

# SEJTFELSZÍNI LIGAND-KÖTŐHELYEK DINAMIKÁJA

DAMJANOVICH SÁNDOR, TRÓN LAJOS és SZÖLLŐSI JÁNOS

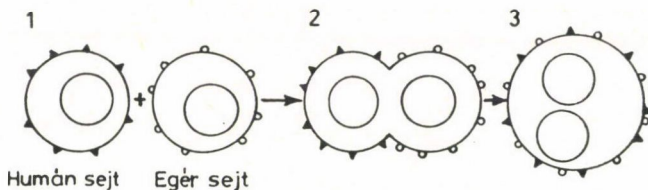
Debreceni Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete

Az 1972-ben ismertetett SINGER—NICOLSON membránmodell számos egymásnak esetenként ellentmondó kísérleti eredményt figyelmen kívül hagyva, elsősorban FRYE és EDIDIN sejtfúziós kísérletén (1. ábra) alapult (FRYE, EDIDIN 1970, SINGER, NICOLSON 1972). Ebben a kísérletben humán és egér sejteket Sendai vírussal fuzionáltattak és megállapították, hogy a heterokaryon membránjának a felszínén a külön megjelölt humán, ill. egér antigének kb. 40 perc alatt egyenletesen összekeveredtek. TAYLOR és mtsainak klasszikus cikke, amely a capping jelenségét először írta le, szintén a receptorok és más ligand-kötőhelyek szabad diffúzióját támasztotta alá (TAYLOR és mtsai 1971). A SINGER—NICOLSON féle folyékony mozaik membrán-modell kisebb-nagyobb módosításokkal mai napig érvényes. Az I. táblázat mutatja a különböző membrán-modellek keletkezésének kronológiai sorrendjét, melyek azonban 1972-től kivétel nélkül kénytelenek alapként elfogadni a folyékony mozaik membrán-modellt, mint alaptézist. Az egyre szaporodó kísérletes bizonyítékok, amelyek egy része típusában a Boyse-féle „blocking-test” továbbfejlesztésén alapul, felvetik azonban, hogy a lipid és főleg a glikoproteid membránalkotórészek egymáshoz viszonyított elhelyezkedése nem minden esetben véletlenszerű (2. ábra) (BOYSE és mtsai 1968, FLAHERTY, ZIMMERMAN 1979). SINGER

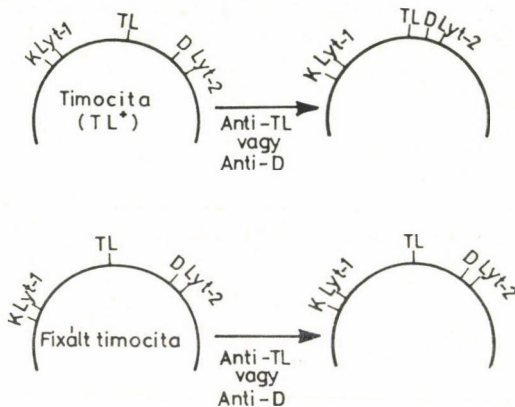
## I. táblázat

### Membrán-modellek

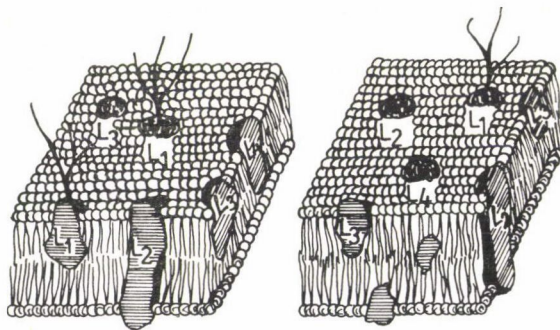
1952 DAVSON—DANIELLI	Bimolekuláris lipid membrán
1972 SINGER—NICOLSON	Fluid mozaik membrán
1974 SINGER	Long-range protein kölcsönhatás
1976 EDELMANN	Surface Modulating Assembly (SMA)
1976 BRETSCHER	Directed Lipid Flow
1979 HEWITT	Surf-Riding Model
1979 LUX	Membran Skeletal Model
1979 KOCH	Dinamikus receptor minta
1980 DAMJANOVICH, SOMOGYI, TRÓN	Kétdimenziós receptor minta
1980 SCHINDLER, OSBORN, KOPPEL	Polimer hálózat
1981 HENIS—ELSON	Aktív kihorgonyzás
1981 PETERS	Skin Skeleton
1981 SCHINDLER	Matrix Model



