

# CITOSZKELETON SZEREPE A FAGOCITA SEJTEK EFFEKTOR FUNKCIÓINAK REGULÁCIÓJÁBAN

FÓRIS GABRIELLA és KÖVÉR ANDRÁS\*

Debreceni Orvostudományi Egyetem, I. sz. Belgyógyászati Klinika és Központi Kutató Laboratórium\*

A szervezetbe került kórokozók, korpuzzkulmok, antigén tulajdonságú sejtes elemek, tumor sejtek, ill. oldott állapotban levő makromolekulák eltávolítására az immunapparátus két, különböző sejt típusa képes: a monocita-makrofág sejtek és a régebben mikrofágoknak nevezett polimorfonukleáris leukociták, ill. neutrofil granulociták. A továbbiakban egyszerűen fagocita sejtekről fogunk beszélni összefoglalóan, amit az tesz indokolttá, hogy mindkét sejt típus azonos feladatot teljesít azonos biokémiai mechanizmusok alapján. Természetes, hogy a kétféle fagocita sejt néhány anyagcsere folyamata eltérő, pl. a granulociták glukóz felhasználása döntően aerob, míg a peritoneális makrofágoké anaerob glikolízis útján történik. Ez azonban nem obligát különbség, mivel az alveoláris makrofágok és a vérben keringő monociták ugyancsak aerob glikolízissel bontják a glukózt (AXLINE és mtsai, 1980).

Az utóbbi években kezd kirajzolódni a fagociták effektor funkcióinak legfontosabb kérdése, nevezetesen, hogy a fagocita sejtek a receptoraikkal megkötött kórokozókat, antigénként szereplő sejtes elemeket, vagy immunkomplexet (szolubilis antigén és specifikus antitest keringő komplexe) vagy bekebelezik és intracellulárisan degradálják, vagy extracellulárisan pusztítják el. Ezzel kapcsolatos az „aktiválás” fogalmának tisztázása. Bizonyos természetes, vagy szintetikus előállított ligandok a fagociták membrán receptoraihoz kötődve aktiválni képesek a sejteket, de ennek kritériuma az immunológus szerint csak az lehet, hogy a fagocita fokozott intra- vagy extracelluláris killing-re képes. A „killing” kifejezés ebben a megfogalmazásban tágabb értelmet nyer, bele tartozik ugyanis a tumor sejtek fokozott destrukciója, vagy az immunkomplexe fokozott degradációja sejten belül vagy kívül. A fagocita sejtek, különösen a monolayer kultúrákban is tenyésztethető makrofágok kiválóan alkalmasak, bizonyos minden eukaryota és nem-vezető membránnal rendelkező sejtre érvényes szabályozási problémák tanulmányozására. Az *in vitro* aktivált fagocita sejt ugyanis egy bonyolult és összerendezett membránfolyamaton keresztül jut el ahhoz a végállapothoz, amikor az inkorporált korpuzzkulom a fagoszómába ömlő lizoszómák hatására sejten belül degradálódik, vagy a lizoszómák oxidációs termékeiket (szuperoxid anion,  $H_2O_2$ ) és proteolitikus enzimeiket az extracelluláris térbe ürítik. A membrán-fúzió mindkét reakció eseté-

ben döntő szerepet játszik. Nem meglepő tehát, hogy az aktiválódás kezdeti lépései és alapvető szabályozása azonos rendszereken keresztül történik (ÖGMUNDSDOTTIR és WEIR 1980).

### *Fagocita sejtek aktiválódásának transzmembrán szignalizációja*

Az invazív kórokozó, target sejt, immunkomplex megtapadása a fagocita sejtek külső felszínén receptorokon keresztül történik. Amennyiben a tapadás az antigénként szereplő korpuszkulum ellen termelt specifikus antitest segítségével történik, úgy a tapadás az Fc receptorokon keresztül jön létre. A tapadást és az azt követő fagocitózist lényegében a különböző, és az Fc receptorokkal szemben különböző affinitással rendelkező IgG alosztályok közvetítik a molekula Fc részének CH<sub>2</sub>, ill. CH<sub>3</sub> domainjén keresztül, míg az IgG molekula variabilis Fab' része az antigénhez kötődik. Az IgG-t kötő receptorok különböző típusa ismert, melyeket összefoglalóan Fc $\gamma$  receptoroknak nevezünk, szemben az IgM-et kötő Fc $\mu$  receptorokkal, melyeknek biológiai jelentősége nem tisztázott. A szolubilis vagy korpuszkuláris elemet tartalmazó komplexek képesek a komplement rendszer aktiválására, ill. bizonyos antigének, mint a gombák egy része, baktérium sejtfal antigének, endotoxinok önmagukban is képesek erre (BIANCO és mtsai 1975). A keletkezett C3 komponens C3b és C3a alegységre hasad, mely alegységek közül a C3b önálló receptorral rendelkezik a fagocita sejtek membránján. A C3b, mint ligand önmagában is képes fagocitózist közvetíteni. In vivo feltehetően a fagocitózis az Fc és C3b receptorok összerendezett funkciójának eredménye.

Újabban kimutatták, hogy a C3a alegység, amely egy alacsony molekulasúlyú peptid, a fagociták membránjához kötődve fokozza az Fc és C3b receptorok aktivitását (KAY és mtsai 1979). A ligand kötődés létrejöttét és az azt követő aktiválódást az Fc és C3b receptorok sűrűsége és szabad mozgása dönti el. Az Fc receptorok működését a ciklikus nukleotidák szabályozzák.

Azok a farmakonok, amelyek a cAMP szintet emelik, mint a cholera toxin, izoproterenol, vagy a foszfodieszteráz gátlók, ill. a prosztataglandin E széria képviselői, az Fc receptor által közvetített rozetta képzést (tapadást), ill. a fagocitózist fokozzák (MUSCHEL és mtsai 1977). Az oldódó cAMP származékok, mint a dibutiril cAMP vagy a 8-bromo-cAMP ugyanúgy hatnak (STABINSZKY és mtsai 1980). Ezzel ellentétben, a cGMP szintet emelő inzulin, vagy a 8-bromo-cGMP az Fc receptor aktivitás csökkenéséhez vezetnek, és ez cAMP szintet növelő hatású szerek adásával korrigálható (SANDLER és mtsai 1980).

