

MEMBRÁNFEHÉRJÉK ROTÁCIÓS ÉS LATERÁLIS MOBILITÁSA

TRÓN LAJOS ÉS DAMJANOVICH SÁNDOR

DOTÉ Biofizikai Intézete, Debrecen

A sejteket határoló felületeik izolálják a környezettől, de ugyanakkor a sejtmembránon keresztül minden sejt érintkezik és kapcsolatban áll a környezetével. A sejt és a külvilág közötti anyagcsere biztosítása a sejtmembránnak csak egyik funkciója. Az extracelluláris ingerek szintén a plazma membrán közvetítésével érik a sejteket. A sejtfelületen, tehát a citoplazma membránon át realizálódik a sejt növekedésének, osztódásának, differenciálódásának és fejlődésének, a külvilággal való kommunikációjának szabályozása. Ezen folyamatokban, bár kétségtől számos egyéb tényező is közrejátszik, a membránnak izoláló és egyszersmind információ, és anyagcsere, közvetítő szerepénél fogva központi jelentősége van. Ma már elfogadottnak tekinthető az a nézet, hogy a membránok közvetve vagy közvetlenül szinte minden sejtszintű folyamatban elvitathatatlan jelentőséggel bírnak. A felsorolt tények alapján teljesen indokoltnak tűnik az a törekvés, hogy a membránok összetételével, szintézisével, struktúrájával, különböző komponenseinek sajátosságaival kapcsolatos kérdésekre mind tökéletesebb és teljesebb választ nyerjenek a kutatók.

A folyékony mozaik membránmodell

A sejtmembrán különböző strukturális és funkcionális sajátosságait leíró modellek kritikai áttekintésére nem vállalkozhatunk, csupán a jelenleg legáltalánosabban elfogadott SINGER és NICOLSON folyékony mozaik membrán modell (41, 43) néhány vonására utalunk. A membrán többé-kevésbé egy orientált kettős lipidrétegnek képzelhető el, amelynek nagy hányada foszfolipid, ill. szfingolipid és szterol. Kísérleti adatok szerint 37 °C-on a foszfolipidek túlnyomó hányada „folyékony” állapotban van. A foszfolipid molekulák úgy orientáltak, hogy a hidrofób szénhidrogén láncok a kettősréteg belseje felé mutatnak. A hidrofíl felületi rétegekhez fehérje molekulák kapcsolódnak (ekto- és endoproteinek), ezenkívül előfordulnak ún. transzmembrán integrális fehérjék, amelyek a membrán egész vastagságát átérik. Ezek stabilizálása „trimodális”, a kettős rétegen belül hidrofób, a felületeken pedig hidrofíl kölcsönhatások révén biztosított. A citoplazma membránok fehérje tartalma eredettől függően széles határok (20–75%) között váltakozik (6, 31). A membránfehérjék egy része

speciális lipid és szénhidrát molekulákkal lehet komplexben (lipo- és glikoproteinek). Az integrális bi- és trimodális glikoproteineknek, valamint ezek komplexeinek a membránhoz viszonyított elhelyezkedése olyan, hogy azok nem vándorolnak az egyik membrán felszíntől a másikig és vissza, azaz nem rendelkeznek transzverzális mozgékonyssággal. Hasonlóan, a glikolipidekre sem jellemző a transzmembrán mobilitás. (Ezzel ellentétben a foszfolipidek, bár igen kicsiny sebességgel, néha transzmembrán rotációra — „flip-flop” — képesek (22). Az említett fehérjék, gliko- és lipoproteinek speciális funkciókat láthatnak el (pl. receptorok vagy antigének, esetleg meghatározott enzimaktivitásuk van).

Az integrális és perifériás membránkomponensek (fehérjék, fehérjekomplexek, gliko- és lipoproteinek) a membránon belül nincsenek mereven rögzítve, hanem egyre több kísérleti adat szerint rotációs és laterális mozgékonyssággal rendelkeznek (l. pl. 4, 16, 42, 43). Bár ezek a mozgások, ill. azok sebességét jellemző diffúziós állandók értéke aránylag széles tartományba esik, mind a rotációs, mind a kétdimenziós membránban való laterális diffúzió erősen gátolt és távol áll a megfelelő szabad diffúziós mozgások sebességétől (32).

