

FLUORESZCENCIA-SPEKTROSKÓPIÁS MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA BIOLÓGIAI RENDSZEREK VIZSGÁLATÁBAN: FÖRSTER-TÍPUSÚ ENERGIATRANSZFER

SOMOGYI BÉLA, MATKÓ JÁNOS és PAPP SÁNDOR

Debreceni Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Debrecen

I. Bevezetés

A lumineszcencia tárgykörébe tartozó alapjelenségek egyike az ún. Förster-típusú energiatranszfer, aminek lényege, hogy ha egy fluoreszkáló festék emissziós spektruma átfed egy másik festék (akceptor) abszorpciós spektrumával, a gerjesztett donor dipól-dipól kölcsönhatás révén sugárzás nélkül is átadhatja gerjesztési energiáját a tőle 10 nm távolságon belül tartózkodó akceptornak. Tekintve, hogy ezen folyamat sebessége (az átmenet valószínűsége) a donor—akceptor távolság (R) hatodik hatványa szerint csökken, a folyamat tanulmányozása igen érzékeny módszert jelent az ilyen nagyságrendű távolságok és különböző biológiai funkciók közötti korrelációk vizsgálatában. A transzfer mértéke információt szolgáltathat különböző molekuláris és sejtszintű folyamatokról, s a folyamatokban résztvevő (jelölt) komponensek helyének változásáról. Így a fluoreszcencia — s a vele kapcsolatos energiatranszfer folyamatok — igen komplex elméleti háttére ellenére, az energiatranszfer relatív változásának meghatározása révén sok esetben igen hasznos, a biológiai objektumok széles skáláján — molekuláris szinttől sejtszintig — alkalmazható félempirikus, fenomenológikus vizsgálati módszer is lehet.

Jelen közlemény keresztmetszeti képet ad arról, hogy a Förster-típusú energiatranszfer miként használható a különböző molekuláris és sejtszintű biológiai problémák megoldásában. Tekintve, hogy elsődleges célunk az energiatranszfer hatékonyságának a bemutatása biológiai rendszerek vizsgálatában, az alapjelenséget illetően csak néhány összefüggés felírására szorítkozunk, s a részleteket illetően az e tárgykörben megjelent kitűnő összefoglalókra és monográfiákra utalunk (CANTOR, TAO 1971, DALE, EISINGER 1974, FAIRCLOUGH, CANTOR 1978, STRYER 1978).

Egy donor—akceptor pár esetén a gerjesztett donor molekula energiasztése a következő módon mehet végbe:

- a) fluoreszcencia útján (k_f sebességi állandóval)
- b) Förster-típusú energiatranszfer útján (k_t sebességi állandóval)
- c) különböző kioltó mechanizmusok révén ($\Sigma_i k_i$ eredő sebességi állandóval)

A fentieknek megfelelően definiálható az energiatranszfer E hatásfoka:

$$E = \frac{k_t}{k_f + k_t + \sum_i k_i} \quad (1)$$

A transzfer k_t sebességi állandójára FÖRSTER munkái alapján (FÖRSTER 1948, FÖRSTER 1966) felírható, hogy

$$k_t = 8,71 \times 10^{23} J n^{-4} k_f R^{-6} \kappa^2 \text{ sec}^{-1}, \quad (2)$$

ahol k_t a fluoreszcencia átmenet sebességi állandója, n a donort és az akceptort elválasztó közeg törésmutatója, R a donor—akceptor távolság, J az ún. átfedési integrál (a hullámhossz függvényében megadva):

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty \varepsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}, \quad (3)$$

ahol $\varepsilon_A(\lambda)$ az akceptor moláris extinkciós együtthatója, $F_D(\lambda)$ a donor korrigált emissziós intenzitása egységnyi hullámhosszra vonatkoztatva.

A κ^2 a donor—akceptor pár relatív orientációját jellemzi:

$$\kappa^2 = (\cos \alpha - 3 \cos \beta \cos \gamma)^2, \quad (4)$$

ahol α a donor és az akceptor dipólusmomentumai által bezárt szög, β a donor momentuma és a donor—akceptor középpontjait összekötő egyenes által bezárt szög, γ az akceptor momentuma és a donor—akceptor középpontjait összekötő egyenes által bezárt szög.

Az (1) összefüggés másik gyakran használt alakja:

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}, \quad (5)$$

ahol

$$R_0 = 9,74 \times 10^3 (J n^{-4} \Phi \kappa^2)^{1/6}. \quad (6)$$

Itt

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + \sum_i k_i} \quad (7)$$

a donor kvantumhatásfoka.

A kísérleti lehetőségeket illetően a transzfer E hatásfokának meghatározására számos egyensúlyi, ill. fluoreszcencia élettartam mérésen alapuló módszer ismeretes (EISENBERG 1975, DALE és EISINGER 1975), amelyek részletezésével itt nem foglalkozunk.

2. Molekuláris paraméterek meghatározása Förster-típusú energiatranszfer segítségével

A Förster-típusú energiatranszfer hatodik hatvány szerinti távolságfüggése rövid (2–10 nm) távolságon belül igen jó térbeli felbontást biztosít. Tekintve, hogy az energiatranszfer „hatótávolsága” a molekulák (főleg a makromolekulák) átmérőjének tartományába esik, kézenfekvő alkalmazási területként adódik molekulán belüli, molekula-aggregátumok komponensei közötti távolságok vizsgálata. Az energiatranszfer ugyanezen sajátossága teszi lehetővé asszociációs-disszociációs folyamatok követését, reakciók sztöchiometriájának meghatározását, enzim reakciók sebességének mérését stb. Az a tény, hogy a fluoreszcencia élettartam általában a nsec (10^{-9} sec) tartományba esik, a módszer alkalmazási lehetőségeinek kiterjesztését jelenti, amennyiben segítségével az ilyen időtartományba eső mozgások detektálhatók, s változásaik mérhetők. Ilyen, különböző fizikai-kémiai, polimerkémiai, biokémiai, biofizikai, biológiai szempontból egyaránt fontos mozgástípusok pl. a translációs diffúziós mozgás, az intramolekuláris Brown-mozgás, a molekulán belüli atomcsoportok relatív mozgása stb.

2.1 Intramolekuláris távolságok mérése

Makromolekulák jól definiált, specifikus helyére megfelelő donor—akceptor párt képező fluoreszcens festékeket kötve, a megfelelő helyek közötti átlagos távolság a donor és akceptor molekulák között történő rezonancia energia transzfer hatásfokának (és egyéb paramétereinek) meghatározása után kiszámítható. Ehhez nyilvánvaló feltétel, hogy a festékek kötődése ne okozzon olyan mértékű konformáció változást, ami megváltoztatja a kérdéses távolságot. Ezen feltétel teljesülésének kísérletes bizonyítása általában nehezen kivitelezhető. A szokásos eljárás — amennyiben erre lehetőség van — a távolság különböző festékpárok segítségével történő meghatározása. Amennyiben különböző festékpárokkal közel azonos távolság adódik, az említett feltétel nagy valószínűséggel teljesül, s a meghatározott távolság elfogadható.