Az effektor funkciók további lépései, a lizofagoszóma kialakulása, ill. extracelluláris killing esetén a lizoszómák extracelluláris ürülése ugyancsak a ciklikus nukleotidák szabályozása alatt áll, csak hogy éppen ellentétes módon: a cGMP szintet emelő szerek és maga a cGMP jelentősen fokozzák a lizofagoszóma fúziót, ill. a lizoszóma membrán fúzióját a plazmamembránnal (LOWRIE

és mtsai 1980). A cGMP fokozza az enzim szintézist, az enzimek felszabadulását, valamint a roncsoló hatású oxidációs termékek felszabadulását is, így az extra- és intracelluláris killinget. A cAMP ezzel éppen ellenkezőleg hat, erős gátló hatással rendelkezik mindkét effektor funkciót illetően (WEISSMANN és mtsai 1975, DIAMANSTEIN és ULMER 1976). Az elmondottakból kitűnik, hogy a ciklikus nukleotidák rendkívül fontos reguláló szerepet játszanak a fagociták effektor funkcióinak alakulásában. A ciklikus nukleotidák hatásukat az eukaryota sejtekre a proteinkináz enzim aktiválásán keresztül fejtik ki (BLOOM és mtsai 1980). A reakciósor egyes lépéseit és a köztük levő kapcsolatokat nem ismerjük. A harmadik szekunder messenger az aktiválódás folyamatában a  $Ca^{2+}$ , amelynek bejutását a sejtbe újabban a membrán lipidek változásával hozzák összefüggésbe. A fagocita sejtek aktiválódásának talán legkorábban jelentkező tünete a foszfatidil-inozitol turnover fokozódása. A szerzők úgy vélik, hogy a receptor-ligand kötődés által létrehozott trigger effektus hatására a foszfatidil-inozitolt hasító enzim aktiválódik, és a szubsztrátot inozitolfoszfátra és diacilglicerolra hasítja. A keletkezett diacilglicerol foszforilálódik a membránban és egy „exchange-protein” az endoplazmás retikulumba juttatja, ahol a foszfatidil-inozitol reszintetizálódik és egy másik „exchange-protein-” hez kötődve visszajut a membránba (MICHELL 1975). Ez a folyamat  $Ca^{2+}$ -tól független, de megnyitva az ion-csatornákat  $Ca^{2+}$  felvételt eredményez, amely azután a guanilcikláz aktiválásán keresztül emeli a cGMP szintet.

A foszfatidil-inozitol turnover szerepét az aktiválódásban megerősíti, hogy aktivált makrofágok a szervesen jelzett foszfort a membrán foszfolipid frakciójában építik be, amely nagymennyiségű foszfatidil-inozitolt és foszfatidilszerint tartalmaz (MICHELL és mtsai 1977).

#### *Az aktiválódást kiváltó ligandok*

A fagocita sejtek természetes aktiválói azok a specifikus antigén hatására termelt T limfocita produktumok, amelyeket összefoglalóan limfokinek-nek nevezünk, és amelyek a target sejt felszínén glikoprotein természetű receptorokhoz kötődnek. Az bizonyos, hogy ezek a receptorok  $\alpha$  L-fukóz-t tartalmaznak a kötőhelyeken, míg a különböző aktiváló hatású limfokinek L-ramnóz vagy L-xilóz véghelyzetű szacharida komponensekkel rendelkeznek (REMOLD 1973, ROCKLIN 1976). Keresztgátlásos kísérletekkel, ill. L-fukozidáz alkalmazásával ezt megnyugtatóan sikerült bizonyítani.

A fagociták aktiválhatók Fc és C3b receptorokon keresztül is, de csak abban az esetben, ha aggregált IgG-vel vagy mmunkomplexszel történik a kapcsolódás. Az aktiválást kísérő biokémiai folyamatok, ill. a transzmembrán szignalizáció ugyanis csak akkor indul be, ha a receptor-ligand komplexek keresztkötésekkel kapcsolódnak a membrán külső vagy belső felszínén. Ebben az esetben „spot” és „cap” képződés alakul ki, melynek előfeltétele a membrán-

rögzítő mikrotubulusok szétesése az aktivált membrán régióban. A másik feltétel a szabadon mozgó receptorok irányított mozgatása a mikrofilamentumok segítségével a membránnak ugyanezre az aktivált régiójára.

Sejtaktiválódást hozhatnak létre ezenkívül növényi lektinek, mint a Konkanavalin A, továbbá néhány baktérium. Ezekben az esetekben a cukor tartalmú ligand kötődik cukorkomponenst tartalmazó receptorokhoz, feltehetően a hidroxil csoportokon keresztül, direkt kapcsolódással (ÖGMUNSDOTTIR és mtsai 1978). Természetes aktiválóknak tűnnek a kemotaktikus peptidek, amelyek specificitása nem teljesen tisztázott és jelentőségük feltehetően messze túlnő a kemotaxis keretein. Újabbán IgG molekula Fc részéről lehasadó peptidok létezését írták le (PASSWELL és mtsai 1982), és lényegében a már igen régen ismert tuftsin is ebbe a csoportba tartozik (NAJJAR és NISHIOKA 1970). Aktivátorként hatnak ezeken kívül az ionofor hatású vegyületek, melyek közül legtöbbet vizsgálták a Ca ionofor hatású A 23187-et (HAND és mtsai 1977), továbbá az oxidáló szerek, melyek a membránhoz kötött glutathion szabad szulfhidril csoportjait oxidálják (MELLON és REBURN 1976).

Ezek a természetes és szintetikus aktiváló ágensek a transzmembrán szignált illetően hatásukat specifikus receptorokon keresztül kifejthetik a fokozott foszfatidil-inozitol hasításon, fokozott adenilcikláz vagy guanilcikláz aktivitáson keresztül. A transzmembrán szignál sokszor az alkalmazott koncentrációtól vagy esetleg az inkubációs időtől függ (SERHAN és mtsai 1980). Feltehető, hogy az effektor funkciók gátlását vagy fokozódását eredményező egyes lépések rendkívül változatos módosulása az egyes aktiváló ágensek hatására az alternatív szignalizáció eredménye.

Igen kevés olyan adat ismeretes, amely arra vonatkozóan adna felvilágosítást, hogy bizonyos triggererek az extra-, míg mások az intracelluláris killing mechanizmusát indítanák be. Az eddig elmondottakból következik, hogy elvben három variáció lehetséges: 1. ha a guanilcikláz aktivitás képezi a transzmembrán szignált — ekkor az Fc mediált fagocitózis gátolt, az enzim release fokozott — extracelluláris killing következik be; 2. ha egy átmeneti adenilcikláz aktiválódást a cGMP szint növekedése követ — fokozott fagocitózis, majd intracelluláris killing következik be, végül 3. az az eshetőség sem zárható ki, hogy az adenilcikláz aktiválódása fokozza a fagocitózist, de ez csökkent intracelluláris killing-gel jár együtt (lizofagoszóma fúzió gátolt, proteáz aktivitás csökkent, így az intracelluláris tárolás lesz az aktiválódás eredménye.

Az eddigiek alapján az is bizonyos, hogy ezek a kapcsolások igen gyorsan, a receptor-ligand kötődés legelső pillanataiban jönnek létre és hogy ebben a legfontosabb szerepet mai tudásunk alapján a két vegyértékű kationok a  $Ca^{2+}$  és a  $Mg^{2+}$  játsszák.

### *A kalmodulin szerepe az aktiválódásban*

1972-ben WOLFF és SIEGEL állították elő először tisztított formában szarvasmarha agyszövetből a *kalmodulint*, ezt a 17 ezer dalton molekulású fehérjét. A kalmodulin intracellulárisan helyezkedik el és egyszerre négy Ca-ion képes megkötni. Ha azonban már egyetlen Ca-ion kötődik hozzá, a fehérje konformáció változást szenved és a molekulák több mint 50%-a  $\alpha$  helikális struktúrát vesz fel. Bizonyos ellentmondó adatok magyarázatára alkalmas, hogy egyetlen Ca-ion megkötése után a kalmodulin már képes pl. a cAMP lebontásáért felelős foszfodiestheráz aktiválására, míg a mikrotubulusok disszociációját csak négy Ca-ion megkötése után képes megindítani (MEANS és DEDMAN 1980).