1. ábra. Humán és egérsejtek fúziója után a citoplazma membránok specifikus receptorai eloszlanak a heterokaryon sejtek egész felületén



2. ábra. Fixálatlan egér timociták felszínén akár anti-H2-D, akár TL antitestek kötődése a két (D és TL) receptor egymáshoz való közeledését eredményezi. Hasonló redistribúció fixált sejtekben nem észlelhető



3. ábra. Az L1—L4 ligandkötő receptorok két különböző típusú eloszlása a membránban

maga is nagyobb jelentőséget tulajdonított már 1974-ben a membrán fehérjéje által alkotott váznak, mint a lipid-alkotórészeknek (SINGER 1974). EDELMANN, LUX, majd PETERS, bár különböző kiindulási alapról, egyaránt arra a megállapításra jutnak, hogy a lipid rétegben diffundáló receptorok mozgását a fehérje-váz rendszer gátolhatja (EDELMANN 1976, LUX 1979, PETERS 1981). A gátlás történhet a citoskeletonhoz mintegy kihorgonyzott fehérjéken ke-

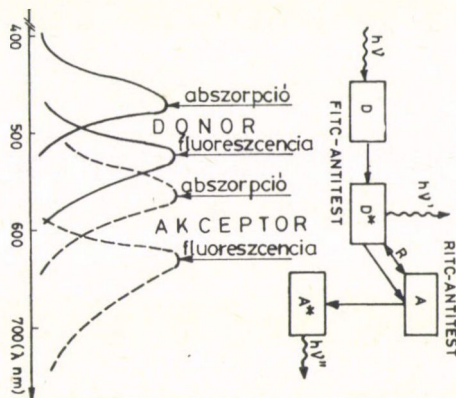


resztül, de származhat a membrán fehérjék hálózatos szerkezetéből vagy egyéb specifikus és nem specifikus fehérje—fehérje kölcsönhatásból is.

Saját megközelítésünk (3. ábra) a membrán síkjában elhelyezkedő receptorok, ill. ligand-kötőhelyek egymásmellettségének és mozgási szabadsági fokának a funkcionális jelentését helyezi előtérbe (DAMJANOVICH és mtsai 1981). Az alábbiakban elsősorban az ezen elképzelést kísérletesen megközelítő irodalmi és saját vizsgálati módszerekkel és adatokkal kívánunk foglalkozni.

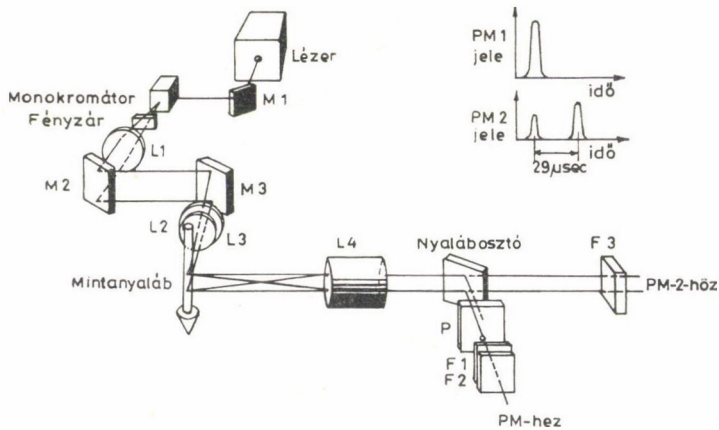
### Sejtfelszíni elemek proximitási viszonyainak vizsgálata

