvitelére van meg a lehetőség. A transzformációhoz hasonlóan a transzdukciót is fel lehet használni a finomabb szinten mozgó géntérképezés munkálataihoz. Ezzel szemben a következőkben tárgyalásra kerülő szexuális rekombináció a nagyobb vonalú térképezés kivitelezéséhez nyújt lehetőséget.

1.35.25. Konjugáció

A genetikai anyag sejtek közötti transzportját szexuális úton először 1946-ban LEDERBERG és TATUM igazolták. Az *E. coli* két, kétszeresen auxotróf törzsét (képletesen itt az **1.** törzs: $A^+B^+C^-D^-$; a **2.** törzs: $A^-B^-C^+D^+$) keverték össze, majd keresték azokat a kettős rekombinánsokat, melyek mind a négy bélyegre nézve prototrófok (vagyis $A^+B^+C^+D^+$) lettek. Sikerült is ilyeneket izolálniok. Később kiderült, hogy a genetikai információcseréhez a két törzs sejtjeinek közvetlen kontaktusa elengedhetetlenül szükséges. Amennyiben ugyanis ezeket egymástól szeparáltan, egy a sejtek számára nem, de makromolekulák, így például a DNS számára már átjárható üvegszűrővel, középen elválasztott, U-cső két szárában tenyésztették, úgy a genetikai anyag cseréjére nem került sor. Hasonlóan, bármelyik törzset tenyésztették is a másik szűrletén, a rekombinánsok fellépése elmaradt. A transzformációval ellentétben viszont a DN-ázok jelenléte ezt a típusú DNS-transzfert nem gátolta.

Amikor ilyen típusú rekombinánsokat „génkapcsolódási" vizsgálatoknak vetettek alá, megállapítást nyert, hogy az egyes recipiensekbe egyidejűleg nem egy vagy néhány, hanem akár számos marker átvitele történhetett. Jelentősen hosszabb DNS-fragmentek átadása játszódhatott le, mint a transzformációk esetében. Később az *E. coli* K-12-törzs izolált sejtjeiből származó klónokkal kísérletezve nyilvánvalóvá vált, hogy egyes sejtek DNS-donorként (ezeket F^+-nak jelölték; F: fertilitás), míg mások recipiensként (F^-) szerepelnek. Az F^+- és F^--sejtek kölcsönhatását vizsgálva az alábbi eredményeket kapták:

$F^- \times F^-$ párosítás esetén nincsenek rekombinánsok.

$F^+ \times F^-$ párosítás alkalmával rekombinánsok 10^{-5}–10^{-6} közötti gyakorisággal fordulnak elő.

$F^+ \times F^+$ Párosítás esetén a rekombinánsok előfordulása rendkívül csekély gyakoriságú.

Feltételezhető, hogy egy F-faktor (fertilitás-faktor) jelenléte nélkülözhetetlen lehet ahhoz, hogy a genetikai transzfer szexuális rekombináció révén végbemehessen. Kimutatták, hogy ilyen faktor létezik, és hogy ez az F^+-sejtekből könnyen átvihető az F^--sejtekbe. Egyes kísérletekben az F^--sejtek csaknem 70%-a F^+-vá alakult. Ez viszont arra engedett következtetni, hogy az F-faktor ilyen nagy gyakoriságú átvitele egészen más kinetikával lehet kapcsolatos, mint amely a genetikai markerek sokkal alacsonyabb gyakoriságú transzferét az F^+ F^- kereszteződések alkalmával szabályozza. Később megfigyelték, hogy akridin-orangezsal, vagyis egy olyan mutagén ágenssel kezelve a sejteket, melynek hatására az extrakromoszomális DNS-részecskék tönkremennek, F^+-sejtek F^--sejtekké válnak. Időközben sikerült az F^+-sejtek egy olyan törzsét is elkülöníteni, melynek segítségével ezerszer több rekombinánshoz jutottak, mint amikor az F^--sejteket közönséges F^+-sejtekkel párosították. Ezt a nagy rekombinációs gyakoriságú donort (*high frequency of recombination donor:* Hfr) szuperhímnek *(super male)* nevezték el. Jellemző ezekre, hogy kereszteződések alkalmával F-faktorukat sokkal ritkábban adják át a recipienseknek. A Hfr-sejtek bizonyos körülmények között közönséges F^+ sejtekké alakulhatnak, viszont ez utóbbiak néha „felfokozódhatnak" Hfr-sejtekké. Ezzel szemben, tisztán F^--sejtekből spontán sohasem jön létre sem F^+-, sem Hfr-sejt. Közönséges F^+- és Hfr-törzsek összehasonlítása citológiai alapon, lényeges különbséget tárt fel: az F-faktor az F^+-sejtekben autonómiát élvez, nincsen a kromoszómába integrálva, hanem mint extrakromoszomális DNS-fragment a citoplazmában szabadon fordul elő. Az F-részecske párosodási kényszert fejt ki, melynek hatására a sejtek között konjugáció megy végbe. Ennek során az F-faktor a recipiens sejtbe kerül (kromoszomális DNS azonban ilyenkor nem cserél sejtgazdát). Így egyrészt érthető, hogy miként válik a párosodások alkalmával az F^--sejtek oly nagy száma F^+-vá, másrészt miért szünteti meg az akridin-orange az F-pozitivitást. A Hfr-sejtekben az F-faktor nem autonóm, hanem a baktérium DNS-ével a legszorosabban társul. Ilyen integrált állapotban is képes párosodási kényszert kifejteni, azonban a létrejött konjugáció alkalmával már magával viheti a bakteriális genom tetemes frakcióját is.

A Hfr-sejtekkel történt rekombinációs kísérletek során megállapítást nyert, hogy ilyenkor a gének átvitelében meghatározott szabályszerűségek észlelhetők. Egyes markerek átvitele pl. mindig sokkal nagyobb gyakorisággal történik, mint másoké. A genetikai anyag transzferje lineáris, mégpedig egy meghatározott fix ponttal kezdődően, minthogy a különböző rekombinánsokban mindig ugyanazok a markerek érik el legnagyobb gyakoriságot. Az ún. megszakított párosításokkal tisztázták

e jelenség természetét. Hfr- és F^--sejteket kevertek össze és tették lehetővé párosodásukat. Időközönként a tenyészet alikvot mennyiségeit elkülönítették és az ezekben folyamatban levő sejtpárosodásokat erőteljes rázatással megszakították. Ezután az átvitt markerek számának megállapításához teszteltek. A legalacsonyabb gyakorisággal azoknak a markereknek az átvitele történt meg, melyek a kromoszómán a géntranszfer kiindulási pontjától a legtávolabb helyezkedtek el. Normális körülmények között, mielőtt még ezeknek a távoli géneknek az átvitelére is sor kerülhetne, a párosodás már megszakad. Amikor a párosodási kísérleteket lágy agarba ágyazott sejtekkel végezték, ami megakadályozza a párosodó sejtek spontán szétszakadását, azt találták, hogy az F^--sejtbe a Hfr-sejtek teljes genomja átmehet, és hogy az utolsónak átkerülő marker maga az F-faktor. Valójában a Hfr × F^- kereszteződések alkalmával a DNS-ben valahol, mégpedig éppen az F-faktorban, törés következik be, úgyhogy a transzfer során az elsőnek átvitt DNS az F-faktor információjának egy részét már tartalmazza, míg az utolsónak átvitt DNS-hez az F-faktor maradék információja kötődik. ^{32}P-vel jelzett Hfr-DNS-sel igazolták, hogy percenként a donor genom 1,0%-a megy át a recipiensbe. A transzfer sebessége a párosodás alkalmával konstans.

1.35.26. Extrakromoszomálisan örökített replikonok

A baktériumokban előforduló kicsiny, extrakromoszomális genetikai elemeket plazmidoknak vagy episzómáknak nevezzük. A sejt szaporodásának normális körülményei között a plazmidok nélkülözhető sejtalkotóelemek. Az általuk viselt gének a gazdasejtet új tulajdonságokkal ruházzák fel. Különböző típusaikat ismerjük és közöttük a legfontosabbak:

a) Szexfaktorok: A kromoszómatranszferben játszanak szerepet. A legjobban az ún. F-faktor tanulmányozott, mely az *E. coli* K 12-törzsében fordul elő.

b) Col-faktorok: Olyan géneket viselnek, melyek a gazdasejtet colicintermelésre teszik képessé. A colicinek a coliform baktériumokra letális hatású, fehérjetermészetű toxinok.

c) Rezisztencia (R)-faktorok: Az általuk viselt gének a gazdasejtnek különböző antimikrobiális vegyületekkel, így antibiotikumokkal szemben rezisztenciát biztosítanak. Egyetlen plazmid többszörös rezisztenciát is nyújthat pl. sztreptomicin, kloramfenikol, tetraciklinek és szulfonamidokkal szemben. Bizonyos esetekben a plazmid néhány elemi egységre disszociálhat: az egyik ilyen elemi egységet, melyet „rezisztenciaátviteli faktornak" (RTF) neveznek, úgy tartják nyilván, mint amely azokat a

géneket viseli, melyek a sejtek közötti transzferfolyamatokat szabályozzák. Más elemi egységek, ezeket R-determinánsoknak keresztelték, a rezisztenciagéneket viselik. Meghatározott körülmények között a plazmid különböző elemi egységei egymáshoz szorosan kapcsolódva együtt maradnak. Ilyenkor a teljes plazmidot mint integrált R-faktort jelölik meg.

Termofil bacillusokból HOSHINO és munkatársai (1985) újabban négy antibiotikum-rezisztencia plazmidot is izoláltak. Az antibiotikum-ellenállás lokuszainak és a plazmid replikációjának szempontjából fontos régióknak a helyeit e plazmidok fragmentjeinek *Bacillus subtilis*ben kivitelezett klónozásával határozták meg.

d) Staphylococcusok penicillináz plazmidjai: Ezek a penicillinnel szemben rezisztenssé tevő penicillináz információját tartalmazó gént viselik. Az R-faktoroktól abban különböznek, hogy transzferre, konjugáció révén nem képesek. Fág közvetítette transzdukcióval jutnak sejtről sejtre.

A plazmidoknak számos olyan sajátossága van, mely a baktériumok vírusaira (a fágokra) emlékeztet. Nem csupán a gyógyszerekkel szembeni rezisztenciában játszanak kiemelkedő szerepet, hanem közreműködésükkel a bakteriális rekombinációs folyamatok során új, sajátos antigénkombinációval és virulenciafaktorokkal jellemezhető törzsek, patogén organizmusok jönnek létre.

A plazmidok sokoldalú szerepére a baktériumok életében mind több és több közlés utal. WILKINS és munkatársai (1981) például kimutatták, hogy az Inc I. α-plazmid révén kódolt DNS-primáz az *Escherichia coli* egy primázdefektív mutánsában a DNS replikációját hatékonyan elősegíti. Miről is van itt szó? A DNS-replikáció fontos jellemvonása az egyik növekedő fonal diszkontinuus szintézise. E folyamatban részt vevő fragmentek szintézisét DNS-polimerázok nem kezdeményezhetik, minthogy ezek az enzimek oligonukleotid primer 3′-OH terminusát igénylik. A replikáció alkalmával a primer szekvenciákat a *dna*G-gén terméke, az ún. „primáz" (RNS-polimeráz) szintetizálja. Ez 60 000 molekulasúlyú protein alegységként, mégpedig egy multienzim komplex résztvevőjeként működik. A plazmidenzim helyettesíteni képes az *E. coli* primázát és a baktériumkromoszóma diszkontinuus szintézisét hatékonyan segíti elő. Nagyon fontos új megállapítás tehát, hogy a bakteriális DNS-replikációban a DnaG-proteinen kívül más primer előállító enzimek is részt vehetnek.

Valamennyi eddig kimutatott plazmid cirkuláris, kettősfonalú DNS-molekula. Molekulasúlyúk 3×10^6-tól 1×10^8-ig terjed, mely elégséges 5–160 átlagos polipeptid kódolására.

A plazmidok replikonok. Replikációjuk a baktériumok kromoszóma-

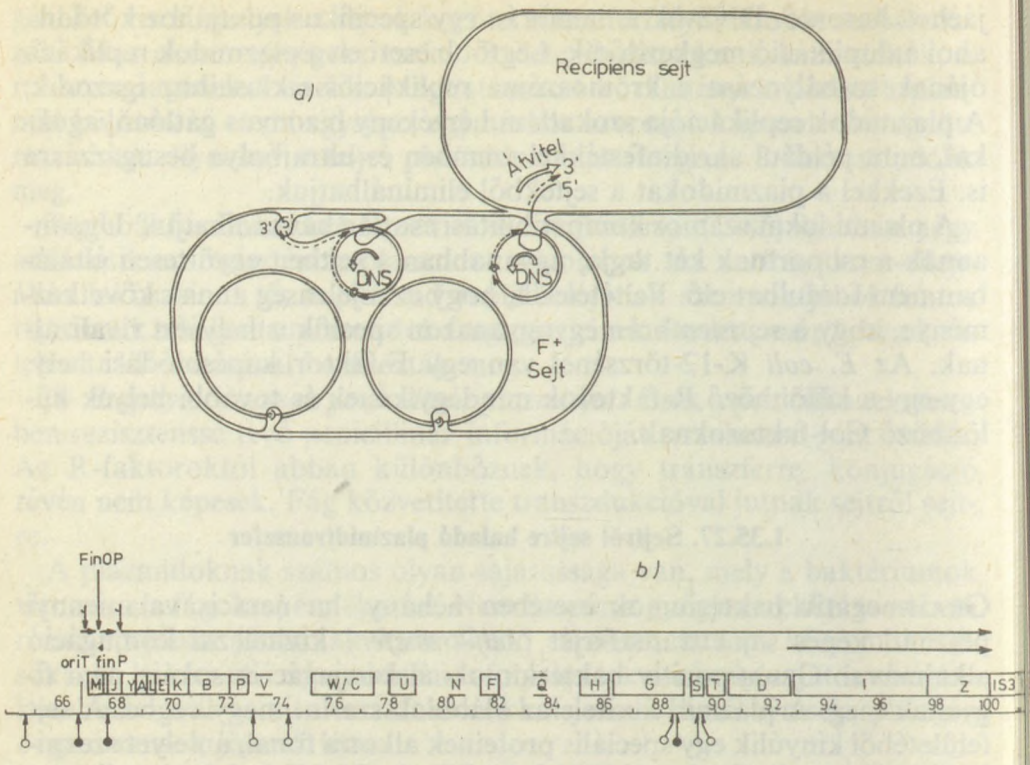
jáéhoz hasonló. DNS-ük a membrán egy specifikus pontjához kötődik, ahol a duplikáció megkezdődik. Legtöbb esetben a plazmidok replikációjának szabályozása a kromoszóma replikációs ciklusaihoz igazodik. A plazmidok replikációja szokatlanul érzékeny bizonyos gátlóanyagokkal, mint például akridinfestékkel szemben és ultraibolya besugárzásra is. Ezekkel a plazmidokat a sejtekből eliminálhatjuk.

A plazmidokat számos kompatibilitási csoportba sorolhatjuk. Ugyanannak a csoportnak két tagja, ugyanabban a sejtben együttesen általában nem fordulhat elő. Feltételezik, hogy ez a jelenség annak következménye, hogy a sejtmembrán egyugyanazon specifikus helyéért rivalizálnak. Az *E. coli* K-12-törzsénél van egy F-faktor kapcsolódási hely, egy-egy a különböző R-faktorok mindegyikének és további helyek különböző Col-faktoroknak.

1.35.27. Sejtről sejtre haladó plazmidtranszfer

GRAM-negatív baktériumok esetében néhány, ha nem is valamennyi plazmid képes saját transzferjét *(self-transfer)* kivitelezni konjugáció alkalmával. GRAM-pozitív baktériumoknál konjugációt sokáig nem figyeltek meg. A plazmid átvitele az alábbiak szerint megy végbe. A sejt felületéből kinyúlik egy speciális proteinek alkotta fonal, amelyet szexpilusnak neveznek, és plazmidgének kódolnak. Ez a fonal, mely néhányszor hosszabb lehet mint maga a sejt, csúcsával a GRAM-negatív sejtfalhoz tapad. Az így megérintett sejt ezáltal fogva marad és valósággal ki van pányvázva a plazmidot viselő sejthez. Ezután a két sejt vontatással (melynek mechanizmusa ismeretlen) közvetlen kontaktusba kerül. A plazmid ezután a replikáció egy sajátos folyamatán megy keresztül. Ezt „transzfer replikációnak" nevezzük. Az egyik DNS-fonal a recipiensbe kerül, a másik marad a donorban. A transzferrel egy időben azonban mindkét fonalnak elkészül a komplementere is, az egyik a recipiensben, a másik a donorban. Közvetlenül a transzfer után, ligáz hatására végbemegy cirkularizációjuk is, és ezzel a replikáció be is fejeződött *(179. a.-c. ábra)*.

Mikromanipulátor segítségével a már „kipányvázott" sejteket egymástól elkülönítették és ezzel megakadályozták, hogy egymás közvetlen közelébe kerüljenek. Néhány ilyen izolált sejtből már rekombináns klónok voltak kitenyészthetők. Ez arra utal, hogy a DNS átadása már a belül feltehetően hosszanti csatornát tartalmazó szexpilusokon keresztül megtörténhetett. A legtöbb transzfer azonban csak azután jön létre, midőn a sejtek közvetlen sejt-sejt kontaktusba kerülnek. A DNS-en kívül sem citoplazma, sem más sejtalkotóelem nem megy át a recipiensbe. Az


a)
Recipiens sejt
Átvitel
3'
5'
3'
5'
DNS
DNS
F+
Sejt
b)
FinOP
oriT finP
M J Y A L E K B P V W/C U N F Q H G S T D I Z IS3
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100
DONOR
c)
Visszamaradó fonal
Helyettesítő fonal
DNS-polimeráz III
Primer
DNS-helikáz I (ptral)
Pórus a traYZ endonukleázzal és a traD fehérjével
3'
5'
Sejttakaró
Kiegészítő fonal
Átvitt fonal
Primer
DNS-polimeráz III
DNS-kötő protein
RECIPIENS

összetapadt két sejt végül is szétválik, és két plazmidtartalmú sejt jelenik meg.

A plazmidok egymás között és bázisszekvencia-homológiájuk mértékének megfelelően a gazdakromoszómával *crossing over* révén rekombinálódnak. Mivel mind a plazmidok, mind a kromoszóma cirkuláris szerkezetűek, a két DNS integrációjához páratlan számú *crossing-over* vezet, melyek után már mint egyetlen egység replikálódnak.

Megkülönböztetésül episzóma megnevezéssel (mely eddig a plazmiddal szinonim fogalom volt) illetik azokat a plazmidokat, amelyek a baktériumok kromoszómájába (rekombináció révén a bázispár-homológiának megfelelő régión belül) integrálódni képesek.

Ha egy GRAM-negatív sejtnek két plazmidja van, melyek közül az egyik önátvivő, a másik nem, úgy az előbbi az utóbbi átvitelét is kivitelezheti, vagyis azt „mobilizálja". Ez a mobilizálás pl. úgy történik, hogy a két plazmid akár véglegesen, akár átmenetileg, *crossing over* révén integrálódik. Más lehetőség is van. Ehhez integráció nem szükséges. Ilyenkor az önátvitelre nem képes plazmidnál rendszerint csak néhány génfunkció hiányzik (pl. a képesség pilus kialakítására), melyet az önátvivő a másiknak pótolni képes. Az önátvivő plazmid a baktérium kromoszómáját is mobilizálja, amikor azzal integrálódik. Ha ez az integráció viszonylag stabilan ment végbe, úgy a sejt osztódása során egy olyan klónt alakít ki, melynek minden egyes sejtje képes kromoszómatranszfer-

◄ *179. ábra*

a) Két kromoszómát és két autonóm F-replikont tartalmazó F^+-sejt konjugációja és recipiens sejttel. A bal oldalon az F magában a gazdasejtben replikálódik. A jobb oldali a replikáció révén hatol be a recipiensbe. *b)* Az F plazmid transzfer régiójának fizikai és genetikai térképe. A számok kilobázis koordináták, míg a gének feletti horizontális vonalak az átírásra utalnak. Az *ori*T-től kiinduló DNS átvitel során utolsónak a transzfer régió megy át. A *tra*M és a *traJ* promoter régiók szekvenciáit már feltárták. A *tra*Y–Z operonnak saját külön promotere van. Az üres és fekete körökkel jelzett vertikális nyilak az Eco RI és Bg/II restrikciós helyekre utalnak. A promotertől induló *tra*M és *tra*Y–Z operonok átírása a *traJ* termékétől függ, mely viszont a FinOP represszor negatív szabályozásának van alávetve. Az egyes géneknek tulajdonított szerepek: szabályozás, *fin*P és *traJ*; pilusképzés, *tra*A, -L, -E, -K, -B, -V, -W/C, -U, -F, -Q, -H, és -G; a párosodás stabilizációja, *tra*N és -G; konjugációs DNS-anyagcsere, *tra*M, -Y, -D, -I és -Z; felszíni kizárás *tra*S és -T. *c)* Az F-plazmid konjugációs átvitelének modellje. A plazmid specifikus fonalát (vastag vonal) az *ori*T-nél a *tra*YZ endonukleáz metszi be. Ezután a fonal, 3'→ 5' irányban, feltehetően a traD protein közreműködésével, a donor és a recipiens sejtek kültakaróinak pórusain át vontatódik. A donorban visszamaradó plazmid fonal vékonyan kihúzva. Az átvitt fonal terminusai a sejtmembránhoz egy endonukleázt is tartalmazó komplex segítségével tapadnak. A *traI* terméke, a DNS helikáz I, az átvitelre kerülő fonalon vándorolva a plazmid duplex DNS-t letekercseli. Amennyiben a helikáz a konjugáció alatt membránkomplexhez kötődik, úgy az általa kiváltott ATP hidrolízis szolgáltathatja azt a mozgató erőt, mely az átviteli fonalat a recipiens sejtbe juttatja. A DNS-transzfer a donorban a helyettesítő fonal, míg a recipiensben a kiegészítő fonal (szaggatott vonalak) szintézisével társul. Mindkét fonal de novo primér szintézist és a DNS polimeráz III holoenzim aktivitását igényli. E modell feltételezi, hogy a DNS-t DNS-t kötő protein borítja. A pórus természetétől függően ez a protein, a DNS-hez kötve, a donorból a recipiens sejtbe kerülhet (WILLETTS és WILKINS, 1984)

re. Az ilyen klón a Hfr-klón. Az R- és a Col-faktorok között is találunk néhány kromoszómamobilizációra képes plazmidot. Azokat a plazmidokat, melyeknél a mobilizáláson kívül más kimutatható hatást nem észleltek, egyszerűen mint „szexfaktorokat" jelölik meg.

A gazdasejtek esetenként plazmidjaikat véglegesen elveszthetik, és ha a sejtből sejtbe menő transzfer és replikáció révén pótlásuk nem történik meg, úgy plazmidmentes klónok jönnek létre. A transzfer – mint láthattuk – konjugációval és fágok közvetítésével, transzdukcióval lehetséges. A plazmidok elvesztése és transzfer útján történő visszanyerése az a két folyamat, melynek egyensúlya az egyes plazmidtípusokat a sejtpopulációk viszonylag kis százalékában fenntartja. Ha ezt az egyensúlyt szelekció zavarja meg, mint pl. az R-faktorok esetében az antibiotikum-kezelés, úgy a megfelelő típusú plazmid már a gazdasejtek többségében előfordulhat. A plazmidok transzmissziós gyakoriságát többnyire a pilusképzés képességének hiánya, ill. tartós represszió ja korlátozza. Általában igen alacsony szintű és minden százezredik hordozó sejtre korlátozódik. Nagyok az eltérések azonban a fajok között, és különösen az interspecifikus transzfer viszonylatában. Így pl. az F-faktor (az *E. coli* K-12 szexfaktora) teljesen represszálatlan, és az *E. coli* törzsei között átviteli gyakorisága 1,0. Ezt a faktort azonban az *E. coli* sejtjei a *Proteus mirabilis* sejtjeinek már csak 1×10^{-5} vagy még ennél is kisebb gyakorisággal adják át.

A plazmid-DNS konjugációs, sejtből sejtbe történő átvitele során lezajló legfontosabb történések: a DNS metszése, a DNS transzfer kezdeményezése az átviteli hely originjénél, a plazmid DNS kettős fonalak szétkülönítése, szimpla DNS fonal átvitele, konjugációs DNS szintézis mind a donor, mind a recipiens sejtben és a replikált plazmid molekulák recirkularizációja *(179. ábra)*. E téren a legtöbb vizsgálatot az F plazmiddal végezték. A DNS transzfert megelőző sejt-sejt kölcsönhatáshoz pilusra van szükség. A konjugációs plazmidok igazoltan ilyenekre is kódolnak. A plazmid DNS transzferjének kezdeményezése a plazmid molekula egy meghatározott specifikus helyén történik, melyet az átvitel (transzfer) originjének vagy *ori*T-nek jelölnek. A *179. b. ábra* az F transzfer régiójának térképét mutatja be, melyen az *ori*T is látható. Ez aszimmetrikusan oly módon orientált, hogy magának a transzfer régiónak az átvitele utoljára történik meg. A DNS metszése az *ori*T-nél következik be *(179. c. ábra)*. A DNS átvitel csakúgy, mint a konjugációs DNS szintézis kezdeményezése, egy ma még ismeretlen jelzés szabályozása alatt áll, mely a két sejt meginduló párosodásával kapcsolatos. Utóbbi valamely kulcs protein szerkezetében alloszterikus változásokat idézhet elő, mely az *ori*T aktiválását vonja maga után. Föltételezik, hogy ez a kulcsprotein a *tra*M terméke lehet, mely bár a pilus szintézishez, a

párképződés stabilizálásához vagy az *oriT*-nél végbemenő metszéshez nem szükséges, azonban a DNS átvitelben és a donor sejtben lezajló konjugációs DNS szintézisben lényeges fontosságú. Az *oriT* szekvenciája a különböző plazmidokban eltérő és nagyon specifikus. Az *oriT* bemetszése után a fonal már kész az átvitelre. A plazmid két DNS fonalának ahhoz, hogy a recipiensbe csak egy kerüljön át, szét kell tekerednie. Ezt a feladatot a DNS helikáz I enzim, a *traI* gén terméke hajtja végre. Ez a fibrózus protein, mely a legtöbb *tra*-géntermékkel szemben a citoplazmában található, mintegy 180 000 molekulasúlyú és DNS-dependens ATP-áz aktivitással rendelkezik. A konjugációs DNS átvitelben a DNS giráz (Eco DNS topoizomeráz II) is részt vesz, mely a zárt cirkuláris duplex DNS-t negatívan csavarodottá alakítja. A plazmid DNS egyetlen fonalának átvitele, normális körülmények között, a donor sejtben (megjelölése: DCDS) a helyettesítő fonal és a recipiensben (RCDS) a kiegészítő fonal szintézisével egyidejűleg zajlik. A konjugációs DNS szintézis, más DNS replikációkhoz hasonlóan, 3′-OH primér terminus kialakítását és DNS polimeráz részvételével meghosszabbodási reakciót igényel. A DNS polimeráz III holoenzim annak a DNS-nek a szintéziséért felelős, mely az F átvitt fonalát helyettesíti. A transzfernek alávetett DNS 3′-OH terminusa a helyettesítő fonal folyamatos szintéziséhez a prímet szolgáltatja. A konjugációs DNS anyagcserének a recipiensben két fontos történése van: az átvitt fonallal komplementer DNS szintézise és a plazmid DNS cirkularizációja. Hasonlóan a bakteriális DNS replikációhoz a konjugációs DNS szintézis is egyfonalú-DNS-kötő proteint igényel. Az *E. coli*-ban az egyfonalú DNS-hez az SSB protein kötődik. Ez a DNS duplexet destabilizálja és az in vivo DNS replikációhoz is nélkülözhetetlen. Számos plazmid-DNS primázokra is kódol, és ezekről az enzimekről úgy tudjuk, hogy a konjugációs DNS szintézishez priméreket (indító RNS-ek) állítanak elő. Vannak plazmidok, melyek homológ primáz géneket hordoznak és ezek ugyanannak az enzimnek a szintézisét specifikálják. Feltételezik, hogy a recipiensben a kiegészítő fonal szintézisének kezdeményezését plazmid primázzal a szülői donorból származó enzimellátás is segíti. A cirkularizáció a recipiens sejtben a homológ DNS régiók közötti rekombinációval folyik. Az átvitt fonal cirkularizációja folyamatos kovalensen zárt templátot eredményez, mely a kiegészítő fonal szintézisének teljessé tételéhez feltétlenül szükséges. Az RNS primérek eltávolítása és az újonnan szintetizált DNS terminusainak ligációja után feltehetően egy topoizomeráz, mint a DNS giráz, azokat a negatív szuperhelikális csavarulatokat hozza létre, melyek révén végül is a hatékony átíráshoz és a vegetatív DNS replikáció kezdeményezéséhez szükséges plazmid alakzat jöhet létre (WILLETTS és WILKINS, 1984).

1.35.28. Plazmidokhoz kötött tulajdonságok

A plazmidgének által meghatározott sejttulajdonságok közül először a gyógyszerrezisztenciával foglalkozunk. GRAM-negatív baktériumokban az olyan antibakteriális anyagokkal szembeni rezisztenciát, mint amilyen a sztreptomicin, a penicillinek, a tetraciklinek, a kloramfenikol és a szulfonamidok, egyik vagy másik plazmidhoz különböző kombinációkban kötött gének szabályozzák. A GRAM-pozitív *Staphylococcus*okban a penicillinnel, eritromicinnel és a nehézfémekkel (pl. Hg^{++} és Co^{++}) szembeni rezisztencia ugyancsak plazmidokhoz kötött. Ezekkel a hatóanyagokkal szembeni ellenállóképesség a kromoszómához kötődő génekkel is kapcsolatos lehet, a mechanizmus azonban így már más. A legtöbb plazmid által szabályozott rezisztencia a hatóanyag enzimatikus inaktiválásában nyilvánul meg. Ez gyakran acetilezéssel vagy foszforilációval kapcsolatos. A kromoszómához kötött rezisztencia általában az ún. cél- vagy találati molekulának a kérdéses gátló anyaggal szembeni csekélyebb mértékű affinitásában jut kifejezésre. Ezek a megállapítások azzal a ténnyel egyeztethetőek össze, hogy a plazmidok (definíciószerűen) nélkülözhető sejtalkotóelemek. Csupán a kromoszomális gének biztosíthatnak olyan rezisztenciát, mely az antibakteriális anyagot megkötő hely strukturális megváltozásával kapcsolatos, minthogy a nélkülözhetetlen sejtalkotóelemeket meghatározó gének maguk is nélkülözhetetlenek.

Az *E. coli* egyes sertésekből származó enteropatogén törzsei enterotoxint és α-hemolizint termelnek. E toxinokért felelős gének átvihető plazmidokon vannak jelen. Hasonlóan a *Corynebacterium diphtheriae* toxinja és a *Streptococcus* eritrogén toxinja, plazmidokkal közel rokon temperált fágok lókuszaiban determináltak.

Mindazokkal a tulajdonságokkal, melyekkel fentebb a plazmidokat jellemeztük, a baktériumok vírusait, a fágokat is jellemezni lehetne. Egy *Pseudomonas*-fág esetében ki is mutatták, hogy jelenléte elősegíti a konjugációt. A leglényegesebb különbség azonban közöttük, hogy a fágok érett, proteinnel burkolt virion alakítására képesek, mely szabaddá válik és más sejtekhez a környező közegen keresztül jut el. Mindenesetre nagy hasonlóságuk a fágok és plazmidok szoros evolúciós rokonságára enged következtetni, amit még az is megerősíteni látszik, hogy egyes plazmidok és fágok egymással rekombinálódni is képesek.

Az a nagy könnyedség, amellyel a plazmidok sejtről sejtre továbbadódnak, és a gyógyszerek okozta rendkívül erős szelekció együttesen meg is hozták a sajnálatos eredményt. Japánban például 1968-ban az R-szabályozású, többszörösen rezisztens *Shigella* törzsek száma az 1955-ös 10–20%-ról 80%-ra emelkedett. Angliában a polirezisztens *Salmonella*

typhimurium először 1961-ben jelent meg. 1964-ben e faj összes izolált törzse között már 21% multirezisztens volt. Általában a GRAM-negatív patogének rezisztenciamarkereinek 60–90%-a átvihető plazmidokhoz kötött. Jóllehet az *in vivo* rezisztenciatranszfer kísérletesen meghatározott mértéke igen alacsonynak bizonyult, járványtani bizonyítékok igazolják, hogy mégis a transzfer járulhatott hozzá a GRAM-negatív, patogén, gyógyszerrezisztens törzsek számának viharos emelkedéséhez. Az a gyakorlati eljárás, hogy a háziállatok tápanyagaihoz antibiotikumokat kevernek, szelekció révén rendkívül megnövelte az R-faktorok gyakoriságát az állatok GRAM-negatív bélmikrobiótájában, ahonnan viszont az ember bélbiótájának adódhatnak át. Angliában észlelték például, hogy mezőgazdasági dolgozók ürülékében sokkal nagyobb gyakorisággal fordulnak elő multirezisztens, R-faktort viselő baktériumok azokon a farmokon, ahol már bevezették a sertések etetését antibiotikumokkal kiegészített tápanyagokkal, mint ahol ez még nem történt meg.