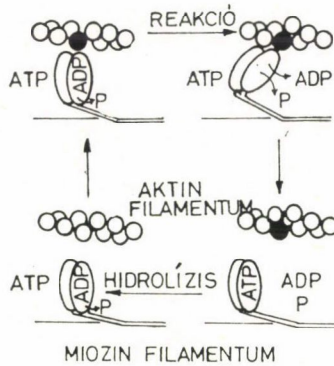
A kalmodulin az egysejtűektől az emlős szervezetig a törzsfajlás minden fokán megtalálható, ugyanakkor a szervezet összes sejtjében betölti Ca-kötő szerepét. Fontos és széles körű szerepére utal, hogy számos enzimreakció indukál. Legfontosabb és legismertebb funkciója, hogy nem-izom sejtekben a troponin C-vel azonos szerepet tölt be. Immunfluoreszcens technikával kimutatható, hogy a kalmodulin az aktinhoz kötődve helyezkedik el, és lényegében a miozin könnyűláncát foszforiláló proteinkináz regulátor részével azonos. Ugyancsak immunfluoreszcens technikával ki tudták mutatni, hogy a kalmodulin a mikrotubulusok mellett is vonulatot képez. In vitro kísérletekkel tisztázták, hogy a kalmodulin gátolja a tubulin szintézist, a tubulin polimerizációt és fokozza a depolimerizációt (YERNA és mtsai 1979).

Az adenil- és guanileikláz, valamint a foszfodiestheráz aktiválásával szabályozza a ciklikus nukleotidák szintjét a sejtben, ugyanakkor a ciklikus nukleotidákhoz hasonlóan szekunder-messenger-ként a citoszol-ban oldott, vagy membránhoz kötött proteinkinázok aktiválására is képes (DOBROWSKA és HARTSHORNE 1978).

Az eddig ismertetett transzmembrán szignálok egymással szoros összefüggésben, sokszor egymással antagonizálva, vagy mint redundáns mechanizmusok, alternatív utakat képezve, de mindenképpen a citoszkeleton elemein keresztül hozzák létre a fagocita sejtek aktiválódását és vezetnek a fentebb már említett három lehetőség valamelyikéhez.

### *A citoszkeleton elemei*

A citoszkeleton morfológiailag elkülöníthető részei funkcionálisan éppen olyan megbonthatatlan egységet képeznek, mint a ciklikus nukleotidák. Morfológiailag és didaktikailag a citoszkeleton a hely- és helyzetváltoztatásra képes mikrofilamentumokból és a sejt stabilitásáért felelős szilárdító elemből, a mikrotubulusokból, ill. az eddig még nem tisztázott jelentőségű intermedier filamentumokból áll.



1. ábra. Az aktin-miozin kapcsolódásának vázlatos rajza

A *mikrofilamentumok* izom és nem-izom sejtekben miozinból és aktinból állnak, a különböző segéd-fehérjéken kívül (SCHAUB és WATTERSON 1981, WEATHERBEE 1981). A miozin egy hexamer alakú molekula, amely két, egyenként 200 ezer dalton molekulasúlyú helikális struktúrájú heavy chainből (HC) áll. A láncok  $\text{NH}_2$  terminális végén a helikális struktúra megszűnik, a láncok globuláris formában visszatekerednek és két fejet képeznek (1. ábra). Ezek a fejek az aktív centrumai az ATP hidrolízisének és reverzibilisen kötik az aktin molekulákat. Mindkét fej nem-kovalens kötéssel képes kötni egy-egy light chaint (LC), melyek nagy affinitással kötik a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  ionokat, továbbá foszforilálhatók (P—LC). Molekulasúlyuk 18–20 ezer dalton. A másik az alkali LC (A—LC) és általában a két fejben azonos. A partner fehérje az aktin egy 42 ezer dalton molekulasúlyú polipeptid, amely globuláris (G-aktin), illetőleg filamentum (F-aktin) formában lehet jelen. Nem-izom sejtekben a miozin mennyisége változó, de nagyon alacsony, míg az aktin igen magas koncentrációban fordul elő, amennyiben az eukaryota sejtek összes fehérje tartalmának 10–30%-át teszi ki.

A koncentrációhoz szükséges energiát nem-izom sejtekben is az ATP szolgáltatja oly módon, hogy a kémiai energiának legalább 40%-a alakul át mechanikai munkává. Ebben az energia konverzióban a miozin játssza a legnagyobb szerepet, mivel a molekula nemcsak struktúr-fehérje és aktív enzim centrum egyben, de az energia konverzió is ennek a speciálisan szervezett molekulának a segítségével jön létre. A molekula HC részének az a szakasza, ahol a nyél a fejjel szomszédos, az ATP hidrolízisének hatására alloszterikus változáson megy át. Vázizmok esetében az aktin filamentum a miozin molekulák között csúszik a szarkomer egyik vége felől a közepe felé és így kontrakció közben az egész szarkomer rövidül. Számos vizsgálat azt mutatja, hogy a miozin kereszt-kötéseket képez a szomszédos aktin szálakkal és a szarkomer közepe felé tolja. Az aktinnak ezt az irányított mozgását az a konformáció változás hozza létre, melynek energia forrása az ATP hidrolízise és amely a miozin fejek rotáció-

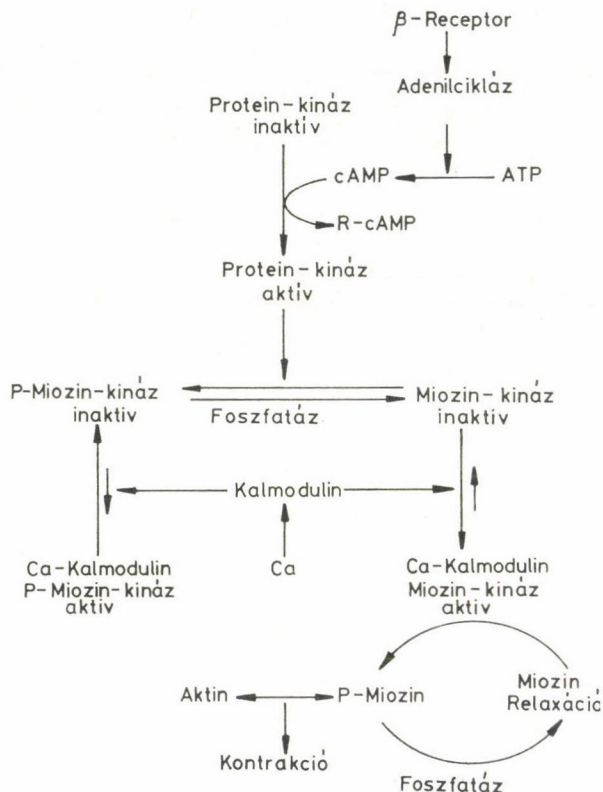
jában nyilvánul meg. További vizsgálatokkal tisztázták, hogy az ATP bomlása ADP-re és P-re az ATP hidrolízise során felhasználható szabad energiának csak 15%-át szabadítja fel, ezzel szemben a ciklus elején a szubsztrát kötődése a miozin fejekhez, valamint a ciklus végén a végtermékek release-e jelentik a nagy szabadenergia változást. Nagy energiájú foszforilált intermediereket nem tudtak kimutatni, ami azt jelenti, hogy nyugalmi állapotban a szabad miozin fejek csak igen lassú ütemben használják fel az ATP-t, és ezzel biztosítják a gazdaságos ATP konzumpciót, továbbá azt, hogy az ATP-ADP arány igen magas maradjon és ne érje el az egyensúlyi állapotot. Tekintettel arra, hogy az energiának csak kis hányada szabadul fel a hasításkor, az ADP-P termék a miozin fejen marad, és ez a komplex egy energetikailag stimulált állapotát jelenti a miozinnak, relaxált izmokban is. Az izom aktiválódása után a miozin fejek és aktin szálak között a keresztkötések létrejönnek és ez az ADP-P disszociációjához és szimultán energia-felszabaduláshoz vezet. Ez az energia elegendő azután a már tárgyalt konformáció változáshoz, ill. miozin-fej rotációjához, amely végül is a miozin és aktin relatív elmozdulását eredményezi. A ciklus végén új ATP szubsztrát molekula kötődik a miozin aktív helyéhez és ez a kötődés elég szabadenergiát szolgáltat ahhoz, hogy a miozin fej leváljon az aktin szálról. Nem-izom sejtekben a kontraktilis mikrofilamentumok hasonló aktiválódása játszódik le, mint az izomrostokban, és eltérés csak a Ca-ionok reguláló szerepében mutatható ki.