A sejtmembránban elhelyezkedő különböző vagy identikus ligand-kötőhelyek tér-, ill. síkbani közelségét élő sejtekben fluoreszcencia energia transzfer módszerrel célszerű megközelíteni. E spektroszkópai módszer előnye más, pl. rezonancia spektroszkópiás módszerekkel szemben az, hogy a különböző ligandok specifikusan jelezhetők fluoreszkáló festékekkel anélkül, hogy biológiai aktivitásukat elvesztenék és ezek kölcsönhatása folyadék-közegben viszonylag gyorsan élettani körülmények között is tanulmányozható (CANTOR, SCHIMMEL 1980). Egyedi sejteken mikroszkóp fluorimetria segítségével határozhatjuk meg megfelelő festékpárral megjelölt ligandok távolságát. A távolságmérés spektroszkópai feltételeit a 4. ábra mutatja. FERNANDEZ és BERLIN 1976-ban alkalmazta először a rezonancia energia transzfer mérését sejtfelszíni távolságok meghatározására (FERNANDEZ, BERLIN 1976). CHAN és mtsai 1979-ben nagy sejtpopulációk vizsgálatára alkalmas áramlási citofluorimetriás rendszerben is képesek voltak Con A receptorok távolságának meghatározására Fiend-erythroleukemia sejtek felszínén (CHAN és mtsai 1979). Ez a módszer különösen alkalmas arra, hogy az egyes ligand-kötőhelyek nem véletlen, min-



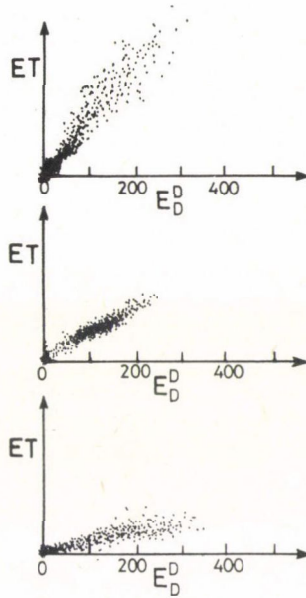
4. ábra. A fluoreszcencia energia transzfer során a donor (FITC-antitest) által abszorbeált energia áttevődik az akceptorra (TRITC-antitest) és végeredményben akceptor fluoreszcenciát eredményez. A transzfer létrejöttéhez szükséges, hogy a donor emissziós spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma bizonyos mértékig „átfedjék” egymást

taszerű egymás melletti elhelyezkedését feltérképezzük. Saját kísérleteinkben CHAN és mtsai módszerét alkalmaztuk egér limfóma sejtek (T-41 LDBH/Lymph C3H×DBA 2/f-f2) H2-antigénjeinek, ill. Con A receptorainak vizsgálatára. Kísérleteink során megállapítottuk a vizsgált T-41 limfóma sejtek felszínén a H2-antigének és a Con A receptorok sejtenkénti darabszámát. Az előző  $4 \times 10^5$ , míg az utóbbi  $4,4 \times 10^6$  átlagos értéket adott. Az 5. ábra mutatja az áramlási citofluoriméter sematikus ábráját, amely a mérést lehetővé tette. A 6. ábra mutatja a H2-antigén és a Con A receptorok relatív távolságának változását, amikor mind a két fajta ligand-kötőhely egyenletesen oszlott el a sejt felszínén, illetve, amikor egyikük cap-képződés során a sejt egyik pólusára gyűlt össze. A H2-antigének jelzésére H-100 30/6 és H-100 27/55, ill. H-100 5/28 kódjelű anti-H2-K<sup>k</sup> monoklonális antitesteket használtunk, amelyeket előzetesen FITC-cel vagy TRITC-cel jeleztünk. Az antitestek kötődő képessége az 1 : 3 vagy 1 : 4 fehérje : festék jelölési arány esetében nem változott lényegesen. A H2-K<sup>k</sup> antigének és a Con A receptorok relatív távolságának meghatározására a Con A receptorokat ugyancsak FITC-cel, vagy TRITC-cel jelzett tetramer Concanavalin A molekulákkal jeleztük. Így donor, ill. akceptor molekulaként mindig a fluoreszcein, ill. rhodamin festékpárt alkalmaztuk, amelyre nézve az  $R_0$  távolság kb. 5,6 nm. Kísérleteink egy részében a H2-K<sup>k</sup> antigén különböző specifikus helyeihez kötődő monoklonális antitesteket kötve, amelyeket megfelelő módon elláttunk fluoreszcencia donor, ill.