Gyakori eset, hogy egy makromolekula működésének megértéséhez igen hasznos adat a molekula alakjának ismerete. Jó példa erre a rodopszin, amelynek molekulásúlya 40 000 dalton. Egy ilyen molekulásúlyú gömb alakú molekula átmérője kb. 4,5 nm. Ez azt jelenti, hogy ha a rodopszin gömb alakú, akkor nem éri át a membránt, amelyben működését kifejti. Ha viszont, alakja elnyújtott, akkor átérheti azt. Ez utóbbi, elnyújtott alakra utaló molekuláris távolságokat (a legnagyobb 7,5 nm) határoztak meg WU és STRYER (1972) különböző donor—akceptor párokat képező fluoreszcens festékekkel jelölve a rodopszin meghatározott helyeit. Bár a méréseket nem a kezeletlen membránban, hanem digitonin oldatba, illetve mesterséges membránba vitt rodopszinon

végezték, az eredmény — az ugyanis, hogy a rodopszin elnyújtott alakú, ami lehetővé teszi számára, hogy helyes orientáció esetén átérje a membránt és mint a membrán foton-aktivált csatornája működjön — nagy valószínűséggel extrapolálható a természetes környezetében található rodopszinra is. Későbbi, más módszer használatával végzett kísérletek ugyancsak alátámasztják WU és STRYER megállapítását (SARDET, TARDIEN, LUZRATI 1976, MONTAL, DARSZON, TRISSL 1977). Hasonlóan, a G aktin specifikus helyeinek fluoreszcens jelölésével mérték intramolekuláris távolságot MIKI és MIHASHI (1978). A G aktin nukleotid kötőhelyét ε -ATP-vel, a cys-373 SH csoportját pedig N-/4-dimetilamino-3,5-dinitrofenil/maleimiddel (DDPM) jelölve mind „steady state” fluorimetriás úton, mind fluoreszcencia élettartam mérésével meghatározták az ε -ATP-ről a DDPM-re irányuló energia transzfer határfokát. A különböző módon mért transzfer határfoka hibahatáron belül azonos érték volt. Ennek felhasználásával a G aktin nukleotid kötő helyének a 373-as ciszteintől mért távolságait meghatározva, arra 3 nm értéket kaptak.

Mint ismeretes, az enzimek a kémiai reakciók sebességét 10 — 12 nagyságrenddel növelik. Katalizáló hatásuk kifejtésének első lépése az ún. enzim-szubsztrát komplex kialakulása. Ugyancsak ismeretes, hogy az enzimek ezen reakciógyorsító hatása szelektív, vagyis az enzimek szubsztrátjaikra nézve igen specifikusak. Ez azt jelenti, hogy az enzim-szubsztrát komplexben az enzim és szubsztrát között több ponton is kötések alakulnak ki. Nyilvánvaló, hogy az enzim és szubsztrát között kialakuló kötések, valamint az enzim kötőcentrumában található egyéb csoportok természetének tisztázása igen fontos a katalízis mechanizmusának feltárásában. E helyütt a probléma tisztázásához használatos módszerek felsorolásától eltekintve, csak a Förster-típusú energiáttranszfer mérésén alapuló módszer alkalmazásával foglalkozunk.

Ezt a módszert használták a termolizin aktív centrumának tanulmányozására HORROCKS és mtsai (1975), valamint BERNER és mtsai (1975). A termolizin a hődenaturációval szemben nagy mértékben ellenálló fehérjebontó enzim. Az aktivitásához szükséges cink ion az aktív centrumot képező mélyedésben van, s az aktív centrum tartalmaz még négy kalcium ion kötőhelyet is. A fenti szerzők az enzim aktív centrumában levő Zn^{2+} iont Co^{2+} ionra, míg az egyik Ca^{2+} -t Tb^{3+} ionra cserélték. Ekkor az enzim triptofán csoportjait gerjesztve, azok energiáttranszfer révén gerjesztik a Tb^{3+} iont, ami viszont a Co^{2+} ionnak adja át energiája egy részét. A kobalttal jelölt és kobaltot nem tartalmazó enzimpreparátumok Tb^{3+} emissziójának vizsgálatából meghatározható a Tb^{3+} és Co^{2+} közötti energiáttranszfer hatékonysága. Ezen adat birtokában a fenti szerzők a donor—akceptor távolság értékére 1,36 nm-t kaptak, ami jól egyezik a röntgen kristallográfiás módszerrel mért adatokkal.

Későbbi vizsgálatokban ugyanezen energia transzfer rendszert használták a termolizin hődenaturációjának vizsgálatára (KHAN és mtsai 1978). A hőmérsékletet 20 °C-ról indulva fokozatosan 90 °C-ig emelték. Eközben a Tb^{3+} —

Co^{2+} távolság szigmoid lefutást követve 1,46 nm-ről kb. 2,2 nm-ig emelkedett. A 80 °C körüli és annál magasabb hőmérsékleten a fluoreszcencia intenzitások alacsony szintje miatt, meglehetősen megnőtt a mérés hibája. Ez az egyik lehetséges magyarázata annak, hogy a mért transzfer határfokából számított donor—akceptor távolság nem tükrözte a termolizin kb. 80 °C körül bekövetkező denaturációját. Egy másik, a mérési módszer sajátosságából következő probléma ez esetben az, hogy a donor—akceptor távolság esetleg jelentős növekedését az energiáttranszfer erős (hatodik hatvány szerinti) távolságfüggése miatt a natív, kisebb donor—akceptor távolsággal jellemezhető enzim molekulák jele elnyomhatja.

WOLFMAN és HAMMES (1977) az enzim specifikus kötőhelyeire bekötött donor és akceptor molekulák segítségével tanulmányozták a nyúlizom foszfofruktokináz enzimének regulációját. Vizsgálataikban az enzim aktív centrumához közel eső citrát-kötő helyet és a legreaktívabb SH csoportot jelölték. A citrát-kötő helyhez piridoxál-5'-foszfátot (PMP) kötöttek, míg az SH csoportot NBD-kloriddal (7-kloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) vagy NSM-mel (4-dimetil-amin-4'-maleimidostilben) reagáltatták. Mindkét esetben a PMP szerepelt donorként. Az NBD-vel jelölt enzim esetében a donor—akceptor távolság értéke 4 nm-t, míg NSM jelölés esetén 3,6 nm-t kaptak. A további vizsgálatok azt mutatták, hogy a donor—akceptor távolság a kísérleti hibán belül változatlan marad mind pH:7,0, mind pH:8,0 esetén. Változatlan marad továbbá különböző (0,1—1 mM) koncentrációjú ATP, 6 mM fruktóz 6-foszfát, valamint 5 mM MgCl_2 jelenléte esetén is. Ez azt mutatja, hogy sem az enzim aktivitásában regulációs szerepet játszó aggregációs folyamatok, sem a különböző — a szabályozásban ugyancsak résztvevő — ligandok okozta konformációs változások nem vezetnek a donor—akceptor távolság változására. Tekintve, hogy a donor—akceptor pár az enzim aktív centruma közelében van, az eredmények azt mutatják, hogy az aktív centrum lokális konformációs állapota nem érzékeny a regulációs faktorokra, s így a citrát enzimgátló hatása allosztérikus.

2.2 Intermolekuláris távolságok mérése

Az intramolekuláris távolságméréshez hasonlóan, különböző egymáshoz kötődő vagy egymás közvetlen közelében lokalizált molekulákat megfelelő donor, ill. akceptor molekulákkal jelölve, a Förster-típusú rezonancia energiáttranszfer mérése útján a rendszer funkciójával összefüggő, s truktúrára jellemző információk nyerhetők. Az intermolekuláris transzfer rendszereknek különös szerepe van a sejten belül található tartósan vagy átmenetileg előforduló különböző struktúrák (pl. kromoszóma, multienzim komplexek, antigén-antitest komplexek, mediátor-receptor komplexek, enzim-ligand komplexek stb.) tanulmányozásában. Az alábbiakban említett példák ezen vizsgálatok jelentő-

ségét, sokoldalú alkalmazhatóságát kívánják illusztrálni — a teljességre való törekvés igénye nélkül.

Förster-típusú energiatranszfer vizsgálatok sorozata segítette a hét polipeptid- láncból felépülő citokróm *c* oxidáz rendszer térbeli elrendezésének vizsgálatában. Három specifikus hely (egyik a citokróm *c* hem csoportja) közötti távolság meghatározása a citokróm *c* oxidázt alkotó alegységek relatív térbeli elrendezésére nézve igen értékes ismereteket adott. Ugyanakkor egy érdekes kérdést is felvetett. Azt ugyanis, hogy miként mehet végbe a kötött citokróm *c* hem csoportja és a legközelebbi hem *a* csoport közötti relatíve nagy — 2,5 nm — távolságot áthidaló elektrontranszport (DOCKTER, STEINEMANN, SCHATZ 1978).