Nyugvó sejtekben a citoszol szabad  $Ca^{2+}$  koncentrációja kb.  $10^{-7}$  M. Amennyiben ez a szint  $10^{-5}$  M-ra emelkedik, a kontraktilis elemek aktiválódnak. A vázizomzatban a Ca-ionok reguláló hatása egy fehérje molekula segítségével történik, amely az aktin felszínén helyezkedik el. Ez a regulátor molekula a globuláris fehérjéből, a troponinból és egy szuperhelikális struktúrájú nyélből, a tropomiozinból áll (2. ábra). A globuláris troponin, mely 40 nm intervallumokban helyezkedik el az aktin szálak mindkét oldalán, a troponin I, C és T alegységekből áll. Amikor a sejten belül a  $Ca^{2+}$  koncentráció alacsony, akkor a tropomiozin csavarmenet kimozdul a vájulatokból és fedi az aktin szálak azon pontjait, amelyek keresztkötésre képesek a miozin fejekkel. Ebben a helyzetben az izom relaxált állapotban van. Magas  $Ca^{2+}$  koncentráció esetén a  $Ca^{2+}$  kötődik a troponin C-hez és konformáció változást hoz létre. A tropomiozin visszahelyezkedik a vájulatokba és a szerikus gátlás megszűnik. Az aktin-miozin keresztkötések létrejöhetnek és az izom kontrahálódik. A stimuláció végén a citoszol Ca-ion koncentrációja csökken, a troponin C-ről a  $Ca^{2+}$  leválik és a ciklus kezdődik előről.

A döntő különbség a nem-izom sejtekben a szabályozásnak azon módján alapszik, hogy a Ca-ion kötő, reguláló fehérje, a kalmodulin, nem az aktinnal, hanem a miozinnal áll szoros kapcsolatban. Magas Ca-ion koncentrációk esetében a  $Ca^{2+}$  kötődik a kalmodulinhoz, és az így aktivált fehérje azután aktiválja azt a proteinkinázt, amelyik a miozin egyik könnyűláncát (P-LC) foszforilálja.



2. ábra. Az aktin és a regulátor fehérjék kapcsolata



3. ábra. A miozin aktiválásának vázlatja (simaizomokban és nem-izom sejtekben)

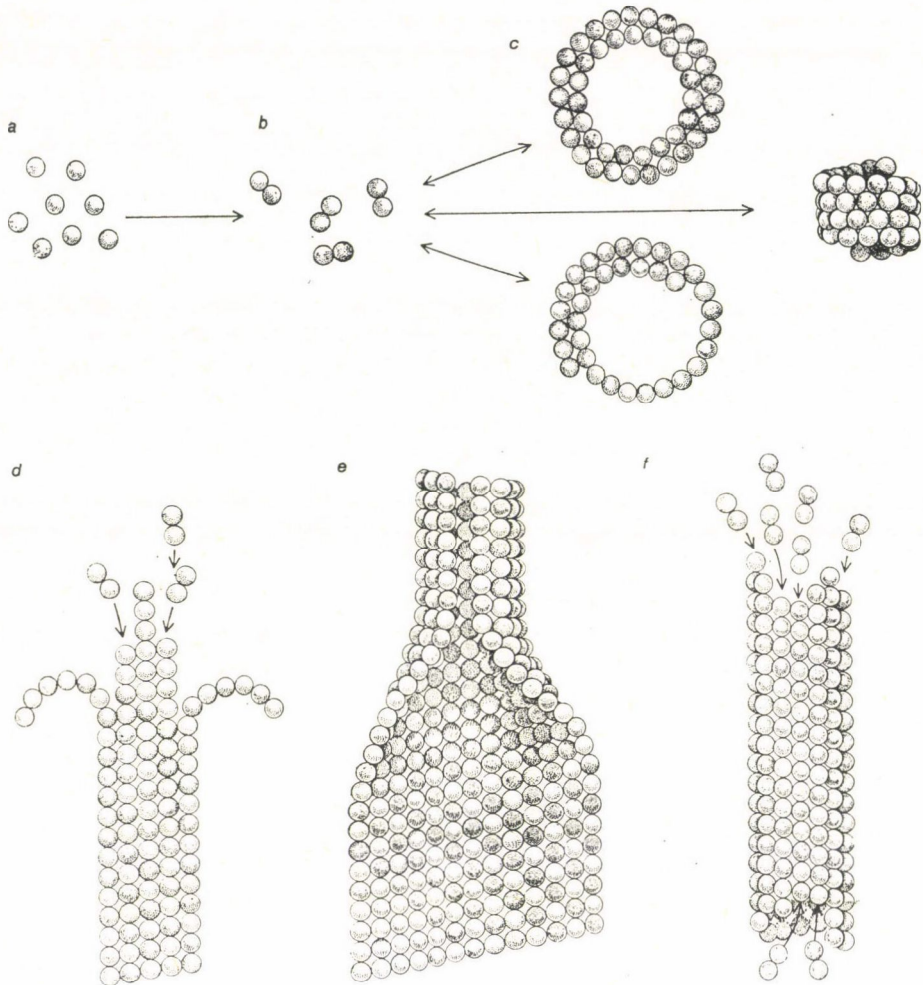
Az ily módon foszforilált miozin affinitása az aktinhoz jelentősen fokozódik, a keresztkötések létrejönnek és ennek következménye a kontrakció. A ciklus végén a  $\text{Ca}$ -ion szint csökken, a  $\text{Ca}^{2+}$  leválik a kalmodulinról, a proteinkináz inaktívulódik, a P-LC-t pedig egy folyamatosan működő foszfatáz defoszforilálja (3. ábra). Igen érdekes, hogy a P-LC maga is képes kationokat kötni, és így nyugalmi állapotban  $\text{Mg}$ -ionok kötődnek hozzá, aktiválódáskor azonban a  $10^{-5}$  M  $\text{Ca}^{2+}$  leszorítja a  $\text{Mg}^{2+}$ -t. Meg kell jegyeznünk, hogy mindhárom  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje, a troponin C, a kalmodulin és a P-LC filogenetikailag homológoknak tekinthető.