A diffúziós mozgások gátolt volta számos tényező eredménye lehet. Először is ezek a mozgások a híg vizes oldatok cP nagyságú viszkozitásával szemben Poise nagyságrendbe eső viszkozitású közegben játszódhatnak le. A membrán lipidek legnagyobb részéről feltételezik, hogy azok szabadon keverednek, de bizonyos lipid-lipid kölcsönhatások azt eredményezik, hogy az alapvetően folyadék lipid részben tartósan kialakulhatnak olyan „szigetek”, amelyeknek lipid összetétele jelentősen eltér az átlagos összetételtől. A membrán-lipidek aszimmetriája a kettős réteg két felének egymástól eltérő összetételében is megnyilvánulhat (7). A membrán komponensek horizontális kölcsönhatásai révén planáris asszociációk alakulhatnak ki (34). Bizonyos membránkomponensek ki lehetnek zárva specifikus lipid régiókból. Ha egy membránkomponens nem juthat be akár a folyékony, akár a szilárd lipid régiókba, ez az illető species látszólag gátolt laterális diffúzióját eredményezi. A kettősréteg külső- és belsőfelületén kialakulhatnak olyan hálószerű fehérje struktúrák, amelyek szintén akadályozhatják a laterális mozgékonysságot (32, 44). A citoskeleton rendszer (mikro- és vastag filamentumok, valamint mikrotubulusok) szintén korlátozhatja a diffúziós mozgások sebességét (49, 51). A néha több μm hosszúságú citoskeleton kötegek bizonyos membránkomponenseket kihorgonyozhatnak. Ez a diffúziót akadályozó faktor, ill. annak hatása alacsony hőmérsékleten, ill. magas Ca^{2+} koncentráció mellett csökken, mert ilyen feltételek mellett a mikrotubulusokat alkotó tubulin depolimerizálódik. Alkaloidokkal (colchicin, colcimid, vinblastine sulfat) a mikrotubulus rendszert szétroncsolva a sejtfelszíni jelenségek erősen befolyásolhatók (2).

Membrándinamikai vizsgálatok és kísérletes módszerek

A fentebb részletezett diffúziós mozgások a membrándinamikának csak egyetlen aspektusát jelentik. A membrándinamikával foglalkozó kutatásokat JOVIN (23) alábbi módon csoportosította:

1. fluiditás vagy mikroviszkozitás vizsgálatok
2. strukturális heterogenitás vizsgálatok (régiók, különböző aszimmetriák)
3. mobilitás vizsgálatok (laterális, rotációs és transzverzális diffúzió)
4. receptor szerveződés- és funkcióvizsgálatok
5. transzmembrán fluxus vizsgálatok.

Fenti jelenségek olyan molekuláris történéseket foglalnak magukba, mint különböző kötődési, aggregációs és fúziós reakciók, elektrokémiai diffúzió, Brown-mozgás, konformációs átmenetek, katalízis stb. Mindezek különböző környezeti faktorok hatása alatt állnak (ionösszetétel, hőmérséklet, nyomás, pH), továbbá a membrán külső és belső felszínére lokalizálható specifikus kölcsönhatásoktól függenek (pl. hormonok és egyéb ligandoknak receptorokhoz való kötődése, valamint a citoskeleton rendszer működése). Mindezekből következik, hogy a membrán dinamikai vizsgálatok céljára számos biofizikai, biokémiai és biológiai technikát fejlesztettek ki, ill. adaptáltak.

Molekuláris mozgások, ill. a strukturális rendezettség és annak időben történő változása vizsgálható többek között a következő kísérletes módszerekkel:

- mágneses rezonancia spektroszkópia (ESR, NMR, szaturációs transzfer ESR, szaturációs transzfer NMR);
 - ultrahang és infra abszorpciós spektroszkópia;
 - emissziós spektroszkópia;
 - fényabszorpciós spektroszkópia; (dichroizmus mérések); elektroforézis (membrán fragmentumok, receptorok, sejteken végzett elektroforézis).
- A molekuláris szerveződés, ill. annak időben változásai a következő kísérletes technikákkal vizsgálhatók:
- röntgen és neutron szórás
 - rugalmas és rugalmatlan (rezonancia Raman) fényszórás, mikroszkópos (fény-, fluoreszcenciás-, elektronmikroszkópos) technika,
 - kémiai kinetikai vizsgálatok (stopped-flow, T-jump, P-jump),
 - kémiai és biológiai módszerek (kémiai módosítás, rekonstitúciós vizsgálatok, fúziós vizsgálatok, növekedés- és differenciálódás vizsgálatok, katalitikus aktivitás mérések).

Természetesen a felsorolt módszerek mindegyike meghatározott időfelbontással jellemezhető és egy-egy konkrét dinamikai vizsgálat céljára való al-

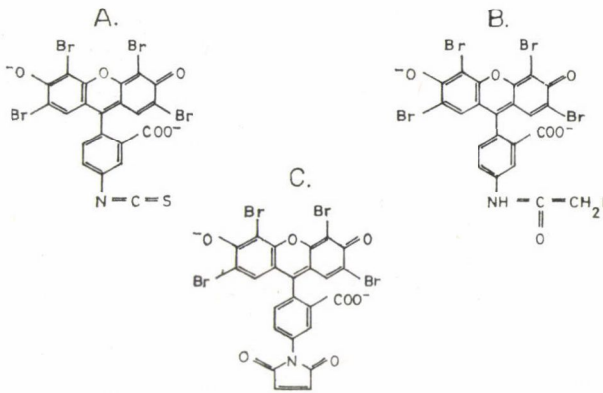
kalmazhatósága attól függ, hogy a vizsgált jelenség milyen időskálán játszódik le.