Esherichia coli-ből preparált piruvát dehidrogenáz multienzim komplex három enzimet — E_1 , E_2 , E_3 — tartalmaz, amelyek sztöchiometriai aránya a komplexben 24:24:12. A komplexen belül az intermedier molekulákat valószínűleg egy rotációra képes 1,4 nm hosszúságú „kar” szállítja az egyik aktív centrumtól a másikhoz (KÖRKE, REED 1960). Ezen elképzelés módosított formája szerint az intermediereket két ilyen forgó „kar” átadhatja egymásnak (KÖRKE és mtsai 1963), ami az egyes aktív centrumok közötti maximális távolságot az előbbiből következő 2,8 nm helyett 5,6 nm-re terjeszti ki. MOE, LERNER és HAMMES (1974) kimutatták, hogy az E_1 enzim aktív centrumába kötött tiokróm-difoszfáttól az E_3 aktív centrumába kötött FAD felé irányuló rezonancia energiatranszfer hatásfoka 8%, ami ebben az esetben a két aktív centrum között 4,5 nm nagyságú távolságot jelent. Ez a kísérleti eredmény tehát kizárta a fenti egyszerű intermedier transzfer lehetőségét, s egyúttal valószínűsítette a második — a forgó „kar”-ok közötti intermedier átadás útján realizálódó — mechanizmust. Természetesen más — a mérési eredménnyel összeegyeztethető — mechanizmus is elképzelhető, mint pl. az aktív centrumok konformációs változás okozta időleges közeledése útján végbemenő intermedier transzfer. Ugyanezen komplex E_1 enzimének energiatranszfer segítségével történő tanulmányozása vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy allosztérikus ligandok által produkált konformációs változás több mint 4 nm távolságban is érezhető hatását. A piruvát dehidrogenáz (E_1) SH csoportját — ami távol van mind az aktív centrumtól, mind a regulátor helytől — az enzim aktivitásának jelentős változása nélkül maleimiddel, az enzim Co-A kötő regulátor centrumát ANS-sel jelölve PAPADAKIS és HAMMES (1977) azt találták, hogy a festékek közötti távolság több mint 4 nm. Ugyanakkor, az SH-t jelölő festék mobilitása jelentősen megnő, ha az enzimhez Co-A kötődik. Ez egyértelműen a Co-A által előidézett, nagy távolságban (4 nm) is jól észlelhető konformációs változást mutatja. Egy másik rendszer, amelynek vizsgálatában jelentős ismereteket szolgáltatott az energiatranszfer mérését célzó fluoreszcens vizsgálatok, a kódatírást végző DNS-függő RMS polimeráz. Az enzim négyféle alegységből épül fel ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$). Bár szerkezetéről, működéséről, szabályozásáról,

sok adat áll rendelkezésre, hatásmechanizmusa távolról sem tekinthető ismertnek.

Működése a DNS-hez történő kötődéssel kezdődik. Tekintve, hogy csak a DNS helix egyik láncát írja át, kézenfekvő feltételezés, hogy kötődésével lokálisan felnyitja a hélix két láncát összekötő hidrogénhidakat. Az így keletkezett hurok a kódátírás alatt az enzim mozgásával együtt, ugyancsak tovább halad a DNS mentén. A hurok létezésének bizonyításához, méretének meghatározásához számos módszert — ezek között fluoreszcenciás módszert is — alkalmaztak. A hurok minimális méretének meghatározására DAMJANOVICH és mtsai (1977) a Förster-típusú energiatranszfer jelenségét használták fel. Vizsgálataikhoz mesterséges DNS-t [poli d(A-T)] használtak. Az energiatranszfer-rendszert a DNS-hez kötődő etidium bromid s az enzim primer aminjaihoz kötődő fluoreszkamin alkotta. Az eredmények tanúsága szerint, a hurok mérete legalább 0,5—1 hélix-fordulatra terjed ki.

Ugyanezen enzim alegységei által meghatározott térbeli viszonyok vizsgálatára alkalmazta STENDER és PALM (1979) a rezonancia energiatranszfer útján történő távolságmérést. Az általuk alkalmazott donor—akceptor párok egyike fluoreszkáló rifampicin származék volt, amely a rifampicinhez hasonlóan szelektíven kötődik az enzim β alegységének meghatározott helyéhez. Ily módon a továbbiakban ez a hely mint állandó referencia pont használható. Az enzimet alegységekre bontva, minden alegységet külön-külön megjelöltek a megfelelő — a rifampicin származékkal donor—akceptor párt képező — fluoreszcens festékkel. Ezt követően egy adott jelzett alegységből és nem jelzett alegységekből összeállították az enzim több alegységből álló szerkezetét. Ezen eljárást különböző alegységeket jelölve megismételték, s a mért eredményekből meghatározták a β alegységen található rifampicin származék különböző alegységektől mért átlagos távolságait. Ezen értékek: a γ alegységre 5,9 nm; az α_2 alegységre 7,2 nm; s a β alegységre 6,1 nm.

A Förster-típusú energiatranszfer felhasználási lehetőségének egy másik példája az AULD, LATT és VALLEE (1972) által kidolgozott módszer, amely segítségével reakciókinetikai mérések végezhetők. A módszer lényege az, hogy ha danzilezett szubsztrátot használunk, az enzim-szubsztrát komplex kialakulása az enzimben található triptofán(ok) jelenléte miatt egy — a komplexre jellemző — donor—akceptor pár képződését jelenti. Így a donort abszorpciós maximumán gerjesztve, az akceptor emissziójának időbeli változása az enzim-szubsztrát komplex koncentrációjának időbeli lefutásával párhuzamos. Így a maximális fluoreszcencia intenzitás és fluoreszcencia-időfüggvényből számítható görbe alatti terület segítségével meghatározhatók az enzim kinetikai jellemzői.

2.3. A távolság meghatározásának hibaforrásai

Az előzőkben bemutatott példák tanúsága szerint a Förster-típusú energiáttranszfer jól használható, mint „spektroszkópiás mérőszalag” (STRYER és HAUGLAND 1967). Ugyanakkor, a módszer alkalmazása során a helyes következtetések levonása érdekében számos hibaforrásra kell tekintettel lenni. A transzfer hatásfok mérésével történő intra- vagy intermolekuláris távolságok meghatározásánál gyakori eset, hogy a molekulák festékekkel történő jelölése vagy nem specifikus, vagy a specifikus jelzés a molekula különböző helyein is előfordulhat. Ebben az esetben — a festék: jelölt molekula arányától függetlenül — a donor—akceptor párok távolsága nem ugyanaz. A rendszerben előforduló különböző donor—akceptor távolságok gyakorisága a vizsgált rendszer természetétől függő $f(R)$ sűrűségfüggvény segítségével írható le. Ez egyértelműen azt jelenti, hogy a transzfer hatásfok segítségével számolt R érték az aktuális donor—akceptor távolságok sajátos átlaga lesz. Tekintve, hogy az E értéke a távolságok hatodik hatványától függ (l. 5. egyenlet), a különböző távolsággal jellemezhető festékpároknak a mért átlag értékhez adott járuléka is a távolság hatodik hatványa szerint változik. Ez okozza azt, hogy az ily módon számított átlagos donor—akceptor távolság (\bar{R}) az $f(R)$ függvénnyel jellemzett populáció esetén, erősen a kisebb távolságok felé tolódik, vagyis:

$$\bar{R} < \int_0^{\infty} R f(R) dr. \quad (7)$$

Feltéve, hogy egy molekula vagy molekula rendszer jól meghatározott helyein specifikusan kötött donor—akceptor pár található, a fenti effektus lényegese lecsökken, de nem feltétlenül elhanyagolható. Ebben az esetben is számolni kell egy, az $f(R)$ távolságeloszlást „szélesítő” hatással. Általánosan elfogadott, hogy a molekulák több, közel azonos szabadenergia szinttel jellemezhető konformációs állapot között fluktuálhatnak. Ezen különböző konformációs állapotok — bár szabadenergia szintjük egymáshoz közel eső — a festékpárt kötő csoportokra nézve különböző távolságokat jelenthetnek. Ebben az esetben a konformációs állapotok eloszlása produkál egy, az állapotoknak és azok eloszlásának megfelelő távolságeloszlást.