A szabályozás további lehetőségét rejti magában, hogy béta adrenerg stimuláció hatására a cAMP dependens proteinkináz foszforilálni képes magát a miozin kinázt, mely ebben az állapotában refrakterré válik az aktivált kalmodulinnal szemben. Ehhez a relaxációhoz hozzájárul még a  $\text{Ca}^{2+}$  szint csökkenése is, ami úgy jöhet létre, hogy a cAMP dependens proteinkináz a membrán fehérjéket foszforilálva szimultán képes fokozni  $\text{Na}^+$  ( $\text{K}^+$  és a  $\text{Na}^+$ ) $\text{Ca}^{2+}$  transzportot is, amely végül is az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint tartós csökkenéséhez vezet.

A nem-izom sejtekben az aktin aggregált monomerek, ill. polimerek formájában van jelen és feltételezik, hogy csak a szükségletnek megfelelően rendeződik filamentumok formájában. Az aktin polimerizációs-depolimerizációs egyensúlyát különböző segéd-fehérjék szabályozzák, melyeknek fiziológiai szerepe csak részben tisztázott. A DNAáz I és a profilin 1 : 1 arányú keverékben komplexet képeznek a G-aktinnal és gátolják annak a polimerizációját. Ezzel szemben az alfa-aktinin, mely a dense body-hoz és tapadási plaque-hoz kötődik az aktin polimerizációt és a filamentumok lehorgonyozását segíti elő. Az aktin binding protein (ABP) az aktininnel közösen, az aktin gelációt segíti elő, és megfelelő körülmények között elősegítheti a háromdimenziós rigid aktin hálózat (lattice) vagy az aktin kötegek kifejlődését. A filamin nem-izom sejtekben az F-aktinhoz kötődve gátolja az aktin-miozin interakciót.

A mikrotubulusok az eukaryota sejtek alakváltozásáért és stabilitásáért felelősek, bár legfontosabb feladatuk kétségtelenül sejtosztódás zavartalan lebonyolítása (DUSTIN 1980, KIRSCHNER 1978). A mikrotubulusok páros alagegységekből állnak (dimerek), amelyeknek mindegyike egy  $\alpha$  és egy  $\beta$  tubulint tartalmaz. Ezek 50—55 ezer dalton molekulásúlyú globuláris fehérjék, amelyek kolhicin, ill. vinblasztin-kötő, továbbá GTP és GDP-kötő helyeket hordoznak. A dimerek, megfelelő pH-jú és  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes közegben in vitro is polimerizálódnak. A mikrotubulusok organizálódása mindig az amorf tubulinból álló centriolumokból indul ki. A dimer gyűrűvé, kettős gyűrűvé vagy spirállá alakul, míg a protofilamentumok inkább lappá alakulnak és csak később záródnak csövekké (4. ábra). A mikrotubulusok képződésének szabályozója, mint erről már volt szó, a kalmodulin, mely gátolja a képződését és fokozza a depolimerizációt. A mikrotubulusok igen érzékenyek a hőmérsékletcsökkenésre és az intracelluláris nyomás fokozódására. A microtubule associated proteins (MAPs) kb. 200 ezer dalton molekulásúlyú kisegítő fehérjék, amelyek a tau-proteinnel együtt facilitálják a mikrotubulus képződést, bár maguk nem épülnek be a tubulusokba. A tubulusok felszínén elhelyezkedő MAP résztvehet kereszt-kötések képzésében és így a sejt alaki stabilitásának fenntartásában szerepet játszhat. A mikrotubulusok GTPáz aktivitással rendelkeznek, és N, ill. E kötőhelyeiken mind a GTP-t, mind a GDP-t megkötik, mégis a mikrotubulusok organizációjának energiaforrása nem tisztázott. Az N kötőhelyhez kapcsolódó GTP, jelzett GTP-vel végzett vizsgálatok alapján 11 assembly/disassembly



4. ábra. A mikrotubulus polimerizáció vázlatja

cikluson keresztül változatlanul maradt a kötésben, ezért feltételezik, hogy ezen a kötőhelyen a GTP-nek csak struktúr szerepe van. Az E kötőhelyen elhelyezkedő GTP hidrolizálható, de mint kiderült nem az organizációban, hanem a depolimerizációban van szerepe, mivel az utóbbi az energiaigényes folyamat. Az E helyhez kötődő GDP ezzel szemben stabilizáló hatású és a további polimerizációt gátolja.

Végül a citoszkeleton elemei közé tartoznak az *intermedier* vagy *100 Å filamentumok*, melyek minden emlős sejtben megtalálhatók. Kémiai vizsgálatukat is elvégezték és kimutatták, hogy kb. 54 ezer dalton molekulásúlyú egységeinek aminosav összetétele a legkülönbözőbb specierek esetében azonos. Szerepéről rendkívül keveset tudunk. Érdekes az az adat, hogy kolhicinnel

kezelt sejtekben a mikrotubulusok eltűnése után az intracelluláris mozgások jellege megváltozik és ugyanakkor a 100 Å filamentumok mennyisége rendkívül megnő (WANG és GOLDMAN 1978).

#### *A citoszkeletont károsító vegyületek hatása a fagociták működésére*

A citoszkeleton mindhárom komponense külön-külön és együttesen is jól vizsgálható immunfluoreszcens, vagy elektronmikroszkópos technikák alkalmazásával, és már szemikvantitatív eljárások is rendelkezésre állnak (BERLIN és OLIVER 1978). A citoszkeleton funkcionális vizsgálatára azonban az ad lehetőséget, hogy a már említett kolhicin és a vinca alkaloidák közé tartozó vinblasztin és vinkrisztin a tubulin dimerhez kötődve gátolja a tubulusok organizációját. A glutathion-oxidáló szerek, mint a dikarboxilsav vagy a tercier butilhidroperoxid a mikrotubulusok dezorganizációját váltják ki. Mindhárom vegyületcsoport esetében nehézséget jelent az a tény, hogy a mikrotubulusok számos más, a sejt számára életfontosságú folyamatban irányító szerepet töltenek be. A citoszkeleton mikrotubulusaira vonatkozóan a fenti készítményekkel végzett in vitro kísérletekből így csak fenntartásokkal vonhatunk le következtetéseket.

A Cytochalasin B a mikrofilamentumok kialakulását gátolja oly módon, hogy a fagocita sejtek aktin binding proteinjéhez (ABP) kötődve gátolja az aktin gelációját az aktiválás során. Az aktin polimerizációját gátló kémiai anyagot nem ismerünk. Nem szerencsés az sem, hogy a Cytochalasin B a mikrofilamentumokat károsító koncentrációban gátolja a sejtek cukor felszívódását.

A citoszkeleton funkcionális vizsgálatai (OLIVER 1978) arra mutatnak, hogy fagocitákban akár a kolhicin-vinblasztin, akár a Cytochalasin B kezelés azokat a folyamatokat gátolja, amelyek alapvetően membrán-dependensek, így pl. zavart szenved a sejtek helyváltoztatásával járó migráció, kemotaxis, továbbá a fagocitózis és a lizoszóma ürítés. Az elmondottakból következik, hogy károsodik az aktiválás végeredményét jelentő intra- vagy extracelluláris killing fokozódás. Cytochalasin B gátolja a random sejtmozgásokat, így a sejtmigrációt, receptor aktivitást és a fagocitózist, ezzel szemben fokozza a lizoszomális enzimek ürítését és a „respiratory burst” oxidációs termékeinek felszabadulását. A kolhicin gátolja az irányított mozgásokat, mint a kemotaktikus ingerre adott választ, a fagocitózist és a lizofagoszómák kialakulását, azaz az intracelluláris killing-et. A mikrotubulusok így feltehetően a nagy membránmozgások előkészítésében vesznek részt és hiányukban nem következik be a lizoszómák membránjának egybeolvadása a fagoszóma membránnal vagy a plazmamembránnal.