5. ábra. Az „all-line” üzemmódban működtetett lézer fényét egy monokromátorba vezetjük, ahonnan a különböző hullámhosszú komponensek más-más szög alatt lépnek ki. A gerjesztésre használt 488 nm és 514 nm-es komponenseket a többi komponens mechanikus kitakarása után egy optikai leképező rendszer a sejteket szállító folyadéksugárra képezi le olyan módon, hogy a két lézergusár és a mintát szállító mintanyaláb metszéspontjai egymástól 0,1 mm-re vannak. A detektáló rendszerben egy dichroikus nyalábosztó és megfelelő optikai szűrők segítségével a 488 nm-es gerjesztésű fluoreszcenciából a fluoreszcein és a rodamin emissziós sávjában a két detektor egy-egy jelet, az 514 nm-es gerjesztésű emisszióból pedig a 2. számú detektor az előző jelekhez képest 29  $\mu$ sec késéssel egy további jelet detektál. E három jel feldolgozásából az energia transzfer hatások számítható





6. ábra. A T-41 egér limfóma sejteket FITC-konjugált H-100 27/55 antitestekkel, valamint TRITC-konjugált Concanavalin A lektinnel jelöltük. Az ordinátán a donor és akceptor direkt fluoreszcenciájára korrigált energia transzfer (ET) jelet, az abszcisszán a donor fluoreszcenciának megfelelő  $E_D^0$  jelet ábrázoltuk. A két mennyiség korrelációját leíró egyenes iránytangense az energia transzfer mértéke. Mindhárom mintát telítési FITC-H-100 27/55-tel és  $20 \mu\text{g/ml}$  TRITC-Con A-val inkubáltuk. Az inkubálási sorrend és hőmérséklet a három minta esetén a következő volt: A: H2 (szobahőmérséklet); RAMIg + Con A ( $37^\circ\text{C}$ ); B: H2 + Con A ( $4^\circ\text{C}$ ); C: H2 (szobahőmérséklet); RAMIg ( $37^\circ\text{C}$ ); Con A ( $4^\circ\text{C}$ )