A fentiekből következik, hogy különösen térbeli modellek felállítása esetén nem elegendő az \bar{R} ismerete. A távolságeloszlás $f(R)$ sűrűségfüggvényének meghatározására CANTOR és PECHUKAS (1971) egy a transzfer hatásfok R_p függésének mérésén alapuló módszert javasol. Ugyanakkor, más módszer is található az irodalomban, amelynek segítségével az $f(R)$ függvényről információ nyerhető (GRINVALD és mtsai 1972).

A továbbiakban, a donor—akceptor párok orientációjából származó, a távolság meghatározásának bizonytalanságát eredményező hatásokat vizsgálva DALE és EISINGER (1974, 1976) nyomán induljunk ki abból, hogy a donor-

akceptor párok távolsága minden festékpárra nézve azonos és időben változatlan. Ebben az esetben a donor—akceptor párok relatív orientációja az egyetlen további változó, ami az E értékét befolyásolja.

Feltételezve, hogy

$$\sum_i k_i \ll k_t k_f \quad (8)$$

az (1) és (2) segítségével az alábbi összefüggést kapjuk:

$$E = \frac{\kappa^2}{\frac{R^6}{C} + \kappa^2} \quad (9)$$

ahol C az egyenletek által meghatározott, s esetünkben változatlan érték.

Nyilvánvaló, hogy az E kísérletes úton történő meghatározása esetén az egyes donor-akceptor párokra jellemző E_i értékek átlagát ($\langle E_i \rangle$) kapjuk, ami azt jelenti, hogy a (9) egyenlet jobb oldalán álló kifejezés várható értékét kell megvizsgáljunk. Eközben két szélső esetet tárgyalunk: az egyik az ún. dinamikus átlagolás, amikor feltételezzük, hogy a donor—akceptor páron belül a fluoreszcens molekulák orientációjának változása sokkal gyorsabb folyamat, mint akár a transzfer (k_t), akár a donor emissziója (k_f); a másik eset az ún. sztatikus átlagolás, amikor az orientáció változása a donor gerjesztett állapotának életideje alatt elhanyagolható.

Az első esetben nyilvánvaló, hogy a transzfer bekövetkezte előtt minden lehetséges orientáció többször is előfordul, vagyis a transzfer hatékonysága minden donor—akceptor párra nézve azonos. Ez esetben:

$$\langle E \rangle_d = \langle E_i \rangle_d = \frac{\langle \kappa_i^2 \rangle}{C^{-1} R^6 + \langle \kappa_i^2 \rangle}. \quad (10)$$

Az egyenlet ilyen alakja azt jelenti, hogy ha a donor—akceptor orientációs szabadságának ismeretében a $\langle \kappa_i^2 \rangle$ értékére korlátokat szabhatunk, akkor az $\langle E \rangle_d$ ismeretében az R értékre alsó és felső határokat adhatunk meg. A második esetben, amikor a donor—akceptor pár orientációjának változása lassú, a különböző festékpár molekulák különböző E_i értéket adnak, s ezek nemcsak a κ_i^2 értékétől, hanem a κ_i^2 és $C^{-1} R^6$ aránytól is függenek. Ez esetben tehát

$$\langle E \rangle_s = \langle E_i \rangle_s = \left\langle \frac{\kappa_i^2}{C^{-1} R^6 + \kappa_i^2} \right\rangle. \quad (11)$$

A κ_i^2 szélső értékeire vonatkozó ismereteink így a $C^{-1} R^6$ tag miatt nem alkalmazhatók a számított R érték bizonytalanságának becslésére. Vannak olyan esetek, amikor

$$k_t \ll k_f, \quad \text{azaz} \quad \langle E \rangle \ll 1,$$

ami azt jelenti, hogy a κ_1^2 jó közelítéssel elhanyagolható a $C^{-1}R^6$ taghoz képest. Ez azt eredményezi, hogy ekkor a dinamikus átlagoláshoz hasonlóan a κ_1^2 szélső értékeire vonatkozó ismeretek alapján jó közelítéssel meghatározható az R távolság alsó és felső határa.

A fentiekben külön választottuk a donor—akceptor párok orientáció és távolság eloszlásából származó, az átlagos távolság bizonytalanságát eredményező faktorokat. A valóságban tovább növekszik a probléma, ha figyelembe vesszük, hogy mind az orientáció, mind a távolság valamilyen eloszlással jellemezhető, s a két eloszlás nem független egymástól. Már nem túl nagy molekulák esetén is több, egymásra szuperponálódó mozgás együttese eredményezi a donor és akceptor molekulák közötti aktuális távolság változását. Ugyanakkor, a fésztékek közötti távolság változása rendszerint az orientáció változását is jelenti (a speciális esetektől eltekintve) és viszont. A módszer ugyanakkor — mint az az előbbiekből is kitűnik — jól használható a távolságméréssel összefüggő egyéb molekuláris problémák megoldására.

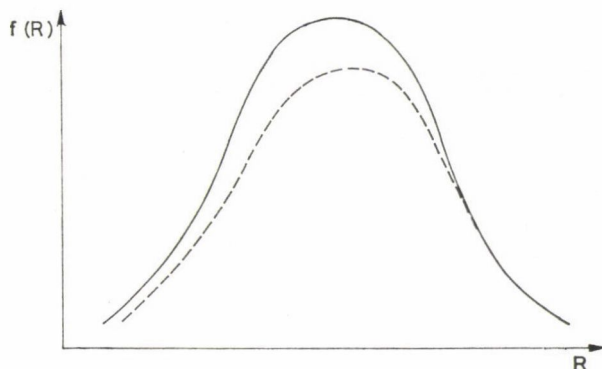
2.4. Dinamikus folyamatok jellemzése

Mint az az előző részből is kitűnik, az esetek azon részében, amikor a mérés célja sztatikus paraméterek (távolságok, különböző molekulák relatív térbeli elhelyezkedése stb.) meghatározása, a donor gerjesztett állapotának élettartama alatt lezajló dinamikus folyamatok — a donor—akceptor pár távolságának, relatív orientációjának változása — többnyire zavaróak, s a számított adatok pontosságát csökkentik. Ugyanezen folyamatok igen hasznosak azonban, ha különböző, ezen paraméterekkel szoros kapcsolatban álló dinamikus folyamatokat akarunk vizsgálni.

Ha a donor és akceptor molekulák a donor gerjesztett állapotának élettartama alatt jelentős mértékű Brown-mozgást végeznek, ez a mozgás — a diffúziós állandók értékének megfelelően — befolyásolja a Förster-típusú energiatranszfer hatékonyságának értékét. A translációs diffúziós mozgás ezen szerepét illetően KATCHALSKI és mtsai (ELKANA, FEITELSON, KATCHALSKI 1968, STEINBERG, KATCHALSKI 1968) végeztek vizsgálatokat. A szerzők a jelenség kvalitatív leírását az alábbiak szerint adták meg: $t = 0$ időpillanatban gerjesztjük a donor molekulákat egy végtelenül rövid impulzussal. A donorok legerjesztődését két alapvető — párhuzamos — folyamat szabja meg: a donorok fluoreszcenciája és a donor—akceptor molekulák közötti energiatranszfer. Ez utóbbi folyamat sebességi állandója fordítva arányos a donor—akceptor távolság hatodik hatványával. Ennek következtében a gerjesztés utáni pillanatokban azon donor molekulák gerjesztődnek le energiatranszfer útján nagyobb hányadban, amelyekhez közelebb található akceptor molekula. Ha a gerjesztett állapotban levő donor molekulák számának időbeli változását vizsgáljuk, akkor az a donor—akceptor távolság függvényében más és más érték lesz.