A membrándinamikai vizsgálatok szerteágazó volta, valamint a rendelkezésre álló igen sok kísérletes technika miatt a továbbiakban kizárólag a membránfehérjék mobilitásával kívánunk foglalkozni, egyidejűleg az alkalmazott technikákat a fényemissziós, fényabszorpciós és fénymikroszkópos módszerekre kívánjuk korlátozni.

Tranziens abszorpciók mérése

Vizes oldatban levő makromolekulák rotációs Brown-mozgásának vizsgálatára aránylag hosszú idő óta sikeresen alkalmazzák a fluoreszcencia depolarizációs méréseket. A módszer lényege a fotoszelekció, amelynek során a síkban poláros gerjesztő fény a vizsgált makromolekulák kezdeti véletlenszerűen orientált, egyenletes eloszlásából a gerjesztett molekuláknak egy orientált alpopulációját választja ki. Ez azzal kapcsolatos, hogy az abszorpció során preferenciálisan gerjesztődnek azok az egyedek, amelyeknek az abszorpciós átmeneti dipolmomentuma a beeső fény elektromos vektorával párhuzamos, vagy azzal kis szöveget zár be. A gerjesztett molekuláktól származó fluoreszcencia emissziós jelek a fotoszelekció utáni anizotróp eloszlást tükrözik. A gerjesztéstől számított minél rövidebb időn belül következik be a fluoreszcens legerjesztődés, a fluoreszcenciás fény annál magasabb polarizációval jellemezhető. Ha az abszorpció (gerjesztés) és az emisszió között eltelt átlagos idő alatt a makromolekulák térbeli orientációjukat számottevő módon megváltoztathatják, az emittált fény polarizációja csökken. A depolarizációs folyamat steady-state mérések eredményeivel jellemezhető (54), vagy időben követhető nanoszekundumos technikával (52, 53). A módszer alkalmazhatóságának az a feltétele, hogy a fluoreszcenciás élettartamok és a fotoszelekció eredményezte rendezett állapot lecsengését jellemző rotációs relaxációs idők összemérhetőek legyenek. Ez a 10^{-9} sec — 10^{-7} sec-os fluoreszcenciás élettartamokat figyelembe véve azt jelenti, hogy a módszer nem alkalmazható olyan rendszerek esetén, amelyek rotációs relaxációs ideje 1 μ sec körüli érték vagy annál hosszabb. Tekintettel arra, hogy a membránfehérjék rotációs Brown-mozgásukat nagy viszkozitású környezetben végzik, valamint, hogy a diffúziós mozgások sebességét számos, fentebb már említett tényező korlátozza, a fluoreszcenciás emisszió gyakorlatilag teljesen lecseng, még mielőtt szignifikáns depolarizáció lépne fel.

A lassú rotációs mozgások méréséhez olyan spektroszkópiai állapotokra van szükség, amelyek élettartama a μ sec—msec időtartományba esik. Ilyen hosszú élettartamú állapotok a tripllett állapotok. Az irodalomban közölt tripllett próbák túlnyomórészt valamilyen reaktív csoporttal makromolekulákhoz kapcsolható eozin (tetrabróm fluoreszcein) származékok (1. ábra). A megfelelő, hosszú életű tripllett állapottal rendelkező jelzők szintetizálása után

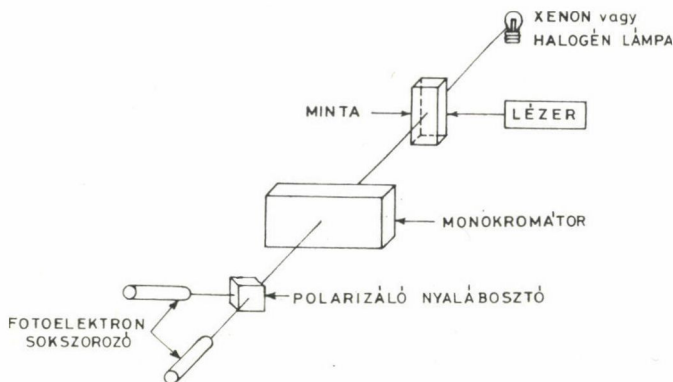


1. ábra. Lassú rotációs mérésekhez alkalmas triplett próbák. A) Eozin izotiocianát; B) Eozin jódiacetamid; C) Eozin maleimid

lehetőség nyílt lassú rotációs diffúziós mozgásoknak a nanosecundumos depolarizációs mérésekkel teljesen analóg foszforeszcencia depolarizációs vizsgálatár a.