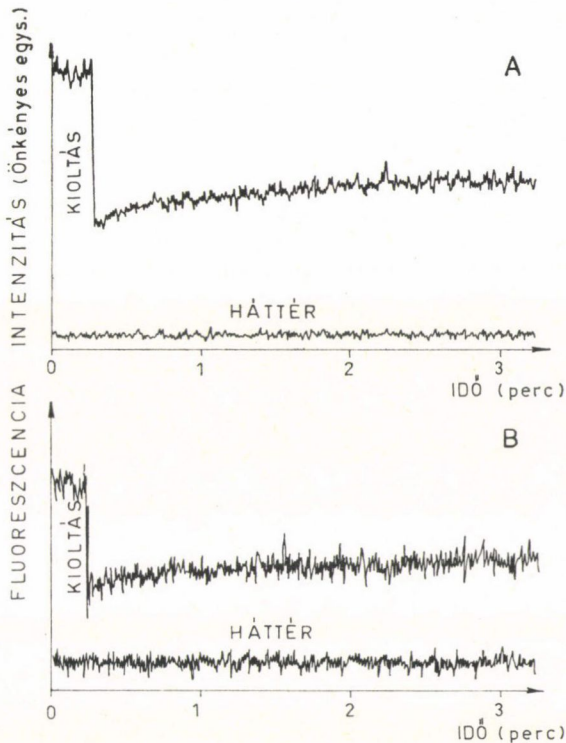
akceptor molekulákkal, mintegy feltérképeztük az antigénnek a sejt külső felszíne felé eső, felületi determináns csoportjait. Az egymással nem kompetitív módon kötődő H-100 30/6 és H-100 27/55 antitestek kötőhelye az energia transzfer hatékonyságából ítélve a H2-K<sup>k</sup> antigén felszínének közelítőleg elmentés pontján kell hogy elhelyezkedjen. Tekintetbe véve a H2-K<sup>k</sup> antigén nagyságát, amely a kb. 50 000 dalton molekulasúly és gömb alakú modell esetében kb. 50 Å-nyi átmérőt jelenthet, továbbá, hogy a festékekkel a 150 000 dalton molekulasúlyú IgG<sub>2</sub> típusú antitest molekulákat véletlenszerűen jeleztük a festékekkel, az alacsony transzfer határfok másképpen nehezen magyarázható. Ha azonos típusú, tehát egy H2-K<sup>k</sup> antigénhez csak egyetlen példányban kötődő monoklonális antitesteket jeleztünk vagylagosan fluoreszcenciával, ill. rhodaminnal, nem sikerült energia transzfert mérnünk sem T-41 sejteken, sem A/J egerek lépéből származó kevert T- és B-populációt tartalmazó limfocita preparátumon. A H2-K<sup>k</sup> antigének közötti energia transzfer hiánya arra utal, hogy az antigének nem képeznek mikroaggregátumokat a membránban az antitestekkel történő reagálásuk során. Ez a megfigyelés amellettszól, hogy a H2 antigének a membránban jó közelítéssel egyenletesen helyezkednek el. Az általunk nemrég bevezetett kiértékelési módszer lehetővé

teszi az energia transzfer hatékonyság eloszlásának vizsgálatát (DAMJANOVICH és mtsai közlés alatt, TRÓN és mtsai közlés alatt). Mérési adatainkat e módszerrel kiértékelve megállapítottuk, hogy a T-41 sejtek H2-K<sup>k</sup> antigénjei a kis-, illetve nagy-sejteken azonos sűrűségben fordulnak elő. Mivel a T-41 sejtek szaporodása meglehetősen gyors (generációs idejük kb. fél nap), a sejtek nagyságeloszlása értelemszerűen jó korrelációt mutat a sejtciklus különböző fázisaival. Az eredményekből tehát arra következtetünk, hogy a sejtmembrán, ill. a H2-K<sup>k</sup> antigének szintézise párhuzamosan halad. Vizsgálataink nem találtak kapcsolatot a H2-K<sup>k</sup> antigén és a Con A receptorok eloszlása között, de lehetővé tették, hogy kidolgozzunk egy olyan módszertani megközelítést, amellyel a sejtfelszíni proximitás viszonyok az eddigieknél sokkal több biológiai információt adó felbontással tanulmányozhatók. EDELMANN és mtsai által megfigyelt kapcsolat, amely a H2-D és a Rauscher vírus antigének eloszlásának az összefüggését tárta fel, esetünkben nem is volt várható, tekintettel a Con A receptorok fehérje részének nagy heterogenitására. A Con A ugyanis a glikoproteidok szabadon álló alfa-mannopiranozid gyűrűjéhez kapcsolódik specifikusan. E cukor-komponenst azonban nagyon különböző fehérjék hordozhatják a sejtek felszínén. Elsődleges célunk a Con A kiválasztásával az volt, hogy megfelelően magas fluoreszcencia intenzitás értékekkel dolgozva megbízható módszert állítsunk be, amelynek segítségével az energia transzfer hatékonyság áramlási fluorimetriás rendszerekben is jól tanulmányozható.