RTF-plazmidok, melyek csak az önátvitel génjeivel rendelkeznek, de gyógyszerrezisztenciát biztosító génekkel nem, ugyancsak rendkívül gyakoriak az ember és az állatok bélbaktérium-biótájában. Így egészséges emberekből és állatokból izolált 60 *E. coli* törzs közül 20 hordozott RTF-et, míg betegekből izolált 21 enteropatogén törzs közül 15. Az RTF kimutatása egyébként az alábbiak szerint történik: először is az A-törzset, melyet RTF jelenlétére vizsgálunk, a B-törzzsel párosítjuk. Az utóbbi csupán egy nem átvihető R-determinánssal rendelkezhet. A B-törzset ezután egy harmadikkal, egy plazmidmentes C-törzzsel párosítják. A B-törzsből a C-nek átadott R-determináns igazolja az A-törzstől szerzett RTF jelenlétét.

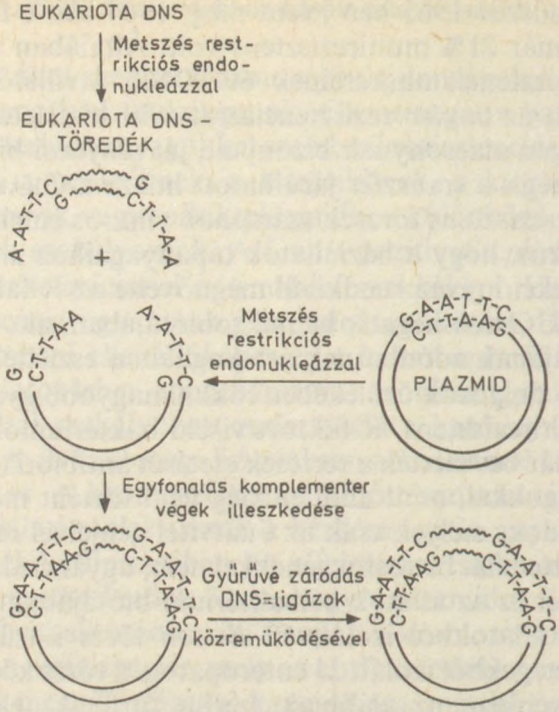
Plazmidokat cirkuláris DNS alakjában izolálni lehet, és ezekbe valamely eukariota sejt DNS-éből nyert szegmentet a *180. ábrának* megfelelően be is építhetünk. Az inkorporáció egyes lépései (*lásd* még 2.29. alf.):

a) Restrikciós endonukleázzal a plazmidot meghatározott helyen megnyitjuk. Ez az enzim a DNS-duplexben a specificitásának megfelelő palindromban (ragadós komplementervégeket eredményező) metszést hajt végre, miközben a plazmid körkörös molekuláját rövid, egyfonalú végekkel ellátott lineárissá alakítja át.

b) Ezt követően ugyanezzel a restrikciós endonukleázzal eukariota DNS-fragmentek előállítása következik.

c) A beépítésre kerülő eukariota DNS-fragmentekből és a lineáris plazmidmolekulákból keveréket állítunk elő, melyben azok komplementer, egyfonalú, „ragadós" végeikkel egymáshoz körkörösen csatlakoznak.

d) Ezután DNS-ligázzal kovalens kötésüket is lehetővé tesszük. A beépített idegen szekvenciát tartalmazó plazmid-DNS ezután transzfor-



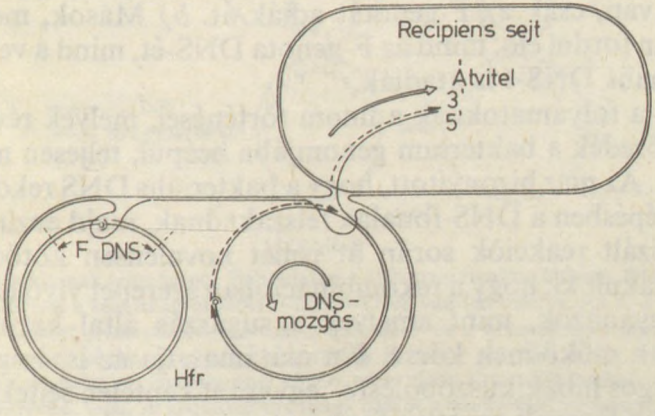
180. ábra
Eukariota DNS-fragment beépítése *in vitro* bakteriális plazmidba

málható baktériumsejtbe juttatható, melynek citoplazmájában majd mint független replikon szerepel. Az így „fertőzött" sejt klónt képez, melynek populációjában minden egyes sejt eukariota DNS-t is tartalmazó plazmidot visel. Az ilyen klónból nagyléptékű tömegkultúrákat állíthatunk elő, melyből a sejteket kinyerve a plazmid-DNS-t extrahálhatjuk. Ebből a beépült eukariota DNS-t restrikciós endonukleázzal kivághatjuk, majd a kívánt mértékben tisztíthatjuk. Ilyen módszerek segítségével már különböző állatok (*Drosophila,* béka stb.) génjeit vitték át plazmidokba. Ez a módszer lehetővé teszi olyan emlős és növényi gének előállítását, kvantitatív izolálását és tanulmányozását, melyek termékei a mezőgazdasági vagy az orvostudomány szempontjából fontosak. A legtöbbször azonban, legalábbis a gyakorlat számára, magának a génterméknek lehetőleg ipari méretű előállítása lenne a fontos. Eukariota gének baktériumokban is megnyilvánulhatnak, bár mennyiségileg általában rendkívül alacsony szinten.

1.35.29. Az F-genota

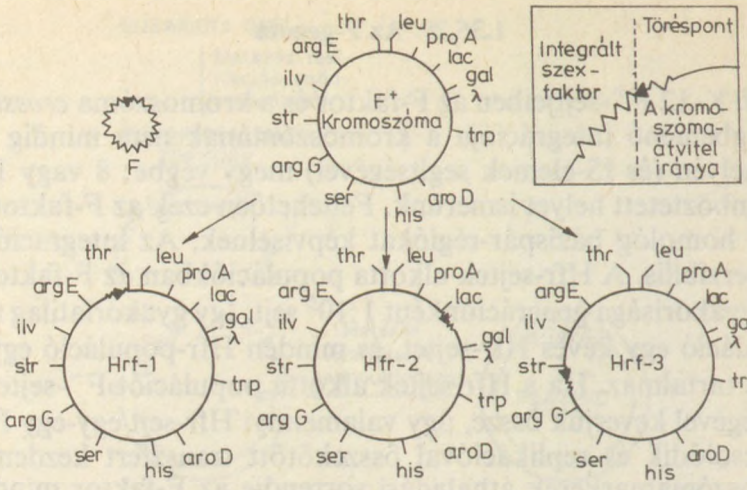
Az *E. coli* K-12 F^+-sejtjeiben az F-faktor és a kromoszóma *crossing over* révén végbemenő integrációja a kromoszómának nem mindig ugyanazon a helyén (és IS-elemek segítségével) megy végbe: 8 vagy 10 ilyen megkülönböztetett helyet ismerünk. Feltehetően ezek az F-faktor DNS-régióival homológ bázispár-régiókat képviselnek. Az integráció folyamata reverzíbilis. A Hfr-sejtek alkotta populációkban az F-faktor kiválásának gyakorisága generációnként $1:10^5$ sejt. Így gyakorlatilag minden F^+-populáció egy kevés Hfr-sejtet, és minden Hfr-populáció egy kevés F^+-sejtet tartalmaz. Ha a Hfr-sejtek alkotta populációt F^--sejtek fölös mennyiségével keverjük össze, úgy valamennyi Hfr-sejt egy-egy F^--sejthez kapcsolódik és replikációval összekötött transzfert kezdeményez. A kromoszómamarkerek áthaladási sorrendje az F-faktor mindenkori helyéhez viszonyított pozíciójuktól függő *(181.* és *182. ábrák)*.

Nagyon ritka esetben (10^{-8}–10^{-6}/sejt/generáció) a Hfr-sejtben az F-faktor leválása a kromoszómáról *crossing over* révén, szokatlan helyen következik be *(183. ábra)*. Az így létrejött, önállósodott F-faktor (F-plazmid) a kromoszóma-DNS egy szegmentjét is körkörös struktúrájába zárja. Ebben az állapotban „F-genotá"-nak nevezik, és azt a sejtet, mely az ilyen F-genotát (rekombináns F-plazmidot) hordozza, nem F^+-nek, hanem F′ *(F-prime)*-nek jelölik. Az a sejt, amelyben az F-genota létrejön, az „elsődleges F′"-sejt. Ennek kromoszómája az F-genotába került szegmentnek megfelelően hiányos. Az F-genota átvitele valamely normális F^--sejtbe, kiindulását képezi egy „másodlagos F′"-törzs kialakulá-



181. ábra

Hfr-sejt révén végbemenő DNS-átvitel. Minthogy az F-faktor és a kromoszóma integrálva vannak, az F-faktor replikatív átvitele magának a kromoszóma-DNS-nek is szekvenciális átvitelét idézi elő



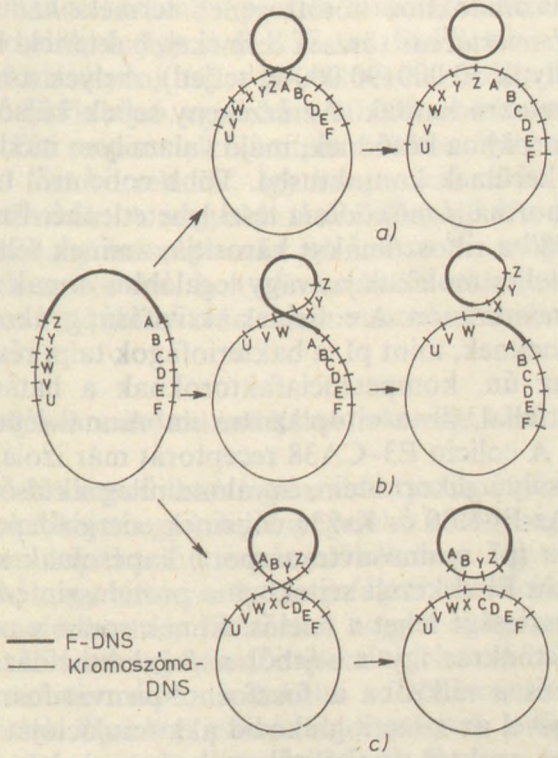
182. ábra

A szexfaktornak és az F^+-kromoszómának integrációja három különböző Hfr-hímet hoz létre. A felső kör az F^+-kromoszómát mutatja be; ezen az ismert genetikai markerek közül csupán néhány van feltüntetve. Az alsó körök azokat az eseteket szemléltetik, amikor a szexfaktor (F) a kromoszómával a *met-* és *thr-*, a *lac-* és a *gal-*, végül az *str-* és a *ser*-lokuszok között integrálódott. A 3, ill. 4 betűből alkotott szimbólumok a sejt biokémiai aktivitását szabályozó géneket jelzik. Így „*lac*" jelzi a lokuszoknak azt a csoportját, melyek a β-galaktozidok értékesítését szabályozzák, „*his*" a hisztidin bioszintézisét szabályozó lokuszok együttese stb.

sának. E törzs sejtjeiben a kromoszóma génjeinek egy része már diploid állapotban van. Az ilyen sejtekben a *crossing over* nagy gyakorisággal fordul elő, aminek következtében az F-genota váltakozva hol leszakad, hol integrálódik a kromoszómába. Ha a másodlagos F′-törzs egy tenyészetét egy F^--tenyészettel párosítjuk, úgy a transzfer két típusa megy végbe: *a)* Azok a sejtek, melyekben az F pillanatnyilag éppen leszakadt állapotban van, csak az F-genotát adják át. *b)* Mások, melyekben az F integráltan fordul elő, mind az F-genota DNS-ét, mind a vele érintkező kromoszomális DNS-t is átadják.

Azoknak a folyamatoknak a finom történései, melyek révén egy idegen DNS-töredék a baktérium genomjába beépül, teljesen még ma sem ismeretesek. Az már bizonyított, hogy a bakteriális DNS rekombinációja során első lépésben a DNS-fonalak felszakadnak, majd enzimek segítségével katalizált reakciók során át ismét kovalensen kötődnek. Az a vélemény alakult ki, hogy a rekombinációban szerepet vivő legfontosabb enzimek ugyanazok, mint amelyek a sugárzás által károsított DNS kijavításában működnek közre. Ezt alátámasztja az is, hogy a „sötét" vagy a „világos hibakiküszöbölésre" egyaránt képtelen sejtek a rekombináció fentebb tárgyalt egyetlen formáját sem képesek megvalósítani. Az ilyen sejteket rec^--mutánsoknak nevezik. Összehasonlítva a rekombiná-

ció tárgyalt főbb típusait, megállapíthatjuk, hogy számos közös jellemvonásban azonosak. Minden esetben lényeges elem a recipiens genomjából egy szakasz kimetszése és helyébe a donor DNS egy szakaszának beépítése. Ez a reakció természetesen nem véletlenszerű, mivel a recipiens kimetszett genomja általában a beépített genomnak megfelelő alléleket képviseli. Ez arra utal, hogy a donor DNS-töredék a recipiens DNS azon régiója mellé „sorakozik fel", mely bázisszekvenciája szempontjából a legjobban hasonlít rá. Ez valójában az ún. homológ régió. Ezután a donor DNS-sel feltehetően hidrogénkötések jönnek létre, amelyek azt a szoros közelséget biztosítják, amely a továbbiakban ahhoz szükséges, hogy a donor DNS-fonal a recipiensébe beépülhessen.



183. ábra

Az F-genoták alakulásának lehetőségei. Bal oldalon a Hfr-kromoszóma látható, felső harmadában vastag vonallal kihúzva a vele integrálódott F-faktor-DNS van feltüntetve. Az A–F és U–Z betűk kromoszóma-*marker*eket jeleznek. *a)* A *crossing over* az F és a kromoszóma közötti párosodás eredeti régiójában megy végbe. Eredmény a normális F-faktor regenerálódása. *b)* A párosodás kivételes helyen megy végbe, ezt *crossing over* követi, mely olyan F-genotát eredményez, mely XYZ kromoszóma-*marker*eket visel. A kromoszóma maga ezeket a *marker*eket elvesztette, igaz viszont, az F-faktor DNS-éből egy szegment visszamaradt körkörös rendszerében. *c)* A párosodás egy másik, de ugyancsak kivételes régióban megy végbe. Ennek révén olyan F-genota jelenik meg, mely az F-faktor DNS-ét teljes egészében, továbbá korábbi csatlakozási helyének mindkét oldaláról származó kromoszomális géneket is tartalmaz

A konjugációval kapcsolatos genetikai transzfer kettős *crossing over* történés, melynek során a recipiens genom jelentős hányada donor DNS-sel cserélődik ki. Az F-faktor integrációját, mely az F^+-sejt Hfr-be alakulását eredményezi, egyszeri *„cross over"*-nek tartják, tekintve, hogy az F-részecske ugyancsak körkörös.

1.35.30. Colicinek

Az antimikrobiális anyagok termelése, melyek hatása a közelrokon fajok vagy a termelőével azonos faj más törzsei ellen irányul, szélesen elterjedt jelenség a mikroorganizmusok világában. Közöttük a legjobban tanulmányozott és plazmidokhoz kötött gének termékeiként szereplő ún. colicinek *Enterobacteriaceae* törzsek termékei, baktericid hatású proteinek (molekulasúlyuk 50 000–90 000-ig terjed), melyek a termelővel közelrokon szervezetekre hatnak. Az érzékeny sejtek külső membránján megfelelő receptorokhoz kötődnek, majd valamilyen módon a citoplazmamembránnal kerülnek kontaktusba. Több colicinről tudjuk, hogy a belső membrán normális működését teszi lehetetlenné. Ezzel szemben a „colicin E3-CA38" a riboszómákat károsítja, aminek feltehetően az az oka, hogy vagy teljes molekulája, vagy legalábbis annak egy része már át is hatolhat a membránon. A colicinek aktivitását gyakran hasonlítják össze más proteineknek, mint pl. a bakteriofágok talpi részének, a szexpilusoknak és az ún. kompetenciafaktoroknak a hatásával, melyek ugyancsak a sejtfallal, ill. a citoplazmamembránnal lépnek specifikus kölcsönhatásba. A colicin E3–CA38 receptorát már izolálni is sikerült: 60 000 molekulasúlyú glikoprotein, és valószínűleg a külső membránban helyezkedik el. Az El-K30 és K-235 colicinek energiadependens transzportfolyamatokat (pl. aminosavtranszport) kapcsolnak szét. Feltételezik, hogy a colicin El-el kezelt sejtekben a proteinszintézis gátlásáért a sejt aminosav-vesztesége lehet a felelős. Ennek során a membrán azért nem megy még tönkre: így a sejtből a β-galaktozidáz például nem szabadulhat ki, és a mikroba a foszfoenol-piruvát-foszfotranszferázrendszer segítségével az α-metil-glükozid akkumulációját még folytatni is képes. Eltérően azoktól a sejtektől, melyeket az elektrontranszport-foszforiláció klasszikus szétkapcsolóival kezeltek, a colicin El-el kezelt sejtek membránja a hidrogénionok számára nem válik sokkal átjárhatóbbá. Ezzel szemben a sejtet a káliumionok mégis elhagyják, és a magnézium-, továbbá a kobaltionok számára is sokkal permeabilisabbá válik. A colicin El-el kezelt sejtekben az ATP-szint is csökkent. Ez esetben a működő, membránkötődésű ATP-ázt tartalmazó sejtekben ez a csökkenés arra volt visszavezethető, hogy a sejt a káliumionoknak és

feltehetően más ionoknak is a koncentrációgradiensét, még ATP-fogyasztás terhére is, folyamatosan fenntartani igyekezett. Az ATP-szintnek ez a csökkenése azonban önmagában még nem tehető felelőssé a colicin El antibakteriális hatásáért.

A colicineket extrakromoszomális DNS-elemek határozzák meg. A *col*-gén integrálódhat ugyan a kromoszómába, azonban még nincs tudomásunk arról, hogy colicineket valódi kromoszomális gének is determinálnának. A sejtek lizátumaiban a Col-faktorok, sok más plazmidhoz hasonlóan, zárt cirkuláris molekulák alakjában fordulnak elő. A Col-faktorokat molekulasúlyuk alapján két jól elkülöníthető csoportba sorolhatjuk: **1.** A Col-faktorok egyes monomer alakjai (D-CA23, El-K30 stb.) $5x10^6$ molekulasúlyúak, mely elegendő DNS-t tartalmaz mintegy 10, átlag 30 000 molekulasúlyú protein kódolásához. **2.** A Col-faktorok más monomer alakjai (így a B-K77, az Ib-P9 stb.) legalább 10-szer nagyobb molekulasúlyúak (62×10^6–94×10^6 között). Ez már elegendő DNS akár 100 különböző, egyenként 30 000 molekulasúlyú fehérje kódolásához. E két csoport elkülönítése számos fiziológiai és genetikai tulajdonsággal tart korrelációt. Így konjugáció révén csak a nagyobb plazmidok önátvivők. A nagyobb molekulasúlyú Col-faktoroknak sejtenként csak néhány másolata van jelen, és e két csoport tagjai abban is különböznek egymástól, hogy fennmaradásukhoz a gazdasejt bizonyos funkcióira különböző mértékben vannak ráutalva.

1.35.31. A colicinek molekulacsaládjának rokonsági köre. A bakteriocinek

Már a colicinekkel kapcsolatos legkorábbi tanulmányok e vegyületek és a bakteriofágok közötti egyik leglényegesebb különbségként a colicineknél a fágszerű multiplikáció hiányát jelölték meg. Ugyanakkor azonban azt is igazolták, hogy bizonyos bakteriofágok és colicinek azonos receptorokhoz kapcsolódhatnak. Ismeretes, hogy a lizogén (profághordozó) baktériumokat UV-besugárzással indukálni lehet. A colicinogén törzseket is lehet colicintermelésre indukálni a DNS-szintézis inhibitoraival történő kezeléssel. Újabban párhuzamot találtak a Col-faktorok és a profágok szabályozó mechanizmusai között is.

Jelenleg a colicinek és a bakteriofágok relációjában valamennyi párhuzamos vonást az analógiák síkján kezelünk. Evolúciós rokonságukra vonatkozóan ugyanis nem rendelkezünk közvetlen bizonyítékokkal.

A termelővel közel rokon (gyakran csak fajazonos) mikroszervezetekre ható gátlóanyagok előfordulását a baktériumok számos más csoportjában, így GRAM-pozitívak körében is kutatták. A colicinszerű anyagokra (bakteriocinekre) visszavezethető hatások gyors felismerése nem

könnyű feladat, mert pl. agarlemezeken a kolóniák körül hasonló akciót nagyon különböző anyagok válthatnak ki. Így ammónia, hidrogén-peroxid, tejsav, foszfolipázok, hemolizinek, a lizosztafin litikus hatású enzim, defektív bakteriofágok, foszfolipidek és zsírsavak. Az ún. bakteriocinek eredeti definíciójának megfelelően ezek colicin típusú proteinek, melyek letális bioszintézissel, intraspecifikus aktivitással és specifikus receptorokhoz történő adszorpcióval jellemezhetőek. Ma már tudjuk, hogy az ilyen típusú antagonisztikus anyagok is szélesen elterjedtek. Igaz, sok esetben csak kevéssé pontosan leírt „bakteriocinekről" publikáltak, és feltehető, hogy különösen a GRAM-pozitív baktériumoknál leírt ilyen anyagok nem a klasszikus értelemben vett colicin típusú proteinek. A bakteriocinek kémiailag lehetnek egyszerű proteinek, de tartalmazhatnak emellett szénhidrátokat is. A specifikus receptorokhoz kötődve, valamilyen módon letális hatást fejtenek ki az érzékeny szervezetre. Antibiotikus hatóspektrumuk szigorúan törzsspecifikus. Jóllehet egyesek ezek között is a membránt károsítják, másokról azonban kimutatták, hogy az RNS- vagy a DNS-szintézist akadályozzák. A bakteriocintermelés képessége a „bakteriocinogén"-nek nevezett episzomális DNS-fragmentekkel kapcsolatos. Baktériumok, melyek ilyen episzómával rendelkeznek, nagyobb mennyiségű bakteriocint mindaddig nem termelnek, mígnem indukcióban, pl. UV-sugárzásban nem részesülnek. Ezután a produkció már olyan magas szintet érhet el, hogy maguk a termelő sejtek is tönkremennek és lizálnak. Az ilyen episzómák nehezen átvihetőek más sejtekbe, ill. ehhez már F-faktor jelenlétére is szükség van. Utóbbi a párosodás alkalmával a bakteriocinogént magával vontatja.

Bár a colicinek, ill. a bakteriocinek kémiájával, bioszintézisével és hatásmechanizmusával már sokan foglalkoztak és e téren jelentős mennyiségű információ áll rendelkezésünkre, mégis ezen anyagok biológiai rendeltetéséről csak keveset tudunk. Kérdés, hogy vajon a Col-faktor, ill. a *col*-gén, mely az előbbi egy szegmentje, milyen szelektív előnyökben részesítheti birtokosát és minek köszönhető, hogy ezek a faktorok az evolúció folyamán létrejöttek és fennmaradtak.

1.35.32. Plazmidnómenklatúra

Miután a plazmidok a mikroorganizmusok genetikája, evolúciója, ökológiája és taxonómiája kutatásainak középpontjába kerültek, szükségesnek látszik a plazmid terminológiájával, és néhány, itt gyakran szereplő genetikai fogalommal külön is foglalkozni. Csupán a fontosabbak rövid magyarázatára szorítkozunk. Megjegyzendő, hogy az itt közölt definí-

ciók nem minden esetben általánosan elfogadottak (lásd NOVICK és munkatársai, 1976, MOHAY, 1986 stb.).

1. Plazmid (extrakromoszomális genetikai elem): extrakromoszomális állapotban stabilan örökített replikon. A prokarioták természetesen előforduló plazmidjai általában nélkülözhetők.

2. Episzóma: replikációra képes genetikai elem, mely vagy a gazdasejt kromoszómájába integrálódott, vagy attól függetlenül a citoplazmában fordul elő.

3. Konjugációs plazmid: mely a konjugáció alkalmával a DNS-átvitelt kivitelezi. Például az *E. coli* F-plazmidja, Col IIb, V és a B jelzésű plazmidok, továbbá a GRAM-negatív baktériumok számos R-plazmidja. Mindazokat a természetesen előforduló plazmidokat, melyek a konjugációk során közvetítő szerepet játszanak, egyszerűen konjugációs plazmidoknak kellene megjelölni.

4. Nem konjugációs plazmid: mely DNS-transzfer kivitelezésére konjugáció révén nem képes.

5. Rejtett plazmid: melynek fenotípusos tulajdonságot nem tulajdonítunk.

6. F-plazmid: a „fertilitásfaktorok" prototípusa, mely az *E. coli* K-12-törzsében a konjugációért felelős. Lényegében a konjugációs plazmidok egy bizonyos típusa.

7. F′-plazmid: F-származék, melybe a bakteriális kromoszóma egy szegmentje épült be.

8. Hfr: e jelzés annak az állapotnak a megjelölésére szolgál, amikor a konjugációs plazmid a kromoszómába integrálódva fordul elő és így, megfelelő recipiensbe orientált kromoszómaátvitelt képes előidézni.

9. R-(rezisztencia) plazmid: mely antibiotikumokkal és/vagy más antibakteriális gyógyszerekkel szemben rezisztenssé tevő genetikai információt visel.

10. R-donor (rezisztenciadonor): az a baktériumtörzs, mely általában konjugáció útján, alkalmas recipiensnek rezisztenciagéneket ad át.

11. Col-plazmid: bármely plazmid, mely colicintermelés információját hordozza.

12. Bakteriális konjugáció: a baktériumok közötti, celluláris kontaktustól függő, genetikai kicserélődés folyamata, melynek során a genetikai anyag a donorból a recipiensbe kerül.

13. Mobilizáció: az a folyamat, amikor a DNS-transzfert egy ehhez stabilan és kovalensen nem kötődő konjugációs plazmid valósítja meg. Lehetséges, hogy az ilyen transzfer alkalmával közöttük átmeneti, ideiglenes kötések jönnek létre, de erre vonatkozóan ma még nincs sok adatunk.

14. Transzkonjugáns: az a baktériumsejt, mely konjugáció alkalmával

egy másik baktériumtól genetikai anyagot kapott. A transzkonjugánst csak akkor tekinthetjük rekombinánsnak, ha az átvitt genetikai anyag a recipiens sejtben egy előzően ott már jelen volt replikonba be is épült. Amennyiben az átvitt genetikai anyag a recipiensben plazmidként állandósul, úgy a sejtet plazmid transzkonjugánsnak nevezzük. Ha az átvitt anyag nem plazmid volt és nem épült be egy már meglevő replikonba, úgy nem replikálódik és az osztódások során kivész a sejtből. Ilyenkor abortív transzkonjugánsról beszélünk.

15. Transzfer gének: azok a gének, melyeket a konjugációs plazmid szállít és a donor fenotípusáért felelősek. Az ilyen gének megjelölésére a *tra* rövidítést ajánlják.

16. Szuperinfekciós gátlás: midőn egy, már a sejtben meglevő plazmid egy másik plazmid behatolását vagy állandósulását (szuperinfekcióját) akadályozza. A szuperinfekciós gátlás mechanizmusai közé tartozik a transzkripció vagy transzláció akadályozása, a DNS-restrikció, az inkompatibilitás és a „belépés kizárása".

17. Szegregáció: független, általában homológ, genetikai elemek szeparálódása a sejtosztódás folyamán. Két vagy három, általában nem homológ genetikai elem szegregációja ugyanabba az utódsejtbe az ún. „együttes szegregáció".

18. Plazmid-inkompatibilitás: eszerint két különböző plazmid ugyanabban a gazdasejtben tartósan nem fordulhat elő.

19. Konjugációs (vagy donor) pilusok: baktériumok konjugációspecifikus, hajszálszerű felületi képletei.

20. Fertilitásgátlás: midőn ugyanabban a sejtben két plazmid van jelen, az egyik megakadályozhatja a másik konjugációját vagy konjugációs pilusának szintézisét. A legtöbb fertilitásgátlás kiváltására képes plazmid saját konjugációs pilusának szintézisét is akadályozza.

21. Homogenitás: két genetikai elem egymás relációjában homogénnek tekinthető, ha ismert történések során át, egy közös genetikai elemtől származtathatók.

22. Heterogenitás: két genetikai elem heterogénnek tekinthető, ha közös leszármazásuk nem ismeretes.

23. Plazmidkiméra: lényegében egy rekombináns plazmid, mely két olyan szülői genetikai elemtől származik, melyek genetikai információcserére általában képtelen organizmusoktól nyerik eredetüket. Az ún. hibrid plazmidok *in vivo* vagy *in vitro* előállított plazmidok, általában genetikai információcserére képes szervezetekből származó DNS-t tartalmaznak. Az összetett vagy vegyes plazmidok *in vitro* előállított, stabil rekombináns plazmidok, melyek DNS-e genetikai információ kicserélésére általában nem képes szervezetekből származik. Az utóbbi idők fejlődő technikája tette lehetővé, hogy DNS-t baktériumokból szárma-

zó, restrikciós endonukleázokkal specifikus töredékekre szabdaljunk. Ezeknek a fragmenteknek két területen van jelentősége: **1.** Nagy, komplikált DNS-genomok fizikai térképezése. **2.** A „genetic engineering" metodikájában. Ez utóbbi esetben a kívánt gént tartalmazó fragmentet gyorsan replikálódó DNS-hez lehet kapcsolni. Ilyenek a baktériumok, vírusok és a plazmidok DNS-ei. Az új genetikai kombinációk baktériumkultúrákba építhetők be, ami lehetővé teszi előállításukat nagy mennyiségben. Az ilyen természetű kutatások a legnagyobb óvatosságot igénylik, minthogy számos veszély lehetőségét rejtik magukban. Így pl. különböző eredetű DNS-eket kombinálva olyan szervezeteket állíthatunk elő, melyek előre nem látható tulajdonságokkal rendelkeznek. Az a baktérium, melyet a „genetikai mérnöki" tevékenység során laboratóriumokban a leggyakrabban alkalmaznak, az *E. coli* egy törzse, mely normális körülmények között az emberi bélcsatornában is jelen van. Így fennáll a lehetőség, hogy ilyen *coli* törzs, mely egy toxintermelő baktériumból, gerinces rákkeltő vírusból vagy hormontermelő sejtből származó rekombináns DNS-t tartalmaz, megszökhet a laboratóriumból és elterjed az emberi populációban.

24. Transzlokációs szekvencia: általában állandó méretű genetikai elem, mely az egyik genetikai lokusztól a másikhoz épen transzlokálódik.

25. pBR322 plazmid. A genetikai manipulációkhoz egyik leggyakrabban használt plazmid, melynek szerkezetét a *184.a. ábrán* mutatjuk be (SUTCLIFFE, 1979, továbbá HIGGINS és munkatársai 1985 után). Ugyanezen az ábrán (*184.b.*) a vektorként ugyancsak gyakran alkalmazott λ-fágnak a baktérium-gazdasejt kromoszómájába való integrálódásának vázlatát is szemléltetjük.

26. Transzpozon. Mobilis, transzponabilis, egy vagy több gén hosszúságú DNS-szekvencia, melyet inverz repetitív szekvenciák határolnak (lásd 1.35.36. alfejezet; *187. ábra*).

27. Inverz repetitív szekvencia.Általában rövid nukleotidszekvencia, melyet ugyanazon a DNS-fonalon közvetlenül követhet fordított sorrendű megismétlése, mint pl. a palindrom(a) esetében (lásd 1.35.19. alfejezet), vagy közrefogva hosszabb-rövidebb DNS szakaszt.

28. Repetitív DNS. Egymást követően többszörösen megismétlődő DNS-szekvenciák.

29. IS. Általában korlátolt hosszúságú, transzponábilis DNS-szekvenciák (inszerciós szekvenciák), melyek a DNS molekulába egy vagy több helyen helyspecifikus rekombinációval integrálódhatnak.