Ez a jelenség több okra is visszavezethető, de talán az egyik legfontosabb megfigyelés, hogy a kolhicin bár csak kisebb mértékben gátolja a fagocitózist,

a leváló fagoszómembrán ezekben az esetekben számos fontos fehérje és lipid komponenst nem tartalmaz, ami az intramembrán mozgások károsodására utal.

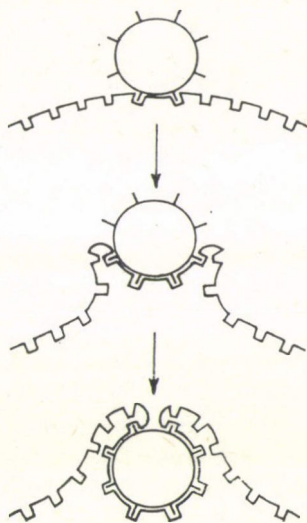
#### *A citoskeleton szabályozó szerepe az aktiválás egyes lépéseiben*

A fagocita sejtek aktiválódásának első lépése a receptor-ligand kapcsolódás. Az Fc és C3b receptorok esetében a ligandként szereplő IgG, ill. komplement 3. komponens csak akkor képes aktiválni a sejtet, ha a receptorok sűrűsödése a membrán megfelelő régióiban bekövetkezik. Ennek előfeltétele, hogy a receptorok szabadon mozogjanak a lipid bilayer vizes fázisában és a membrán külső vagy belső oldalán egymással keresztkötések képződhessenek. A citoskeleton elemeinek ismeretében igen tetszős volt tehát az az elképzelés, hogy a reakció kezdetén a receptorok mintegy le vannak horgonyozva a mikrotubulusokhoz, ezért a receptorok sűrűsödésének előfeltétele a mikrotubulus depolimerizáció, mely az „anchorage” megszüntetését eredményezi. Fluoreszcenciával jelzett Koncanavalin A, vagy IgG kolhicinnel kezelt sejtek egyik polusán helyezkedik el, jellegzetes cap-formában, míg kezeletlen sejtekben a jelzett ligandok homogén kötődést mutatnak a sejt egész felszínén. A további részletes vizsgálatok azután arra mutattak, hogy az aktiválódás fiziológiás körülmények között éppen ellenkezőleg, egy gyors és intenzív mikrotubulus polimerizációval kezdődik és a receptorok sűrűsödése ezzel egy időben következik be. A mikrotubulus polimerizáció úgy látszik előfeltétele az aktin polimerizációnak és a receptorsűrűsödés helyén kialakult mikrofilamentum sűrűsödésnek. A mikrotubulusok dezorganizációja időben csak később következik be. A mikrotubulusok polimerizálódása az egész sejtben megfigyelhető, mindig egy központi centriolumból indul ki, és a keletkezett hálózat radiálisan, a tér minden irányában kialakul. Az aktin háló ezzel szemben szorosan a cap alatt helyezkedik el és a sejtnek csak bizonyos régiójára vonatkozik (OLIVER 1978).

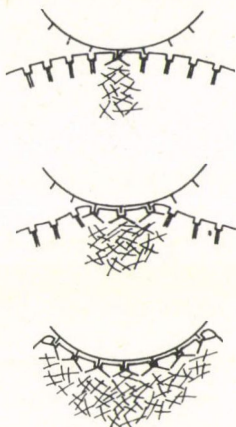
Amikor a sejt aktiválása olyan liganddal történik, amely keresztkötések létrehozására nem alkalmas, pl. kemotaktikus peptidek esetében, a mikrofilamentum hálózat diffúz és a sejtnek a kemotaktikus inger irányával megegyező, ún. vezérelően helyezkedik el.

A sejt aktiválás következő lépését — mint már erről szó volt — az ingerként szereplő ligand határozza meg. Inkorporáció csak akkor következik be, ha a receptor-ligand komplexek a sejt meghatározott régiójában vagy régióiban sűrűsödni tudtak. Amennyiben a ligandként szereplő IgG és/vagy C3b fragmentum szabad végéhez korpuzskuláris antigén kapcsolódik a fagocitózist az ún. „zipper-model” szerint képzeljük el (SILVESTRIN és LOIKE 1980). Ennek előfeltétele, hogy az antigénként fellépő korpuzskulum-antigén determinánsai homogénezen helyezkedjenek el a korpuzskulum felszínén, és a korpuzskulum körül feltüremelő membrán minden irányban fogaskerékként tudjon receptorai-

val beilleszkedni az antigént borító ligandok kifelé álló terminális, receptorhoz illő részeivel. A zipper-model szerint történő fagocitózis másik előfeltétele így az hogy az antigént a ligand homogén, egész membránra kiterjedő módon borítsa be (5. ábra és 6. ábra). A fagocitózis szakaszában az egész sejt területén csökkent a mikrotubulusok mennyisége, és a ligand-kötés régiójában kialakult lobopódiumban intenzív aktin polimerizáció, valamint nagy mennyiségű miozin mutathatók ki. Ezt a folyamatot a mikrotubulusok egész sejtre kiterjedő polimerizációja indítja el. A mikrotubulusok szerepe a fagocita sejtek aktiválásában tehát döntő jellegű, és inkább indirekt szabályozás, amelynek mechaniz-