### *Membrán fehérjék mobilitásának vizsgálata*

A membrán integrális komponenseinek vizsgálatára a PETERS által 1974-ben bevezetett FRAP (fluoreszcencia újraeloszlás fotokémiai kioltás után) bizonyult a legalkalmasabbnak (PETERS és mtsai 1974). Az eddig vizsgált membrán fehérjék laterális mobilitása fehérjénként erősen változó. Míg a lipid próbák diffúziós sebessége  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s körüli diffúziós állandóval jellemezhető, addig a fehérjék  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  cm<sup>2</sup>/s sebességgel mozognak. Mitochondriális membránokban kimutatták, hogy a citoskeleton dezintegrálása után a makromolekulák sokkal gyorsabban diffundálnak. A rhodopszin a citoskeleton nélküli pálcika membránokban hasonlóan viszonylag gyorsan diffundál, a diffúziós állandója kb.  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s. Mesterséges membránokban a fehérjék diffúziós sebessége elérheti a  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s-t is (WEBB 1981). A 7. ábra a T-41 sejtek H2-K<sup>k</sup> antigénjének laterális diffúziójára vonatkozó saját kísérleteinket mutatja be. Az antigént H-100 27/55 típusú teljes antitesttel vagy ennek papain emésztéssel nyert Fab fragmentumával jelöltük, miután előzőleg az antitestet TRITC-cel reagáltattuk. Mint a 7. ábrán látható, a fotokémiai kioltás után a kioltás helyére visszadiffundáló antigén-antitest komplexumok az eredeti fluoreszcencia szintnek csak kisebb részét állították helyre. Ez nagy valószínűséggel azt jelenti, hogy a H2-K<sup>k</sup> antigén laterális diffúziója korlátozott. A Fab frag-





7. ábra. FRAP (fluoreszcencia újraeloszlás fotokémiai kioltás után) kinetika T-41 sejteken, 20 msec időtartamú kioltó impulzus alkalmazásával. A sejtek jelölésére FITC-H-100 27/55 antitestet (A), ill. annak Fab fragmentumát (B) használtuk

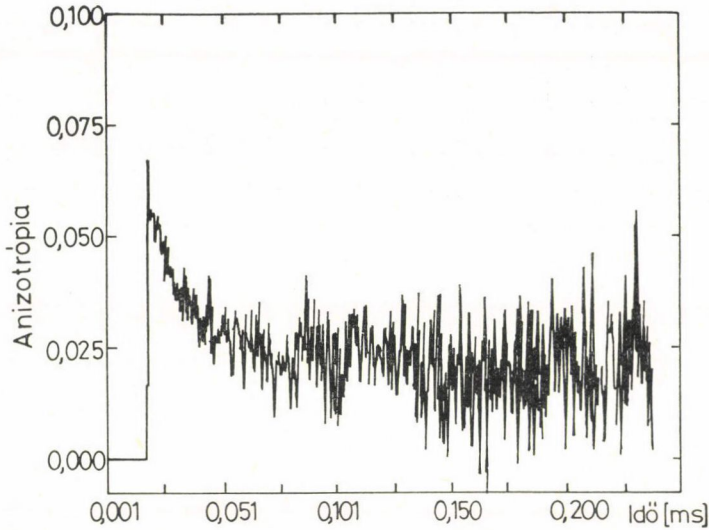
mentummal jelzett antigén számított laterális diffúziós sebessége  $3-5 \times 10^{-9}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  volt, a teljes antitesttel képzett komplex  $10^{-9}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  diffúziós állandójával szemben. A laterális diffúzió nincs szükségszerűen szoros korrelációban a rotációs mobilitással, amelynek funkcionális jelentősége adott proximitási viszonyok mellett még kifejezettebb lehet (JOVIN és mtsai 1981). A rotációs