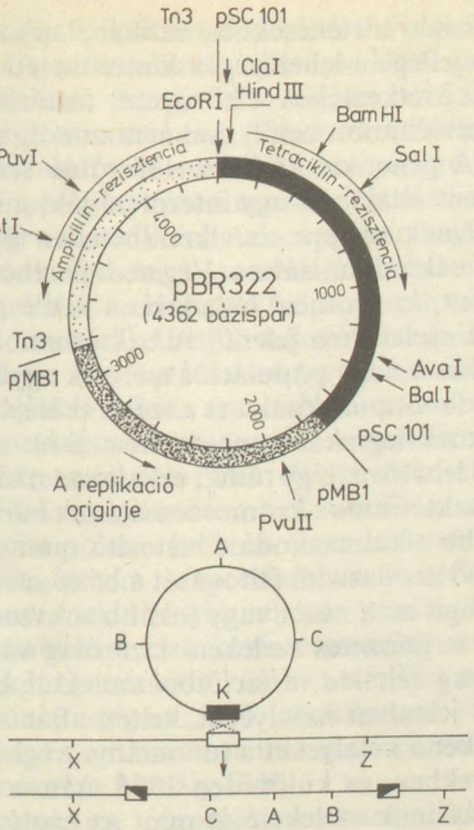
30. Génamplifikáció. A replikáció során egyes géneknek több, sokszor nagyszámú kópiája (másolata) is szintetizálódhat. Gyakran ez párhuzamos lehet a gén terméke iránti mennyiségi igénnyel.

Ahhoz, hogy az evolúció kibontakozhasson, a fehérjék permanens változékonysága mint szelekciós bázis elengedhetetlen. Ennek hátterében viszont a DNS változékonysága áll. A működésükben ma eltérő fehérjék információjának megjelenése sok esetben bizonyíthatóan is azonos gének divergenciájára vezethető vissza. E divergenciáért felelős lehet pontmutáció, továbbá csekélyebb mértékben DNS-beépülés, -kiesés, addíció és génfúzió is. Sokan azt tartják, hogy az evolúció számára a génekben bekövetkező véletlenszerű genetikai események alkotják a megváltozások legfőbb forrásait. Ennek ellenére azt a nézetet, miszerint az új működések fellépése a gének duplikációja alkalmával bekövetkező véletlenszerű mutációkra vezethető vissza, ma már egyesek mint a molekuláris evolúció korábbi „klasszikus" felfogását jelölik meg. A 70-es évek felfedezései ugyanis a DNS evolúciójának számos olyan vonását tárták fel, melyek a hasznos véletlenek szelekciójának kizárólagos szerepét kétségbe vonják.

A molekuláris genetikai kutatások legnagyobb részt *E. coli*-val és *E. coli*-fágokkal folynak. Sajnos a kapott eredményeket – nem ritkán – következetlenül extrapolálják magasabb rendű szervezetekre. Azt az állítást, hogy az evolúció új fehérjék fejlődése útján halad, már 1969-ben megkérdőjelezték, rámutatva, hogy alapvetően újszerű fenotípusok a már meglevő strukturális gének eltérő ellenőrzési körzetekbe rendeződésével is létrejöhetnek. Kimutatták pl., hogy a magasabb rendű állati szervezeteknél a mutációk akkumulációjának mértéke a strukturális génekben nem mutat párhuzamot az anatómiai evolúció mértékével. Ma úgy tűnik, hogy a szervezeti evolúció előrehaladhat a strukturális gének megváltozása nélkül, csupán a génszabályozás módozatainak átszerveződésével is.

A tipikus neodarwini evolúciós szemlélet feltételezi, hogy az evolúció mértékét és irányát a pozitív szelekciós kényszer határozza meg. Ezzel szemben mai ismereteink szerint az evolúció, legalábbis részben, a szelekció szempontjából neutrális mutációk véletlenszerű rögzülésének útján is haladhat. Ezt a nézetet a „szelekcionisták" erősen támadják (Goodman és munkatársai, 1975; Blundell és Wood, 1975). Bár ezt a vitát természetesen nem lehet lezárni, tény, hogy a „neutralisták" új hangsúlyt adtak a véletlenszerű történések evolúcióban játszott tradicionális szerepének.

A mikrobiológiában a jelenleg létező evolúciós elméletek a mutációk sztochasztikus jellegére alapítanak és ennek jogosultságát óriási kísérleti anyag látszik bizonyítani. Monod (1970) szerint a mutáció, természetéből adódóan véletlenszerű történés, és ez a lényegbevágó véletlenszerűség



184. ábra

a) A genetikai manipulációk során klónozáshoz gyakran alkalmazott pBR322 plazmid szerkezete. Ez lényegében a Tn3, pSC 101 és a pMB1 DNS-einek kombinációjából jött létre. A pMB1 a Col E1 plazmidnak közel rokona. A pBR322 összesen 4362 bázispárt tartalmaz és penicillin, továbbá tetraciklin rezisztenciára kódol (HIGGINS és munkatársai, 1985). A rezisztencia-gének R-plazmidokból eredtek és a pMB1-nek megjelölt kicsiny plazmidhoz kapcsolódtak. Az ampicillin-rezisztenciát β-laktamázra kódoló gén biztosítja. E gén az ábrán megadott irányban íródik át. Az ábrán a helyspecifikus hasítási helyeket nyilak tüntetik fel. A pBR322 az *E. coli*ban és más rokon baktériumokban replikálódik. A sejtekben több, így akár 40 példányban is jelen lehet. Ennek nagy jelentősége van, mert mennél nagyobb a kópiaszám, annál nagyobb lehet a hordozott gén termékének hozama. A pBR322 replikációja teljesen a gazdasejt enzimeitől függ. A pBR322 replikációs enzimekre nem kódol. A kloramfenikol gátolja az *E. coli* kromoszóma replikációját, de nem a pBR322-ét. Ha a sejteket ezen antibiotikummal kezelik, úgy a plazmid még tovább replikálódik és a tenyészetben az összes DNS-nek akár 50%-át is elérheti (SUTCLIFFE, 1979; HIGGINS és mukatársai, 1985).
b) A genetikai manipulációkban vektorként gyakran alkalmazzák az *E. coli* lambda fágját. E fág DNS-e a gazdasejt kromoszómájába integrálódhat. Ennek folyamata példa a helyspecifikus rekombinációra. Az ábra ezt szemlélteti. A lambda DNS cirkuláris molekula, a baktérium kromoszómája lineárisnak feltüntetve. Az A,B,C,X és Z a fág, ill. a baktérium DNS-én géneket jeleznek. A vírus kapcsolódási helye (fekete téglalap) és a baktérium kromoszómájának kapcsolódási helye (fehér téglalap) között egyszerű reciprok *cross over* megy végbe. Végül a kromoszómába integrált fággenom elhelyezkedése látható. A beépült fág DNS-t két végén hibrid tapadási helyek szegélyezik
(módosítva BOYD után, 1984)

a hátterül szolgáló fizikai történések statisztikai alapjait tükrözi. A mutációk stochasztikus jellege a lehetőségek kimeríthetetlen kincsesbányáját nyújtja, aminek következtében a környezet részéről történő kihívásokra (bizonyos intervallumon belül) csaknem mindig megfelelő genetikai válasz érkezik. A genetikai kódban előforduló szinonim kodonok védőrendszerét viszont általában úgy interpretálják, mint olyan biztonsági megoldást, melynek szerepe az elkerülhetetlen genetikai „hibák" fenotípusos kihatásának minimizálása. Végeredményben tehát a jelenleg uralkodó nézet szerint, az evolúció haladását a túlélési előnyökkel rendelkező genotípusok szelekciója jelenti. A baktériumoknál a rendkívül rövid generációs idő és a nagy populációs méretek együttesen látszanak biztosítani a mutáns fenotípusoknak azt a széles skáláját, mely a változó környezeti feltételeknek leginkább megfelelő alakok szelekcióját nagy valószínűséggel teszi lehetővé. Úgy tűnik, ezt a nézetet alapvetően igazolja az a tény, hogy a baktériumok kromoszómájának bármely lokuszában létrejöhetnek nagyobb alkalmazkodást biztosító mutációk.

Jóllehet az evolúció neodarwini felfogását a biológusok a legszélesebb körben elismerik, mégis az a nézet vagy inkább sokszorosan igazoltnak látszó tény, hogy a természetes szelekció kizárólag vagy elsősorban is csak a genetikai anyag véletlen variációiból szelektál, egyesekben mind a múltban, mind a jelenben kételyeket keltett. Bár sokak szerint az 1960-as években ezeket a kételyeket a tudomány „véglegesen elseperte", mégis az 1970-es években, és különösen 1975 után, a genetikai anyag véletlenszerű változásainak szelekcióját mint az evolúció legfontosabb mozgatórugóját illetően, újra súlyos aggályok merültek fel. Igaz, a neodarwini felfogás ma is uralkodó, azonban fennáll a lehetősége, mint az a tudomány történetében annyiszor előfordult, hogy e koncepció többkevesebb korrekciójára lesz majd szükség ahhoz, hogy az evolúciós szabályozás materiális alapjairól a tényleges, a valóságos folyamatoknak hűebben megfelelő képet alkothassunk. A következőkben röviden e kételyekkel és néhány újabban felvetett evolúciós nézőponttal foglalkozunk.

1.35.34. Az entrópiás és modulált mutációk evolúciós szerepe

A problémák már az ún. spontán mutációkkal kezdődnek. Mint ismeretes, információátvitel egyetlen rendszerben sem történik 100%-os hatékonysággal, vagyis „zaj" nélkül. Így a polinukleotidok replikációja során is mindig keletkezik bizonyos mérvű genetikai „zaj". Ezt a zajt a termodinamika második törvénye biokémiai megnyilvánulásának tekinthetjük. A genetikai zajt a spontán pontmutációkkal lehetne azonosítani. Közismert, hogy a genetikai zaj valóságos szintje sokkal alacsonyabb,

mint ahogy az tisztán fizikokémiai alapokon nyugvó kalkulációk szerint elvárható lenne. A polimerázok nyilvánvalóan igen nagy mértékben csökkentik a zajszintet. A zajt lehet ugyan minimalizálni, de teljesen megszüntetni nem (SHANNON-elv). REANNEY (1976) szerint a minimális genetikai zaj az ún. entrópiás mutációkban nyilvánul meg, melyek lényegében előre nem várhatóan következnek be, és eredetük az alapul szolgáló fizikokémiai történések bizonytalanságában rejlik. Ezzel szemben a mutációk egy másik típusát, a „modulált" (alkalmazott, szabályozott) mutációkat, melyeknek szerinte sokkal nagyobb evolúciós jelentőséget tulajdoníthatunk, nem tekinthetjük teljesen entrópiásnak. Az *E. coli*ban pl. a mutátor és az antimutátor lokuszok növelik, ill. csökkentik a mutációs rátát. Az első növeli a variabilitást és kiszélesíti a szelekciós bázist, az utóbbi ezeket csökkenti, ami a minimális variabilitást igénylő, nagyon stabil környezetekben tűnik előnyösnek. Az *E. coli* kromoszómájában a mutT-lokusz különösen A:T→G:C transzverziókat idéz elő, mikor is a mutagén polimerázok és a társult enzimek a mutációknak nemcsak a rátáját, hanem a specificitását is befolyásolják. Az ilyen mutációkat már nem tekinthetjük teljesen véletlenszerűeknek. Tény viszont, hogy a variabilitást csak kevéssé szelektív módon fokozzák.

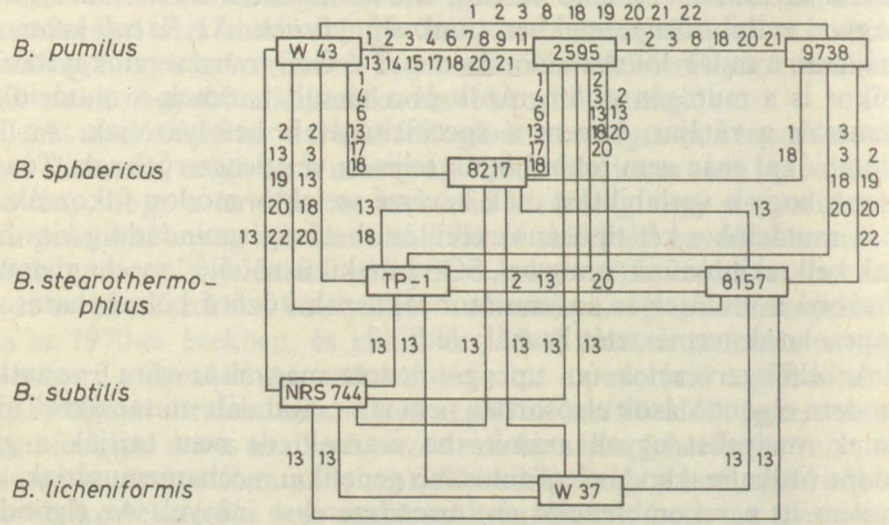
A mutációk e két típusának elkülöníthetőségét mindaddig vitathatónak kell tekintenünk, amíg az „SOS hibakiküszöbölő" mechanizmusok, továbbá a mutátor és antimutátor lokuszok közötti kölcsönhatások és kapcsolatok természetét homály fedi.

Az élő szervezetek ún. „programozott megváltozására" vonatkozó modern elgondolások elsősorban nem is a „modulált mutációkra" alapítanak, melyeket ugyan számításba vesznek, de nem tartják a gyors adaptív alkalmazkodás legfontosabb genetikai mechanizmusának. A figyelem itt a rekombinációs enzimrendszerekre irányul. Az elgondolás szerint, az evolúció során az új genotípusok fellépéséhez, kialakításához vezető magasabb szintű és a teljes genomkomplex ellenőrzése alatt álló genetikai transzformációs folyamatok már sok százmillió évvel ezelőtt háttérbe szorították az entrópiás és modulált mutációkat mint az evolúció számára felhasználható, kiszelektálható változatok kizárólagos, elsődleges forrásait.

1.35.35. Extrakromoszomális DNS-elemek jelentősége a mikrobák evolúciójában

Az extrakromoszomális DNS-elemek (transzfer faktorok, fágok, beépülésre képes DNS-szekvenciák stb., melyeket az irodalomban mint plazmidot, exogenotát, episzómát, ugráló gént stb. tartanak nyilván) nagy

száma és gyakorisága már korán azt a véleményt alakította ki, hogy ezek rendkívül hatékonyan hozzájárulhatnak az evolúció meggyorsításához. Ami a gyakoriságukat illeti, kimutatták például, hogy a természetben előforduló *Enterobacteriaceae* törzsek 50%-a tartalmaz extrakromoszomális replikonokat. A rendkívül plasztikus, nagy anyagcsere-flexibilitású *Pseudomonas* genuszban a lizogén törzsek gyakoriságát 100%-ra becsülik. Az extrakromoszomális DNS-ek száma és fajtája is rendkívül nagy és állandóan új génkombinációkban léphetnek fel. Az *E. coli*nál a nyilvántartott plazmidok listáján már több mint 270 szerepel. Ezenkívül a „coliform" szervezeteknél több mint 30 különböző profágot is demonstráltak. Konjugációs plazmidokat *Bacillus*oknál még nem mutattak ki. Ezzel szemben plazmidszerű cirkuláris DNS-ek előfordulását már szá-



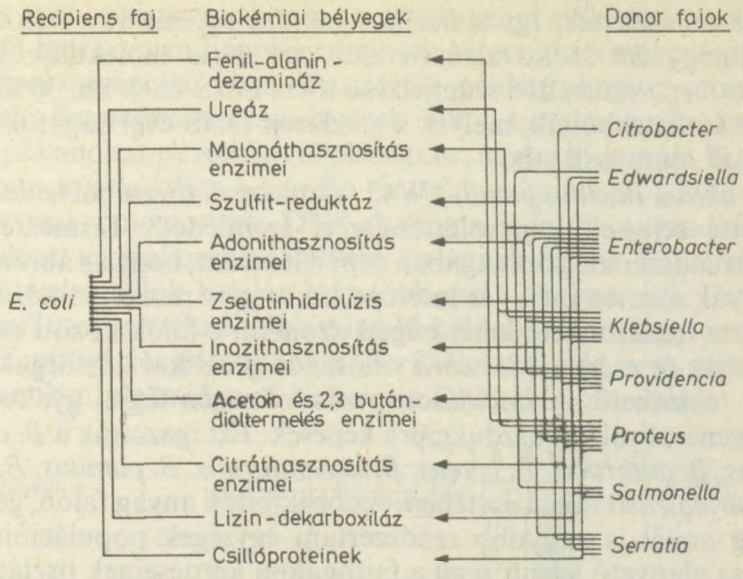
185. ábra

A *Bacillus pumilus*ból izolált fágok révén sejtről sejtre haladó DNS-csere útjait ábrázoló genetikai „körforgalom"-diagram. Minden szám egy meghatározott fágot jelent. A bekeretezett, vastagabban nyomtatott számok a bal oldalon olvasható *Bacillus* fajok vizsgált törzseinek jelzései. A vízszintes vonalakon megfigyelhető számok az azonos fajok törzsei közötti DNS-cserét lebonyolító fágokra utalnak. A függőleges vonalak a fajok között lehetséges transzfert szemléltetik. E diagram a kérdéses fágok által kiváltható, lízist előidéző fertőzés potenciális lehetőségeit szemlélteti. Egyes fágok, bár képesek a gazdasejten adszorbeálódni és abba DNS-üket injiciálni, azonban a lítikus ciklust elindítani már nem. E vizsgálatok során olyan fágot, mely a gazdasejteket 100%-os hatékonysággal lizogenizálta volna, nem találtak. Ezenkívül a felsorolt fajokban defektív temperált fág génjei is jelen vannak. Ezt a fágot azonban transzdukcióra képtelennek találták. Az ábrán megadott utakon a transzdukáló fágok sejtről sejtre haladva fejrészeikben potenciálisan mind kromoszomális, mind plazmid DNS-t közvetíthetnek. A DNS sorsa, ha már a sejten belül van, egyrészt a donor és a recipiens sejt közötti nukleotidhomológia fokától függ, másrészt számos más egyéb tényezőtől, így pl. a restrikciós–modifikációs rendszerek specifitásától stb. A *Bacillus* genuszon belül fajok közötti transzformáció ugyancsak lehetséges. Így transzformáció révén a *B. natto, B. niger, B. globigii* és a *B. licheniformis* genetikai markerei stabilan beépülhetnek például a *B. subtilis* genomjába (Reanney, 1976)

mos fajuknál észlelték. Így a *Bacillus pumilus* egyes törzseiben a totális DNS mintegy 2%-át kovalensen zárt cirkuláris molekulák képezik. A *Bacillus megaterium* 216 számjelzésű törzs DNS-ének kb. 30%-a minicirkuláris képletekből áll, melyek a gazdasejt DNS-ével nagyfokú bázishomológiát mutatnak stb.

A *185. ábra* a *Bacillus pumilus* W43 számjelzésű törzséből izolált fágok közvetítette sejt–sejt kapcsolatrendszert szemlélteti. Természetesen e kapcsolatrendszer még önmagában nem jelenti azt, hogy az ábrán feltüntetett pályák mentén intra- és interspecifikus génáram is halad. A fágok közvetítette transzdukció lehetőségeit azonban e fajok között már adatok igazolják és ezért a *185. ábra* valóságos genetikai körforgalom-diagramnak tekinthető. A *Bacillus*ok pszeudolizogén fágjai gyakoriak, és gyakran generalizált transzdukcióra képesek. Ezt igazolták a *B. amyloliquefaciens, B. anthracis, B. cereus, B. licheniformis, B. pumilus, B. subtilis* és a *B. thuringiensis* fágjai esetében. Az öröklődési anyag fajon, genuszon vagy még annál is nagyobb rendszertani egységek populációin belüli körforgása alapvető jelentőségű a fajfogalom kérdéseinek tisztázásánál. Egyre többen fogadják el azt a nézetet, miszerint a természetben a fajok genetikailag, a környezetükben előforduló más fajok genomjától nem izoláltan fejlődnek. A „taxospecies" és a „genospecies" megjelölések már erre utalnak. Az első a konvencionális rendszertani értelemben vett faj, a második azoknak a szervezeteknek az összessége, melyek egymás között öröklődési anyaguk kicserélésére képesek. Feltételezik pl., hogy a *Bacillus* genusz csupán egyetlen genospecieszt alkot.

A *186. ábra* a genetikai körforgalom lehetőségeit szemlélteti a „coliform" szervezetek és más bélbaktériumok körében. Az *E. coli*ba pl. legalább 356 „különböző" extrakromoszomális elemmel lehet polinukleotidot betáplálni. Az ezek molekulasúlyára és hosszára vonatkozóan közölt adatokból arra lehet következtetni, hogy annak az extrakromoszomális elemekkel társuló DNS-nek a mennyisége, amely egy „coliform" sejtbe beléphet, elérheti, sőt meghaladhatja a sejt saját genomjának DNS-tartalmát. Ezek az extrakromoszomális elemek nagyon különböző géneket hordozhatnak. Így, minthogy a konjugatív plazmidok és bizonyos transzdukáló fágok a gazdaszervezetek igen széles skáláját ölelik fel, vagyis kevéssé specifikusak, ezek révén pl. az *E. coli* kromoszómájában fizikailag eredetileg hiányzó, specializált biokémiai tulajdonságokat kódoló gének jelenhetnek meg, melyek a továbbiakban szelekciós előnyöket biztosítanak. Ilyen tulajdonságok a *186. ábrán* bemutatásra került ureáz, lizin-dekarboxiláz, fenil-alanin-dezamináz, szulfit-reduktáz stb., melyek génjei a „nem coliform" bélbaktériumok kromoszómáiból különböző extrakromoszomális elemekkel az *E. coli*ba juthatnak. Mindezekből azt az általános megállapítást szűrhetjük le, hogy egy olyan



186. ábra

Különböző proteineket kódoló gének, melyek eredendően a legtöbb *E. coli* törzs kromoszómájából hiányoznak, vírusok és plazmidok segítségével „tartalékfajokból" a „coliform"-szervezetek sejtjeibe kerülhetnek (REANNEY, 1976)

ökoszisztémában, ahol a mikrobióta tagjainak kapcsolata elegendően nagyszámú extrakromoszomális elemmel van biztosítva, a természetes szelekció genetikai bázisa az egyes sejtek, klónok, törzsek, ill. fajok viszonylatában sokkal szélesebb, mint a laboratóriumi táptalajokon tenyésztett baktériumpopulációk monoklónjaiban. Ebből logikusan következik, hogy az eddig „egyszerűnek" vagy „primitívnek" tekintett baktériumsejt a valóságban, a különböző mikrokörnyezetek változó viszonyaira elegáns adaptív mechanizmussal reagálni képes organizáció. A baktériumok közötti szelekció az extrakromoszomális DNS-elemek révén minimális anyagcsereköltséggel, a diszperzált genetikai variáció igen magas fokát tarthatja fenn. Ezzel egyidejűleg viszont az egyes sejtgenofórok méretét olyan lehetséges minimumra csökkenti, mely még maximálisan biztosítja a reprodukció gyors rátája nyújtotta előnyök kihasználását.

A fágok közvetítette transzdukció jelentőségét az adaptáció folyamatában sokan hangsúlyozzák. Minthogy ilyenkor, így például az *E. coli*nál lényegében egy DNS-frakció cserél sejtgazdát, azt lehet mondani, hogy az *E. coli* faj totális genomja ökológiailag az utódfágok populációjában van diszpergálva. A feltevések szerint valamennyi prokariota faj genomját két alternatív állapotban képzelhetjük el. A legáltalánosabb állapot,

amikor a gének a kromoszóma DNS-én folyamatos szekvenciákat alkotnak. Alternatív állapotban e géneket a mikrobióta közös környezetben élő tagjai között extrakromoszomális DNS-ek, „rezervoir" fajokban tartják fenn. Ily módon a stabilitás és a flexibilitás között egyensúlyi állapot jön létre, mely maximálisra növeli az ökoszisztémának mint egésznek a túlélési kapacitását (REANNEY, 1976).

A sejtek túlélését egy adott környezetben gyakran az a sajátos egyensúlyi állapot szabja meg, amely a genofor mérete megszabta „genetikai teher" és a szervezet osztódási sebessége között fennáll. Ahhoz, hogy a sejt meghatározott környezeti feltételek között helyét megállhassa, DNS-ének elegendő, őt a szükséges nélkülözhetetlen biokémiai képességekkel felruházó gént kell tartalmaznia. Ugyanakkor a konkurrens szervezetek leküzdéséhez a gyors szaporodási képesség is nélkülözhetetlen. Ennek következtében a genom mérete a túlélést gyakran és közvetlenül befolyásolja, mégpedig az osztódási sebesség mértékének meghatározásával. A genom mérete a környezeti viszonyok változását a szükségleteknek megfelelően, extrakromoszomális DNS-ek segítségével rugalmasan követheti. A sejt lizogenizációja fággal, egyetlen genetikai történés keretében 2%-kal is növelheti a genom méretét. Ezzel szemben transzfer faktorok leadása csökkenti a DNS-tartalmat. Mivel a „coliform" szervezetek DNS-ének akár 30%-a is profág eredetű lehet és a baktérium-DNS 20%-a plazmidok formájában lehet jelen, a genomméretek változtatásának igen nagy lehetőségei vannak.

1.35.36. A „genetic engineering" fogalmának tágabb értelmezése

A *„genetic engineering"* szakkifejezést általában csak azokra a laboratóriumi manipulációkra alkalmazzák, melyek során restrikciós és összekötő enzimek révén a különböző forrásokból származó DNS-eket új kombinációkká egyesítik. Újabban ezt a fogalmat egyesek már sokkal szélesebb értelemben, a polinukleotid kicserélődések természetes, sejten belüli és sejtek közötti folyamataira vonatkoztatva is használják. Eszerint a „genetic engineering" valamennyi genetikai rekombinációt magába foglalja. Így REANNEY (1976) szerint magát az eukarioták szexuális rekombinációját is az evolúció során létrejött egyik legsikeresebb „genetikai mérnöki" manipulációnak kell tekintenünk.

Feltételezhetően az élet valamennyi formája rendelkezik olyan enzimekkel, melyek a polinukleotid-csere specifikus folyamatát közvetíteni képesek, és valamennyi természetes DNS-en találhatók stabil, elsősorban is a kicserélődéssel kapcsolatos, azt lehetővé tevő helyek, jóllehet a DNS-replikáció hibajavító és rekombinációs folyamatai során kicserélő-

dések „nem megfelelő helyeken" ugyancsak előfordulnak. Minden ismert replikon tartalmaz és használ specifikus rekombinációs mechanizmusokat. E folyamatba bevont molekulák denaturációs proteinek, szekvenciaspecifikus endo- és exonukleázok, javító enzimek, mint pl. a polimeráz I, továbbá összekötő enzimek.

A restrikciós endonukleolitikus metszések specificitása szigorú. A DNS-kicserélődés számos folyamata abban az értelemben méretezett, hogy csak bizonyos specifikus pontok közötti egységek átvitele lehetséges. A DNS-kettősfonal metszésének célpontjául szolgáló szimmetriaelemek (palindromok) általánosan elterjedtek mind a prokariotáknál, mind az eukarioták kromoszómájában is. A természetes szelekció a palindromok közötti szekvenciák kicserélődésének lehetőségeit maximálisra növeli, mégpedig oly módon, hogy a DNS-kicserélődés folyamatában a gének és operonok funkcionális integritása megmaradjon. Nem kis fontosságú tény, hogy kimutattak olyan DNS-szekvenciákat is, melyek rekombinációk létrejöttét a rekombinálódó fonalak bázisszekvencia-homológiája nélkül is lehetővé teszik. A legjobban tanulmányozott ilyen típusú szekvenciák az ún. IS-osztályba tartoznak. Bázispárokban mérve ezek hossza igen eltérő: IS1, 750; IS2, 1300; IS3, 1300 stb. Az IS-elemek a kromoszómába különböző pozíciókban és orientációban épülhetnek be. Jelenleg úgy tűnik, hogy az IS-elemek alapvető szerepet játszanak az adaptáció folyamatában. Ha egymással kölcsönhatásba lépő polinukleotidokba IS-szekvenciák épülnek be, úgy segítségükkel rekombináció már olyan DNS-molekulák között is létrejöhet, melyekben teljesen hiányzik a felépítésükben rejlő homológia. Ilyen tekintetben az IS-elemeket „átvihető rekombinációs célpontoknak" lehetne megnevezni. Jelenlétük valamennyi baktériumban kimutatható; az egyik kromoszomális lokusztól a másikhoz, továbbá sejtről sejtre is átvihetőek.

Az IS-típusú DNS-elemek az adaptív folyamatokba rendkívüli mértékű hajlékonyságot, flexibilitást visznek be. Ezt a bélbaktériumok már többször említett gyógyszer-rezisztenciájával példázhatjuk.

A legtöbb R-faktor jellemző genetikai vonása, hogy bennük olyan gének vannak jelen, melyek antibiotikumokat inaktiváló proteineket kódolnak. Az ilyen gének eredetét egybehangzóan még nem állapították meg, azonban adataink alapján úgy tűnik, hogy bizonyos aktinomiceta fajok antibiotikum-módosító enzimei igen hasonlóak a plazmidok által közvetített gyógyszer-rezisztenciáért felelős proteinekhez. Az ilyen enzimek birtoklása kétségtelenül sok talajlakó mikroba számára szelektív előnyt biztosít. Olyan plazmidokat, melyek mind bélbaktériumokat, mind sugárgombákat egyaránt fertőznek, laboratóriumban már előállítottak, és feltehető, hogy ilyenek a természetben rendszertanilag távol álló csoportok között összeköttetést létesíthetnek. Amennyiben a rezisz-

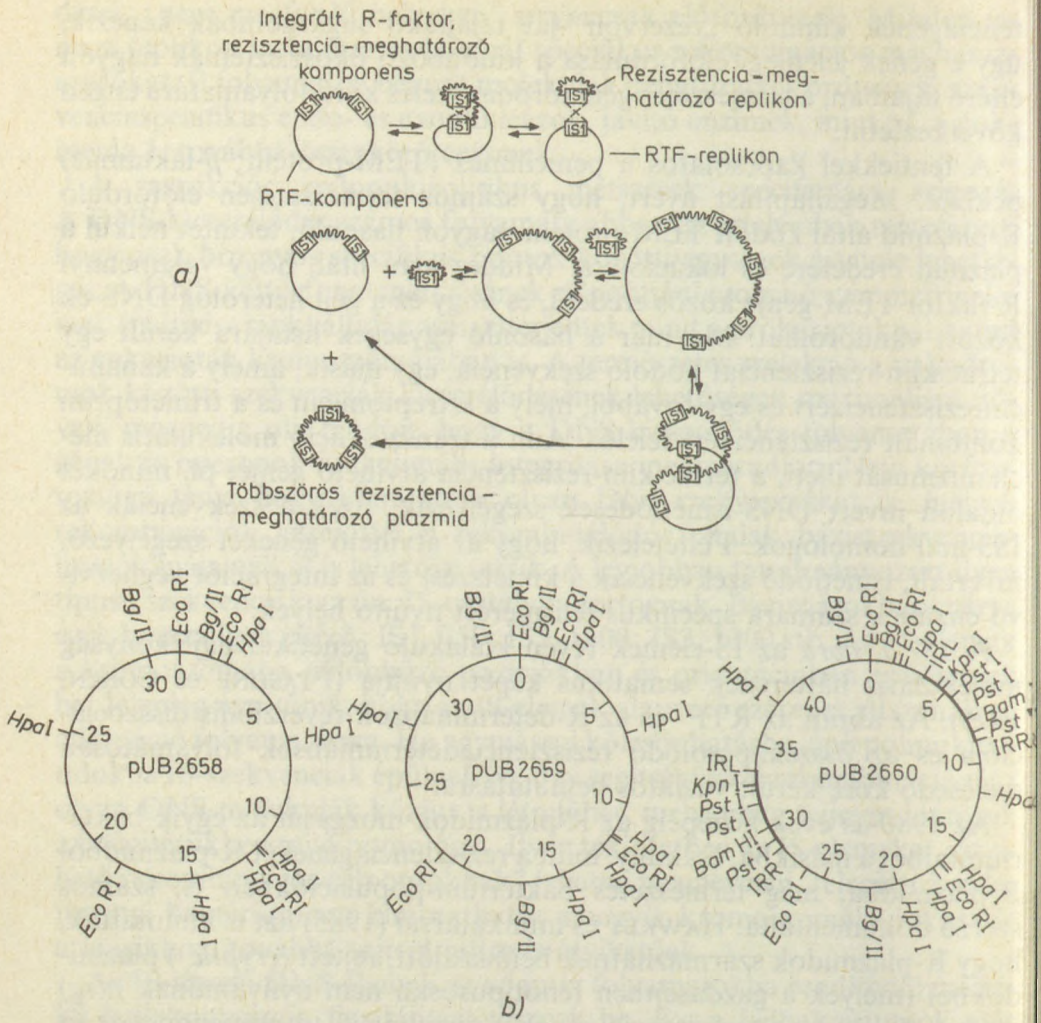
tenciagének kiinduló „rezervoir"-ját talajlakó sugárgombák képezik, úgy e gének jelenlegi előfordulása a különböző ökoszisztémák nagyon eltérő fajaiban, a természetes génszóródás széles körű folyamatára enged következtetni.