Az alábbi ábra folytonos vonallal megadott függvénye legyen egy hipotetikus $f(R)$ sűrűségfüggvény, ami $t = 0$ időpontban jellemzi a (gerjesztett donor)-akceptor távolság eloszlását. Ez az eloszlás nyilvánvalóan a rendszer geometriáját tükröző dinamikus egyensúlyi állapotra jellemző (1. ábra).

Ha a translációs diffúziótól eltekintünk, egy $t > 0$ időpontban a gerjesztett állapotban levő donor molekulákra nézve az $f(R)$ sűrűségfüggvény a szag-



1. ábra. A (gerjesztett donor)-akceptor távolság eloszlását jellemző sűrűségfüggvény $t = 0$ (—), ill. $t > 0$ (---) időpontban

gatott vonallal jelölt módon torzul. Ennek oka az energiáttranszfer, ami nagyobb valószínűséggel megy végbe a kisebb R értékeknél. Ennek következtében számottevő diffúziós mozgás esetén a $-R$ irányába mutató diffúziós áram igyekszik az $f(R)$ sűrűségfüggvény eredeti (egyensúlyi) alakját helyreállítani. Más szóval, azon donor molekulák, amelyek $t = 0$ -ban távol voltak az akceptortól — így kisebb valószínűséggel gerjesztődtek le a $(0, t)$ időintervallumban —, a diffúzió révén azokhoz közelebb kerülve nagyobb valószínűséggel vesznek részt energiáttranszfer folyamatokban, mintha nem lenne diffúzió.

A szerzők által a translációs diffúzió fenti hatásának kvantitatív leírására használt egyenletek megoldása nem adható meg analitikus formában, ezért azokat számítógép segítségével illesztették a kísérleti adatokhoz. Kísérleteikben különböző viszkozitású oldatokban vizsgálták a szabad diffúziót végző donor és akceptor molekulák közötti energiáttranszfer hatékonyságát, s a kísérleti adatoknak az egyenletekhez történő illesztése útján nyert diffúziós állandó értékei, igen jó egyezést mutattak az egyéb módszerekkel nyert értékekkel.

Ezt a módszert adaptálták HAAS és mtsai (1978) homológ oligopeptidek láncvégei Brown-mozgásának követésére. N^5 -(2-hidroxietyl)-L-glutamin egységből felépülő 4–9 tagszámú oligopeptidek egyik végét naftil származékkal, a másik végét danzillal jelölve, vizsgálták a gerjesztett molekulák legerjesztődésének időfüggését a külső viszkozitás és a lánc hossz függvényében. Vizsgálataikban feltételezték, hogy a láncvégek relatív mozgása szabad diffúziós moz-

gással modellezhető, amely diffúziós mozgás fékezője, a totális frikciós erő (f_t), belső és külső frikciós erők összege:

$$f_t = f_i + f_e. \quad (12)$$

A láncvégek relatív mozgásából következően — az előzőekben ismertetett translációs diffúzióhoz hasonlóan — a diffúzió növeli a donor—akceptor molekulák közötti energiáttranszfer hatékonyságát, vagyis gyorsítja a donor molekulák legerjesztődését.

A kísérleti eredmények elméleti modellhez történő illesztése ez esetben is számítógép segítségével történt. A molekulák belső Brown-mozgását jellemző diffúziós állandó értékét illetően azt találták, hogy az annál nagyobb, minél hosszabb az oligopeptid, viszont egy adott oligopeptid esetén független attól, hogy a láncvégek távolsága mennyire tér el az átlagos láncvég távolságtól. Ez utóbbi érdekes megállapításra úgy jutottak, hogy a donor—akceptor távolság függvényeként felírt diffúziós állandó ($D(R) = D' \cdot aR$, ahol D' és a áll) esetén nem tudták kielégítően illeszteni a kísérleti adatokat a folyamatot leíró differenciálegyenlethez.

3. Intracelluláris távolságmérés Förster-típusú energiáttranszfer folyamatok segítségével

A sejtek anyagszere állapotában bekövetkező változások rendszerint szubstruktúrák — membrán, citoplazma, kromatin, különböző makromolekulák stb. — egy részének mennyiségi és minőségi változását eredményezik. Ilyen minőségi változás lehet pl. különböző komponensek relatív helyzetének, térbeli eloszlásának megváltozása. Példa lehet erre a különböző receptorok laterális diffúziós és aktív folyamatok hajtotta összeállása („cluster” képződés) vagy a kromatin struktúrájának fellazulása.

Különböző komponensek relatív eloszlásának változása — bizonyos feltételek teljesülése esetén — jól követhető fluoreszcencia energiáttranszfer mérések segítségével.

Mivel a sejt igen sok komponensből felépülő komplex rendszer, ezen mérésekhez rendszerint külső fluoreszcenciás jelzőket használnak alkalmas transzfer-rendszerként.

Az alkalmazott festékpárok számára s a vizsgálható sejtszintű problémák széles körére való tekintettel a továbbiakban a teljességre való törekvés nélkül, csupán néhány kiragadott példát tárgyalunk.

3.1. Sejtmembránok vizsgálata energiatranszfer segítségével

A sejtek külső membránjának egyik lényeges funkciója a sejt és környezete közötti információcsere lebonyolítása. Ezen funkció ellátására a különböző specifikus receptorok széles skálája található a citoplazmatikus membránban (receptorok hormon, neurotranszmitter és egyéb molekulák felismerésére és megkötésére). Ezen receptorok nagy részéről elmondható, hogy specifikus behatásra — valószínűleg az információ átvitel optimalizálása miatt — adaptív módon mennyiségi vagy/és minőségi változást mutatnak: változhat pl. a felületi eloszlásuk, sűrűségük, konformációs állapotuk stb. A receptorok populációinak jellemzése ily módon felvilágosítást nyújthat a sejtek állapotáról.

A konkanavalin A (kon A) kötő receptorok reakciójának ilyen különbségét figyelték meg normális és tumorosan transzformált fibroblasztok összehasonlítása esetén. Tumoros sejtek kon A-receptor komplexei összetorlódnak („cluster” képződés), ami normális sejteken nem figyelhető meg. Kézenfekvő, hogy a kon A molekulák egy-egy szubpopulációját alkalmas festékekkel (donor — akceptor pár) megjelölve, tumoros és normál sejtek esetén a festékek közötti energiatranszferben különbség figyelhető meg: tumoros sejteknél jelentős energiatranszfer várható, míg normál sejteknél kicsi vagy semmi.

FERNANDEZ és BERLIN (1976) mikroszkóp fluorimetriás mérései igazolták, hogy a rezonancia energiatranszfer igen alkalmas eszköz a sejtek külső membránja szervezetségi szintjének vizsgálatára. Kon A molekulák egy részét dimetilaminonaftalen szulfonilkloriddal (DANS), egy másik részét rodamin izotiocianáttal (RITC) jelölve a két festék közötti energiatranszfert vizsgálták, miután a jelzett kon A molekulákat a sejt kon A kötő receptoraival reagáltatták. Nyilvánvaló, hogy a festékek koncentrációját, a jelölés körülményeit előkísérletben kellett a festékpárra specifikussá tenni. Erre a célra glutáraldehiddel aggregáltatott, a két festéssel festett tubulin keveréket használtak. Vizsgálataikban az energiatranszfer egzakt mérése helyett, az akceptor és a donor fluoreszcencia intenzitások hányadosát (I_A/I_D) határozták meg. A transzferhatásfok növekedtével ugyanis, nő az akceptor fluoreszcencia intenzitása és csökken a donoré, tehát nő a fenti hányados. Nyilvánvaló, hogy ez a megközelítés számos feltételezést rejt magában, s inkább empirikusnak, mint egzaktinak mondható.

Kon A molekulákat külön RITC-cal és DANS-sal jelölve, s azokat a sejtekhez kötve követni tudták a kon A-receptor komplexek felületi szerveződésének kinetikáját: míg a normál sejtek esetén az I_A/I_D hányados a kezdeti enyhe emelkedés után állandó szinten maradt, addig a transzformált sejtek esetén értéke az idővel (kb. egy órán át) lineárisan nőtt.