## II. táblázat

Időfüggő foszforeszcencia anizotrópia méréssel tanulmányozott rendszerek

Con A receptorok	emlős sejtek
Band 3 protein	eritrociták
Glikoforin	lipid vezikulák
IgE receptor	bazofil karcinoma sejtek
AChR	posztiszin membrán, lipid vezikulák
EGF	tumor sejtek
$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPáz	membránok
Band 3 protein	vtv membrán és sejt
H-2 hisztokomp. antigén	limfóma sejtek

Fenti vizsgálatokat illetően l. MATAYOSHI és mtsai 1982.



8. ábra. Eozin-ITC-konjugált H-100 27/55 antitestekkel jelölt T-41 sejtuszuspenzióan mért foszforeszcencia depolarizációs kinetika

mozgás mérésére abszorpciós dichroizmus, foszforeszcencia anizotrópia, triplet-triplet abszorpció és fluoreszcencia kimerítési módszerek egyaránt alkalmazhatók. A II. táblázat mutatja a foszforeszcencia anizotrópia időbeni változásának követésén alapuló módszerrel eddig tanulmányozott membrán komponenseket (MATAYOSHI és mtsai, közlés alatt). Ezen vizsgálatokból tudjuk, hogy pl. az epidermis növekedési faktorának rotációja a receptorokhoz történő kötődés után 37 °C-on jelentősen lelassul, amely lassulás a számítások szerint mikroaggregátum képződésre utal (ZIDOVETZKI és mtsai 1981). Ugyanakkor a receptorhormon komplexnek a laterális diffúziós mozgása a hőmérséklet növelésével fokozódott. Ezért célszerűnek láttuk megvizsgálni a H2-K<sup>k</sup> antigén rotációs mobilitását is. A 8. ábra mutatja a foszforeszcens festékkel (eozinnal vagy eritrozinnal) jelzett H-100 27/55 típusú antitest forgására jellemző időfüggő anizotrópia változásokat. A III. táblázat részletesen mutatja a számított rotációs korrelációs idő értékeket a kezdeti és a végső anizotrópia beállást különböző kezeléseket után. A legerőteljesebb változás a H2-K<sup>k</sup> antigén forgásában akkor jött létre, ha poliklonális, nyúlban termeltetett egér-ellenes antitesttel reagáltattuk a H2-K<sup>k</sup> antigént specifikusan jelző monoklonális antitesteket, a mozgás nagy mértékű lelassulásának oka feltehetően a poliklonális antitest által létrehozott hálózat merevítő hatása volt. A festék, ill. az antitest saját mozgása a mérési módszer által nyitott időtartományon belül nem látható. A foszforeszcens festék által „láthatóvá” tett mikroszekundumos időtartománynál 2–3 nagyságrenddel gyorsabban lezajlik. Ezért a mért forgás teljes egészében az antigénnek tulajdonítható. A III. táblázatban jól látható, hogy amikor jelzetlen és a foszforeszcens festéket hordozó monoklonális anti-



## III. táblázat

A H-2 antigén rotációs mobilitása

	Rotációs korrelációs idő ( $\mu$ s)	Amplitúdó ( $r_0 - r_\infty$ )	Bázis ( $r_\infty$ )	Hőmérséklet ( $^\circ$ C)
EO-27/55	16	0,02	0,025	4, 37
+ Con A	10	0,2	0,03	4
+ RAMIg	14	0,03	0,04	4
+ Con A	30	0,04	0,033	37
+ RAMIg	>2000	-0,04	0,07	37
+ 30/6	11	0,03	0,027	4, 37
EO-27/55 F(ab)	13	0,06	0,027	37
Antitest	—	—	—	37