A fentiekkel kapcsolatos a penicillináz (TEM-protein; β-laktamáz) példája. Megállapítást nyert, hogy számos természetesen előforduló R-plazmid által kódolt TEM-protein nagyon hasonló, tekintet nélkül a plazmid eredetére és lokációjára. Mindez arra utal, hogy valamennyi R-faktor TEM-génje közös eredetű, és hogy ez a gén heterológ DNS-ek között vándorolhat. Ma már a hasonló egységek listájára került egy tetraciklin-rezisztenciát kódoló szekvencia, egy másik, amely a kanamicinrezisztenciáért és egy további, mely a sztreptomicin és a trimetoprim kombinált rezisztenciáért felelős. Ami a transzlokáció molekuláris mechanizmusát illeti, a tetraciklin-rezisztencia átvihető génjét pl. mindkét oldalon invert DNS-ismétlődések szegélyezik. Ezek a szekvenciák az IS3-mal homológok. Feltételezik, hogy az átvihető géneket szegélyező, invertált, ismétlődő szekvenciák a kimetszést és az integrációt véghezvivő enzimek számára specifikus felismerést nyújtó helyek.

A *187.a. ábra* az IS-elemek révén kialakuló genetikai hajlékonyság molekuláris hátterének sematikus képét nyújtja (PTASHNE és COHEN, 1975). Az ábrán az RTF- és az R-determinánsok reverzíbilis disszociációja és az összekapcsolódó rezisztenciadeterminánsok folyamatosan szélesedő köre került vázlatos bemutatásra.

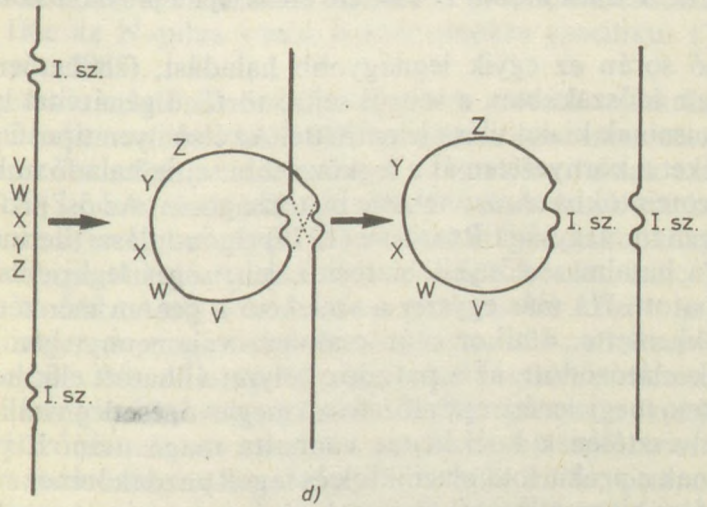
Az 1980-as évek közepéig az R-plazmidok mozgását az egyik baktériumfajból a másikba, csakúgy, mint a rezisztenciagénekét R-plazmidból R-plazmidba, még természetes baktérium-populációkban is, számos szerző dokumentálta. HAWKEY és munkatársai (1985) azt is kimutatták, hogy R-plazmidok származhatnak bennszülött, rejtett (*cryptic-*) plazmidokból (melyek a gazdasejtben fenotípusosan nem nyilvánulnak meg) azáltal, hogy drog-rezisztencia géneket tartalmazó transzpozonokat (a transzpozon egy vagy több gént hordozó mobilis DNS-szakasz, melyet inverz repetitív szekvenciák határolnak) fogadnak. A meghatározott gazdához adaptált plazmidok ilyenfajta gyarapodása a gazda számára hasznos génekkel dinamikus és szakadatlan folyamatnak tekinthető, mely végül is a hasznos gének széles körű szóródását eredményezi.

Providencia stuartii izolátumokban karbenicillinnel szembeni rezisztencia kialakulását észlelték. Ezt a rezisztenciát egy 47 kb plazmid (pUB2660; *187.b. ábra*) közvetítette, mely a *P. stuartii* egy plazmidmentes törzsébe konjugációval került. A karbenicillin szenzitíveknek vagy egyáltalán nem volt plazmidja, vagy egy rejtett 30 kb plazmidot tartalmaztak. E plazmid restrikciós endonukleáz térképezése igazolta, hogy szoros rokona a *P. stuartii*ból már korábban kimutatott 32 és 34 kb


Integrált R-faktor, rezisztencia-meghatározó komponens
Rezisztencia-meghatározó replikon
RTF-komponens
RTF-replikon
a)
Többszörös rezisztencia-meghatározó plazmid
pUB2658
pUB2659
pUB2660
b)
Transzpozon
GGACCT
AGGTCC
CCTGGA
TCCAGG
Inv. szekv.
Rezisztenciagének
Inv. szekv.
c)

rejtett plazmidoknak (pUB2658 és pUB2659). Az R-plazmid térképezése pedig arra utalt, hogy a 34 kb rejtett plazmidból két Tnl-t hordozó transzpozonnal kiegészülve jöhetett létre. A *187.c.* és *d. ábra* a transzpozon idealizált szerkezetét és kiválásának vázlatát mutatja be.

Eszerint a legutóbbi években a kromoszóma funkcionális organizációjának új perspektívái bontakoztak ki előttünk. A DNS szekvenciális organizációjának bizonyos fokú átszervezését lehetővé tevő szimmetrikus szekvenciák és a restrikciós enzimek célhelyei, mint záró és nyitó pontok, a kromoszómák közönségesen előforduló, integráns elemeinek bizonyultak. A rendkívül szétszórt IS-elemek jellegzetesen invert vagy egymás utáni (tandem) DNS-ismétléseket tartalmaznak. Ezek a szekvenciák az evolúció során a szelekció révén jelentek meg és a rekombináció számára előnyben részesített helyeket nyújtanak. A genom ilyen értelmű



◄ *187. ábra*

a) IS-elemek segítségével megvalósuló genetikai változások. Az ábra a komplex plazmidképzés és a rezisztencia-determinánsok kibővítése egy lehetséges mechanizmusát mutatja be (PTASHNE és COHEN 1975). *b)* A pUB2658 (rejtett-), pUB2659 (rejtett-) és a pUB2660 (karbenicillin-rezisztenciát hordozó-) plazmidok restrikciós endonukleáz térképei HAWKEY és munkatársai (1985) után. A koordináták kb-ben adva. A pUB2660 plazmidon, mely két Tnl régiót hordoz, a 30 és az 5 koordináták körül vastagon kihúzott szekvenciák a Tnl (DNS szakasz, mely a β-laktamáz gént tartalmazza) pozícióit mutatják be. IRR = inverz repetitív szekvencia jobbra; IRL = inverz repetitív szekvencia balra. *c)* A transzpozon feltételezett szerkezete. Géneket, melyek pl. antibiotikumokkal vagy mérgekkel szemben rezisztenciát biztosíthatnak, mindkét oldalukon inverz repetitív szekvenciák határolhatnak. Ez számukra nagyfokú mobilitást biztosít, minthogy a baktérium genomjából cirkuláris fragmentek alakjában kiválhatnak. *d)* A transzpozon kiválásának vázlatos ábrázolása. Balról jobbra: a baktérium kromoszómájában a V,W,X,Y és Z gének együttesét mindkét oldalon inverz szekvenciák szegélyezik. Az utóbbiak között *cross over* történés megy végbe, ami V,W,X,Y és Z gének nélküli baktérium genomot és egy abból kivált és e géneket hordozó különálló cirkuláris szekvenciát eredményez

szabályozottsága lényegében a működő DNS-blokkok gyors kicserélődését teszi lehetővé. Ez a csere végbemehet egy sejten belül, vagy ha hatékony sejtek közötti géntranszfer lehetséges, úgy sejtek között is.

Az egymást követő szekvenciaduplikációk megkönnyítik a rekombinációs történéseket. Az ilyen duplikáció destabilizálja a genetikai organizációt, mivel ez a DNS-t a rekombinációra hajlamossá teszi. A tandem ismétlődések REANNEY (1976) szerint sem a prokariotáknál, sem a magasabb rendű szervezeteknél nem tekinthetők stabilaknak. A duplikációkban bizonyos tendencia rejlik az ismétlődő, homológ régiók közötti reciprok *„cross over"* révén, cirkuláris mini DNS-ek kialakítására is. Vagyis ez azt jelenti, hogy az ismétlődő DNS kedvez az extrakromoszomális DNS-ek létrejöttének.

1.35.37. A sejtek közötti DNS-csere evolúciója a prokariotáknál

Az evolúció során az egyik legnagyobb haladást, feltehetően még a prekambrium időszakában, a sejtről sejtre történő génátvitel hatékony mechanizmusainak kialakulása jelenthette. Az első ilyen típusú polinukleotid-cseréket a környezeten át a legközelebbi sejtig haladó nukleinsavegységek proteintokba zárása tehette biztonságossá. Az ősi prokarioták vonalán a genom nagysága REANNEY (1976) elgondolásai szerint a gyors reprodukció hatalmas előnyeit biztosító, lehetséges legkisebb méretre redukálódhatott. Ha már egyszer a szelekció a genom méretét addig a pontig csökkentette, amikor már csaknem valamennyi gén egyetlen példányra korlátozódott, az a paradox helyzet állhatott elő, hogy minden új funkció megjelenése egy előzetesen meglevő, esetleg vitális fontosságú gén elvesztésének kockázatát vonhatta maga után. E probléma megoldásának a prokariota plazmidok és fágok gazdakörének rendkívüli kiszélesedése bizonyulhatott, melynek révén a természetes mikrobanépességek egyes komponenspopulációi az egész ökoszisztéma adaptív genetikai kísérletezésének részeseivé váltak. Ily módon a sejtek és az extrakromoszomális DNS-ek dinamikus partneri viszonya a genetikai újdonságok létrejöttének sokkal nagyobb lehetőségét biztosította, mint a tisztán entrópiás és modulált mutációk. A prokariotáknál az extrakromoszomális DNS-elemek széles spektruma alakult ki. Ezek között két „osztály" elemei különösen sikeresnek bizonyult. Az első a bakteriofág típusú részecskék, melyek fejrésze DNS-t tartalmazott, míg a farkrésze a hatékony sejtadszorpciót és -penetrációt tette lehetővé. Az egykori prokarioták csaknem valamennyi típusának genomja tartalmazhatott ilyen, részecskék konstrukcióját kódoló géneket. A második „osztály" elemei a sejt–sejt párosodással kapcsolatban jöttek létre. Természetesen

ezek a megoldások nem külön, hanem az evolúció során együttesen jelentek meg és hathattak.

Ebből a szempontból értékelhetjük a pCU1-jelzésű konjugációs plazmiddal (IncN inkompatibilitási csoport) végzett vizsgálatok eredményeit is. Az e csoportba tartozó plazmidoknak a GRAM-negatív baktériumok között széles gazdaköre van. Átvitelük nagy gyakorisággal mehet végbe az *Escherichia coli*ból. Feltételezik, hogy a pCU1 konjugatív transzfer rendszerének szélesebb lehet a gazdaköre, mint magának a teljes plazmidnak. E plazmidcsoport génjei rövid, merev, N-pilusnak nevezett sejtfelületi struktúrákat determinálnak. Korrelációt lehetett kimutatni e pilusok jelentléte és az ezeket hordozó sejtek konjugációs készsége között. Azok az *E. coli* K–12-törzsek, melyek N–pilusokkal rendelkeznek az N–pilus specifikus bakteriofágok két csoportjával szemben érzékenyek: **1.** a fonalas IKe bakteriofágokkal és **2.** a PRD1 ikozahedrális fágokkal szemben. Ezek minden esetben az N–pilusok csúcsához tapadnak. Az IKe az N–pilus viselő baktériumokra specifikus (THATTE és munkatársai, 1985).

A filogenezis másik fő vonalát nagyobb méretű sejtek képviselték, melyek különben az ismétlődő DNS-elemeket rendszeresen megtartották. Ezek az ősi eukariota szervezetek is tartalmazhattak extrakromoszomális DNS-t és ezek sejtről sejtre történő átvitelének mechanizmusait. Midőn az ilyen típusú sejtek „társulásokat" alkottak, akkor a metazoa-evolúció genetikai anyagát már a sejtek közötti kölcsönhatások formálták tovább. Amíg a szelekció a prokarioták között az extrakromoszomális elemek sejtgazdakörét szélesítette, addig a soksejtű szervezetek „sejtpopulációiban" a sejtről sejtre haladó nukleinsavtranszfert finomította és koordinálta. A magasabb rendű organizmusok fejlődésében szerepet játszó extrakromoszomális nukleinsavak legfőbb csoportját a lipoprotein-membrán kettős rétegével burkolt RNS-„virionok" alkotják. Valamennyi gerinces kromoszómájában találhatók ezekkel az onkornavírusok I. osztályába tartozó elemekkel kapcsolatos információk, és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján ma már nyilvánvaló, hogy az onkogén folyamatok ezektől is függenek.

Ismeretes, hogy milyen rendkívül nagy idő telt el az első mikrofosszíliák megjelenése és a kambriumban bekövetkezett, sokrétű, adaptív differenciálódás korszaka között, mely azután már gyorsan elvezetett a legtöbb létező törzs ősének megjelenéséhez. Feltehető, hogy ez a több milliárd év hosszúságú intervallum azt a periódust képviselte, amely alatt az evolúció haladása először csupán az entrópiás, majd később már a modulált mutációktól is függött. Extrakromoszomális DNS-elemek ez alatt a periódus alatt is jelen lehettek, azonban anyagcsere-formáló szerepük az akkor meglevő bióta (élővilág) meglehetősen korlátozott

genetikai diverzitása következtében kevéssé hatékony lehetett. Ezenkívül, az extrakromoszomális elemek által közvetített genetikai információátadás hatékonysága a populációsűrűségtől mindig is érzékenyen függhetett. A biológiai evolúció korai szakaszában a bioszféra populációsűrűsége sok nagyságrenddel alacsonyabb lehetett, mint a modern bioszféráé.

1.35.38. Gén- és genomduplikációk. A genetikai potenciál növelése

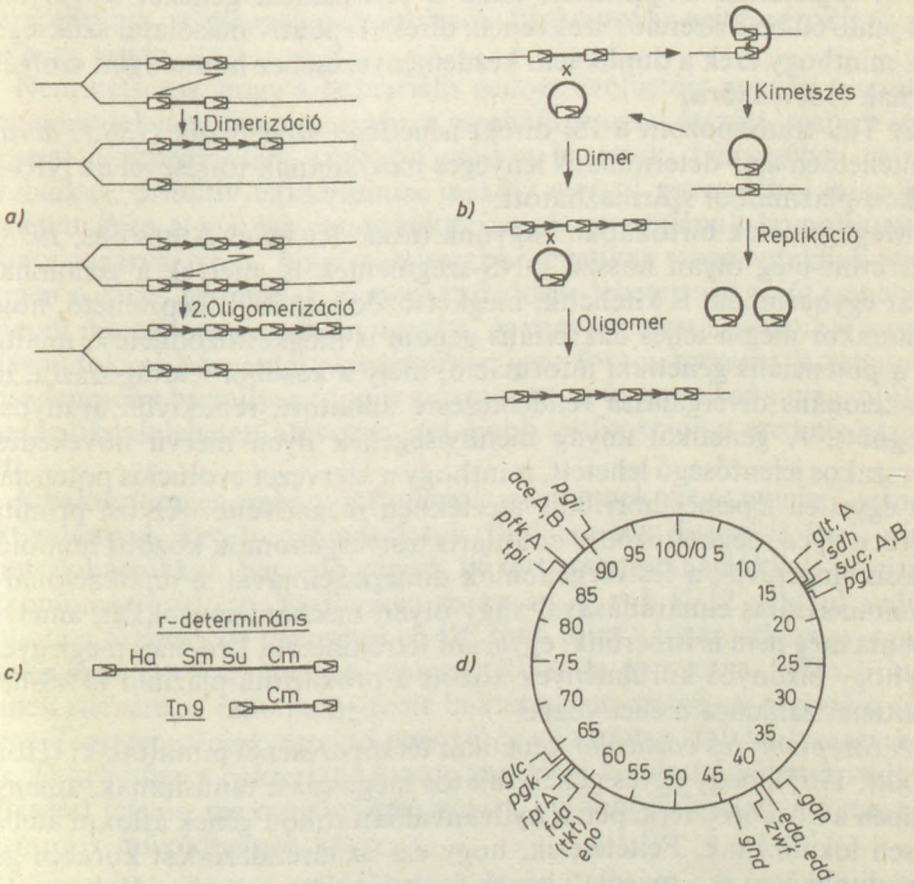
A bakteriális genom evolúciójának kutatása az 1970-es évek vége felé újabb fordulatot vett. A kromoszóma organizációjának további, statisztikai alapokon nyugvó tanulmányozása tette ezt lehetővé. Úgy tűnik, hogy az ismétlődő DNS-elemek a génduplikációk, sőt a hosszabb DNS-szakaszok konzerválódott duplikációi, jelentősen megnagyítva a funkcióváltozásra alkalmas genetikai potenciált, a prokarioták evolúciójában is fontos szerepet játszhattak.

Truffa-Bachi és munkatársai szerint (1975) az *E. coli*ban négy enzim is, az aszpartokináz I-homoszerin-dehidrogenáz I, az aszpartokináz II-homoszerin-dehidrogenáz II, az aszpartokináz III és a homoszerinkináz, melyek közös antigén-determinánsokat tartalmaznak, feltehetően egyetlen közös ősi génből származnak, mely egynél többször is megkettőződött. Nagyon valószínű, hogy az *E. coli*ban az *arg*F- és az *arg*I-gének is közös ősi géntől erednek. Feltételezik (Riley és Anilionis, 1978), hogy az *arg*F-gén az *E. coli* K-12-genomjában már csak a legújabb evolúciós időkben jelent meg. Az *arg*F-gén maga első lépésben egy *arg*I-gén duplikációjával alakulhatott ki, majd episzomális komponensként mobilizálódhatott és végül a genomba új pozícióban épült be.

A génevolúció és a kvantitatív génexpresszió-kutatás különösen sok eredményt ért el a plazmidokon lokalizált rezisztenciagének tanulmányozásával. Ismeretes, hogy valamely genetikai determináns aktivitása lényegesen növelhető, ha génmásolatainak száma tandem duplikációk révén növekedik. Eukarióták és prokarióták kromoszómagénjeinek, továbbá baktériumok plazmidokon hordozott rezisztencia determinánsainak számát lehet e mechanizmus segítségével növelni. A tandem duplikációkat gyakran azok a legitim rekombinációk kezdeményezik, melyek a gént szegélyező direkt repetitív DNS szekvenciák között mennek végbe (*188.a. és b. ábrák*). Néhány plazmidon hordozott antibiotikum-rezisztencia determináns oly módon fejlődött, hogy duplikációinak megkönnyítésére, két végén hosszú (700–1200 bp) direkt repetitív szekvenciákkal rendelkezik, melyek stimulálják a rekombinációs történéseket. Ilyen pl. az Inc FII-jelzésű R-plazmid méreg rezisztencia r-determináns régiója, a Tn 1721-en a Tc^r gének együttese és a Rtsl kanamicin rezisztencia determinánsa.

A tandem duplikációk magyarázatára két modellt fejlesztettek ki (*188.a. és b. ábrák*; FOSTER, 1983). Közös jellemvonásuk, hogy a duplikációt a rezisztenciagéneket szegélyező direkt repetitív DNS szekvenciák közötti *rec*A-dependens homológ (legitim) rekombináció kezdeményezi.

Az első modell szerint (*188.a. ábra*) a duplikáció kezdeményezése a DNS replikációja alkalmával történik és kettős, azonban egyenlőtlen



188. ábra

a) Az egyenlőtlen átkereszteződéssel (crossing over) létrejövő tandem génduplikáció modellje. A téglalap alakú egységek az amplifikálható géneket szegélyező direkt repetitív szekvenciákat szemléltetik. Az antibiotikumrezisztencia-gént a két ismétlődő egység közötti vastagabb vonal mutatja. A rekombinációt a vékony vonalak jelzik. *b)* A rezisztencia-gén kimetszésével és újra beépítésével végbemenő tandem génduplikáció létrejöttének modellje. Egyéb jelölések mint az *a)* ábrán. A rekombinációs történés x-szel jelölve. *c)* Amplifikálható méregrezisztencia determinánsok szerkezete. Az NR1-jelzésű R plazmid és a rokon Tn9 transzpozon amplifikálható, méregrezisztencia, r-determináns régiói. A téglalap alakú egységek direkt repetitív, rezisztenciagéneket szegélyező IS1 szekvenciákat szimbolizálnak. Ezek az elemek biztosítják a higannyal, a szulfonamidokkal stb. szembeni rezisztenciát (*a–c:* FOSTER, 1983, után). *d)* A glükózkatabolizmus génjeit magába foglaló négy géncsoport az *E. coli* géntérképén (RILEY és munkatársai, 1978)

crossover eseményt igényel. A 2-ik modell (*188.b. ábra*) megkívánja, hogy a rezisztenciagént előbb egyszerű crossover metssze ki, majd egy másik, intakt rezisztencia determinánst hordozó plazmidba integrálódjon. A 2-es modell szerint a duplikációs folyamatban a kimetszett cirkuláris rezisztencia determinánsok intermedierek.

A *Proteus mirabilis*ben az NR1 plazmid méreg-rezisztencia (r-determináns) régiójának amplifikációjához a rezisztencia géneket szegélyező ISl-jelű 760 bp inszerciós szekvencia direkt repetitív másolatai szükségesek minthogy ezek a duplikáció kezdeményezéséhez homológiát szolgáltatnak (*188.c. ábra*)

A Tn9 transzpozont a ISl direkt ismétlései szegélyezik (*188.c. ábra*). Feltehetően az r-determináns lényeges hányadának törlésével az NR1-el rokon plazmidból származhatott.

Megfigyelések birtokában vagyunk (*lásd:* RILEY és ANILIONIS, *1978*), miszerint még olyan hosszú DNS-szegmentek is, melyek a genomnak akár egyharmadát is kitehetik, megkettőződhetnek. Elképzelhető, hogy valamikor még a teljes bakteriális genom is megkettőződhetett, miáltal az a potenciális genetikai információ, mely a későbbi feldolgozásra, ill. funkcionális divergálásra rendelkezésre állhatott, rendkívüli arányban megnőtt. A genetikai anyag mennyiségének ilyen mérvű növekedése korszakos jelentőségű lehetett, minthogy a szervezet evolúciós potenciálját egyetlen lépéssel horribilis mértékben megnövelte. Az ősi primitív sejtben ilyen megkettőződés cirkuláris testvérgenomok közötti homológ rekombinációval, a testvérgenomok dimerizációjával, a replikációnál a monomerizálás elmaradásával vagy olyan mechanizmusokkal, amelyeket ma még nem is ismerünk, egyaránt létrejöhetett. Érdemes megjegyezni, hogy bizonyos körülmények között a prokariota plazmid DNS-nek multimerizálódása mehet végbe.

A *Streptomyces coelicolor* genetikai térképezésénél mutatták ki (HOPWOOD, 1967), hogy egyes gének sajátos megoszlást tanúsítanak, amennyiben a körkörös térképen a nyilvánvalóan rokon gének átlósan átellenesen lokalizáltak. Feltételezik, hogy ezt az elrendeződést korábbi genomduplikáció és a másolati gének funkciós divergenciája idézhette elő. Az *E. coli* genetikai térképének statisztikai analízise arra utal, hogy a reakció típusa alapján rokon génpárok olyan tendenciát, hogy egymáshoz viszonyítva 90°/180° távolságban helyezkednének el, nem mutatnak, azonban az anyagcserében összetartozó gének ezt a tendenciát már tanúsítják. Az *E. coli* térképén a glükózkatabolizmus legtöbb génje négy csoportban lokalizált *(188.d. ábra)*, és e csoportok egymástól 90°-ra helyezkednek el (RILEY, SOLOMON és ZIPKAS, 1978). Ma még nem vagyunk abban a helyzetben, hogy az evolucionálisan rokon gének kromoszomális lokalizációjának kérdését megválaszolhassuk, jóllehet más *En-*

terobacteriaceae fajok is, mint pl. a *Klebsiella* és a *Salmonella* az *E. coli*éhoz hasonló génelrendeződést mutatnak. Amennyiben a 90°/180° génlokációk nem véletlenszerűek, úgy ez a génmegoszlás valószínűen a múltban végbement kétszeres szekvenciális genom-megkettőződést tükrözi, melyet azután a génmásolatok funkcionális szétkülönüléséhez vezető evolúció követett. Ez azonban még nem biztos és az is lehet, hogy a nem véletlenszerű génmegoszlás, amint arra korábban (*lásd* 542. old.) rámutattunk, a génmegnyilvánulások funkcionális sejtkontrolljára vezethető vissza.

Nem kétséges, hogy a bakteriális genom evolúciója nagyon komplex folyamat lehetett és számos olyan mechanizmussal átszőtt, melyek egymással párhuzamosan, szinkron módon hatottak. Lényegében az ősi archaikus, primitív baktériumok csekély méretű genomjából talán így jöhetett létre a ma élő enterobaktériumok genomjának komplexitása. Nincs kizárva tehát, hogy a hosszabb genetikai szegmenteknek vagy éppen a teljes genomnak a megkettőződése lehetett az az út, amely a genom méretét rendszeresen növelte, és ezen az úton a genetikai anyag plazmidokkal közvetített kiegészülése igen fontos szerepet játszhatott. Mindenesetre bármilyen úton is származott az új genetikai anyag, utólag mutációknak lehetett alávetve, ami újabb sejtfunkciókat eredményezhetett.

A baktériumgenomban új funkciók jelenhetnek meg „nyugvó" gének aktiválásával, kettős génmásolatok funkcionális divergálásával, géntranszlokációkkal, hasonló régiók közötti rekombinációkkal, illegitim rekombinációval stb. Evolúciója során az *E. coli* K-12 például azóta, amióta a *Salmonella* genusztól elvált, több mint három térképegységnyi hosszúságú DNS-szegmentet szerzett (Riley és Anilionis, 1978). Mindennek ellenére, a tanulmányozott baktériumnemzetségek genetikai térképe a sejtgenerációk ezrein keresztül is viszonylag stabilnak mutatkozik. Feltehetően a bakteriális genom genetikai konfigurációjának stabilizálásáért felelős, ma még kevéssé ismert, különböző konzerváló mechanizmusok működhetnek közre.

1.35.39. Új gének evolúciója

Az új gének, ill. géntermékek evolúciójának tanulmányozása ma már kiterjedten folyik (lásd Kilbane, 1986). A D-arabinóz pl. nem tartozik az *Aerobacter aerogenes* normális szubsztrátjai közé, de tenyészeteiben találtak mutánsokat, melyek egyedüli szén- és energiaforrásként D-arabinózzal növekedtek. Ezek a mutánsok kezdetben lassan szaporodtak és az L-fukóz-izomeráz szintézisére vonatkozóan konstitutívek vol-

tak. Ennek az enzimnek egyébként a D-arabinózra is van ugyan, de minimális aktivitása. Később gyorsan szaporodó mutánsokat is izoláltak, melyeknél a mutációt az L-fukóz-izomeráz génben mutatták ki. Ez a változás az enzim számára a D-arabinóz felé nagyobb affinitást biztosított és a tekintetben lényegesen különbözött a vad típusú enzimtől. A továbbiak során más mutánsokat is izoláltak, melyek D-arabinózzal nem csupán jól szaporodtak, hanem olyan L-fukóz-izomeráz gént is tartalmaztak, mely D-arabinóz révén indukálható volt. Más esetben kimutatták, hogy egy *Salmonella typhimurium* törzs, mely a leucin szintéziséért felelős gént (*leu*D) elvesztette, azáltal nyerte vissza leucin-szintetizáló képességét, hogy a *new*D génjében mutációt szenvedett, és ennek megváltozott géntermék viszont közreműködött a *leu*D enzim helyettesítésében. Ugyancsak más esetben az *Escherichia coli* egy, a *lac*Z gén törlése folytán β-galaktozidáz deficiens törzséből izoláltak laktózon növekedő mutánsokat. Ezekből új gént mutattak ki, amit *ebg*A-nak jelöltek, és géntermék a β-galaktozidáz funkcióját vette át. Ez az enzim a *lac*Z gén termékével immunológiai keresztreaktivitást nem mutatott. A példákat még sorolhatnánk.

1.35.40. Protoplasztfúziók

Az 1.13.10. alfejezetben röviden már érintettük a szfero- és protoplaszt előállítás módszereit és a falmentes baktériumok biológiájának problémakörét. Az utóbbi években, elsősorban is a protoplasztkutatással foglalkozó két szegedi munkacsoport eredményeinek hatására, világviszonylatban széles körű kutatások indultak a protoplasztfúziós technikák felhasználására a bioaktív vegyületeket termelő ipari mikroszervezetek nemesítésében, a genetika számos elméleti kérdésének tisztázására stb. A protoplasztfúzió Ferenczy és munkatársai (1974, 1975), Fodor és Alföldi (1976), Schaeffer és munkatársai (1976), továbbá Hopwood és munkatársai (1977) úttörő tevékenysége nyomán kifejlesztett modern technológiái, mint a protoplasztok irányított és genetikailag ellenőrzött fúziós rendszerei, többek között azt is lehetővé teszik, hogy genomok is egyesíthetők legyenek, mégpedig olyan szervezetek esetében is, melyek között információcserére természetes miliőkben nincs semmiféle lehetőség. Ma már megfelelő eljárásokkal a protoplasztok fúzióját irányítani tudjuk, növelhetjük fúziós gyakoriságukat és a szomatikus hibridek szelekcióját valósíthatjuk meg (lásd Ferenczy, 1985). A kutatások mind a prokariotákra, mind az eukariotákra kiterjednek.

Az eukariotáknál fajon belüli és fajok közötti hibrideket állítottak már elő. Kísérleteznek pl. sejtmag izolálással, *in vitro* kivitelezett magfúzióval

és a diploidizált magok visszaültetésével. A protoplasztokat különböző módszerekkel késztetik fúzióra. Ezek között gyakran szerepel az az eljárás, amikor a különböző partnerek protoplasztjait, Ca^{2+} ionok jelenlétében, 20–25%-os polietilén-glikol (PEG) oldattal kezelik.Ez esetben a partnerek citoplazmamembránjának lipidjei a kölcsönös érintkezés helyén átrendeződnek, kicserélődhetnek, miközben a fúzió végbemegy. A fúziók gyakorisága növelhető elektromos erőtér hatására is. A fúzió után a közös sejtfal regenerálódhat. Sikerült már fúziót és szomatikus hibridizációt állati és emberi sejtek között is megvalósítani. Alapvető problémának látszik, hogy a sejtek fúziója után sejtmagvaik is fúzionáljanak. E téren azonban még számtalan a megoldatlan kérdés. Jelenleg úgy tűnik, hogy magfúziót csak bizonyos típusú szervezeteknél (így egyes élesztőknél) lehet elérni (FERENCZY, 1984).

A protoplasztok és proptoplasztfúziók kutatása nagy lépésekkel halad előre a prokariota szervezetekkel is (*lásd* HOPWOOD, 1981 stb.). A *Thermomonospora fusca*ból, e termofil aktinomicetából protoplasztokat állítottak elő. Protoplasztfúziót követő rekombinációt igazoltak a *T. fusca* YX-jelzésű méregrezisztens mutánsával. Úgy tűnik, hogy mezofil sztreptomiceták néhány génje termofil aktinomicetákban is megnyilvánulhat (PIDCOCK és munkatársai, 1985). A *Streptomyces chrysomallus* körkörös genetikai térképének megszerkesztésénél, legalábbis részben, már protoplasztfúziókkal nyert információkat is hasznosítottak (KELLER és munkatársai, 1985). WIRTH és munkatársai (1986) a *Streptococcus faecalis* esetében rendkívül hatékony protoplaszt-transzformációs rendszert fejlesztettek ki. A sejtfal-regeneráció gyakoriságát 100%-os szintre, míg a transzformánsok számát, 1 μg DNS-re számítva, 3 napon belül 10^6-ra növelték.