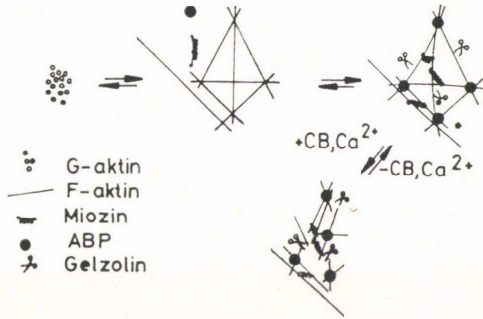


5. ábra. Fagocitózis a „zipper modell” szerint

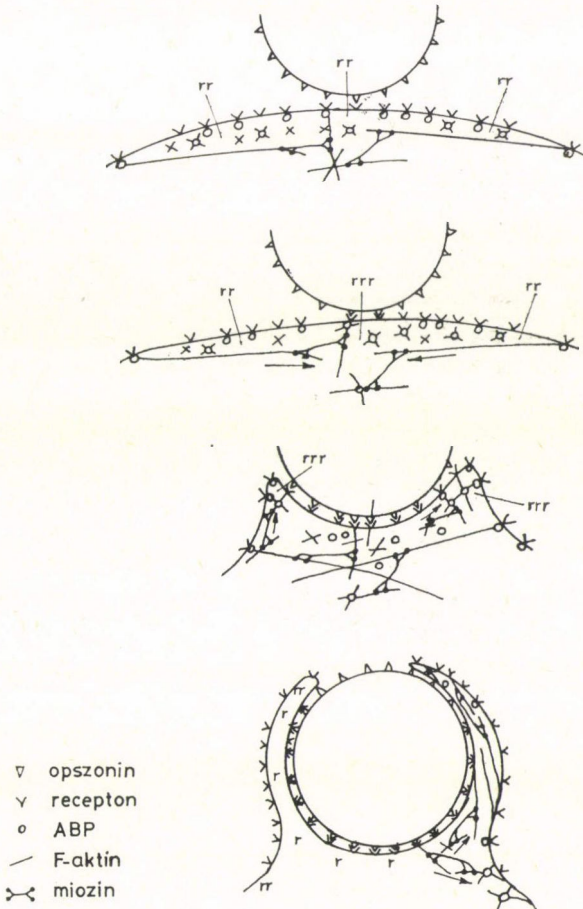


6. ábra. Kontraktilis fehérjék sűrűsödése a receptor-ligand kötés régiójában

musát nem ismerjük. HARTWIG és mtsai (1980) munkája alapján annál jobban ismerjük a lobopódiumban lezajló jelenségeket, melyek végül is az egész membrán rész bekebelezéséhez vezetnek. A lobopódiumban a frissen polimerizálódó aktin filamentumok először random-szerűen helyezkednek el, majd később egyre inkább parallel elrendeződésben futnak a lobopódium hossz tengelyével párhuzamosan. Az első reakció természetesen a G-aktin átalakulása fibrilláris F-aktinná, amely lépést a fagocitákban az ABP katalizált (7. és 8. ábra). A lobopódiumban létrejönnek az F-aktin-ABP keresztkötések, amelynek eredménye aztán egy gélállapotú rigid lattice kialakulása. Ez a gél ATP hatására *in vitro* is kontrahálódik, míg kis koncentrációban a  $Ca^{2+}$  fokozza, ill. magas koncentrációban gátolja. A lattice  $Ca^{2+}$  érzékenységet egy „gelsolin” elnevezésű segédprotein szabályozza (HELEN és STOSSEL 1979). A lattice-be ágyazva, inkorporálva miozin molekulák helyezkednek el, melyek az izometriás tenziót generálják. Jelenlegi elképzelésünk szerint a membrán belső, citoplazma felé eső részében levő ABP leválása az első lépés, mely az aktin átalakulását megindítja, abban a membrán régióban, ahol a külső felszínen a receptor-ligand „cap” már előzőleg kialakult. Az ADP leválásának (aktiválódásának) előfeltétele a gyors, átmeneti mikrotubulus polimerizáció és következménye a mikrotubulus teljes és gyors szétesése a lobopódium területén. A mikrotubulus hálózat a sejt nem érintett területein ép és funkcióképes. Az átkapcsolódás mechanizmusa nem ismert. Az aktin lattice, amely a membrán belső részéhez tapad, arra húzóerőt gyakorol és a membránt begyűri a partikulum irányába, így a membrán lassan elmozdul a partikulum alatt, a partikulum újabb és újabb membránrészekkel érintkezik, mely újabb ABP mennyiségek felszabadulását eredményezi. A lobopódium széli részeibe épült miozin ugyanakkor újabb aktin szálakat von be a lattice képződésbe. A lobopódiumban kívülről befelé egy rigiditási gradiens alakul ki, mely szerepet játszik a  $Ca^{2+}$  csatornák megnyitásában. A  $Ca^{2+}$  beáramlás azután a cap alatti membrán régióban gelációt hoz létre, miközben az aktin kötegek mindjobban húzódnak a kisebb rigiditású hely felől a nagyobb rigiditású hely felé. Az ismertett jelenségek jó magyarázatát adják a már említett zipper-modell szerinti inkorporációnak. Az inkorporáció aktusát a kitüremkedett membrán részek összezárulása fejezi azután be, a korpuszkulum felett. A lizofagoszóma kialakulását az intracelluláris cAMP szint emelkedése gátolja, míg a cGMP fokozza. Ez már önmagában is indokolja, hogy a folyamatot a citoskeleton fontos szabályozási területének tekintsük. A tények azonban ennek ellene szólnak. Sem a Cytochalsin B, sem a vinblasztin ugyanis nem befolyásolják döntő módon a lizofagoszómák fúzióját (OLIVER 1978). Ennek egyik oka talán az, hogy a vizsgálatok döntően monolayer kultúrákban történtek, és az adherált sejtekben a mikrofilamentumok polarizációja csak lassan következik be (BERLIN és OLIVER 1978). A fúzió előfeltétele, hogy a fagoszómát védő és körülötte rendeződő aktin-gél eltűnjön a régióból. Ezt a folyamatot az újra organizálódó mikrotubulusok indítják el. Így az egyetlen biztos adat, hogy



7. ábra. A citoplazma mozgást kontrolláló komponensek kapcsolata



8. ábra. A korpuzskulum bekebelezésének modellje

vinblasztinnal kezelt sejtekben a lizofagoszóma fúziója időben elhúzódó. Ennek megfelelően az intracelluláris killing is lassú.

Az intra- és az extracelluláris killing döntő módon függ a lizoszómák intra- és extracelluláris ürülésétől, a proteázok és az „oxidative burst” termékeinek szintézisétől. Ezeket a folyamatokat a vinblasztin egyértelműen gátolja, míg a Cytochalasin B fokozza.

#### *A citoskeleton működésének szabályozása fagocitákban*

A mikrofilamentum regionális képződését, mint erről szó volt, a mikrotubulusok gyors és provizórikus polimerizációja indítja el, így szerepük a fagocita sejtek aktiválódásában inkább indirekt módon, de központi jelentőségű. Azt is említettük, hogy a depolimerizációt előidéző átkapcsolás mechanizmusáról semmit nem tudunk. Jól ismertek azonban azok a tényezők, melyek a mikrotubulusok gyors szintézisét és szétesését kiváltják az aktivált fagocitákban. A mikrotubulusok polimerizációját az intracelluláris cAMP szint emelkedése gátolja, míg a cGMP szint növekedése fokozza. A cAMP szint emelkedése nem okoz mikrofilamentum dezorganizációt, mivel a depolimerizációval járó cAMP szint emelkedés inkább következménye, mint oka a mikrotubulusok szétesésének (MALAWISTA és mtsai 1978). A citoskeleton és a ciklikus nukleotidák szoros kapcsolatára utal, hogy vörösvérsejtekben az izolált citoskeletonális komponens jelentős adenilcikláz aktivitással rendelkezik (SAHYOUN és mtsai 1981). Így a funkcionális kapcsolatnak szoros strukturális kapcsolat képezheti az alapját. A ciklikus nukleotidakon kívül, a fagocita sejtek  $H^+$  státusa is döntő, szabályozó szerepet játszik a citoskeleton működésében. Már régóta ismeretes, hogy a legkülönbözőbb oxidáló ágensek képesek aktiválni a fagocita sejteket, továbbá, hogy a fertőzéssel és a tumorsejtekkel szembeni védekezés lényegében az effektor sejtek glutathion-SH státusának függvénye (OLIVER 1978). Exogén oxidáló ágensek, valamint az intracelluláris „oxidative burst” oxidáció irányában való eltolódása, pontosabban az oxidált glutathion mennyisége, a mikrotubulus depolimerizáció legfontosabb és leggyorsabb triggere. A mikrotubulusok szétesése ugyanakkor az intracelluláris pH emelkedésével jár. A szabályozás igen általános lehetőségét rejti magában az a tény, hogy TILNEY és mtsai (1978) kísérletei szerint különböző ionofor hatású vegyületek aktin polimerizációt kiváltó hatása nem a kation transzportáló hatásokkal függ össze, hanem a kation transzporttal kapcsolódó  $H^+$  leadással. Így a  $H^+$  veszteség ellentétesen hatna a citoskeletonot képező két komponensre.