T-41 sejteket jelöltünk eozin ITC konjugált 27/55 kódjelű anti-H2 antitesttel, ill. ugyan-ezen antitestekből előállított Fab fragmentummal. A táblázatban feltüntetettük az inkubálási és mérési hőmérsékletet (ez a két hőmérséklet minden egyedi minta esetén azonos volt), a rotációs korrelációs időt, a teljes anizotrópia változást, valamint az anizotrópia végtelen időre extrapolált  $r_\infty$  értékét. Adatokat adtunk meg olyan mintákra is, amelyeket az eozinnal jelölt antitesten kívül a feltüntetett ligandumokkal is inkubáltunk. A táblázat alsó sora arra utal, hogy az eozin ITC konjugált antitest oldatban  $37^\circ$ C-on nem tapasztaltunk rotációs depolarizációt a mikroszekundumos időskálán.

test kötődését nem befolyásoló antitestet adtunk a rendszerhez, vagy a hőmérséklet lecsökkentésével megakadályoztuk, hogy a RAMIg hálózatot képezzen, akkor az antigén mozgása csak kissé változott.

Vizsgálataink mellett, hogy új adatokat szolgáltatnak a H2-K<sup>k</sup> antigén sejt felszíni eloszlásáról az antigén és a Con A receptor relatív proximitási viszonyairól, laterális és rotációs mobilitásáról, megnyitották annak lehetőségét, hogy további szisztematikus munkával feltérképezzük, hogy a sejt felszíni elemek dinamikája és elhelyezkedése mennyire függ a sejt funkcionális állapotaitól.

## IRODALOM

- BOYSE, E. A., OLD, L. J., STOCHERT, E.: *Genetics* **60**, 886 (1968).  
 CANTOR, R. C., SCHIMMEL, R. P.: *Biophysical Chemistry Vol. II*, 433 (1980).  
 CHAN, S. S., ARNDT-JOVIN, D. J., JOVIN, T. M.: *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 56 (1979).  
 DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B., TRÓN, L.: *Adv. Physiol. Sci.* **30**, 19 (1981).  
 DAMJANOVICH, S., TRÓN, L., SZÖLLŐSI, J., ZIDOVETZKI, R., VAZ, W. C. L., ARNDT-JOVIN, D. J., JOVIN, T. M.: közlés alatt (1983).  
 EDELMANN, G. M.: *Science* **192**, 218 (1976).  
 FERNANDEZ, S. M., BERLIN, R. O.: *Nature* **264**, 411 (1976).  
 FLAHERTY, L., ZIMMERMAN, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* **76**, 1990 (1979).  
 FRYE, L. D., EDIDIN, M.: *J. Cell. Sci.* **7**, 319 (1970).  
 JOVIN, T. M., BARTHOLDI, M., VAZ, W. C. L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **366**, 176 (1981).  
 LUX, S. E.: *Nature* **281**, 426 (1979).  
 MATAYOSHI, E. D., CORIN, A. F., ZIDOVETZKI, R., SAWYER, W. H., JOVIN, T. M.: In: „Mobility and Recognition in Cell Biology” (Sund, H., Veeger, C., eds.) W. de Gruyter Berlin, közlés alatt (1982).  
 PETERS, R.: *Cell. Biol. Int. Rep.* **5**, 733 (1981).  
 PETERS, R., PETERS, J., TEWS, L., BAKER, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **367**, 282 (1974).  
 SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: *Science* **175**, 720 (1972).

SINGER, S. J.: *Ann. Rev. Biochem.* **43**, 805 (1974).

TAYLOR, R. B., DUFFUS, W. P. H., RAFF, M. C., DE PETRIS, S.: *Nature New Biology* **233**, 225 (1971).

TRÓN, L., SZÖLLŐSI, J., DAMJANOVICH, S., ARNDT-JOVIN, D. J., JOVIN, T. M.: közlés alatt (1983).

WEBB, W. W.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **366**, 300 (1981).

ZIDOVETZKI, R., YARDEN, Y., SCHLESSINGER, J., JOVIN, T. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* **78**, 698 (1981).