A *Bacillus stearothermophilus*nál a genetikai analízist már protoplasztfúzió segítségével hajtották végre (CHEN és munkatársai, 1986). A kísérleteket e faj NUB36-jelzésű prototróf törzsével végezték. Auxotróf mutánsokat izoláltak és protoplasztfúzió útján egyrészt izogén mutáns törzseket állítottak elő, másrészt a kromoszóma térképezését kísérelték meg.*

* Az alkalmazott módszerekre példaként itt bemutatjuk a CHEN és munkatársai (1986) által a protoplasztképzéshez, a regeneráláshoz és a fúzióhoz követett eljárást: A protoplasztképzést az ún. protoplasztáló (P) közegen hajtották végre, mely azonos a DAVIS és munkatársai (1980) által leírt 10% laktózt, 20 mM $CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$-t, 10 mM $MgCl_2 \cdot 7H_2O$-t tartalmazó LB-közeggel, míg a regenerációs (R) közeg 0,8 % Bacto-agart tartalmazó P-medium volt. Valamennyi közeget még 1,05mM nitrilo-triacetáttal, 0,59 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-val, 0,91 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$-val és 0,04 mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$-val egészítették ki. A *Bacillus stearothermophilus* LB-lemezről (10–13 óra után 60° C-on) származó termofil sejtjeivel mint inokulummal 300 ml-es, 20 ml LB-közeget tartalmazó keverő-lombikot oltottak. A tenyésztést 60°C-on 2 órán át folytatták és a kapott folyadékkultúra sejtszuszpenziójával 300 ml-es, 20 ml LB-közeget tartalmazó nefelométer-edényekbe inokuláltak,

Arról, hogy a bioszféra természetes biotópjaiban spontán protoplasztképződés milyen gyakorisággal mehet, ha megy egyáltalán, végbe és hogy talajokban és vizekben protoplaszfúzióval összekötött géntranszferrel számolhatunk-e, a jelen körülmények között nem sok elképzelésünk van.

1.36. A prokarioták törzsfája

A prokarioták lehetséges evolúciójával már több szempontból is foglalkoztunk. Így érintettük folyamatos differenciálódásuk feltételezett útjait a paleokörnyezet változásaitól függően (*lásd* 44. old.), vagy legfontosabb csoportjaik valószínű leszármazásvonalait az energetikai anyagcserében olyannyira fontos szerepet játszó citokróm-c-struktúrákra alapított törzsfa *(lásd 81. ábra)* viszonylatában stb.

A prokarioták fejlődéstörténetét elénk táró, rendkívül kiterjedt és számtalan ellentmondással terhes irodalmat nagyon célszerűtlen lenne itt akár csak vázlatosan is bemutatni. Ezért a továbbiakban elsősorban is csak azoknak a tényeknek és nézeteknek az ismertetésére szorítkozunk, melyek az 1980-as évtized első felében még többé-kevésbé kiállták a tudományos közvélemény kritikáját.

MÜLLER (1976) szerint a baktériumok evolúcióját és korát tanulmányozhatjuk: **1.** Geológiai–paleontológiai leletek alapján. **2.** A bakteriummorfológia és -fiziológia felismeréseinek figyelembevételével. **3.** Genetikai megfontolások szemszögéből. **4.** A baktériumok és a magasabb rendű állati és növényi szervezetek közötti együttműködés történeti múltjának elemzésével, és végül **5.** A mikrobák ökológiája és a környező világ változásai közötti korrelációk feltárásával.

---

mégpedig oly módon, hogy a 2×10^7–3×10^7 CFU/ml (CFU = kolóniaképző egység) sejtsűrűséget érjék el. A késői exponenciális fázisú kultúrákból (6×10^8–8×10^8 CFU/ml) nyert sejteket centrifugálással gyűjtötték össze és P-közegben 3×10^9–5×10^9 CFU/ml közötti sejtdenzitás eléréséig szuszpendálták. E sejtszuszpenzió 1,0–2,5 ml-nyi mintáját 10 ml-es mikro-FERNBACH-edénybe vitték át és 10 μg/ml végső koncentráció eléréséig lizozimot (1 mg/ml a P-közegben) adtak hozzá. Az edényt vízfürdőn, 60 °C-on 5 percig óvatosan rázatták. A protoplasztok létrejöttét fáziskontraszt mikroszkóppal követték nyomon. Ezután közvetlenül a protoplasztok hígítása következett P-közegben, majd a hígított szuszpenzióból vett mintákat (0,1 ml) óvatosan R-közegből készített lemezekre terítették. Inkubálás 22–24 órán át 60 és 65 °C-on. Minden mintát négy lemezen terítettek.

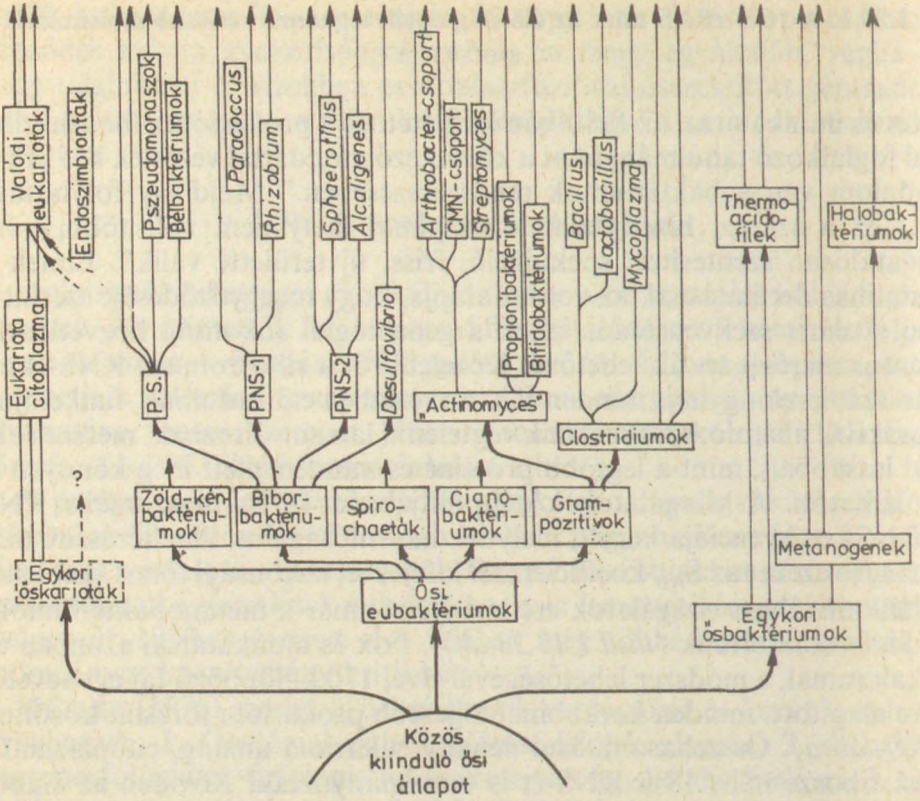
A protoplasztfúzió elérésére az egyes szülők protoplasztszuszpenzióinak (3×10^9–5×10^9 protoplaszt per ml) azonos térfogatait elegyítették, majd a protoplaszt-mixtúra 0,1 ml-ét 0,9 ml frissen előállított, 40% polietilén-glikolt (molekulasúly, 1550) tartalmazó P-közeghez adták. A fúziós keveréket enyhén mozgatva 10 percig 60° C-on inkubálták. A fúzionált protoplasztokat 1800–2000xg-nél 5 percig szobahőmérsékleten centrifugálva gyűjtötték össze, azonos volumenű P-közegben óvatosan újra szuszpendálták és 0,1 ml-nyi mennyiségüket R-közegen lemezelték, melyről azután izolálhattak.

1.36.1. A 16 S rRNS mint az élővilág egyik legkonzervatívabb molekuláris szerkezete

Fox és munkatársai az 1980-ban közzétett és a prokarioták filogenezisével foglalkozó tanulmányukat a következő mondattal vezették be: „Forradalom van a baktériumok rendszerezésében." Majd így folytatták: „... ez a száraz, bizonytalan diszciplína, mely nem volt több, mint hivatalosan szentesített spekuláció, friss, új területté válik". Ennek a hatalmas derűlátásnak az volt az alapja, hogy meggyőződésük szerint a molekuláris szekvenciaanalízisek a geneológiai rokonság közvetlen és pontos mérését teszik lehetővé. Közelebbről a riboszomális RNS-ekről van szó. Ezek ugyanis minden élő szervezetben előfordulnak, funkciójuk rendkívül állandó, szekvenciáik végtelenül lassan változnak, messze sokkal lassabban, mint a legtöbb proteiné és mindemellett még könnyen is izolálhatók. A vizsgálatok középpontjába a 16 S riboszomális RNS (rRNS) szekvenciája került, melynek hasonlóságaira, ill. eltéréseire alapítva, és ezeket az S_{AB}-koefficienssel kifejezve, rokonsági törzsfákat lehet felállítani. Ilyen vizsgálatok eredményeiről már a metanobaktériumoknál is beszámoltunk *(lásd 1.13.23 alf.)*. Fox és munkatársai azonban ez alkalommal, e módszer lehetőségével élve, 170 különböző faj egybevetésére alapított, minden korábbinál teljesebb prokariota törzsfát közöltek *(189. ábra)*. Összehasonlításul néhány eukariota analóg, citoplazmatikus, riboszomális 18 S RNS-ét is tanulmányozták. Röviden az alábbi módszert követték: A faj adott, vizsgálatra kerülő törzsének ^{32}P-jelzett 16 S rRNS-ét ribonukleáz T1-el emésztették és a kapott oligonukleotidokat kétdimenziós papírelektroforézisnek vetették alá. A szekvenciaanalízis eredményei alapján a kérdéses szervezetre jellemző szekvenciák katalógusát állították össze. A különböző baktériumok katalógusainak, ill. ezek révén 16 S rRNS szekvenciáiknak az összehasonlítása lehetővé teszi geneológiai rokonságuk mértékének becslését. Ez utóbbit az S_{AB} asszociációs koefficienssel lehet kifejezni, mely két szervezet (A és B) hasonlóságának mértékét tükrözi:

$$S_{AB} = \frac{\text{az } A+B\text{-ben közös oligomerek nukleotidjainak összege}}{\text{az } A+B \text{ valamennyi oligomerje nukleotidjainak összege}}.$$

Az S_{AB} értékét minden összehasonlított törzs-, ill. fajpár viszonylatában kiszámították. Ezután clusteranalízissel dendrogrammokat készítettek. Ez az analízis Fox és munkatársai szerint (1980) a valóságos filogenetikai rokonsági viszonyok jó közelítését adja, feltéve, ha (!) az egymásból levezethető származási vonalak 16 S rRNS-szekvenciái időben hasonló sebességgel változtak (a szerzőknek úgy tűnik, hogy erről van szó).



189. ábra

A prokarióták leszármazásának fontosabb útvonalai (Fox és munkatársai, 1980)

1.36.2. A törzsfa már nagyon korán háromfelé ágazhatott

A *189. ábrán* látható, hogy az egykori közös ősből az utódok három különálló vonala származik. Ezek szerintük alapjában véve az élővilág három különböző birodalmának is tekinthetők. Az első megfelel a valódi baktériumoknak vagy más néven eubaktériumoknak *(Eubacteriales)*. A második vonal az ősbaktériumokat tartalmazza, míg a harmadik a vizsgált eukarióták citoplazmatikus rRNS-e alapján arra az ősi protoeukariota csoportra utal, melynek tagjaiba egykoron a szimbionta prokarióták sejtszervecskék alakjában beépültek. Ez a hármas felosztás összeegyeztethetetlen azzal a napjainkban szélesen elterjedt felfogással, miszerint az élővilág alapvetően csak prokariotákra és eukariotákra csoportosítható. Az eukariota sejt valójában kiméra, melynek eredete ma még nem világos. Úgy tűnik, mintha a protoeukariota (az ősi gazdasejt) a szimbiózisig külön vonalon fejlődött volna.

Ami az ősbaktériumokat illeti, ezek – mint látható – a valódi baktériumoktól már oly mértékben elkülönültek, hogy szeparálásukat Fox és munkatársai szerint a legmagasabb taxonómiai szinten is megvalósíthatjuk (külön birodalom). E szervezetek egészen sajátos morfológiáját és élettanát másutt mutatjuk be (*lásd* 322. old.). Mindez valóban igazolja Fox és munkatársai állításának helyességét, akik még azt is feltételezik, hogy az ősbaktériumok egykori fenotípusai a Föld történetének még abban az időszakában jöttek létre, amikor egészen sajátos, később teljesen eltűnt környezeti viszonyok formálták őket, és ma olyan anyagcserét és szabályozó mechanizmusokat tárnak elénk, melyek környezeti kezdeményezői már régen nem léteznek.

1.36.3. A klasszikus baktériumok nyolc fejlődési vonala

A 16 S rRNS katalogizálásának alapján az eubaktériumoknak nyolc nagyobb divízióját különíthették el. Ezek:

1. Az első csoport a fotoszintetizáló bíborbaktériumokat és a következő, nem fotoszintetizáló nemzetségeket foglalja magába (*lásd* a *190. ábrát* is): *Escherichia, Pseudomonas, Rhizobium, Alcaligenes* és *Desulfovibrio.*

2. A második csoport tartalmazza az összes GRAM-pozitív valódi baktériumot, kivéve a *Micrococcus radioduranst* és közvetlen rokonait, továbbá a *Mycoplasmákat.*

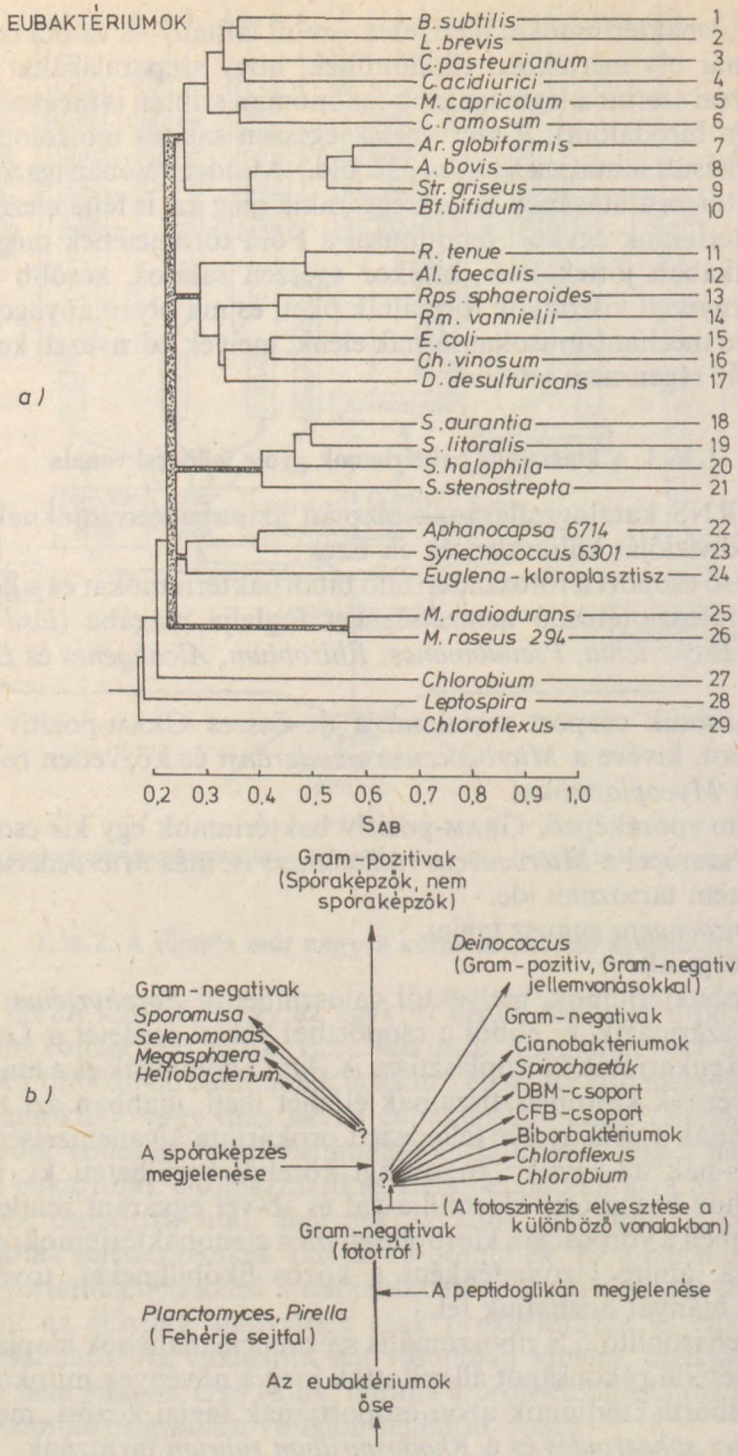
3. A nem spóraképző, GRAM-pozitív baktériumok egy kis csoportja. Közöttük szerepel a *Micrococcus radiodurans* is, más *Micrococcus* fajok azonban nem tartoznak ide.

4. A *Spirochaeta* genusz tagjai.

5. Leptospirák.

6. Cianobaktériumok, melyektől valószínűen a *Porphyridium* kloroplasztisza származik, és ebből a csoportból veheti eredetét a *Lemna* és az *Euglena* eukarioták kloroplasztisza is. Ami a zöldalgák és a magasabb rendű növények kloroplasztiszainak elődjét illeti, újabban azt tartjuk, hogy ez annak a néhány éve felfedezett prokariota alganemzetségnek, a *Prochloron*-nak az egykori rokonsági köréből kerülhetett ki, mely a zöldalgákhoz hasonlóan klorofill-a-val és -b-vel egyaránt rendelkezik. Ezzel szemben a vörösalgák kloroplasztisza a cianobaktériumokra vezethető vissza, amire bizonyítékként a közös fikobillineket, továbbá a klorofill-b hiányát hozhatjuk fel.

Az összehasonlító 5 S riboszomális szekvenciaanalízisek alapján szoros filogenetikai rokonságot állapítottak meg a növények mitokondriuma és a bíborbaktériumok azon csoportjának tagjai között, melybe a *Rhodobacter sphaeroides* és a *Rhodospirillum rubrum* tartoznak.


EUBAKTÉRIUMOK
B. subtilis 1
L. brevis 2
C. pasteurianum 3
C. acidiurici 4
M. capricolum 5
C. ramosum 6
Ar. globiformis 7
A. bovis 8
Str. griseus 9
Bf. bifidum 10
R. tenue 11
Al. faecalis 12
Rps. sphaeroides 13
Rm. vannielii 14
E. coli 15
Ch. vinosum 16
D. desulfuricans 17
a)
S. aurantia 18
S. litoralis 19
S. halophila 20
S. stenostrepta 21
Aphanocapsa 6714 22
Synechococcus 6301 23
Euglena - kloroplasztisz 24
M. radiodurans 25
M. roseus 294 26
Chlorobium 27
Leptospira 28
Chloroflexus 29
0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0
SAB
Gram-pozitivak (Spóraképzők, nem spóraképzők)
Deinococcus (Gram-pozitiv, Gram-negativ jellemvonásokkal)
Gram-negativak
Sporomusa
Selenomonas
Megasphaera
Heliobacterium
b)
Cianobaktériumok
Spirochaeták
DBM-csoport
CFB-csoport
Bíborbaktériumok
Chloroflexus
Chlorobium
A spóraképzés megjelenése
?
?
(A fotoszintézis elvesztése a különböző vonalakban)
Gram-negativak (fototróf)
A peptidoglikán megjelenése
Planctomyces, Pirella (Fehérje sejtfal)
Az eubaktériumok őse

7. és 8. A zöld fotoszintetizáló baktériumok két külön vonala. Egyiket a *Chlorobium*, a másikat a *Chloroflexus* képviseli.

Feltehetően a vizsgálatok további kiterjesztésével az eubaktériumok e csoportjaihoz még továbbiak lesznek csatolhatók (pl. mixobaktériumok stb.).

1.36.4. A bakteriális törzsfa kutatásának megoldatlanul maradt és újabb problémái

Úgy tűnik, a klasszikus rendszerezés alapelvei és ezen új filogenetikai irányzat között eltérések vannak. Nézzük pl. a morfológiai bélyegeket. A törzsfán a gömb alakú baktériumok a nem gömb alakúak kategóriáiban oszlanak el. Az a tény, hogy a *Rhodomicrobium* sarjadzással szaporodik, ezt a fajt nem különösebben különbözteti meg a nem sarjadzó bíbor nem kénbaktériumoktól. A *Mycoplasmák* geneológiailag a *Clostridium*ok egy sajátos alcsoportjának fal nélküli rokonai. Igaz viszont, hogy a spóraképzés már lényeges filogenetikai indikátornak tekinthető.

Rendkívül fontos hangsúlyozni, hogy a Fox-féle értelmezésben az S_{AB}-értékek elsősorban is az evolúciós időre nyújtanak felvilágosítást, és nem az evolúciós progresszióra. Így pl., minthogy az anaerob baktériumok, amilyenek a *Clostridium*ok is, idősebbek az aerob *Bacillus*oknál, ezért egymás között az S_{AB}-értékeknek sokkal szélesebb skáláját mutatják, mint a *Bacillus*ok ugyancsak egymás között. Az S_{AB}-értékek skálái kitűnő lehetőséget nyújtanak az ősi fenotípusok elkülönítésére a sokkal modernebbektől. Fox és munkatársai törzsfájukat nem csupán klasszifikációs szempontból tartják értékesnek. Szerintük lényegesen hozzájárul ez a celluláris evolúció korai történéseinek megértéséhez is. Különös és új problémák is jelentkeznek. Mind ez ideig például azt az álláspontot képviseltük, hogy az első mikrobák anaerob heterotrófok voltak. E nézetet újra felül kell vizsgálnunk. A fotoszintetizálók és nem fotoszintetizálók fejlődési vonalainak éles elválasztása alig lehetséges. A fotoszinte-

◄ *190. ábra*

a) A valódi baktériumok főbb filogenetikai csoportjainak törzsfája. A szereplő fajok számjelzésüknek megfelelően: 1. *Bacillus subtilis*. 2. *Lactobacillus brevis*. 3. *Clostridium pasteurianum*. 4. *C. acidiurici*. 5. *Mycoplasma capriolum*. 6. *C. ramosum*. 7. *Arthrobacter globiformis*. 8. *Actinomyces bovis*. 9. *Streptomyces griseus*. 10. *Bifidobacterium bifidum*. 11. *Rhodospirillum tenuae*. 12. *Alcaligenes faecalis*. 13. *Rhodopseudomonas sphaeroides*. 14. *Rhodomicrobium vannielii*. 15. *Escherichia coli*. 16. *Chromatium vinosum*. 17. *Desulfovibrio desulfuricans*. 18–21. *Spirochaeta aurantia, S. litoralis, S. halophila*, és *S. stenostrepta*. 25 és 26. *Micrococcus radiodurans* és *M. roseus* VW0294. 27. *Chlorobium limicola*. 28. *Leptospira interrogans*. 29. *Chloroflexus aurantiacus* (Fox és munkatársai, 1980). *b)* A peptidoglikánt tartalmazó eubaktériumok feltételezett evolúciós útjának vázlata (Stackebrandt és munkatársai szerint, 1985)

tizálók rendkívül ősiek. Úgy tűnik, hogy a valódi baktériumok ősi prototípusa fotoszintetizáló és talán autotróf lehetett. Az az állítás viszont, hogy az anaerobok ősibbek, mint az aerobok, minden körülmények között helytállónak bizonyul. A *Clostridium*ok, a fotoszintetizáló bíborbaktériumok és a cianobaktériumok is nagyon ősiek. A *Bacillus*ok kb. olyan idősek, mint a földi aerob környezet maga. Fox és munkatársai szerint a 0,5 szintű S_{AB}-értékeket az aerob légkör korának mértékeként tekinthetjük! Másrészről, a különböző metanogén ősbaktériumok közötti nagyfokú diverzitás mértéke (a minimális $S_{AB} = 0{,}22$) határozottan arra utal, hogy ez a fenotípus az evolúciónak már rendkívül korai időszakában jelen volt. Érdemes itt megjegyezni, hogy az ősi üledékekben talált szénhidrogéntípusok, megoszlásukat tekintve sokkal inkább a metanogénekben talált lipidkomponensekéhez hasonlítanak, mint bármely más eubaktériuméhoz (Holzer és munkatársai, 1979).

Nemrég Stackebrandt és munkatársai (1985) az eubaktériumok evolúciójának kutatásában új szempontokat vetettek fel (*190. b. ábra*). Szerintük a *Planctomyces-Pirella*-csoport tagjai ma olyan peptidoglikán nélküli eubaktériumokat képviselnek, melyekhez hasonlóakból egykoron a tipikus, egyetlen peptidoglikán réteget hordozó, Gram-negatív eubaktériumok közvetlenül származhattak. Ezenkívül a filogenetikai, rendszertani kutatásokban semmiképpen sem szabad a Gram szerinti festésnek oly nagy jelentőséget tulajdonítanunk, mint azt eddig tettük. Így pl. bizonyítottnak látszik, hogy a Gram-negatív fototróf *Heliobacterium chlorum* a *Clostridium-Bacillus* csoport rokonsági körébe tartozik. Ezenkívül a Gram-negatív, endospóraképző *Sporosuma*-fajok besorolhatósága – 16 S rRNS összehasonlító vizsgálatok eredményei alapján – a Gram-pozitív endospóraképző eubaktériumok közé a Gram-pozitívak és -negatívak eredetéről szóló eddigi elképzeléseink átértékelését teszi szükségessé.

Ami az eukariota sejtet illeti, ennek fejlődési vonalát nem lehet csak egyszerűen felvázolni, minthogy ez feltétlenül több komponensű kiméra. A növények mitokondriuma feltehetően fotoszintetizáló bíborbaktériumoktól származik (Gibson és munkatársai, 1979). Lehetséges, hogy az eukariota sejt nukleáris komponense a maga egészében vagy annak igen nagy részét tekintve azonos eredetű, de ez még nem bizonyított. Az eukariota sejt eredetére különben a következő fejezetben még visszatérünk. Fox és munkatársainak (1980) következtetései között különösen figyelemre méltó, hogy az eukarioták 18 S rRNS-e az élővilág különálló, harmadik sajátos fejlődési vonalát jelzi. Az viszont már bizonyítottnak tekinthető, hogy az eukariotáknál a citoplazmatikus riboszómatípus proteingénjeinek egyike ősbaktériumtól eredhet.

Mint láttuk, genotípusosan, vagyis filogenetikai vonatkozásban a *My-*

coplasmák a klosztrídiumok rokonai, a közönséges baktériumoktól lényegesen nem különböznek. Riboszomális RNS-eik azonban a valódi baktériumok nagymértékben konzerválódott oligonukleotid-szekvenciáiból csak viszonylag keveset tartalmaznak (WOESE és munkatársai, 1985). Ez tükröződik a leszármazási vonalaiknál megfigyelt fokozott mutációs rátákban is. Populációik variabilitása szokatlanul nagymérvű. Feltételezik, hogy riboszomális RNS-eik lehetnek ezért és gyors evolúciójukért felelősek.

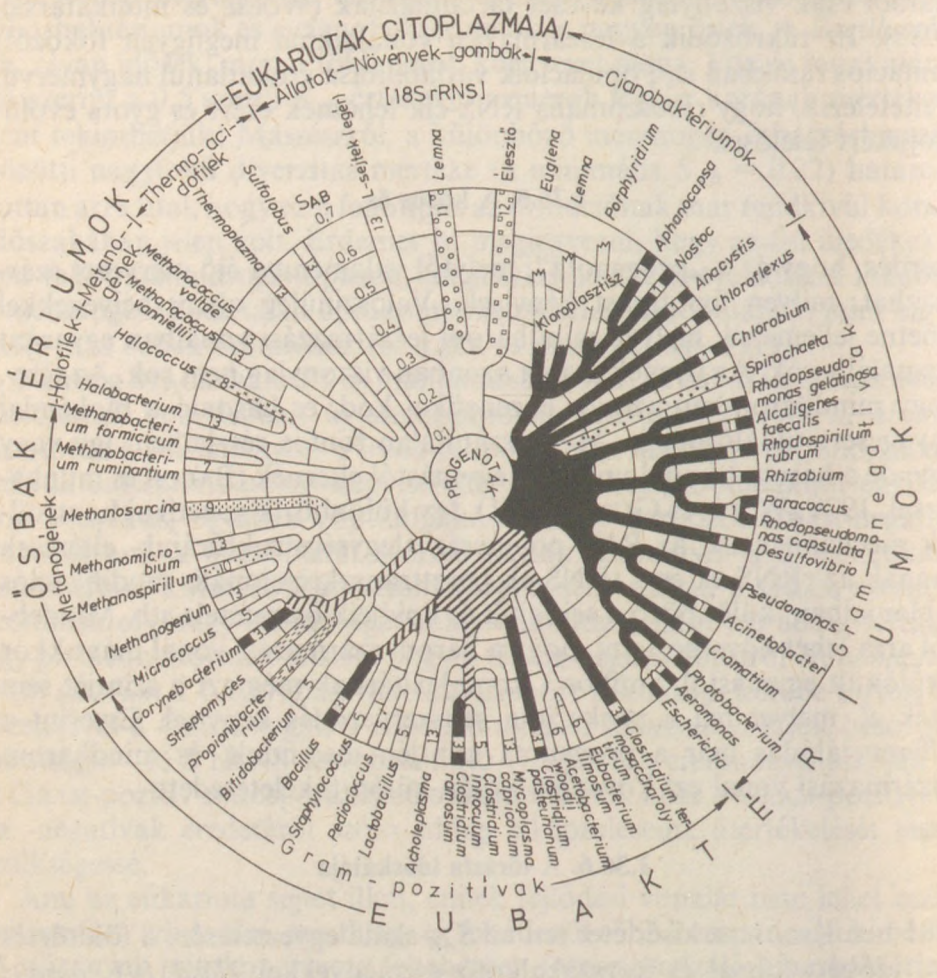
1.36.5. A közös ős

Kérdés, hogy az a „progenota", melytől valamennyi élő szervezet származhat, milyen fenotípust képviselt. Valószínűleg olyan bélyegekkel lehetne jellemezni, melyek mindhárom leszármazási vonalban egyaránt megtalálhatók. Az ilyenek száma azonban viszonylag nem sok. Az tény, hogy mindháromban azonos a genetikai kód, és hasonló a biokémiai anyagcsere úthálózata is. Mégis számtalan fontos részletben, így vagy úgy, de a három birodalom tagjai egymástól eltérnek (BALCH és munkatársai, 1979; WOESE és GUPTA, 1981). Így különbözik genetikai kontrolljuk mechanizmusa, az RNS-polimeráz alegységstruktúrájuk, eltérések vannak az rRNS-ek és a tRNS-ek poszttranszkripcionális modifikációs sablonjaiban, különböző a sejtfaluk és lipidjeik összetétele stb. Mindebből arra lehet következtetni, hogy a három származási vonal már akkor elkülönült egymástól, amikor a komplexitásnak még azt a szintjét sem érték el, melyet ma a prokariota sejtszerveződés képvisel. Eszerint a differenciálódás már a progenota szintjén megindult, és mindhárom leszármazási vonal ezt követően külön-külön tökéletesedett.