A rezonancia energia transzfer vizsgálata a fentiek tanulsága szerint — bizonyos sejtekre nézve — alkalmasnak látszik normál és rákos sejtek diagnosztizálására és elkülönítésére.

A fent leírt módszert adaptálták CHAN és mtsai (1979) multiparaméteres automatizált komputer kontrollált sejt szeparátorra (MACCS). A szerzők az energiatranszfer-rendszerüket a következő módon hozták létre: FITC-cal, ill. RITC-cal jelzett kon A molekulák (F-kon A, ill. R-kon A) keverékét reagáltatták Friend vírus által transzformált eritroleukémiás sejtekkel. A megfelelő kontroll minták a jelöletlen kon A-val, az F-kon A-val, valamint az R-kon A-val reagált sejtuszuspenziók voltak. Méréseiket 4 °C-on végezték, így a kon A kötődés eredményeképpen a sejtek energiaigényes folyamatai révén kialakuló „sapka” képződés („capping”) elmaradt. A sejt anyagcsere folyamatai az alacsony hőmérséklet következtében igen lelassulnak, így ezen a hőfokon a sapkaképződés helyett, csak a — külön energiát nem igénylő — foltképződés megy végbe, ami azt jelenti, hogy a kon A kötő receptorok a membránban kisebb aggregátumokat képeznek. A CHAN és mtsai által végzett mérések tehát az R-kon A és F-kon A molekuláknak ezen receptor aggregátumokon belüli távolságára adhattak felvilágosítást. Az energiatranszfert a donor emissziójának csökkenésén, az akceptor emissziójának növekedésén, valamint az akceptor emissziós polarizációjának csökkenésén keresztül mérték. Mindhárom módszer azt mutatta, hogy az F-kon A és R-kon A térbeli pozíciójából következően energiatranszfer figyelhető meg. Tekintve, hogy mind az F-kon A, mind az R-kon A molekula több festékmolekulát tartalmazott, a kon A geometriai adatait figyelembe véve külön meg kellett vizsgálni a transzfer hatékonyságának a festékeket hordozó molekulák (kon A) térbeli eloszlásától való függését. Ily módon, a transzfer határfokára nyert adatokból távolságot tudtak számolni. A kísérletek során nyert 57%-os transzferhatárfokot alapul véve a GENNIS és CANTOR (1972) által kidolgozott modell segítségével a kon A molekulák átlagos távolságára 4 nm távolságot kaptak. A sejt szeparátor adta azon lehetőség, hogy a transzfer határfok sejtpopuláción belüli eloszlását is követni lehet, a szerzők véleménye szerint az adott sejttípus esetén, nem használható a nyert eloszlás kvantitatív feldolgozására és interpretálására.

A Förster-típusú energiatranszfert használták SHAKLAI és mtsai (1977) a hemoglobin vörösvérsejt membránhoz történő kötődésének vizsgálatára. Vizsgálatuk annak a paradoxonnak a feloldását célozta, miszerint — korábbi vizsgálatok tanúsága szerint — egyrészt igen nehéz hemoglobint nem tartalmazó vörösvérsejt membránt preparálni, másrészt ezen membránokhoz a hemoglobin gyengén kötődik. Kísérleteikben a membránlipid külső régiójába kötődő 12-/9-antróil/-stearinsavat (AS) használták donorként, míg az akceptor szerepét a hemoglobin töltötte be. A pH és a kétértékű ionok hemoglobin kötődésére gyakorolt hatásának tanulmányozása segítségével megállapították, hogy a hemoglobinnak a vörösvérsejt membránjához történő kötődése elektrosztatikus és reverzibilis. A sejtenkénti kötőhelyek száma $1,4 \times 10^6$. A kötés erősségét jellemző asszociációs konstans értékét $0,85 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ -nek találták, ami azt mutatja, hogy a hemoglobin kötődése erős. Az AS és a hemoglobin

molekulák közötti távolság értékére 6 nm-t kaptak, ami jó egyezésben van azzal a feltevéssel, hogy az AS molekulák a membrán külső, míg a hemoglobin molekulák a membrán belső oldalához kötődnek.

DISSING és mtsai (1979) humán vörösvérsejt membránjának aniontranszport rendszerét vizsgálták fluorezcsein higany acetát (FMA) molekulák közötti energiatranszfer segítségével. Olyan membrán preparátumot készítettek, amelyben a membránproteinek túlnyomó része (> 90%) az aniontranszportért felelős, ún. „band 3” protein volt. A protein citoplazma felé eső részén található SH csoportját FMA-val jelölték 1:1 sztöchiometriai arányban. Azt tapasztalták, hogy a jelölés változatlanul hagyta a membrán anionszállító képességét. A jelölés célja az volt, hogy az FMA molekulák közötti energiatranszfer segítségével megállapítsák, hogy a membránban a „band 3” proteinek monomer vagy magasabb oligomer formában vannak jelen. Az energiatranszfer vizsgálatára az FMA emissziós polarizációjának mérését használták. WEBER (1952) munkája alapján az energiatranszfer az alábbi összefüggés szerint befolyásolja az emisszió polarizációjának értékét:

$$\frac{1}{p_{\bar{n}}} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{3}{2} \bar{n} \sin \theta \right), \quad (13)$$

ahol $p_{\bar{n}}$ a polarizáció értéke, ha a fluoreszcenciát átlagosan \bar{n} transzfer előzi meg. p_0 a transzfer nélkül mérhető polarizáció értéke; θ pedig a donor és akceptor orientációját jellemzi.

A szerzők az FMA: protein arányt változtatva kimutatták, hogy ha ez az arány 0,5 alatt van, a polarizáció 0,4, míg 1:1 arányú jelölés esetén a polarizáció értéke leesik 0,1-re. 0,1%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS) kezelés hatására a polarizáció értéke visszaáll 0,1-ről 0,4-re. Mindezek alapján megállapították, hogy a membránban a „band 3” proteineknek 25%-nál kisebb hányada monomer, a többi dimer vagy magasabb oligomer formában található.

Hasonló kérdést vizsgált VEATCH és STRYER (1977), valamint VANDERKOOI és mtsai (1977). Vizsgálataik célja egyik esetben a gramicidin A, a másik esetben az ATP-áz membránban előforduló asszociált formáinak kimutatása volt. Mindkét vizsgálatban egymástól különböző donorral, ill. akceptorral jelölt molekulákat építettek a membránba. VEATCH és STRYER (1977) az akceptorral jelölt gramicidin mólarányát (a) változtatva mérte a donor kvantumhatásfokának (Q) változását, s a

$$\frac{Q}{Q_0} = 1 - Ea \quad (14)$$

egyenlet alapján kimutatták, hogy a membránon belül a gramicidin dimer formában van jelen. VANDERKOOI és mtsai (1977) ugyancsak ATP-áz aggregátumokat mutattak ki. Az általuk mért energiatranszfer nem változott, ha

rendszerüket tojás foszfatidilkolinnal tízszeresre hígították, viszont eltűnt, ha a rendszerbe a jelölt ATP-áz mennyiségét sokszorosán meghaladó jelöletlen ATP-ázt vittek be.