A fagocita sejtek szabályozásában a citoskeleton tehát centrális helyet foglal el és mintegy a karmester szerepét játssza a különböző, egymástól ma még többé-kevésbé függetlennek tekintett szabályozási rendszer között. Ez morfológiai és biokémiai vetületében is igaz.

Fel kell azonban ismernünk, hogy az itt ismertetett kísérleti tények már túlnőnek az immunológia keretein, bár gyakorlati jelentőségük a fertőzéssel



szembeni védekezésben, az arterioszklerózis kutatásban és végül a rákkutatásban felbecsülhetetlen.

Most szeretnénk hangsúlyosan megemlíteni, amit eddig nem tettünk, a fagocita sejtek kiválóan alkalmasak modell-kísérletek számára részben technikai, részben pedig elvi okokból: könnyen hozzáférhető és in vitro jól tenyészthető sejtek, amelyek tetszés szerint vizsgálhatók aktív és inaktív állapotban. Elegendő mennyiségben állnak rendelkezésre még humán vizsgálatok esetében is, így egyszerre végezhető el a morfológiai és biokémiai vagy biofizikai kísérletek. Végül, fiziológiai szerepük jól ismert és funkciójuk változása adekvát kísérleti rendszerekben meghatározható.

A szabályozásnak azonban az a mechanizmusa, melyet ismertettünk, nemcsak a fagocita sejtekre érvényes. Az eukariota sejtek működésének e szabályozása szinte általános érvényű az eddigi vizsgálatok alapján, és szépsége és jelentősége éppen ebben csúcsosodik ki.

#### IRODALOM

- AXLINE, S. G., SIMON, S. L., ROBIN, E. D. and PESANTI, E. L.: In *Mononuclear Phagocytes* ed. R. van Furth, Martinus Nijhoff Publishers, Hague, Boston, London p. 1247 (1980).
- BERLIN, R. D. and OLIVER, J. M.: *J. Cell Biol.* **77**, 789 (1978).
- BIANCO, C., GRIFFIN, F. M. and SILVESTRIN, S. C.: *J. exp. Med.* **141**, 1278 (1975).
- BLOOM, B. R., DIAMOND, B., NEWMAN, W., SCHNECK, J., PISCATELLO, J., DAMIANI, G., ROSEN, N., MUSCHEL, R. and ROSEN, O.: In *Mononuclear Phagocytes* ed. R. van Furth, Martinus Nijhoff Publishers, Hague, Boston, London p. 941 (1980).
- DABROWSKA, R. and HARTSHORNE, D.: *J. Biochem. biophys. Res. Commun.* **85**, 1352 (1978).
- DIAMANSTEIN, T. and ULMER, A.: *Immunology* **30**, 741 (1976).
- DUSTIN, P.: *Scientific Am.* **243**, 67 (1980).
- HAND, W. L., KING, N. L., JOHNSON, J. J. and LOWE, D. A.: *Nature* **265**, 543 (1977).
- HARTWIG, H. J., H. L. YIN and STOSSEL, T. P.: In *Mononuclear Phagocytes* ed. R. van Furth, Martinus Nijhoff Publishers, Hague, Boston, London p. 971 (1980).
- HELEN, L. YIN and STOSSEL, T. P.: *Nature* **281**, 583 (1979).
- KAY, A. B., GLASS, E. J. and SALTER, D. G.: *Clin. exp. Immunol.* **33**, 294 (1979).
- KIRSCHNER, M. W.: *Int. Rev. Cytol.* **54**, 1 (1978).
- LOWRIE, D. B., JACKETT, P. S., ABER, V. R. and CAROL, M. E. W.: In *Mononuclear Phagocytes* ed. R. van Furth, Martinus Nijhoff Publishers, Hague, Boston, London p. 1057 (1980).
- MALAWISTA, S. E., OLIVER, J. M. and RUDOLPH, S. A.: *J. Cell Biol.* **77**, 881 (1978).
- MARCUM, J. M., DEDMAN, J. R., BRINKLEY, B. R. and MEANS, A. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3771 (1978).
- MEANS, A. R. and DEDMAN, J. R.: *Nature* **285**, 73 (1980).
- MELLON, M. G. and REBHUN, L. I.: *Cell. Biol.* **70**, 226 (1976).
- MICHELL, R. H., JONES, L. M. and JAFFERJI, S. S.: *Biochem. Soc. Trans.* **5**, 77 (1977).
- MICHELL, R. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 81 (1975).
- MUSCHEL, R. J., ROSEN, N., ROSEN, O. M. and BLOOM, B. R.: *J. Immunol.* **119**, 1813 (1977).
- NAJJAR, V. A. and NISHIOKA, K.: *Nature* **228**, 672 (1970).
- OLIVER, J. M.: *Am. J. Path.* **93**, 221 (1978).
- ÖGMUNSDOTTIR, H. M., WEIR, D. M. and MARMION, B. P.: *Br. J. exp. Pathol.* **59**, 1 (1978).
- ÖGMUNSDOTTIR, H. M. and WEIR, D. M.: *Clin. exp. Immunol.* **40**, 223 (1980).
- PASSWELL, J. H., GOLDRING, S. R. and DAYER, J. M.: *Immunology* **46**, 415 (1982).
- REMOLD, H. G.: *J. exp. Med.* **138**, 1065 (1973).
- ROCKLIN, R. E.: *J. Immunol.* **116**, 816 (1976).
- SANDLER, J. A., GALLIN, J. I. and VAUGHAN, M.: *J. Cell Biol.* **67**, 480 (1975).
- SAHYOUN, N. E., H. LE VINE III, HEBDON, G. M., HEMADAH, R. and CUATRECASAS, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2359 (1981).
- SCHAUB, M. C. and WATTERSON, J. G.: *Trends in Pharm. Sci.* **2**, 279 (1981).
- SERHAN, Ch. N., KORCHAK, H. M. and WEISSMANN, G.: *J. Immunol.* **125**, 2020 (1980).

- SILVESTREIN, S. C. and LOIKE, J. D.: In *Mononuclear Phagocytes* ed. R. van Furth, Martinus Nijhoff Publishers, Hague, Boston, London p. 895 (1980).
- STABINSKY, Y., BAR-SHAVIT, Z. FRIDKIN, M. and GOLDMAN, R.: *Mol. Cell Biochemistry* **30**, 71 (1980).
- TILNEY, L. G., KIEHART, D. P., SARDET, C. and TILNEY, M.: *J. Cell Biol.* **77**, 536 (1978).
- WANG, E. and GOLDMAN, R. D.: *J. Cell Biol.* **79**, 708 (1978).
- WEATHERBEE, J. A.: *Int. Rev. Cytology Suppl.* **12**, 113 (1981).
- WEISSMANN, G., GOLDSTEIN, I., HOFFSTEIN, S., CHAUVET, G. and ROBINEAUX, R.: *Ann. NY Acad. Sci.* **256**, 222 (1975).
- WOLFF, D. J. and SIEGEL, F.: *J. Biol. Chem.* **247**, 4180 (1972).
- YERNA, M. J. HARSHORNE, D. J. and GOLDMAN, R. D.: *Biochemistry* **18**, 673 (1979).