1.36.6. A törzsfa időskálája

1981-ben KANDLER kísérletet tett az S_{AB}-skála egyeztetésére a földtörténeti időbeosztással és korszakalkotó eseményekkel *(lásd 191. ábra)*. Mindenekelőtt azonban feltehető a kérdés, hogy egyáltalán mennyiben lehetséges az S_{AB}-értékek skáláját a földtörténeti időskálával párhuzamba állítani? Fosszíliák segítségével erre lehetetlen lenne vállalkozni. Lehetséges azonban – legalábbis KANDLER szerint –, ha a ma élő szervezetek jellegzetes anyagcsere-beállítottságát a legújabb paleokémiai adatokkal szinkronizáljuk. A skála legalsó határát természetesen bolygónk kialakulásának 4,5 millárd évvel ezelőtti történéssorozata jelenti. A legrégibb sztromatolitok korát kb. 3 milliárd évre teszik. Az ISUA-sorozat (Grönland) korát 3,8 milliárd évre becsülik, és az ebben található szénvegyületekben (KANDLER szerint) a ^{13}C-tartalom már ugyanazt a diszkri-

minációs fokot mutatja, mint az napjainkban a fotoszintézisnél tapasztalható. A 3,8 milliárd éves ferrivastartalmú üledékek és az ugyanilyen idős ^{13}C-diszkrimináció együttesen jelzik, hogy az oxigéntermelő foto-



Murein: egyrétegű: mDpm [1]; Orn [2];

többrétegű: mDpm [3]; L,LDpm [4]; Lys [5]; B-Typ [6];

Pszeudomurein [7]; Heteropoliszacharid: SO_4-el [8]; SO_4-nélkül [9]

Proteinhüvely [10]; Cellulóz [11] Kitin [12]; Nincs szakkulusz [13]

191. ábra

Az élővilág származását bemutató törzsfa, kiindulva az ősi protosejtektől és főleg a prekambriumban lezajlott differenciálódást szemléltetve. Az elágazásrendszert a riboszomális 16, (ill. 18)S RNS bázisszekvencia-hasonlóságokat tükröző S_{AB}-értékek alapján szerkesztették. Az S_{AB}-skála értékei a földtörténeti időbeosztással az alábbiak szerint szinkronizálhatók: 0,1–0,2 = $3{,}8 \times 10^9$ év; 0,3 = 3×10^9 év; 0,5 = $2{,}2 \times 10^9$ év; 0,7 = 400×10^6 év (KANDLER, 1981)

szintézis már ugyancsak 3,8 milliárd éves (?). A második időmarkert a nehéz kénizotópok diszkriminációjának ténye tárja elénk. Amíg az ISUA-sorozat szulfidjaiban ^{34}S-diszkrimináció még nem mutatható ki, addig a 2,2 milliárd éves kanadai kőzetekben igen, sőt már a későbbi időkéhez hasonló $\delta^{34}S$-értékkel. KANDLER feltételezi, hogy a szulfátredukció ettől az időtől fejlődött ki. Vagyis a *Desulfovibrio desulfuricans* fejlődésvonalának leágazása az anoxigén-fotoszintetizáló baktériumok köréből kereken 3 milliárd éve következhetett be. A harmadik fontos földtörténeti esemény a szabad, légköri oxigén megjelenése, ill. felhalmozódásának megindulása volt. Ennek ideje egybeeshet a terresztrikus vörös homokkövek felhalmozódásával (kb. 2,2 milliárd évvel ezelőtt). Amidőn a légköri oxigén koncentrációja a légkörben elérte a 2%-ot, kialakult az ózonréteg is, és a szárazföldön kezdetét vehette a benépesülés. Ez a térfoglalás mintegy 400 millió évvel ezelőtt a szilur korszakban bontakozhatott ki, ami egyidejűleg pl. az enterobaktériumoknál a törzsfa további elágazásához vezetett. Minthogy ezek a baktériumok ma állatok külső és belső testfelületein, ezekhez szorosan adaptálva élnek, feltehetően együttműködésük már nagyon korán végbement és differenciált koevolúció eredménye lehetett. Ha a *191. ábrán* az összes ma már rendelkezésünkre álló S_{AB}-értéket bemutatnánk, úgy látni lehetne azt a drámai méretű differenciálódást, mely a 0,7 feletti S_{AB}-értékek körletében végbement. Ezt az értéket már a szárazföldek benépesülésének idejével szinkronizálhatjuk. Ekkor már nemcsak a GRAM-negatívak, de a GRAM-pozitívak nagymérvű térfoglalása, ill. taxonómiai szerteágazása (elsősorban is a *Bacillus*ok, *Micrococcus*ok, *Arthrobacter*ek és más szigorúan aerob alakok körében) is megindult.

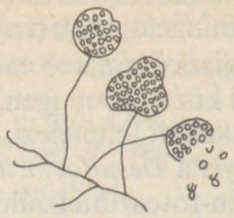
A KANDLER-féle időegyeztetés, és a FOX és munkatársai által közzétett, fentebb ismertetett törzsfa korántsem tekinthető teljesen megalapozottnak. Kétségbe vonható pl., hogy a 16 S rRNS-szekvenciák térben és időben mindig egyenletes sebességgel változtak. Ezért a következő fejezetben az eukarioták eredetével foglalkozva másféle nézetek ismertetésére is sor kerül.

1.36.7 A törzsfa csúcsán a prokarioták legfejlettebb alakjai. A mixobaktériumok

Bár a Földön ma uralkodó soksejtű növényi és állati szervezetek sejtes organizációs szintje eukariota típusú, mégis azt mondhatjuk, hogy a közel 3 milliárd éves törzsfejlődésük során a prokarioták is eljutottak a soksejtűség szintjére. Igaz, a prokariota sejtorganizáció a szervezeti differenciálódásnak korántsem nyitotta meg olyan perspektíváit, mint az eukariotáké. A prokariotáknak különösen három csoportjában, az akti-



Actinomyces; Rothia,
Agromyces; Gordona



Actinoplanes



Ampullariella



Dactylosporangium



Planobispora



Planomonospora



Spirillospora



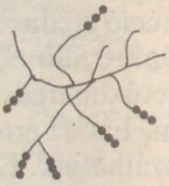
Streptosporangium



Dermatophilus



Nocardia



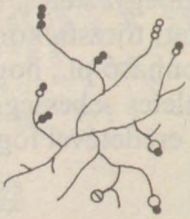
Micropolyspora



Micromonospora



Kitasatoa



Microellobosporia



Streptomyces



Streptoverticillium



Thermoactinomyces



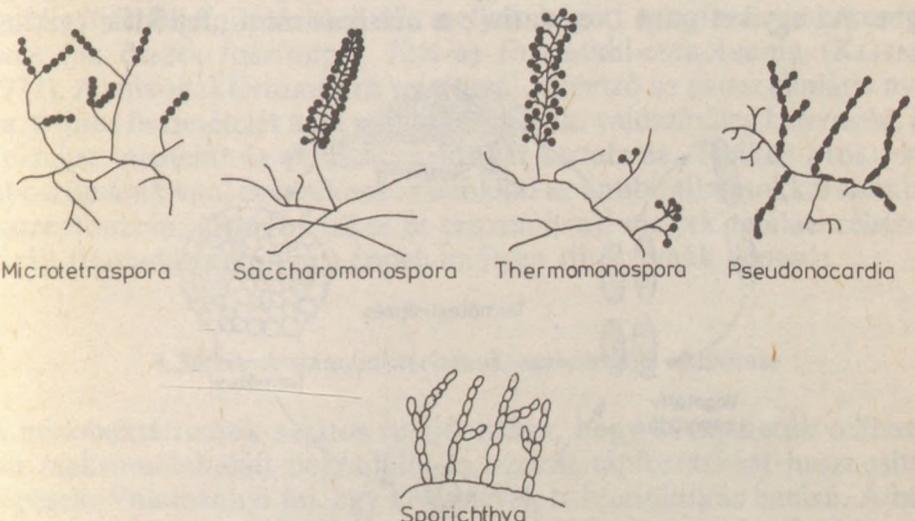
Actinomadura



Microbispora

nomiceták, a cianobaktériumok és a mixobaktériumok körében észlelhető a fejlődés nagyfokú progresszivitása. A sugárgombáknál megfigyelhető harántfalakkal nem tagolt, finom, átlag 1 μm vastagságú, elágazó hifafonalak alkotta szövedék, a micélium, valójában egyes magekvivalensek ellenőrzése alatt álló és néhány mikron hosszúságú hifaszakaszra kiterjedő, nem állandósult sejtekvivalensek sokaságából áll. E hifaszövedékben, melyet gyakorta szubsztáthifa- és léghifaszövedékre tagolhatunk, különböző bonyolódottságú szaporítóképletek, sporofórok jelennek meg *(192. ábra)*. Ezek morfológiájukat tekintve nagy hasonlatosságot mutatnak az eukariota mikrogombák különböző szaporítóképleteivel, ami a két mikrobacsoport evolúciójában és differenciálódásában felismerhető, nagyfokú párhuzamosságra utal.

A cianobaktériumok rendkívül differenciált sejt- és telepszintű organizációját az 1.27.1 alfejezetben már tárgyaltuk. E helyen röviden a prokarioták talán legfejlettebb csoportját, a mixobaktériumokat mutatjuk be. Az evolúciós ranglétrán elfoglalt előkelő pozíciójukat talán legkézenfekvőbben genomméretük igazolja. Amíg az *Escherichia coli* genomja – jóllehet e szervezet a baktériumok között maga is a legfejlettebbek közé tartozik – $2{,}5 \times 10^9$ dalton molekulasúlyú, addig pl. a *Myxococcus xanthus*é $8–9 \times 10^9$ dalton, ill. kb. 10^7 bázispár. Ez egyúttal a legnagyobb



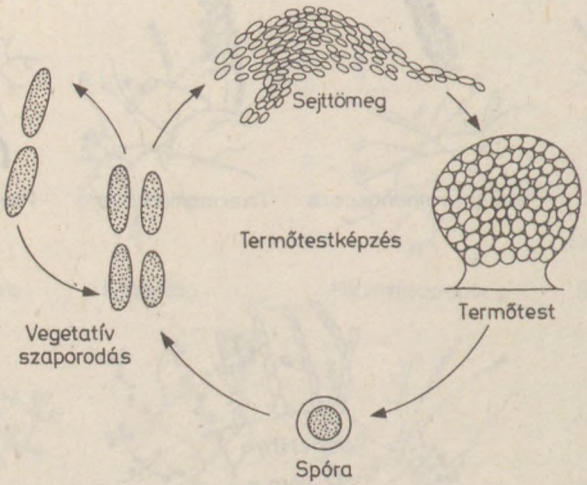
◄ *192. ábra*

A sugárgombák mint a prokarioták egyik legfejlettebb csoportja. A különböző nemzetségek mikroszkópos morfológiájának vázlatos bemutatása. CROSS és GOODFELLOW (1973) adatainak figyelembevételével.

genom, amit baktériumok között valaha is mértek (WALLACE és MOROWITZ, 1973). A *Streptomyces* genom nagysága SZABÓ Gábor professzor szerint (írásbeli közlés) $1{,}3 \times 10^{-14}$g. Minthogy a *Bacillus subtilis* genomja, azé a szervezeté tehát, mely a spóraképzés kapacitásával is rendelkezik, megközelítően az *E. coli*éhoz hasonló méretű, ezért KAISER és MANOIL (1979) feltételezik, hogy a mixobaktériumok nagyszámú génje nem csupán sporulációjukhoz, hanem bonyolult funkcióikhoz és a termőtestképzéshez is szükséges.

1.36.8. A mixobaktériumok fejlődési ciklusa

A mixobaktériumok heterotróf, GRAM-negatív pálcikák, csúszó mozgásúak, fejlődési ciklusukban többsejtű állapot ismerhető fel, képesek komplett mikrobiális sejtek degradálására, agar felszínén lapos, pigmentált, szétterjedő kolóniákat képeznek. A természetben talajokban és bomló növényi maradványokon fordulnak elő. Fejlődési ciklusuk keretében *(193. ábra)* sejtaggregáció, továbbá soksejtű, spórákkal telt termőtestek képződése figyelhető meg. A mixobakteriális termőtestek világos színű, néhány tizedmilliméter átmérőjű képletek, melyek fakérgen, bomló növényi maradványokon és állati ürülékeken jelennek meg. Ezek a termőtestek morfológiailag nagyon változatosak és komplexek. A mixobaktériumok szaporodása két egymáshoz kapcsolódó ciklusban megy végbe. Az egyiket mint „vegetatív", a másikat mint „fejlődési" ciklust



193. ábra

Az ún. „vegetatív" és a „fejlődési" ciklusok egymásba kapcsolódása a mixobaktériumoknál (Vázlat)

különböztetik meg *(lásd 193. ábra)*. Az elsőben a vegetatív sejtek a legtöbb baktériumhoz hasonlóan harántirányú kettéhasadással osztódnak. Megfelelő inger hatására a fejlődési ciklusra térnek át, melynek során sokezer sejt verődik egybe, jellemző alakú termőtestet alkotnak és egyenként mixospóráknak nevezett, nyugvó sejtekké alakulnak át. A mixospórák később kicsíráznak és belőlük vegetatív sejtek jönnek létre. A termőtestben különben a mixospórák, inaktív állapotban vesztegelve, hosszú időn át képesek élni. A mixobaktériumoknál – úgy tűnik – a fejlődési ciklust az éheztetés kezdeményezi és elősegíti. Ezek a szervezetek a soksejtűekhez annyiban hasonlítanak, hogy táplálkozásukat, rajzásukat és termőtestképzésüket sejtcsoportokká szerveződve végzik. A termőtestek kivételével azonban ezek a a sejtcsoportok csak lazán, bár ennek ellenére nagyfokú együttműködési alapon organizáltak.

1.36.9. A mixobaktérium-sejt kültakarója

A mixobaktériumok sejtjeiben gyakran lehet polifoszfátokat és poliszacharidokat mint citoplazmatikus zárványokat megfigyelni. Sejtfalukat tipikus peptidoglikán alkotja. Más eubaktériumokkal szemben azonban faluk a sejtet nem folyamatos rétegként veszi körül, hanem azt csak helyenként, különálló foltok alakjában takarja (KAISER és MANOIL, 1979). A *Myxococcus fulvus*nál a citoplazmamembrán szárazanyagának egynegyede foszfolipidekből áll, melyek között a legfontosabb komponens (az összes foszfolipid 72%-a) foszfatidil-etanol-amin (KLEINIG, 1972). A mixobaktériumokra rendkívül jellemző az extracelluláris nyálka. Sajnos összetételét nem nagyon ismerjük, valószínűleg heterogén, így lipideket, proteint és poliszacharidokat tartalmaz. Tipikus prokariota riboszómájuk van, és érzékenyek azokkal az antibiotikumokkal szemben (sztreptomicin, kloramfenikol és eritromicin), melyek találati célstruktúráit (támadáspontjukat) éppen az ilyen riboszómák képezik.

1.36.10. A mixobaktériumok enzimatikus aktivitása

A mixobaktériumok sajátos tulajdonsága, hogy környezetük oldhatatlan makromolekuláit degradálni és azokat tápforrásként hasznosítani képesek. Valamennyi faj, egy kivételével, bakteriolitikus hatású. A baktériumokat és egyes gombákat nagyon különböző extracelluláris enzimekkel lizálják, majd alkotóelemeiket sejten kívül degradálják. Egy fajuk, a *Polyangium cellulosum* viszont cellulolitikus hatású. A bakteriolitikus enzimek bakteriolizinek, proteázok, nukleázok és lipázok. Szá-

mos lítikus enzimük a baktériumsejtfal mukopeptidjének glikozidikus kötéseit hasítja. A *Myxococcus virens*ből (HASKÅ, 1972) két endo-N-acetil-glükóz-amidázt izoláltak, melyek az N-acetil-glükóz-amin 1. szénatomja és az N-acetil-muraminsav 4. szénatomja közötti glikozidikus kötést bontják. A mixobakteriális fallizáló enzimek között amidázokat is találunk, melyek a peptidoglikán glikánláncai között a polipeptid kereszthálózatban különböző amidkötéseket hasítanak. A mixobaktériumok baktériumokat tartalmazó közegeken sokkal gyorsabban és intenzívebben szaporodnak, mint konvencionális bakteriológiai táptalajokon.

1.36.11. A mixobaktériumok termőtestképzése

Csúszással mozognak, mely a transzlokációnak olyan módja, mely köztifelületekhez, így talajrészecskék, agarlemez, üveg stb. felületéhez kötött. Csillóik nincsenek és sejtjeik csúszásuk alkalmával nem forognak. Rajzásnak náluk azt a jelenséget nevezzük, amikor száz és ezernyi mixobaktériumsejt lazán társulva együttesen mozog. Feltételezik, hogy a rajokat kemotaxis tartja össze, esetleg a sejtek közötti kontaktus az, ami valamilyen módon elősegíti a sejtek mozgását. A termőtestképzés során a sejttömegek mozgásba jönnek és együttes alaki változáson mennek keresztül. Ilyenkor előbb kis dombocskák formálódnak. Ezeket kétféle típusú folyamat alakítja. Az egyik szabályos sejtáram, melyben az egyes sejtek egymással párhuzamosan, dombocska közepe felé haladnak. A másik a sejtek sokaságának az egész terület felszínére kiterjedő, koordinált, ritmusos mozgása. A terület centrumából ilyenkor a szegélyek felé egy vagy két ponton hullámsorok indulnak. Ahol két hullám egymást metszi, ott a vízfelszín hullámaihoz hasonlóan interferálnak. Ezek a hullámok tulajdonképpen az aggregációs folyamatokhoz tartoznak, hosszuk és amplitúdójuk általában 0,1 mm körül van. A hullámok utolsó maradványait az érési folyamatot befejezett sejtek megmerevedett nyálkatömegén bordák alakjában lehet megfigyelni. Azoknak a szabályos morfológiai változásoknak a hátterében, melyek a termőtestképzéshez vezetnek el, biokémiai változások szabályos szekvenciái állnak. Így pl. a termőtestképzés során nagy mennyiségben termelődik egy 23 000 daltonú polipeptid, az ún. „protein S", mely a vegetatív sejtekből nem mutatható ki. Az érés vége felé, midőn a sejtek már termőtestszerű struktúrákba aggregálódtak, ezekben megindul a spóraképződés. Érdekes, hogy ha egyes mixobaktériumok tápanyagokban gazdag tenyészetéhez glicerint nagy koncentrációban adunk (pl. 0,5 M-ben), úgy azokban a sejtek gyorsan és szinkron módon spórákká alakulnak.

Ma feltételezik, hogy csúszó mozgásuk és fejlődési ciklusuk annak következménye, hogy tápforrásként oldhatatlan makromolekulákat hasznosítanak. Minthogy ezek a makromolekulák, mint amilyen a proteineket és a peptidoglikánt tartalmazó sejtfal is, a talajokban szilárd felszínekre adszorbeálódnak, az a szervezet, mely az ilyeneket hasznosítja, sokkal hatékonyabb lehet, ha a felszíneken csúszásra képes. A mixobaktériumok rajzása hatékony eszköz a nagy sejtdenzitások fenntartásához. A termőtestképzés az életciklus sejtkonzerváló fázisának fogható fel, mely a diszperzáló és táplálkozó vegetatív fázissal váltakozik. Ebből a szempontból a termőtesten belül található mixospórák az új, nagy sűrűségű raj képzésének potenciálját jelentik.

1.37. Az eukarioták eredete

Bár az élet eredete több mint 3 milliárd évre nyúlik vissza, mégis a kambriumot megelőző hosszú prekambriális időszak legnagyobb részében csupán egyszerű mikroszkópos szervezetek léteztek, olyanok, melyek többségének mérete és alakja a modern baktériumokéhoz volt hasonló (La Barbera, 1978).

A prekambriális evolúció kiemelkedően fontos történése az oxigéntermelő, fotoszintetizáló cianobaktériumok megjelenése volt. Az oxigén lényegében a fotoszintézis melléktermékeként jött létre és halmozódott fel az atmoszférában, ahol a biológiai adaptációk új ciklusát kezdeményezte. A kialakuló oxidatív légkörhöz alkalmazkodó szervezetek az oxigén jelenlétét először legfeljebb csak tolerálták. Később már mint terminális elektronakceptort aktívan be is vonták anyagcseréjükbe, és segítségével hatékonyabb energiaszerző mechanizmusok fejlődtek. A prekambrium másik döntő fontosságú állomása az eukarioták, vagyis olyan sejttípusok megjelenése volt, melyek már elkülönült, membránnal körülvett maggal rendelkeztek. Az ilyen sejtek sokkal magasabb szintű organizációt képviselnek. Így pl. a diploid állapotot eredményező szexuális reprodukció számos előnyével élve az életképesebb genetikai kombinációk sokkal nagyobb számát állítják elő, és a genetikai hibák kiküszöbölésének is tökéletesebb mechanizmusaival rendelkeznek. Mivel a szexuális reprodukció az új adaptációk gyors szóródását is biztosítja, meggyorsult az evolúciós változások sebessége is. Azok a nagy, komplex, soksejtű és gyorsan diverzifikálódó alakok, melyek a kambrium kezdetétől különösen nagy számban terjedtek el, kivétel nélkül membránnal határolt nukleuszt tartalmazó sejtekből épültek fel (Schopf, 1978).

1.37.1. Az Élet eredetének paleontológiai bizonyítékai

Az Élet fejlődéstörténetét a kambrium időszakának kezdetétől többnyire az üledékes kőzetek fosszíliái alapján rekonstruálhatjuk. A fosszilis maradványoknak, miként az ezeket tartalmazó üledékeknek, kronológiai sorrendje és földrajzi kontinuitása van és a különböző geológiai formációkon belül azonosíthatók. A fosszíliák meghatározott, jellemző összetételű társulásait tartalmazó rétegek segítségével geológiai időbeosztásra, korok, periódusok és korszakok elkülönítésére van lehetőség.

A kőzetekből felépült és különböző korokat képviselő geológiai rétegeket elválasztó határvonalak tekintetében a „legdrámaibb" az, amely a kambriumot a korábbi (prekambriális) idők rétegeitől elválasztja. A geológiai időknek azt a tizenegy nagy periódusát, amely a kambrium kezdetétől napjainkig eltelt, együttesen *phanerozoikum*nak nevezzük. Ez a szó görögből származik és az élet megnyilvánulásának korára utal. Az azt megelőző és a Föld keletkezéséig visszanyúló, hatalmas időtartamú kort egyszerűen prekambriumnak jelölik. A geológiai időskála viszonylagos és csupán a fosszíliák egymásutániságára alapít. Az abszolút kort magát, a radioaktív izotópok bomlásának konstans rátájából lehet kiszámítani. A Föld legkülönbözőbb területeiről származó kőzeteken végzett radioaktív izotópvizsgálatok alapján a phanerozoikum kora mintegy 570 millió évvel ezelőtt kezdődött. Ugyanezzel a módszerrel a Földet 4,6 milliárd évesnek becsülik. Eszerint a prekambrium időtartama mintegy 8-szor hosszabb lehetett, mint a phanerozoikumé. A prekambrium és a phanerozoikum első korszaka, a kambrium közötti határt élesnek tekintik. A kambrium rétegeiben tengeri növények és állatok (férgek, szivacsok, puhatestűek, trilobita ízeltlábúak stb.) fosszíliái bőven találhatók, a prekambriumében nem. Mindamellett primitív fosszilizálódott, állati maradványokat a prekambrium legfiatalabb rétegeiben is észleltek (La Barbera, 1978). Ezek között főleg különböző férgek és szivacsok szerepelnek, melyek együttesen olyan faunát alkotnak, mely a már uralkodóan héjakkal jellemezhető kambriumfaunától élesen eltér. Ilyen leletek azonban csak mintegy 100 millió év időskáláján jelentkeznek, ami a prekambrium teljes időszakának legfeljebb 4%-át teszi ki. Csak az 1950-es évek után derült ki, hogy fosszíliák a prekambrium sokkal idősebb kőzeteiben is előfordulnak. Ezek azonban minden esetben mikroszkopikus méretűek (Schopf, 1978; lásd még az 1.7. alfejezetet is).

1.37.2. Mikor jelenhettek meg az eukarioták?

Az utolsó húsz esztendőben már nyilvánvalóvá vált, hogy az élővilág legalapvetőbb felosztása nem az állatok és növények világáé, hanem a

pro- és eukariotáké (*lásd* 94. old.). Biokémiájukat, anyagcseréjüket, genetikájukat és intracelluláris organizációjukat tekintve a növények és állatok (eukarioták) nagyon hasonlóak. Alapvetően különböznek azonban a baktériumoktól és a cianobaktériumoktól (prokarioták). Az eukariotákban a DNS-t sejtenként nem egy, hanem mindig több kromoszóma is képviseli és ezek nem szabadon vannak a citoplazmában, hanem diszkrét maggá membrán zárja őket körül. A prokarioták ún. paraszexuális reprodukciója lényegesen különbözik a sokkal előnyösebb eukariota szexualitástól. Az eukariota sejtek általában nagyobbak (10–100 μm) a prokariotákénál (1–10μm), melyek túlnyomó többsége egysejtű, míg az eukarioták többsége nagy, komplex és soksejtű. Az eukariota sejtekben autonóm membránkötődésű organellumok (mitokondrium, kloroplasztisz) vannak. Az eukarioták nagyon kevés kivétellel obligát aerobok. A prokarioták aerobok vagy anaerobok. Az eukarioták nagymérvű oxigéndependenciája egyrészről, és a számtalan anaerob vagy fakultatív prokariota típus létezése másrészről, arra utalnak, hogy amíg a prokarioták ősei nagyon különböző oxigéntartalmú atmoszférában fejlődhettek, addig az eukarioták fejlődése már csak viszonylag konstans szintű és nagy oxigénkoncentrációjú légkörben történhetett (Towe, 1970; Schopf, 1978). Azt, hogy az eukarioták mindig aerobok lehettek, azt a rájuk jellemző mitotikus sejtosztódás is bizonyítja. Sok eukariota sejt képes ugyan átmenetileg oxigénhiányt is elviselni, sőt ilyenkor még bizonyos anyagcsere-funkciókat is betölthetnek, mitózisra azonban mindaddig, amíg az oxigénkoncentráció legalább egy bizonyos meghatározott szintet el nem ér, teljesen képtelenek.

Minthogy az eukarioták anyagcseréje a légköri oxigén jelenlététől elválaszthatatlan, feltételezhető, hogy megjelenésük is párhuzamos lehetett. Koruk fosszíliáik alapján is megítélhető, bár a mikroszkópos méretű, kövült őseukarioták tanulmányozása komoly nehézségekbe ütközik. Ha pl. egy kövület egyértelműen eukariotának is minősíthető, még nem feltétlenül biztos, hogy ugyanakkor a rendelkezésre álló radioaktív izotóp-kormeghatározó módszerekkel pontos kora is megállapítható. Először is, az ilyen módszerekkel legjobb esetben is csak ± 5% pontossággal dolgoznak. Másodszor a kormeghatározásokat általában merevedési kőzetekben, vulkanikus lávákon végzik. A fosszíliák viszont üledékes kőzetekben találhatók. Következésképpen, éppen magát a fosszíliát tartalmazó réteg kora meghatározhatatlan. Ezért korukat csupán becsülik az őket tartalmazó rétegek felett és alatt elhelyezkedő merevedési kőzetek mért kora alapján.

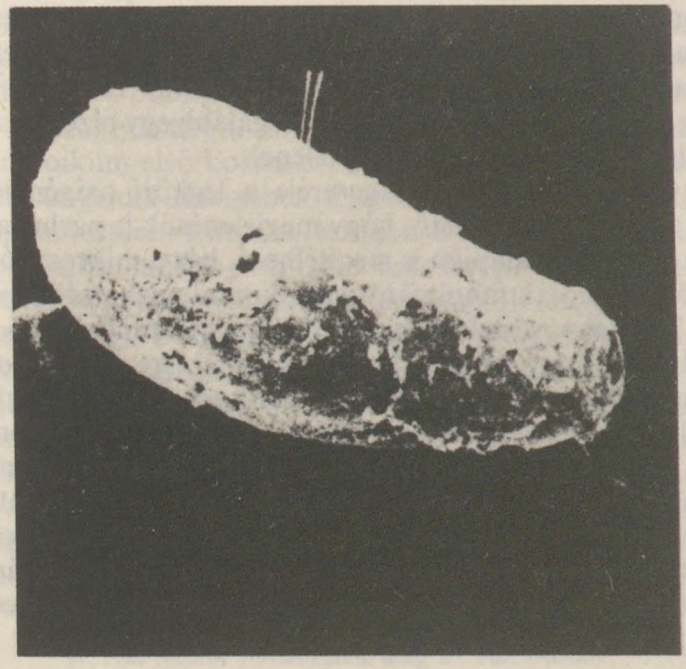
1.37.3. Az első eukarioták fosszilis maradványai

E nehézségek ellenére is ma már konkrét bizonyítékaink vannak az eukariota kövületek előfordulásáról a phanerozoikumnál jóval idősebb prekambriális rétegekből is *(194. ábra)*. E bizonyítékok kétfélék (SCHOPF, 1974; SCHOPF, 1975): **1.** Tipikus eukariota morfológiai jellemvonásokat, ill. organizációs szintet képviselő mikrofosszíliák. **2.** Csupán az eukariotákéra jellemző méretű és nagyságú sejtfosszíliák a prekambriumból. A legfontosabb bizonyító értékű leleteink (SCHOPF, 1975; WALTER és munkatársai, 1976; VIDAL, 1976; HORODYSKI és BLOESER, 1978; SCHOPF, 1978 stb.):

1. A modern gombákra, ill. a zöldalgákra emlékeztető, harántválaszfalakkal elkülönült sejtekből felépült, elágazó fonalak jelenléte a szibériai OLKHIN-formációknak megjelölt üledékekben, melyek korát 725 (680–800) millió évre becsülik.

2. Komplex, palack alakú mikrofosszíliák a keleti Grand Canyon KWAGUNT-formációjából. Koruk kb. 800 (650–1150) millió év.

3. Intracelluláris membránokat és organellumokra emlékeztető kicsiny, sűrű testecskéket tartalmazó egysejtű algafosszíliák Közép-Auszt-



194. ábra

Prekambriális mikrofosszíliák között előforduló ősi eukariota sejtek egy alakja (agyagpala, Grand Kanyon, 800 millió éves). Morfológiailag már minden ismert prokariotánál összetettebb

rália BITTER SPRINGS-formációjából. Koruk megközelítően 850 (740–950) millió év.

4. Ugyancsak a BITTER SPRINGS-kőzeteiben megfigyelt, spóraszerű sejtek négyes, tetraéderes konfigurációjú csoportjai, melyek vagy mitózissal, vagy meiózissal jöhettek létre.

5. Több száz mikrométer átmérőjű, kétségtelenül eukariotának minősíthető, tüskés sejtek vagy algaciszták, melyek 950 millió (750–1050) éves szibériai agyagpalákból kerültek elő.

6. Széles átmérőjű és ritkán keresztfalakkal tagolt, némileg a zöld vagy az aranyzöld eukariota algákra emlékeztető, erősen elágazó fonalak Délkelet-Kalifornia BECK SPRING-dolomitjából (1300 millió év) és Dél-Ausztráliából (850 millió év).

7. Kettősfalú, gömbölyű mikrofosszíliák, melyek eukariota algák betokozódott állapotát képviselhetik, előfordulnak 1400 millió éves (vagy 1280–1450 millió éves) agyagpalákban (Észak-Ausztrália MCMINN-formáció).

8. Zöldalgák mitotikus osztódással létrejött, spórákra emlékeztető, kicsiny, négyes sejtcsoportjai Észak-Ausztrália AMELIA-dolomitjából. Megközelítően 1500 (vagy 1390–1575) millió évesek.

9. Kivételesen jól megőrzött és belsejükben autonóm membránkötődésű organellumokra emlékeztető struktúrákat tartalmazó, egysejtű fosszíliák, közel az AMELIA-dolomithoz, a BUNGLE–BUNGLE-dolomitból.

Mint látható, az eukariotaszerű fosszíliák legidősebbjei feltehetően valamivel kevesebb, mint 1500 millió évesek. Nagyszámú kövült sejttípust ismerünk még idősebb prekambriális üledékekből is, ezek azonban nem tekinthetők eukariotáknak. Így pl. a már említett 2 milliárd éves GUNFLINT- és BELCHER ISLAND-vasformációk (Kanada) kizárólag prokariotatípusokat tartalmaznak.

1.37.4. Az eukariota gombák legrégebbi maradványai

Érdemes itt megjegyezni, hogy az eukariota gombákat is viszonylag ősi csoportnak minősíthetjük. Hifafonal-fragmentjeiket és spóráikat a prekambriális üledékekből azonosítani is lehetett (TYLER és BARGHOORN, 1954; SCHOPF, 1970, SCHOPF, FORD és BREED, 1973 stb.). A gombák legismertebb nagyobb divízióit, teljes bizonyossággal a paleozoikumtól tartjuk nyilván (TIFFNEY és BARGHOORN, 1974). Legutóbb (1981) WAGNER és TAYLOR karbonkori növénymaradványokban olyan fosszilis klamidospórákat találtak, melyek mérete, alakja, falszerkezete és hifastruktúrája a *Glomus*-típusú modern „endomikorrhiza" gombákéval azono-

sítható. Az a tény, hogy karbonkori vaszkuláris növények föld alatti szerveiből jól megőrzött gombaklamidospórákat lehetett kimutatni, új megvilágításba helyezi a mikorrhiza evolúciójának kérdését is.

1.37.5. Pro- és eukariota fosszíliák elkülönítése morfológiai alapon

Minthogy a pro- és eukarioták méreteiben bizonyos határok között átfedések vannak, ezért elkülönítésük pusztán nagyságuk alapján gyakran megoldhatatlan. Ezzel szemben a fosszíliák nagy számának nagyságrendi adataira támaszkodva már inkább valószínűsíteni lehet, hogy eukariota vagy prokariota sejtkövületekkel állunk-e szemben. A gömbölyű cianobaktériumok modern sejtjeinek 60%-a nagyon kicsi, 5 μm-nél kisebb átmérőjű. Csupán egy kevés fajnak van 20 μm-es sejtje, de 60 μm-nél egy sem nagyobb. Az egysejtű eukarioták, így a zöld- és a vörösalgák, sokkal nagyobbak. Ezek sejtnagyságrendje általában az 5 és a 60 μm átmérő közé esik, azonban a ma élő fajaik néhány %-a még 60 μm-nél is nagyobb, sőt egyesek az 1000 μm-t is elérik. SCHOPF (1978) 18 szélesen elterjedt, prekambriális, szedimentációs kőzettípusból származó 8000 fosszilis sejten összehasonlító méretanalízist végzett. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutott, hogy 100 μm-nél nagyobb, vagyis eukariota dimenziójú sejtek 1450 millió évesnél idősebb kőzetekben ismeretlenek. Az utóbbiakban mind a sekélyvízi sztromatolitos kőzetek, mind a parttól távoli vizekben létrejött agyagpalák esetében, csak prokariota méretű sejtkövületeket figyeltek meg. A modern prokarioták nál nagyobb sejtek (>60 μm) elsőnek az 1400 millió éves kőzetekben jelentek meg. Ezek algáknak minősíthetők és ökológiájukat tekintve inkább szabadon lebegő, mintsem szövedéket alkotó fajok lehettek, következésképpen főleg agyagpalákban, vagyis a mélyebb vizek fenéküledékeiben rakódtak le. Ilyen eukariota méretű fosszíliák néhány éve Kínából és a Szovjetunióból is ismeretesek. Legutóbb, több mint 100 μm átmérőjű sejtkövületeket Montana Newland mészköveiben, továbbá 600 μm-nél is nagyobb fosszilis sejteket az ausztráliai MCMINN-formációban fedeztek fel. Mindkettő kora kb. 1400 millió év. A fiatalabb prekambriális üledékekben még nagyobb sejtek vannak, melyek átmérője meghaladhatja az 1 mm-t is. Koruk az Utah-i és a szibériai lelőhelyek alapján 950 millió év, míg az észak-indiaiak 910–1150 millió évesek.