3.2. *In situ* kromatin-struktúra tanulmányozása energiátranzfer segítségével

A rezonancia energiátranzfer használata kipreparált kromatin struktúrájának, valamint nukleinsavak és fehérjék kölcsönhatásának tanulmányozására relatíve gyakori. Ugyanakkor, a sejten belüli natív kromatin struktúrájának e technikával történő vizsgálata a kiértékelési nehézségek miatt nem terjedt el. Intézetünkben megpróbáltunk alkalmas energiátranzfer-rendszert összeállítani, s a kapott eredményeket egy elméleti modell segítségével leírni (SZÖLLŐSI és mtsai 1978, SOMOGYI és mtsai 1979, 1980). Ezen munka egy további, a módszer hatékonyságát bemutató példa. Vizsgálatainkban a fluoreszkamin-etidium bromid (EB) festékpárt használtuk mint donor—akceptor párt. A fluoreszkamin a fehérjék primer amino csoportjaihoz kovalens módon kötődik. Ugyanakkor, a vízzel is reagál, nem fluoreszkáló terméket képezve. Az etidium bromid a kettős szálú nukleinsavakhoz interkalálódás útján kötődik (jóval kisebb mértékben más típusú kötődés is megfigyelhető). Az interkalálódott EB molekula kvantumhatásfoka mintegy hússzorosa a szabad EB molekuláénak. Ennek az az oka, hogy a hidrofób környezetbe került interkalálódott EB molekulától protontranszfer útján sugárzás nélkül elvitt energiahányad jóval kisebb. A fentieknek megfelelően, mindkét általunk alkalmazott festék kvantumhatásfoka megnő, ha azok kötődtek. Ugyanakkor, spektrális tulajdonságaik olyanok, hogy megfelelő sztérikus körülmények esetén jó donor—akceptor párt képeznek. A fluoreszkamin — nem korrigált spektruma alapján — 385 nm-nél gerjeszthető a legjobban, míg emissziós maximuma 470 nm körül van. Az EB abszorpciós maximuma 520 nm-nél található, míg emissziós maximuma 600 nm-nél van (ugyancsak korrigálatlan spektrum alapján).

Méréseinkhez AKR:Lac 3H mg:Lac/F₁ egértörzsből származó normál és tumoros limfocitákat használtunk. Célunk a két sejttípus kromatinállományában levő különbségek alkalmas energiátranzfer-rendszer segítségével történő detektálása volt. Tekintve, hogy a sejtek önmagukban is bonyolult struktúrák, továbbá a fluoreszkamin vízzel adott oldalreakciója jelentősen megnehezíti az eredmények kiértékelését, az energiátranzfer hatásfokának változását próbáltuk követni a sejtkoncentráció és az alkalmazott EB koncentráció függvényében. Egy-egy mérési sorozatban az egy sejtre jutó fluoreszkamin molekulák számát állandó értéken tartottuk. Ezt úgy értük el, hogy készítettünk egy fluoreszkaminnal jelölt sejtszuszpenziót, s az egész mérési sorozathoz ezt használtuk törzspreparátumként.

A transzfer hatásfokának meghatározásához steady state mérések esetén általában az

$$\frac{F_A^D}{F_A^0} = 1 + \frac{\varepsilon_D}{\varepsilon_A} E \quad (15)$$

összefüggés használatos. Az ε_D , ill. ε_A a donor, ill. az akceptor moláris abszorpció állandója a gerjesztés hullámhosszán, míg F_A^0 , ill. F_A^D a csak akceptor, ill. a donor és akceptor együttes jelenléte esetén mérhető fluoreszcencia intenzitás (az egyenlet érvényességének feltétele, hogy a gerjesztési hullámhosszon mind a donor, mind az akceptor gerjeszthető, míg az emissziós hullámhosszon a donor emissziója elhanyagolható legyen).

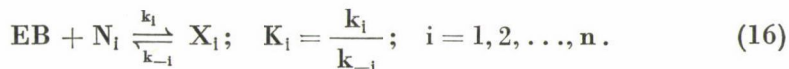
A fenti összefüggés alkalmazásánál problémát jelentett azon megfigyelésünk, miszerint a fluoreszkamin kezelés jelentősen megnövelte mind a normál, mind a tumoros sejtek EB kötő képességét. Ezen probléma megkerülésére önkormányzatos kísérleteket végeztünk. Megállapítottuk, hogy egyik festék sem torzítja észrevehető mértékben a másik spektrumát. A következő lépésben csak fluoreszkaminnal jelölt sejteket használva megállapítottuk, hogy 385 nm-es gerjesztés esetén mekkora a 600, ill. 470 nm-en mérhető fluoreszcencia intenzitások hányadosa. Ennek alapján a kettősen jelölt sejtekben megmérve a 385 nm-es gerjesztéshez tartozó 470 nm-es emisszió intenzitását, meghatározható a 385/600 nm-es intenzitás értéke, amit az F_A^D meghatározásakor a donor járulékaként figyelembe kell venni (levonva azt a kettősen jelölt sejtekben mért 385/600 nm-es értékből). Hasonlóan, a csak EB-dal jelölt sejtek esetén megmérhető, hogy mekkora a 600 nm-en emittált fluoreszcencia intenzitások hányadosa, ha a mintát 385, ill. 520 nm-en gerjesztjük. Ennek segítségével az 520/600 nm-en mérhető fluoreszcencia intenzitás alapján az EB 385/600 nm-en adott fluoreszcencia intenzitását számolni lehet. A két korrekciós faktor használhatósága ugyanakkor megkívánja, hogy egyrészt az EB 385/470 nm-es, másrészt fluoreszkamin 520/600 nm-es fluoreszcenciája közel nulla legyen. Tekintve, hogy ezen feltételek teljesültek, egyetlen — mindkét festékkel jelölt — sejt-szuspenzió végzett mérésekkel meghatározható az energiatranszferhatásfoka.

Tekintve, hogy a transzfer hatékonyság sejt-koncentráció függését kívántuk vizsgálni, elegendő volt az $F_A^D/F_A^0 - 1$ érték meghatározása is, ami az E-vel arányos érték. Ezen értékeket a sejt-koncentráció függvényében ábrázolva mind normál, mind tumoros sejtekkel telítési hiperbolát kaptunk (az összes alkalmazott EB koncentrációnál).

Az eredmények analízise megkövetelte egy olyan elméleti modell kidolgozását, ami figyelembe veszi egyrészt a mérési feltételeket, másrészt a festékek és sejtek reakciókinetikai sajátosságait (SOMOGYI, DAMJANOVICH, KERTAI 1980).

Az EB sejten belüli kötődését illetően az alábbiakat feltételeztük:

a) az EB a DNS különböző helyeihez képes kötődni az alábbi séma szerint:



(EB a szabad etidium bromid molekula; N_i , ill. X_i az i -típusú szabad, ill. etidium bromidot tartalmazó kötőhely; K_i az i -helyre jellemző kötődési konstans.)

b) Bármely N_i helyhez kötődő EB kvantumhatásfoka Φ (a szabad EB kvantumhatásfokát Φ_0 jelöli).

c) $[N_i] \gg [X_i]$, ahol a szögletes zárójelek moláris koncentrációt jelentenek. A fluoresszkamin kötődését illetően — a kísérletek jellegéből következően — feltételezzük, hogy az egy sejtre jutó festékmolekulák számának átlaga állandó és a telítési érték alatt van. A fenti feltételek mellett az alábbi összefüggés nyerhető:

$$\left(\frac{F_A^D}{F_A^0} - 1 \right)^{-1} = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_D c_f \bar{E}} + \frac{1}{C} \frac{\varepsilon_0 \Phi_0}{\varepsilon_D \Phi \bar{E} q c_f}, \quad (17)$$

ahol F_A^D és F_A^0 értéke kísérletesen meghatározható; C a sejt koncentráció; ε_0 , ill. ε az EB moláris abszorpciós állandója szabad, ill. kötött állapotban. ε_D a fluoresszkamin moláris extinkciós koefficiense (ε_0 , ill. ε a szabad, ill. kötött EB moláris abszorpciós állandója a fluoresszkamin gerjesztési hullámhosszán, míg ε_D a fluoresszkamin moláris abszorpciós állandójának ugyanezen hullámhosszon mért értéke). C_f a fluoresszkamin sejten belüli átlagos koncentrációja;* \bar{E} — a kromatin strukturális jellemzőit is tartalmazó — speciális módon definiált transzferhatékonyság; q pedig a sejtek EB kötő képességét jellemző paraméter:

$$q = \alpha \sum_{i=1}^n K_i \xi_i \quad (18)$$

ahol

$$\xi_i = \frac{[N_i]}{\alpha C}, \quad (19)$$

Itt a C a sejt koncentrációt, α pedig az egy sejten belüli EB kötő helyek átlagos számát jelöli.