Az 1400 és 1500 millió évekkel ezelőtti időszak tehát mérföldkövet jelentett. Az ennél idősebb fosszíliák között eukariota típusúak nagyon ritkák, ill. nincsenek. A fiatalabbak között viszont számuk egyre gyarapodik. Emellett az eukariota típusok szétkülönülése azután, hogy e sejttípus először megjelent, már néhány százmillió éven belül viszonylag

gyorsan és széleskörűen ki is bontakozott. Egymilliárd évvel ezelőtt már lényegesen megnőtt az átlagos sejtméret, a morfológiai kompexitás és a faji diverzitás foka. Ezek a tények azt is mutatják, hogy az oxigéntől függő anyagcsere, mely még a legprimitívebb eukariotákban is már fejlettnek tekinthető, mintegy 1,5 milliárd évvel ezelőtt minden bizonnyal már működhetett.

1.37.6. Az ősbaktériumok az eukarioták ősei lennének?

Az eukariota anyagcsere eredetét illetően a 80-as évek derekán még mindig számtalan megoldatlan kérdéssel állunk szemben. Úgy tűnik, hogy jelenleg az élővilág három nagy birodalmának, az eukariotáknak, a prokariota ősbaktériumoknak és az ugyancsak prokariota valódi baktériumoknak a viszonyát kell elsősorban is biokémiai alapon tisztázni. Bár az 1980-ig általánosan kialakult nézet szerint az ősbaktériumok a prokarioták törzsfáján még a peptidoglikán sejtfal megjelenése előtt leágaztak, mégis VAN VALEN és MAIORANA (1980) azt az új gondolatot vetették fel, hogy az ősbaktériumok a törzsfának sejtfalt vesztett oldalágát képezik, és hogy közülük került ki az az ősi sejt is, mely szimbiotaként más baktériumsejteket magába zárva az első eukariota megjelenéséhez vezetett. Az eredeti sejtfal elvesztése többféle okból is megtörténhetett, így pl. a nagyobb mozgékonyság érdekében vagy energiatakarékosságból. Igaz, a legtöbb ősbaktérium ma már rendelkezik valamiféle fallal, amire szerintük csak utólag tehettek szert. A *Thermoplasma* (*lásd* 1.24. alfejezet) azonban véglegesen fal nélküli maradt. Ez utóbbi szervezet számos hasonlóságot mutat az eukariotákkal. Így pl. hisztonszerű proteinje van, mely a DNS nukleoszómaszerű kondenzációját biztosítja. Aktin- és miozinszerű proteineket tartalmaz, továbbá „mikrotestszerű respirációt" árul el. Plazmamembránját lefűzni képes, bár látszólag nem teljesen fejlett endocitózissal. Ilyen képességre feltétlenül szüksége van az olyan sejtnek, mely mások elnyelésére, ill. bekebelezésére képes. Az a tény pedig, hogy a *Thermoplasmá*nak izopreonoid-lipidekből álló ősmembránja van, VAN VALENt és munkatársát arra a feltevésre késztette, hogy az eukariota lipid a feltételezett ősi szimbiózis másik, nem *Thermoplasma*-típusú, unit membránnal rendelkező tagjától származhatott. Azt is lehetségesnek tartják, hogy a ma túlélő ősbaktériumok sajátos lipidjeiket és más tulajdonságaikat már csak azután fejlesztették ki, hogy körükből az ősi eukariota már divergált. A *Halobacterium* (*lásd* 1. 24. alfejezet) ez a másik ősbaktérium, mely sajátos, fényenergiával működő ATP-szintézist valósít meg, az eukariotákkal ugyancsak több hasonlóságot mutat. Így például a fénytranszdukáló pigmentje csaknem azonos a

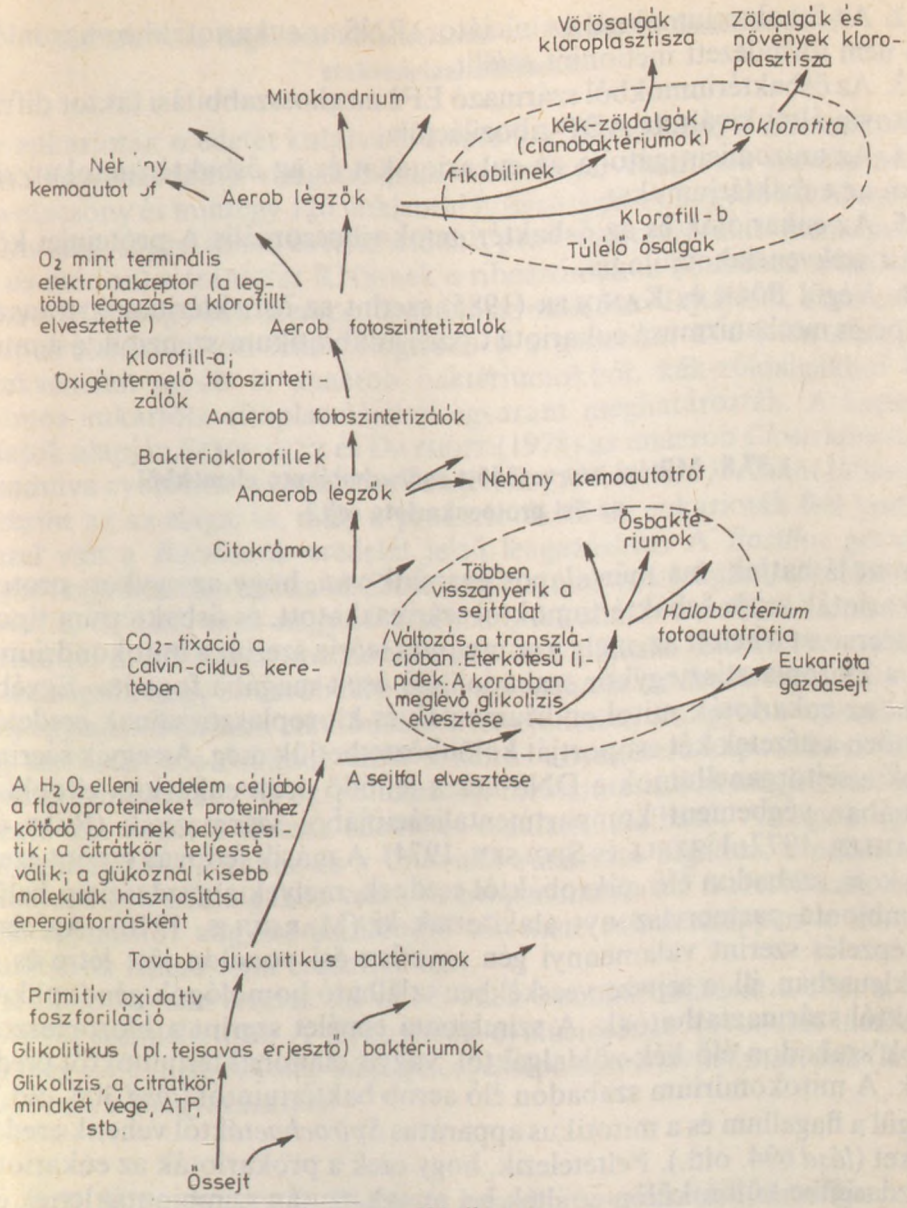
rodopszinnal. Iniciátor tRNS-e bizonyos tekintetben az eukariotákéhoz hasonló, és mint az eukariotáknál, nem formilezett metionint szállít. Egyetlen tanulmányozott riboszomális proteinje aminosav-szekvenciájának van egy olyan szakasza, mely az *Escherichia colié* és a *Saccharomyces* élesztőé közötti átmenetnek tekinthető. A *Halobacterium*ból olyan ferredoxint is kimutattak, mely a növényekéhez nagyon hasonlít és sejtfalát olyan glikoprotein alkotja, melyhez hasonló eukarioták sejtfalában is előfordul.

Az ősbaktériumokban a citrátkör valamennyi enzime jelen van, ha nem is együtt, ugyanabban az egy fajban. Tény azonban az is, hogy az ősbaktériumoknál a transzláció sok tekintetben egyedülálló megoldásokkal jellemezhető (Woese és munkatársai, 1978).

1.37.7. Az ősbaktérium→eukariota leszármazási vonal újabb bizonyítékai

A prokarioták itt vázolt és feltételezett filogenezisét, mely az eukarioták eredetének kérdését is teljesen új fénybe helyezi, Van Valen és Maiorana (1980) után a *195. ábrán* mutatjuk be. Ugyancsak 1980-ban Kessel és Klink arra a nagyon fontos megállapításra jutottak, hogy a prokarioták és az eukarioták között a diftériatoxin reakciója alapján is éles különbséget lehet tenni. Ez a toxin az adenozin-difoszfát-ribóz és az EF2 eukariota peptid meghosszabbítási faktor kovalens kötését katalizálja, ugyanakkor a kötődést a homológ prokariota EF-G-faktorhoz már nem. A diftériatoxin az ősbaktériumok meghosszabbítási faktorának ADP-ribozilációját is katalizálja. Ebben a tekintetben ezt a faktort is EF2 típusúnak jelölték meg. Feltételezik, hogy az ADP-ribozilálható struktúra, mely a meghosszabbítási folyamatban alapvető fontosságú, az evolúció folyamán már nagyon korán kialakult.

1981-ben a termoacidofil ősbaktériumok egy új csoportját fedezték fel. Ezek a szervezetek *(Thermoproteales)* és képviselőjük a *Thermoproteus tenax,* továbbá a már korábbról ismert *Sulfolobus* és *Thermoplasma* együttesen anyagcseréjüket, továbbá DNS-dependens RNS-polimerázaikat tekintve különböznek az ősbaktériumok másik nagyobb csoportjától, a metanogénektől és a hozzájuk sorolható extrém halofilektől (Zillig és munkatársai, 1981). A *Thermoproteus tenax* anaerob, szulfátlégző, termoacidofil ősbaktérium, mely izlandi szolfatárákból került elő és nagyon sajátos összekötő rokonsági kapcsolatokat árul el egyrészt más termoacidofil ősbaktériumok, másrészt az olyan primitív eukarioták felé, mint amilyenek az élesztők is. E szerzők szerint a termoacidofilek és az élesztők RNS-polimerázának, különösen a polimeráz-A-nak nagyfokú hasonlósága határozottan arra enged következtetni, hogy ezek az



195. ábra

A prokarioták filogenezise VAN VALEN és MAIORANA feltételezése szerint (1980)

ősbaktériumok sokkal közelebb állnak az eukariotákhoz, mint a valódi baktériumokhoz. Szerintük az ősbaktériumok az alábbi eukariota jellemvonásokat árulják még el:

1. A *Sulfolobus* és az élesztők iniciátor tRNS-e közötti meglepő mérvű szekvenciahomológia.

2. Az ősbaktériumoknál az iniciátor tRNS az eukariotákhoz hasonlóan nem formilezett metionint szállít.

3. Az ősbaktériumokból származó EF2 meghosszabbítási faktor difteriatoxin által kiváltott ADP-ribozilációja.

4. Az anizomicin gátolja az eukariotákat és az ősbaktériumokat, de nem az eubaktériumokat.

5. Az eukarioták és az ősbaktériumok riboszomális A-proteinjei közötti szekvenciahomológia.

6. Végül BÖCK és KANDLER (1985) szerint az ősbaktériumok transzkripciós mechanizmusa eukariota típusú antibiotikum-szenzibilitást mutat.

1.37.8. Miként szerveződött endoszimbionta elemekből az ősi protoeukariota sejt?

Amint láthatjuk, ma már alapos gyanúnk van, hogy az egykori protoeukarioták sejtje ősbaktériumoktól származhatott, és ősbaktérium típusú szervezet lehetett az, mely a szimbionta teória szerint a mitokondrium, ill. a kloroplasztisz egykor szabadon élő őseit magába fogadta. Egyébként az eukarioták mitokondriumainak és kloroplasztiszainak eredetét illetően a nézetek két csoportját különböztethetjük meg. Az egyik szerint ezek a sejtorganellumok a DNS-nek a fejlődő protoeukariota citoplazmájában végbement kompartmentalizációjából származnak (RAFF és MAHLER, 1972; UZZELL és SPOLSKY, 1974). A másik felfogás szerint ezek egykori, szabadon élő mikrobáktól erednek, melyek a gazdasejten belül szimbionta partnerviszonyt alakítottak ki (MARGULIS, 1970). Az első elképzelés szerint valamennyi gén egyetlen ősi vonalon jött létre és a nukleuszban, ill. a sejtszervecskékben található homológok génduplikációktól származtathatóak. A szimbionta elmélet szerint a kloroplasztiszok szabadon élő kék-zöldalgáktól, vagyis cianobaktériumoktól erednek. A mitokondrium szabadon élő aerob baktériumtól (*lásd* 305. old.), végül a flagellum és a mitotikus apparátus *Spirochaeta*któl vehetik eredetüket (*lásd* 694. old.). Feltételezik, hogy ezek a prokarioták az eukariota gazdasejtbe külön-külön épültek be, annak azután szimbiontái lettek és vele párhuzamosan fejlődve sejtszervecskékké váltak. Ennek a teóriának az értelmében azonban a mitokondrium és a kloroplasztisz génjei az egykori szabadon élő prokariota alakok genomjából származhattak. A sejtszervekké vált prokariotáknak mégis élhetnek szabadon élő rokonai, és összehasonlító vizsgálatokkal e rokonságot fel is lehetne deríteni, amint arra már a mitokondrium és a *Paracoccus* relációjában a citokróm-c szerkezetekre alapítva jó példát is láthattunk (*lásd* 274. old.).

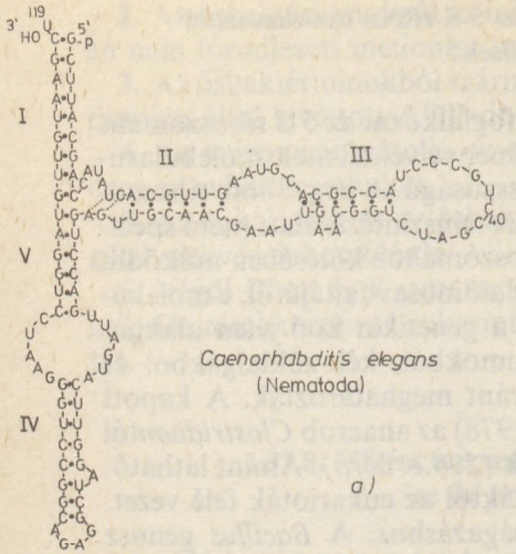
1.37.9. Mire engednek következtetni az 5 S rRNS összehasonlító szekvenciaanalízisek?

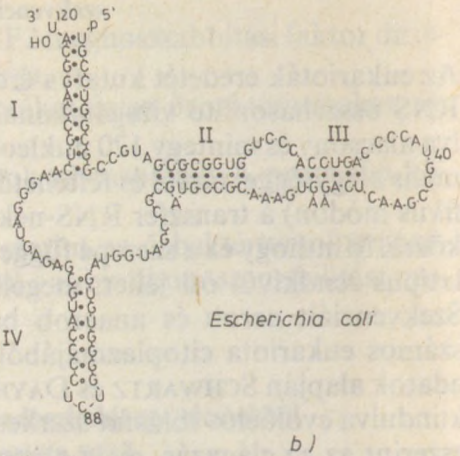
Az eukarioták eredetét kutatva érdemes foglalkozni az 5 S riboszomális RNS összehasonlító vizsgálatainak eredményeivel. Ennek molekulasúlya alacsony és mintegy 120 nukleotid hosszúságú. A nagyobbik riboszomális alegységgel társul és feltehetően a proteinszintézis alatt (nem specifikus módon) a transzfer RNS-nek a riboszómához kötésében működik közre. Minthogy ez a szerepe független az aminosav fajtájától, e molekulatípus rendkívül ősi lehet, megelőzheti a genetikai kód jelen alakját. Szekvenciáit aerob és anaerob baktériumokból, kék-zöldalgákból és számos eukariota citoplazmájából egyaránt meghatározták. A kapott adatok alapján SCHWARTZ és DAYHOFF (1978) az anaerob *Clostridium*tól kiindulva evolúciós törzsfát szerkesztettek *(196.e. ábra)*. Amint látható, eszerint az az elágazás, mely a prokariotáktól az eukarioták felé vezet, közel van a *Bacillus*ok eredetét jelző leágazáshoz. A *Bacillus* genusz egyes tagjaihoz hasonlóan az *Escherichia* is, melynek leágazása az előbbit követte, de attól nem nagy távolságban, fakultatív aerob, és mind fermentatív, mind légzési mechanizmussal rendelkezik. Eltekintve attól a lehetőségtől, hogy az aerob respiráció a *Bacillus* és az *Escherichia* vonalakon egymástól teljesen elkülönülve is létrejöhetett, a nagyobb valószínűség szerint közös ősüknek ezzel a kettős anyagcsere-kapacitással már rendelkeznie kellett. Az oxigént termelő fotoszintetizálók megjelenéséhez vezető két vonal a törzsfa ellentétes oldalain található. Az egyik ág a tanulmányozott rozshoz és a *Chlorella* eukariota algához, a másik az *Anacystis* kék-zöldalgához vezet. A citoplazmatikus 5 S rRNS-szekvenciák egymástól nagyon elkülönülő története mindenképpen a kloroplasztiszok szimbionta eredetére utal.

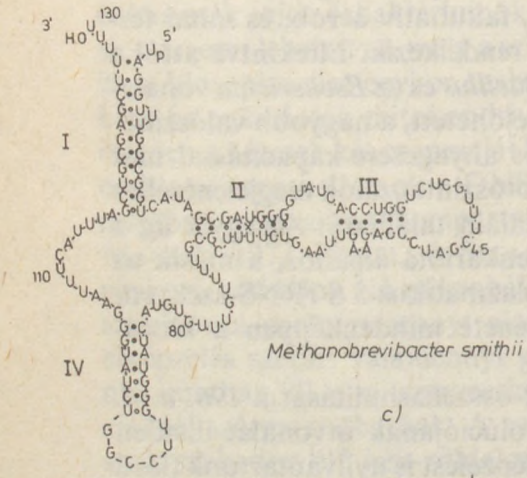
Különböző szervezetek 5S rRNS-ének összehasonlítását a *196. a.-d. ábrákon* szemléltetjük. A riboszómák evolúciójának útvonalát illetően ma még több, nem teljesen bizonyított elképzelést is nyilvántartunk (lásd a *196. ábra* magyarázatát).

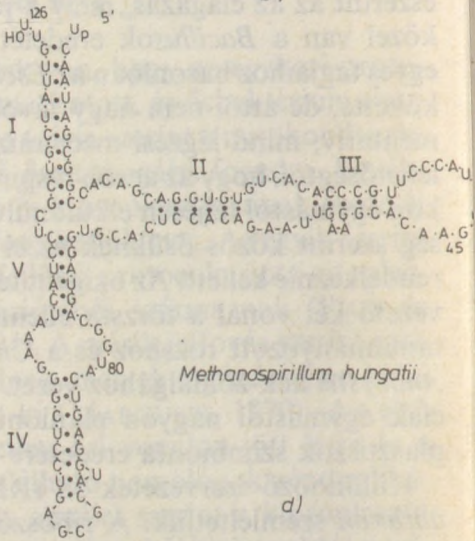
1.37.10. SCHWARTZ és DAYHOFF komplex szerkesztésű törzsfája

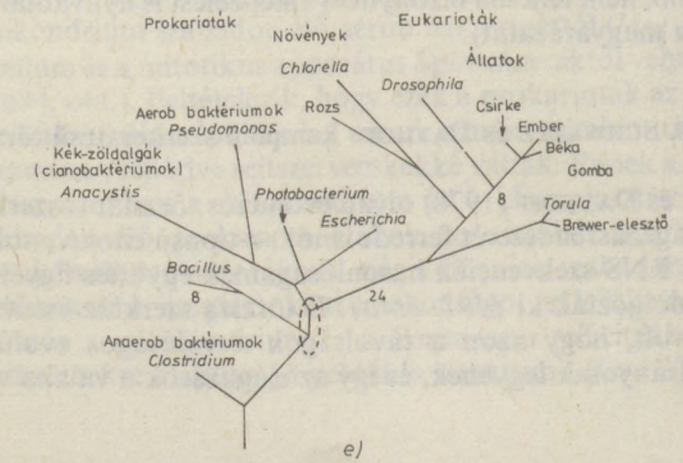
SCHWARTZ és DAYHOFF (1978) olyan evolúciós törzsfát is szerkesztettek, melynek elágazásrendszerét ferredoxinok, c-típusú citokrómok és 5 S riboszomális RNS-szekvenciák hasonlóságainak együttes figyelembevétele alapján dolgozták ki *(197. ábra)*. E törzsfa szerkesztésénél alapvető szempont volt, hogy azon a távolságok a valóságos evolúciós utak hosszával arányosak legyenek, és így az elágazások a valaha végbement


Caenorhabditis elegans
(Nematoda)
a)


Escherichia coli
b)


Methanobrevibacter smithii
c)

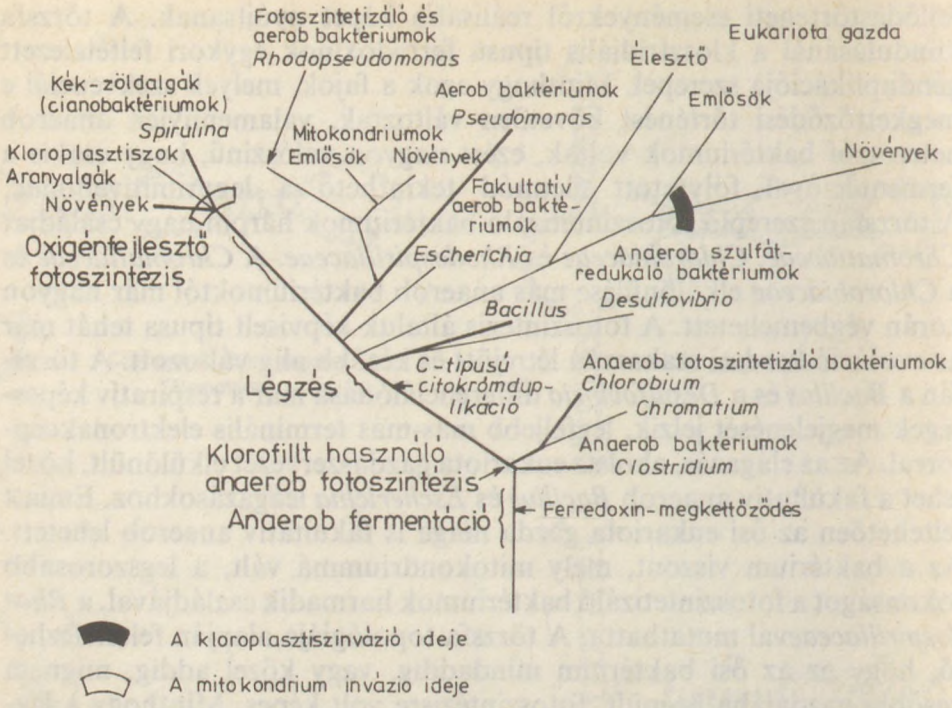

Methanospirillum hungatii
d)


Prokarioták
Növények
Állatok
Eukarioták
Chlorella
Drosophila
Aerob baktériumok
Pseudomonas
Rozs
Csirke
Ember
Béka
Gomba
Kék-zöldalgák
(cianobaktériumok)
Anacystis
Photobacterium
Escherichia
Torula
Brewer-élesztő
Bacillus
8
24
Anaerob baktériumok
Clostridium
e)

fejlődéstörténeti eseményekről reálisabb képet nyújtsanak. A törzsfa kiindulásánál a klosztridiális típusú ferredoxinok egykori feltételezett génduplikációja szerepel. Minthogy azok a fajok, melyek szekvenciái e megkettőződési történést követően változtak, valamennyien anaerob heterotróf baktériumok voltak, ezért nagyon valószínű, hogy csakis a fermentációval folytatott életmód tekinthető a legprimitívebbnek. A törzsfán szereplő fotoszintetizáló baktériumok három nagy családja: *Chromatiaceae, Chlorobiaceae* és *Rhodospirillaceae*. A *Chromatiaceae* és a *Chlorobiaceae* elkülönülése más anaerob baktériumoktól már nagyon korán végbemehetett. A fotoszintézis általuk képviselt típusa tehát már az evolúció kezdeti szakaszán létrejött és később alig változott. A törzsfán a *Bacillus* és a *Desulfovibrio* differenciálódása már a respiratív képességek megjelenését jelzik, legfeljebb más-más terminális elektronakceptorral. Az az elágazás, ahol az eukariota gazdaszervezet elkülönült, közel lehet a fakultatív anaerob *Bacillus* és *Escherichia* leágazásokhoz. Emiatt feltehetően az ősi eukariota gazda maga is fakultatív anaerob lehetett. Az a baktérium viszont, mely mitokondriummá vált, a legszorosabb rokonságot a fotoszintetizáló baktériumok harmadik családjával, a *Rhodospirillaceae*val mutathatta. A törzsfa topológiája alapján feltételezhető, hogy ez az ősi baktérium mindaddig, vagy közel addig, mígnem későbbi gazdájába beépült, fotoszintézisre volt képes. Minthogy a legtöbb eukariotában egyetlen citokróm-c található, helyesnek látszik feltételezni, hogy ennek a beépülő protomitokondriumnak az aerob légzési anyagcseréje sokkal hatékonyabb lehetett, mint gazdájáé, és hogy ez utóbbi azután primitívebb rendszerét el is vesztette. A kék-zöldalgák éppúgy, mint az eukarioták kloroplasztiszai, a víz fotolízisével állítanak elő redukálóképességet, és a rendelkezésre álló adatok szerint ez a képes-

◄ *196. ábra*

a-d) Különböző szervezetek 5S rRNS-ének másodlagos szerkezete. Az 5S adatokra alapítva a riboszómák evolúciója az alábbi utat követhette: eubakteriális riboszómák → ősbaktériumok I-csoportja → ősbaktériumok II-csoportja → eukariota citoplazmatikus riboszómák. Feltételeznek még egy másik utat is: ez a korai ősbaktériumokból indul ki és kétfelé ágazik. Az egyik út az I-típusú ősbaktériumoktól az eubakteriális riboszómákhoz vezet. A másik út a II-típusú ősbaktériumokon át a citoplazmatikus riboszómák felé. Az ábrán szereplő Nematoda 5S rRNS-e tipikus eukariota, az *E.coli*é jellegzetes eubakteriális 5S rRNS, a *M. smithii* 5S rRNS-e az ősbaktériumok I-es, míg a *M. hugatei* az ősbaktériumok II-es csoportjának képviselői (Fox és munkatársai, 1982). *e)* Az 5S riboszomális RNS-ek bázisszekvenciáinak összehasonlítása és a kapott hasonlóságok alapján az ún. mátrix-módszerrel szerkesztett törzsfa. Az elágazások és távolságok az evolúciós változásokat a végbement genetikai történések viszonylagos arányainak megfelelően szemléltetik. Az ábrán néhány oldalág hosszát a 100 maradékra esően felvett pontmutációk száma jelzi. Az elágazásoknak az a pontozottan körülhatárolt körlete, mely az eukarioták és a *Bacillus* genusz felé vezet, még nem kellően tisztázott. Az ábrán szereplő, de csak genusznevekkel megjelölt prokariota fajok, a *Clostridium pasteurianum*, a *Bacillus megaterium*, a *B. licheniformis*, az *Escherichia coli*, a *Pseudomonas fluorescens* és az *Anacystis nidulans*. A *Chlorella* megjelölés a *C. pyrenoidosa*ra vonatkozik (SCHWARTZ és DAYHOFF, 1978)



197. ábra

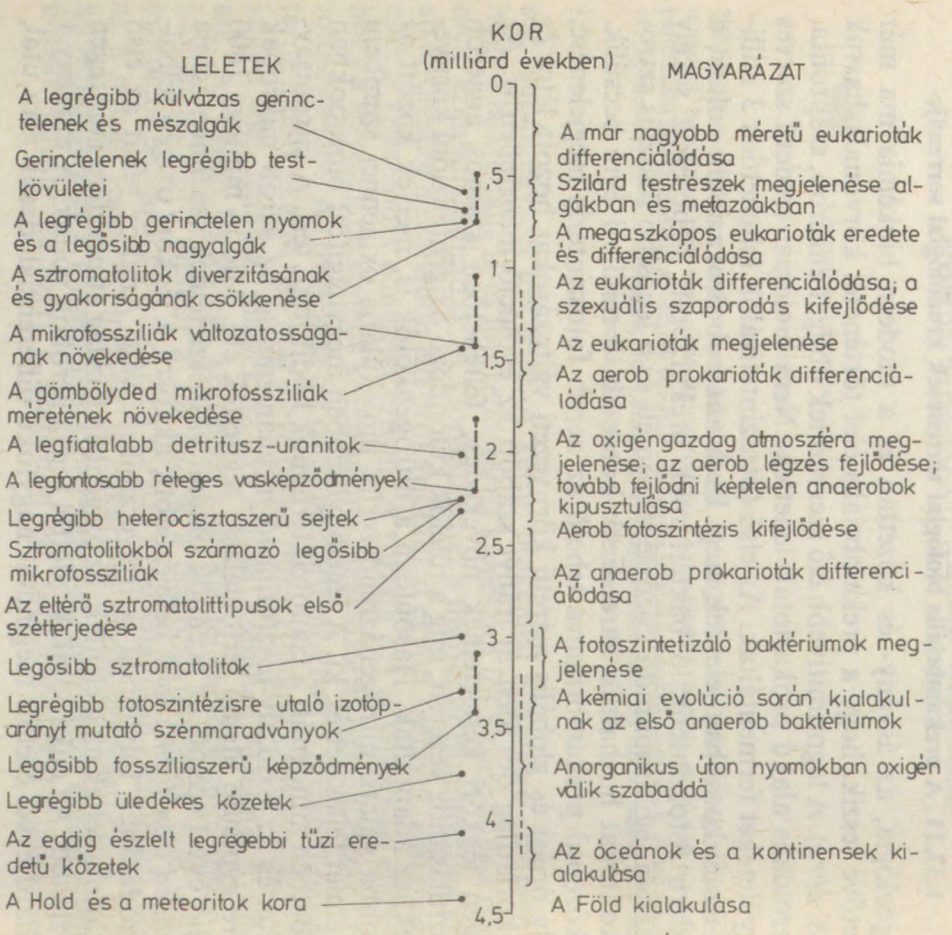
Több biokémiai bélyegre alapított evolúciós törzsfa. A vastagabb vonalak azt az elágazási rendszert mutatják be, melyet két vagy több tulajdonsággal kapcsolatban becsült evolúciós távolságok mátrixából szerkesztettek. A vékony vonalak csak egyes tulajdonságokra alapítanak. A szerkesztésnél figyelembe vett tulajdonságok: ferredoxinok, c-típusú citokrómok, 5S riboszomális RNS-szekvenciák (SCHWARTZ és DAYHOFF, 1978)

ség csupán egyszer jött létre. A két új biokémiai adaptáció eredménye, hogy a bakteriális II-es fotorendszerrel kiegészült fotoszintézis és a respiráció kombinálódhattak. A kloroplasztisz a mitokondriumhoz hasonlóan a törzsfán a szabadon élő prokariotákkal együtt szerepel, ami megint csak a szimbionta elméletet erősíti. A törzsfa azt is világosan elárulja, hogy a légzési lánc számos komponense megelőzte az oxigénfelszabadító fotoszintézist. Az oxigén az ősi cianobaktériumokban is intracellulárisan termelődött és ezekben már eleve olyan intracelluláris komponenseknek kellett jelen lenniök, melyek az oxidációval szemben védelmet nyújtottak. Az aerob légzés egy kezdetleges alakja feltehetően már abban az időben létrejött, amikor a *Bacillus*ok a cianobaktériumok felé vezető evolúciós pályáról letértek. Ez a törzsfa azt is világosan szemlélteti, hogy az a három leágazás, melyek az eukariota gazdaszervezethez, a mitokondriumhoz és a kloroplasztiszhoz vezettek, egymástól élesen elkülönülnek ugyan, de azért a szabadon élő prokariotákkal külön-külön

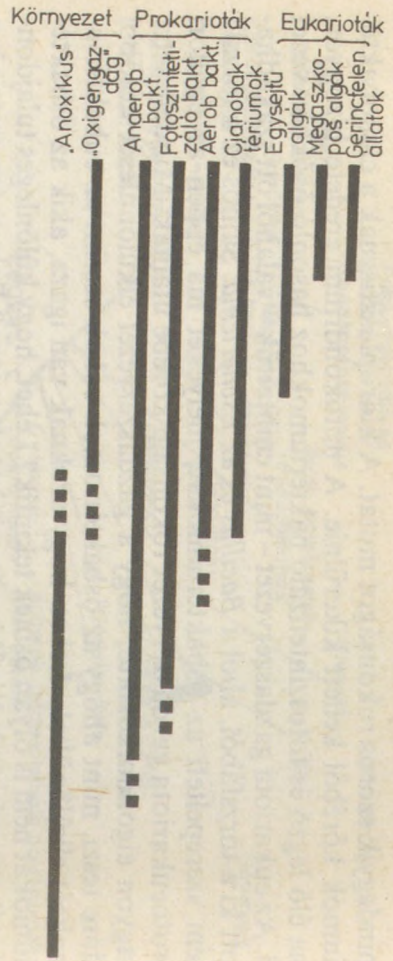
mindegyik szoros rokonságot mutat. A kloroplasztisznak a cianobaktériumok köréből kellett kikerülnie. A mitokondrium eredete bizonyos, ma élő légző és fotoszintetizáló baktériumokhoz hasonló ősökhöz vezet el. Az eukariota gazdaszervezet – mint említettük – valahol ott szakadhatott ki a törzsfából, ahol a *Bacillus* és az *Escherichia*. Sajnos ez a törzsfa nem szerepelteti az ősbaktériumokat, melyeket ma éppen az egykori protoeukariota gazdaszervezet rokonsági körébe utalnak. Mindenesetre nagyon elgondolkoztató, hogy a gazdaszervezet elkülönülését későbbi időre teszi, mint ahogy az ősbaktériumok sokak szerint az eubaktériumoktól elkülönültek. Lehet, hogy azoknak van igaza, akik az ősbaktériumokat nem is olyan ősinek tekintik? Lehet, hogy különleges tulajdonságaikat ezek csak később szerezték volna meg? Sajnos ismereteink e téren még nagyon hézagosak.

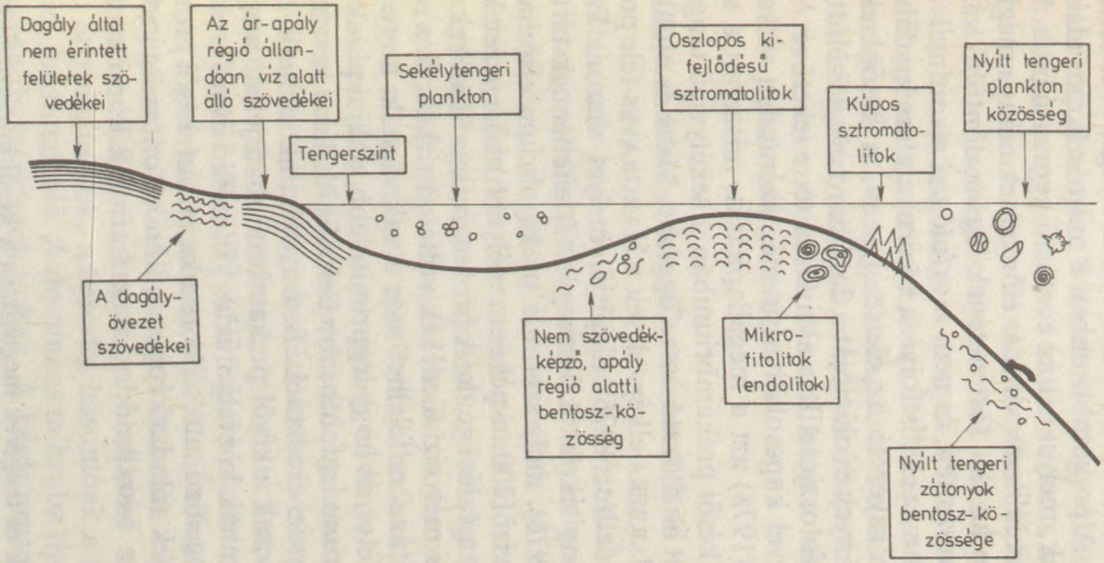
1.37.11. A prekambriális biológiai történések kronológiai sorrendje

A geológia, az ásvány- és kőzettan és a modern biokémia ma már lehetővé teszik, hogy a prekambriális élet történetét körvonalazhassuk (*198. ábra*). A legprimitívebb élő szervezetek obligát anaerob, szaprofita, szferoidális alakú prokarioták lehettek. Nem biológiai eredetű szerves vegyületeket fermentáltak. Az első fotoszintetizálók feltehetően 3 milliárd évnél korábban jelentek meg. Ezek anaerob prokarioták voltak, a modern fotoszintetizáló baktériumok prekurzorai. Többségük sekély vizekben, együttmaradó közösségekben élt és a legősibb fosszilis sztromatolitokat hozhatták létre. Ezek korát kb. 3 milliárd évre becsülik. A középső prekambriumra tehető az aerob fotoszintézis megjelenése, mely óriási és globális méretű környezeti változásokat hozott létre és gyakorlatilag döntően új irányt szabott az evolúció menetében is. Az oxigén légköri készleteinek növekedése feltehetően számos anaerob pusztulásához vezetett, míg a túlélők különböző oxigéntenziójú környezetekhez adaptáltak. Hasonlóan a nitrogénkötők is, melyek között az aerobbá váltak nitrogenázrendszerük molekuláris oxigénnel szembeni védelmét fejlesztették ki. A legelőnyösebben megvilágított biotópokban kezdetben mindenütt a cianobaktériumok hódítottak tért. A citromsavciklus és az oxidatív-foszforiláció mechanizmusai az aerob mikrobák egyre gyorsuló ütemű térfoglalását segítették elő. Midőn mintegy 1800 millió évvel ezelőtt az óceánok oxidált vaskészleteinek szedimentációja *(banded iron formation)* befejeződött, akkorra a légköri oxigén felhalmozódásának folyamata is irreverzíbilissé vált. Amikor tehát az első eukariota sejtek megjelentek, az oxigénben gazdag atmoszféra már régen létezhetett. Az eukarioták kezdettől fogva aerobok voltak. A mintegy 1 milliárd évvel ezelőtt megindult nagyfokú differenciálódásuk arra utal,


LELETEK
KOR
(milliárd években)
MAGYARÁZAT
A legrégibb külvázas gerinctelenek és mészalgák
Gerinctelenek legrégibb testkövületei
A legrégibb gerinctelen nyomok és a legősibb nagyalgák
A sztromatolitok diverzitásának és gyakoriságának csökkenése
A mikrofossziliák változatosságának növekedése
A gömbölyded mikrofossziliák méretének növekedése
A legfiatalabb detritusz-uranitok
A legfontosabb réteges vasképződmények
Legrégibb heterocisztaszerű sejtek
Sztromatolitokból származó legősibb mikrofossziliák
Az eltérő sztromatolittípusok első szétterjedése
Legősibb sztromatolitok
Legrégibb fotoszintézisre utaló izotóparányt mutató szénmaradványok
Legősibb fosszíliaszerű képződmények
Legrégibb üledékes kőzetek
Az eddig észlelt legrégebbi tűzi eredetű kőzetek
A Hold és a meteoritok kora
0
,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
4
4,5
A már nagyobb méretű eukarioták differenciálódása
Szilárd testrészek megjelenése algákban és metazoákban
A megaszkópos eukarioták eredete és differenciálódása
Az eukarioták differenciálódása; a szexuális szaporodás kifejlődése
Az eukarioták megjelenése
Az aerob prokarioták differenciálódása
Az oxigéngazdag atmoszféra megjelenése; az aerob légzés fejlődése; tovább fejlődni képtelen anaerobok kipusztulása
Aerob fotoszintézis kifejlődése
Az anaerob prokarioták differenciálódása
A fotoszintetizáló baktériumok megjelenése
A kémiai evolúció során kialakulnak az első anaerob baktériumok
Anorganikus úton nyomokban oxigén válik szabaddá
Az óceánok és a kontinensek kialakulása
A Föld kialakulása

a)


Környezet
Prokarioták
Eukarioták
„Anoxikus"
„Oxigéngazdag"
Anaerob bakt.
Fotoszintetizáló bakt.
Aerob bakt.
Cianobaktériumok
Egysejtű algák
Megaszkópos algák
Gerinctelen állatok



b)

198. ábra

a) A prekambriális evolúció legfontosabb történései kronológiai sorrendben (SCHOPF, 1978)
b) Az élő szervezetekkel legjobban benépesült földfelszíni környezetek és az üledékes kőzetek mikrofoszíliáinak vizsgálata alapján feltételezett élőlénytársulások megoszlása a késői proterozoikum folyamán (800 ± 100 millió évvel ezelőtt) KNOLL vázlata (1985) alapján

hogy a szexuális szaporodás valamilyen új típusú mechanizmusával rendelkezhettek. A következő 400 millió év alatt az eukarioták gyors típusgazdagodása a soksejtűek megjelenéséhez vezetett, melyek között nem egy már a mai modern növények és állatok előfutára volt. A prekambriumban az evolúció tempója és „stílusa" lényegesen eltért a későbbi phanerozoikumétól. A prekambriumban a mikroszkópos alakok és a prokarioták domináltak, melyeknél az evolúció gyorsaságát a diploiditással összekapcsolt szexuális szaporodás előnyeinek hiánya meglassította. A prekambriumban az élet történetének legsorsdöntőbb változásai biokémiai és anyagcsereszinten, és nem morfológiai síkon nyilvánultak meg. A prekambriumban az élet befolyása a környezetére legalább olyan fontos volt, mint a környezeté az életre. Így pl. a későbbiek során létrejött állatok és növények evolúcióját a 2 milliárd évvel ezelőtti primitív cianobaktériumok fotoszintetikus aktivitása tette lehetővé.

A metazoák eredetével kapcsolatban is még számtalan vitás kérdés van. La Barberának (1978) azt a megállapítását, miszerint a soksejtű szervezetek fellépése a késői prekambriumban a sekélyvizű tengeri környezetek megjelenésével hozhozató összefüggésbe, Muir és munkatársai elutasítják (1979). La Barbera elképzeléseit a Hargraves-féle prekambriális földfejlődési modellre (1976) alapítja, melyet viszont Windley (1977) a geológiai bizonyítékokkal összeegyeztethetetlennek tart. Az az állítás (La Barbera, 1978), mely szerint a prekambrium első háromnegyed részében a sekélyvízi (200 m-nél nem mélyebb) környezetek ritkák voltak, aligha felel meg a valóságnak. A proterozoikus üledékek tanúsága szerint éppen hogy a mélyvízi üledékek voltak a ritkák, és a sekélyek a gyakoriak. Az az állítás sem felelhet meg a valóságnak, hogy a korai élet mélyvizekben jött létre, és hogy legprimitívebb alakjai planktonikusak voltak. A prekambrium legfontosabb fosszilis üledékei, a sztromatolitos karbonátok sekélyvízi eredetűek. Bizonyítékaink vannak, hogy az óceáni mikroplankton csak a késői prekambriumban jelent meg.

A késői prekambriumnak közvetlenül az 570 millió évvel ezelőtt kezdődött kambriumot megelőző, utolsó korszaka, az ún. késői proterozoikum a Föld történetének mindenképpen különös fontosságú időszaka lehetett, amely szorosan összefonódott az eukarioták korai evolúciójának kibontakozásával.

1.37.12. A szárazulatok és tengerek megoszlása a késői proterozoikumban mintegy 800 millió évvel ezelőtt

Ekkor a világóceánokat már nagy, tektonikailag stabil és az alámerült szegélyek sekély tengereivel övezett kontinensek taglalták. Egy vagy néhány szuperkontinens létezését tételezzük fel. Egy esetén a proterozoi-

kus szuperkontinens 800–900 millió évvel ezelőtt megindult szétkülönülési folyamata a kambrium elejéig tarthatott (BOND és munkatársai, 1984). Ennek során a kontinentális szegélyeken kiterjedt üledékes kőzetképződés ment végbe. Az egykori mállási profilok vizsgálata arra utal, hogy ez időben a kőzetek mállásának és az eróziónak a maihoz hasonló típusai juthattak érvényre. Feltételezik, hogy e kor óceánjaiban a tápelemek ciklizációja nagymértékben hasonlíthatott a maihoz. Az óceán és a légkör kémiai összetétele is csak kevéssé térhetett el a jelenlegitől. A feltárt kőzetanyagban az evaporitok és a korai diagenetikus pirit jelenléte azt bizonyítja, hogy a tengeri környezetekben mind szulfát, mind szulfit egyaránt jelen volt, és az üledékes ásványok tanúsága szerint a vas, a mangán és más energetikailag fontos elemek, a lokális környezeti viszonyoktól függően, redukált és oxidált állapotban egyaránt előfordulhattak. Arra is bizonyítékaink vannak, hogy a késői proterozoikumban kontinentális jégtakarók is léteztek.

1.37.13. A késői proterozoikum szárazföldi és vízi életközösségei

E korszakban már jelentős biológiai diverzitás és ökológiai variabilitás létezett (KNOLL, 1985). Több mint 150 olyan proterozoikus formációt tartanak nyilván, melyek mikrofosszíliák társulásait tartalmazzák. A terresztrikus környezeteket, mint pl. az időszakosan megnedvesedő sziklák vagy sivatagi talajok felszínét szárazságtűrő cianobaktériumok és más prokarioták népesíthették be. A proterozoikus paleotalajokban talált szerves maradványok arról tanúskodnak, hogy a terresztrikus környezetekben már jóval a *vascularis* növények létezése előtt ma még kevéssé ismert rendszertani helyzetű élő szervezetek tevékenykedhettek. Az egykori tavakban és azok hullámverési övezeteiben fonalképző mikroorganizmusok szövedékei burjánozhattak. E tavakban és a folyókban eukariota mikróbákat is magukba foglaló planktonikus társulások létezhettek. Ami a gombák egzisztenciáját illeti, adataink e korszakra nézve még bizonytalanok. A sekélytengeri littorális régióban és az árapály zónában szövedékképző tengeri és brakkvízi mikrobák uralkodtak. Ugyanitt sztromatolitok, mégpedig hasonlóak a mai PERZSA-öböl modernjeihez, fordultak elő. A domináns mikroba típusok mindezen élőhelyeken a cianobaktériumok voltak. A késői proterozoikus mikroplankton-közösségek a mai modernekhez annyiban voltak hasonlóak, hogy azokban is eukariota algák domináltak itt-ott kiegészülve fotoszintetizáló prokariotákkal. E közösségekben mint mikroragadozók heterotróf eukariota protiszták tevékenykedtek. A fotoszintetizáló és a ragadozó eukarioták diverzitása feltehetően jóval nagyobb volt annál, mint ami-

lyenre fosszilis maradványaik alapján ma következtethetünk. Fontos tény, hogy e kor mikrobái ásványi vázzal, ill. kültakaróval nemigen rendelkeztek. A baktériumok anyagcseretípusai valószínűen, morfológiailag pedig biztosan már a mai modern óceánokat benépesítőkhöz voltak hasonlóak. Az eukarioták között egy és többsejtűek egyaránt jelen voltak, de kevés adatunk van egykori diverzitásukról.

Feltételezhető, hogy a késői proterozoikumig a prokarioták anyagcseréjében és morfológiájában végbement legfontosabb evolúciós változások már megtörténtek. Az eukariotákkal kapcsolatban azonban teljesen más a helyzet.

A késői proterozoikum folyamán a planktonikus eukariota társulások egyre növekvő morfológia diverzitása jelentkezett. Ez a kibontakozás azonban nem volt töretlen, minthogy a késői proterozoikum végére hanyatlás következett be, és számos morfotípus kihalhatott. Az eukarioták morfológiai-taxonomiai típusgazdagsága, a fitoplanktonok összetételében, a korai kambrium időszakában újabb rediverzifikációval még nagyobb méreteket öltött (Knoll, 1985).

A *198.b. ábra* a késői proterozoikum élővilága legfontosabb társulásainak megoszlását mutatja be Knoll (1985) vázlata alapján.

1.38. Az eukariota sejtszerveződés néhány problémája

Amint az előző fejezetből kiderül, az eukariota sejt struktúráinak és az ezekhez kötött anyagcserének rendkívül bonyolult, ma még csak nehezen áttekinthető leszármazásvonalaival állunk szemben. Az eukariota és prokariota sejtfunkciók evolúciós szempontok szerint megvalósított összehasonlító tanulmányozása jelenleg széles körben folyik, amiből két különösen érdekes problémakört mutatunk most be.

1.38.1. A prokariota és eukariota sejtosztódási ciklusok egybevetése

Napjainkig úgy tűnt, hogy a pro- és eukarioták sejtosztódási ciklusait egymástól élesen megkülönböztethetjük. Ez a ciklus az eukariotáknál alapjában véve három periódusra oszlik és ezeket így jelöljük: *G*1, *S* és *G*2. A prokariotáknál csak kettő van: *C* és *D*. Ezek az *S* és *G*2-vel állíthatók párhuzamba. Az *S* és a *C* egymással analóg periódusok, mivel mindkettő mint a DNS-szintézis időtartama definiálható. A *G*2 és a *D* ugyancsak analógok, minthogy a DNS-szintézis befejezése és a mitózis, ill. a sejt kettéosztódása közötti időnek felelnek meg. Ami a *G*1-periódust illeti, és amely lényegében a DNS-szintézis kezdeményezését előkészítő

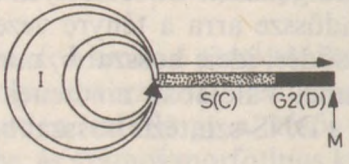
időszaknak fogható fel, ennek létezése körül bizonytalanság uralkodik. Egyesek szerint ez a prokariotáknál is előfordul (HELMSTETTER és PIERUCCI, 1976) és vannak eukariota sejtek is, melyek viszont a *G*1-periódust elkerülik (LISKAY és PRESCOTT, 1978). COOPER szerint (1979) valójában nincs is külön kezelhető *G*1-periódus, mely a prokariotákat az eukariotáktól élesen megkülönböztetné, és a *G*1 csupán része a DNS-szintézis nagyobb periódusának. Ez a nézet viszont szinte felhívás arra, hogy végre kíséreljék már meg a sejtosztódási ciklus egységes, általános érvényű modelljének kidolgozását. COOPER ilyen modellje szerint a *G*1-periódus „létezése" mindössze arra a tényre vezethető vissza, hogy az eukariota sejt megkettőződési ideje hosszabb, mint az *S*- és a *G*2-periódusok együttes időtartama. Valójában nincsenek specifikus *G*1-funkciók, és a *G*1 csupán része a DNS-szintézis hosszabb előkészületi szakaszának.

A baktériumoknál azoknak a sejteknek az esetében, melyek megkettőződési ideje 60 percnél hosszabb, az eukariota sejtosztódási ciklushoz hasonlóan az analóg *G*1-, *S*- és *G*2-periódusok ugyancsak kimutathatóak. Azoknál a baktériumoknál viszont, melyek gyorsan, 60 percnél rövidebb idő alatt osztódnak, nincs *G*1-periódus. Ilyenkor a DNS-szintézis, mely már az előző sejtosztódási ciklusban megindult, a sejt osztódása alkalmával megy végbe. Ahol a megkettőződési idő még 40 percnél is rövidebb, ott az újabb DNS-szintézis már akkor megkezdődik, amikor az előző DNS-replikációs kör még be sem fejeződött. Valójában ez a tény teszi lehetővé, hogy a baktériumsejt sokkal gyorsabban osztódhasson, mint amennyi időt DNS-ének egyszeri teljes replikációja vesz igénybe. Ilyen intenzív osztódási ciklusféleségek az eukariotáknál egyáltalán nem fordulnak elő. A prokarioták osztódási ciklusában a DNS-szintézis sajátos menetét kizárólag a DNS replikációjának kezdeményezési gyakorisága határozza meg. Ha már egyszer a kezdeményezés megtörtént, úgy az egyébként konstans *C*- és *D*-periódusokat szabályozó „óra" a következő sejtosztódást is meghatározza.

Csupán a sejtciklusra való tekintettel úgy tűnik, hogy a prokarioták és az eukarioták közötti egyetlen lényeges különbség az, hogy az eukarioták a sejtosztódás ideje alatt képtelenek DNS-szintézisre. Ez a prokariotáknál azért valósítható meg, mivel a baktériumsejtek nukleotidjai önállóak és a sejt osztódása alatt funkcionálni is képesek. Az eukarioták-nál ez azért nem lehetséges, mert az *S*-periódus teljessé válása egyetlen nukleuszt eredményez, mely csak a mitózis és a sejtosztódás során szeparálódik két nukleuszra. Nagyon valószínű, hogy a mitózis és a DNS vele társuló kromoszómákká kondenzálódása nem összeegyeztethető a folyamatos DNS-szintézissel és ez az oka, hogy az eukarioták sejtosztódási ideje alatt soha sincs DNS-szintézis.

1.38.2. Lehetséges-e alapvető osztódási ciklustípusokról beszélni?

COOPER (1979) azt is kétségbe vonja, hogy egyáltalán „osztódási ciklusról" beszélhessünk. Szerinte a „ciklus" szó már eleve feltételezi, hogy a sejtosztódásnál valami kezdeményeződik, mégpedig maga a sejtciklus. Valójában azonban a sejtosztódással szerinte semmi nem veszi kezdetét, hanem ez csupán a vége egy olyan történéssorozatnak, mely bizonyos kezdeményezési potenciál felhalmozódásával veszi kezdetét és amelyet



199. ábra

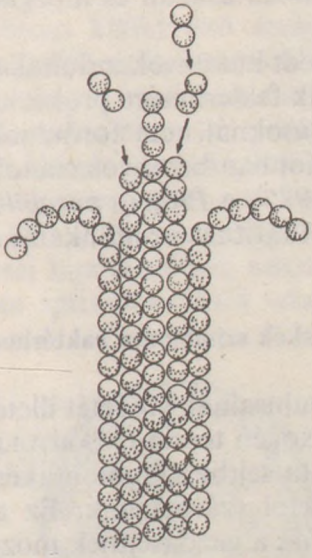
A sejtosztódás egymásra következő fázisainak sematikus ábrázolása COOPER (1979) szerint. I: A kezdeményezés előkészítésének időszaka. Ezt az S(C)- és a G2(D)-periódusok követik. Az utóbbi a mitózissal (M) végződik. A kezdeményezés gyakoriságát a kezdeményezés előkészítésének sebessége határozza meg, amit az ábrán példaként két különböző méretű és ezzel két különböző növekedési sebességet képviselő kör szemléltet. Megjegyzendő, hogy a kezdeményezés előkészítése folyamatosan történik és nem az M-nél veszi kezdetét

szukcessziószerűen a DNS-szintézis kezdeményezése, a DNS-szintézis befejezését követő sejtosztódási előkészületek és végül maga a sejtosztódás követ *(199. ábra)*. A végső sejtosztódás a folyamat végét jelenti, azonban semminek sem a kezdetét. A kérdés még nem lezárt, az azonban nagyon valószínű, hogy a sejtosztódás pro- és eukariota ciklusainak összehasonlításánál és a jellegzetes analóg szakaszok megállapításánál, a DNS-replikáció sajátosságait figyelmen kívül hagyva, az élővilág e két csoportjába tartozó sejtek működésében ezúttal, ott is különbségeket fedeztek fel, ahol nem is volt.

1.38.3. Az eukariota sejtek mikrocsövecske *(microtubulus)* rendszere

Az élő szervezetek sejtes struktúrájában és működésében felismerhető általános egyöntetűség egyik nagyon jellemző példáját az ún. mikrotubulusok nyújtják. Ezek minden eukariota sejtben jelen vannak (MARGULIS és munkatársai, 1978) és részt vesznek az intracelluláris transzportban (OCHS, 1975), az ostoros mozgásban (INOUE és STEPHENS, 1975). Jelenlétüket kimutatták a gombáknál (ORMEROD és munkatársai, 1976), a protozoonoknál (BARDELE, 1975), az embernél stb. Már 1966-ban megállapították, hogy a felépítésükben és ultrastruktúrájukban azonosítható

mikrotubulusok az alacsonyabb és magasabb rendű növényekben és az állatokban egyaránt fontos szerepet játszanak. A mikrotubulusok közreműködnek a pankreász és a pajzsmirigy hormonkiválasztásában. A mitotikus orsó fonalai ugyancsak mikrocsövecske típusúak, mint ahogy a centriólus, melyből ezek a fonalak erednek, maga is mikrotubulusok komplex asszociációja. Mikrotubulusokból állnak a *Heliozoák* axopodjai, de részt vesznek ezek a vörös vérsejtek működésében is. Bárhonnan származzanak is és bármi legyen is funkciójuk, lényegében azonos felépítésűek: kb. 24 nanométeres külső átmérőjű, hosszú, csöves struktúrák. Központi üregük van. Ennek átmérője 15 nm. Hosszuk nagyon különböző, gyakran a 10–25 mikrométert is eléri! Keresztmetszetben kör alakúak *(200. ábra)*. E köröket globuláris proteinalegységek alkotják, melyek száma gyakran 13. Hosszmetszetben megfigyelhető, hogy ezek az alegységek *protofilament*-nek nevezett fonalakat alakítanak ki. Az alegységek valójában dimerek, két nagyon hasonló proteinből épülnek fel: az α- és a β-tubulinokból. Mindegyikük globuláris, molekulasúlyuk kb. 55 000 dalton. Kereken 500 aminosav-komponensből szintetizálódnak és ezek szekvenciája mindkettőben annyira hasonló, hogy feltehetően egyetlen ősi proteinből erednek. Az α- és a β-tubulinok az élő szervezetek minden csoportjában azonosak, amiből arra következtetnek, hogy rendkívül ősiek, és már legalább 2 milliárd éve, mióta eukarioták egyáltalán léteznek, ezek is megvannak. Az agyból tisztán előállított tubulin megfelelő kísérleti körülmények között önelrendeződéssel, hosszú csöves



200. ábra

A globuláris alegységek elrendeződése protofilamentekké a tubulusok falában (Vázlat)

struktúrákat alkot, melyek a sejtekben látható mikrotubulusokhoz nagyon hasonlóak. Ilyenkor elsőnek az α- és β-tubulinok dimerképzése figyelhető meg. Utóbbiaknak guanozin-difoszfát és -trifoszfát számára specifikus kötőhelyük van, melyek az elrendeződési és struktúraalkotási folyamatokhoz energiát biztosítanak. A dimerek csövekké rendezésében vagy a csövek lebontásában kalciumdependens szabályozó protein (kalmodulin) vesz részt. A mikrocsövecskék maguk még komplexebb struktúrákká, így csillókká, ostorokká, alapi testekké stb. aggregálódhatnak. Bizonyos proteinek *(MAP*-ok: *microtubule-associated proteins)* elősegítik a dimerek társulását. Ugyanezek meg is védik a mikrocsövecskéket a károsító hatásokkal szemben.

A mikrotubulusokat gyakran valamiféle „sejtváz" kialakításáért teszik felelőssé. Ez a „váz", ha egyáltalán így fogalmazhatunk, nagyon kevéssé lehet állandó, minthogy a mikrotubulusok percek alatt széteshetnek, majd a tubulinalegységek ugyanilyen gyorsan, teljesen más alakzatokban újra is szerveződhetnek. Megjegyzendő, hogy az eukarioták ciptoplazmájában még számos, egészen más természetű, de ugyancsak fehérjekarakterű fibrillum is jelen lehet (pl. kontraktilis aktin és miozin), melyek finomabbak a mikrotubulusoknál és sokkal stabilabbak. A legtöbb esetben ezek a mikrofibrillumok és mikrocsövecskék a sejtek alakját együtthatásban, kölcsönösen alakítják ki. Rendkívül fontos tény, hogy a mikrotubulusok nem kontraktilisek. Megrövidülésre úgy képesek, hogy valamelyik végükről egyszerűen tubulinalegységek disszociálnak le. A sejtek alakváltoztatásában és mozgásában ily módon fontos szerepet játszanak.

A 70-es években kiterjedt kutatások indultak az eukariota mikrotubulusok rokonstruktúráinak felderítésére prokarioták körében. Ilyenek az *E. coli*nál vagy a *Bacillus*oknál nem fordulnak elő. Üreges, tubuláris struktúrákat észleltek azonban bizonyos cianobaktériumokban (Bisalputra és munkatársai, 1975), a *Proteus mirabilis*ben és a *Treponemá*ban (To és Margulis, *cit.* Margulis és munkatársai, 1978).

1.38.4. A mikrocsövecskék szimbionta baktériumoktól származnának?

Az eukarioták mikrotubulusainak eredetét illetően két hipotézist állítottak fel. Az első az ún. exogén teória (Margulis, 1975) feltételezi, hogy e csövecskék az eukariota sejtbe szimbiontaként belépett, csövecskéket tartalmazó *Spirochaeták*tól származnak. Ez a társulás azért jöhetett létre, mivel a *Spirochaeták* a gazdasejtnek mozgékonyságot biztosíthattak. Az idő haladtával ezek a *Spirochaeták* az eukarioták általános előfordulású (9 + 2) ostoraivá vagy csillóivá alakultak. Amennyiben e

társulás egykori kialakításában részt vett, ősi *Spirochaeta*-alakok típusai nem vesztek még ki teljesen, úgy fennáll a remény, hogy szabadon élő, kevéssé változott leszármazottaik között a (9 + 2) ostoros szervecskerendszer „őseit" is megtalálhatjuk és ezek mikrotubulusokkal is rendelkezhetnek. Az azonosítás természetesen megkövetelné, hogy a *Spirochaeták* mikrotubulusait is tubulinfehérjék építsék fel és ezek homológok legyenek az eukariota sejtekével.

A másik elmélet, melyet endogén hipotézisként említenek, PICKETT–HEAPstól (1974) és TAYLORtól (1976) származik, akik feltételezik, hogy a tubulin a modern vörösalgák őseinek megfelelő, primitív fotoszintézisre képes szervezetekben differenciálódott.

1.38.5. Kísérlet a mikrocsövecskék szimbionta eredetének igazolására

MARGULIS és munkatársai (1978) termeszek utóbelében élő, szimbionta *Spirochaeták* (*Pillotina* sp., *Diplocalyx* sp., *Hollandia* sp.) protoplazmahengerében (*lásd* 1.13.53. alfejezet) 220 Å átmérőjű, megnyúlt mikrotubulusokat figyeltek meg. Ezek feltehetően tubulin összetételűek. Ezek a mikrotubulusok a *Spirochaeták* hosszanti tengelye mentén sorakoznak fel és a gazdaszervezetből centrifugálással nagy mennyiségben különíthetők el. Oldódó proteinjeiket szabaddá téve, nátrium-dodecil-szulfát-gél-elektroforézissel tanulmányozták. E prokariota készítményekből olyan proteinsávokat mutathattak ki, melyek az autentikus agytubulinnal együtt vándoroltak. Ezután különböző antigénforrásokkal tubulinra specifikus fluoreszceinnel jelölt antitesteket állítottak elő. Ezt használták az utóbél-mikrobiota festésére. Az *in situ* citológiai készítményekben a specifikus fluoreszcencia csakis bizonyos prokariotákkal (hollandinák, pillotinák és egy ostoros) társult. Az eukarioták mikrotubulusai méretüket tekintve nagyobbaknak bizonyultak, mint a prokariotáké. A legtöbb eukariota mikrotubulus 240 ± 20 Å átmérőjű. Ezt figyelembe nem véve, MARGULIS és munkatársai hipotézisüket, miszerint a csillók és az ostorok bizonyos szimbionta spirochaetáktól származhatnak, továbbra is fenntartják.

Bibliotheca Academiae Scientiarum Hungaricae
MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÖNYVTÁRA

A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat főigazgatója
Felelős szerkesztő: Szollár Zsuzsa
Műszaki szerkesztő: Marton Andor
A fedélterv P. Horváth Éva munkája
Terjedelem: 62,21 A/5 ív
A szedést készítette a Nyomdaipari Fényszedő Üzem (867854/8), Budapest
Felelős vezető: Baráth János
86.16743 Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat, Budapest
Felelős vezető: Hazai György

Ára: 174,– Ft