Ha az $\left(\frac{F_A^D}{F_A^0} - 1 \right)^{-1}$ mennyiséget a sejt koncentráció reciprokának függvényében ábrázoljuk, a (17) egyenletnek megfelelően egyenest kapunk, amelynek s és t koordináta metszetei az alábbiak:

$$s = q \frac{\varepsilon \Phi}{\varepsilon_0 \Phi_0}, \quad (20)$$

* A C_f értékének meghatározása a fluoresszkamin vízzel adott oldatreakciója miatt nem egyszerű. Egy lehetséges módszer: fluoresszkamint reagáltatunk valamilyen primer aminosoprotot tartalmazó aminosavval úgy, hogy a fluoresszkamin nagy feleslegben legyen. Ezt több fluoresszkamin koncentrációnál megismételve fluoresszcencia intenzitások mérésével meghatározható, hogy adott körülmények között az aminosav hány százaléka reagált fluoresszkaminnal. Az adott aminosav koncentrációjának ismeretében fluoresszcencia intenzitás alapján meghatározható a sejtet tartalmazó minta primer aminosavval reagált fluoresszkamin koncentrációja. Ezt az értéket elosztva a sejt koncentrációval, megkapjuk a C_f értékét.

$$t = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_D} \frac{1}{C_f \bar{E}}. \quad (21)$$

Az s tehát a sejtek EB kötő képességével, míg az $1/t$ az \bar{E} transzferhatásfokkal arányos.

Tekintve, hogy mindkét paraméter tartalmaz információt a sejtek kromatinjáról, a modellt alkalmas különböző kromatinstruktúrával rendelkező sejtcsoportok jellemzésére, esetleg azonosítására. Normál és tumorosan transzformált egér limfocitákon végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy azok — optimalizált kísérleti körülmények között — az s és t paraméterek segítségével valóban jellemezhetők.

4. Összefoglalás

A fentiekben bemutatott alkalmazási lehetőségek széles spektruma azt tanúsítja, hogy a Förster-típusú energiatranszfer jelenségén alapuló mérési módszerek igen hatékonyan alkalmazhatók mind molekuláris, mind sejtbiológiai kutatásokban.

Ezen módszerek térhódításának egyik oka a fluoreszcenciás módszerek nagy érzékenysége. A másik ok a Förster-típusú energiatranszferre jellemző 2–10 nm-es tartományon belüli jó távolságfelbontás, amit a transzfer sebességi állandójának (k_f) a donor—akceptor távolság (R) hatodik hatványa szerinti csökkenése eredményez.

Tekintve, hogy napjaink biológiai kutatásaiban egyre erősödő tendencia a környezetükkel kölcsönhatásban álló részrendszerek tanulmányozása, ami fluoreszcencia mérésen alapuló módszerek esetén általában nehézség nélkül megvalósítható, az ismertett módszerek további térhódítása s a biológiai kutatások egyre több területén történő megjelenése várható.

IRODALOM

1. AULD, D. S., LATT, S. A., VALLEE, B. L.: *Biochemistry* **11**, 4994 (197).
2. BERNER, V. G., DABNALL, D. W., BIRNBAUM, E. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 763 (1975).
3. CANTOR, C. R., PECHUKAS, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2099 (1971).
4. CANTOR, C. R., TAO, T.: *Proc. Nucl. Acid. Res.*, Vol. 2. Harper and Row (Eds.: G. L. Cantoni, D. R. Davies) pp. 31–93 (1971).
5. CHAN, S. S., ARNDT-JOVIN, D. J., JOVIN, T. M.: *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 56 (1979).
6. DALE, R. E., EISINGER, J.: *Biopolymers* **13**, 1573 (1974).
7. DALE, R. E., EISINGER, J.: in: „Biochemical Fluorescence Concepts”, Dekker, New York (Eds.: R. F. Chen and H. Edelhoch) p. 115 (1975).
8. DALE, R. E., EISINGER, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 271 (1976).
9. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: *J. Theoret. Biol.* **41**, 567 (1973).
10. DAMJANOVICH, S., BAHR, W., JOVIN, T. M.: *Eur. J. Biochem.* **72**, 559 (1977).
11. DISSING, S., JESAITIS, A. J., FORTES, P. A. G.: *Biochem. Biophys. Acta* **553**, 66 (1979).
12. DOCTER, M. E., STEINEMANN, A., SCHATZ, G.: *J. Biol. Chem.* **253**, 311 (1978).
13. EISENBERG, I.: in: „Biochemical Fluorescence: Concepts” Dekker, New York (Eds.: R. F. Chen and H. Edelhoch) p. 43 (1975).

14. ELKANA, Y., FEITELSON, J., KATCHALSKI, E.: *J. Chem. Phys.* **48**, 2399 (1968).
15. FAIRCLOUGH, H., CANTOR, C. R.: in: „Methods in Enzymology” Acad. Press, New York (Eds.: C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff) pp. 347–379 (1978).
16. FERNANDEZ, S. M., BERLIN, R. D.: *Nature* **264**, 411 (1976).
17. FÖRSTER, T.: *Ann. Physik.* **2**, 55 (1948).
18. FÖRSTER, T.: in: „Modern Quantum Chemistry” Vol. 3. Acad. Press, New York (Ed.: O. Sinanoglu) p. 93 (1966).
19. GENNIS, R. B., CANTOR, C. R.: *Biochemistry* **11**, 2509 (1972).
20. GRINVALD, A., HAAS, E., STEINBERG, I. Z.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2273 (1972).
21. HAAS, E., KATCHALSKI-KATZIR, E., STEINBERG, I. Z.: *Biopolymers* **17**, 11 (1978).
22. HORROCKS, W. D. JR., HOLMQUIST, B., VALLEE, B. L.: *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4763 (1975).
23. KHAN, S. M., BIRNBAUM, E. R., DARNALL, E. W.: *Biochemistry* **17**, 4669 (1978).
24. KÖRKE, M., REED, L. J.: *J. Biol. Chem.* **235**, 1931 (1960).
25. KÖRKE, M., REED, L. J., CAROLL, W. R.: *J. Biol. Chem.* **238**, 30 (1963).
26. MOE, O. A., LERNER, D. A., HAMMES, G. G.: *Biochemistry* **13**, 2552 (1974).
27. MONTAL, M., DARSZON, A., TRISSL, H. W.: *Nature* **267**, 221 (1977).
28. MIKI, M., MIHASHI, K.: *Biochim. Biophys. Acta* **533**, 163 (1978).
29. PAPADAKIS, N., HAMMES, G. G.: *Biochemistry* **16**, 1890 (1977).
30. SARDET, C., TARDIEU, A., LUZZATI, V.: *J. Mol. Biol.* **105**, 383 (1976).
31. SHAKLAI, N., YGUERABIDE, J., RANNEY, H. M.: *Biochemistry* **16**, 5585 (1977).
32. SOMOGYI, B., KERTAI, P., DAMJANOVICH, S.: *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **15**, 5 (1980).
33. SOMOGYI, B., SZÖLLÖSI, J., RÉDAI, I., DAMJANOVICH, S.: *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **14**, 25 (1979).
34. STEINBERG, I. Z., KATCHALSKI, E.: *J. Chem. Phys.* **48**, 2404 (1968).
35. STENDER, W., PALM, D.: *Biochem. Biophys. Acta* **578**, 337 (1979).
36. STRYER, L.: *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 819 (1978).
37. STRYER, L., HAUGLAND, R. P.: *Biochemistry* **58**, 719 (1967).
38. SZÖLLÖSI, J., SZABÓ, G., SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **13**, 63 (1978).
39. VANDERKOOI, J. M., IERKOMAS, A., NAKAMURA, H., MARTONOSI, A.: *Biochemistry* **16**, 1262 (1977).
40. VEATCH, W., STRYER, L.: *J. Mol. Biol.* **113**, 89. (1977).
41. WEBER, G.: *Trans. Faraday Soc.* **50**, 552 (1952).
42. WOLFMAN, N. M., HAMMES, G. G.: *Biochemistry* **16**, 4806 (1977).
43. WU, C., STRYER, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1104 (1972).