Annak ellenére, hogy az elvi lehetőség adott, foszforeszcencia mérésekre kevés példát találunk az irodalomban. Vizsgálták ugyan ilyen módszerrel nagy viszkozitású oldószerekben kis szerves molekulák rotációs Brown-mozgását, sőt kifejlesztésre kerültek olyan érzékenyséű berendezések, amelyek segítségével fehérjék foszforeszcenciáját szobahőmérsékleten is mérni lehet (39). Ennek ellenére biológiai mintákon foszforeszcencia depolarizációs vizsgálatokat eddig igen csekély számban végeztek a sugárzás nélküli átmenetek relatíve igen nagy valószínűsége miatt. A foszforeszcencia kvantumhatásfok a hőmérséklet drasztikus csökkentése árán ugyan lényeges mértékben fokozható, de a cseppfolyós levegő hőmérséklet-tartományban mért adatoknak az interpretálása nem egyszerű.

Fentiek miatt a triplett próbákkal végzett depolarizációs mérések túlnyomórészt abszorpcióváltozások detektálásán alapulnak. E mérések kivitelezésére elvileg két lehetőség van. Intenzív fényforrások alkalmazásával az első triplett állapotban jelentős populációt generálnak, és ezt követően vizsgálják az S_0 alap szingulett állapotból az S_1 állapotba vezető átmenettel kapcsolatos abszorpciósökkenést („ground state depletion signal”). A másik lehetőség a T_1 állapot populációja által lehetségessé váló $T_1 \rightarrow T_2$ átmentek miatti abszorpció mérése. Tekintettel arra, hogy a T_1 állapotba optikai pumpálással jutnak a molekuláris rendszerek, polarizált fényel történő gerjesztés esetén a fotoszelekció miatt az abszorpcióváltozások polarizációs irány-függőek. A vertikálisan polarizált lézer-impulzusokkal történő gerjesztés szüneteiben (az impulzusok szélessége $1 \mu\text{s}$ körüli érték) egy külön fényforrás alkalmazásával mérik a minta abszorpciós sajátságait (9). Ez a fényforrás lehet Xe-lámpa vagy wolframhalogén lámpa (2. ábra). A mérő fényt a mintán való áthaladás után két részre



2. ábra. Tranziens abszorpciók mérésére szolgáló mérőberendezés. Bővebb magyarázatot I. a szövegben

választják egy megfelelő optikai elem (polarising beam splitter) segítségével oly módon, hogy a fény vertikálisan, ill. horizontálisan polarizált komponensei térben szeparálva külön-külön detektálhatók legyenek. A mért intenzitásokból meghatározható a függőlegesen és vízszintesen polarizált fényre vonatkozó A_V , ill. A_H abszorpciók mértéke, valamint ezen mennyiségeknek a lézer impulzussal történő gerjesztés megszűntétől mért időtől való függése. Az $A_V(t)$ és $A_H(t)$ függvényekből az $r(t)$ abszorpciós anizotrópia a következő módon nyerhető:

$$r(t) = \frac{A_V(t) - A_H(t)}{A_V(t) + 2A_H(t)}.$$

Az anizotrópia időbeli változása független a triplett állapotok élettartamától, s az $r(t)$ függvény analizálása révén a makromolekulák rotációs Brown-mozgásának paraméterei meghatározhatók (21, 45).

Ahhoz, hogy egy membránfehérje rotációs Brown-mozgását tanulmányozni lehessen, biztosítani kell a szóbanforgó protein molekulák alkalmas triplett próbákkal való szelektív jelölését. Ez általában nem könnyű feladat és a megkívánt szelektivitás csak ritkán érhető el. Ilyen eset a humán eritrocita membrán eozin maleimiddel való jelölése (33), amely triplett próba több mint 80%-os valószínűséggel a Band 3 fehérjéhez kötődik. [FAIRBANKS és mtsai (17) a szolubilizált vörösvértest membránfehérjék gélektroforézise alapján a megfelelő csíkokat megszámolták, innen az elnevezés. A Band 3 fehérje a membránfehérjék mintegy 25%-át teszi ki, egy 90 000 dalton molekulasúlyú, transzport folyamatokban involvált fehérje.]

Az eozin izotiocianáttal jelölt Band 3 fehérjének (ez kevésbé specifikus jelölés mint az eozin maleimid jelölés, de a szelektivitás még mindig meghaladja a 80%-ot (10, 33, 35), a membrán normálisával párhuzamos tengely körüli for-

gását jellemző rotációs diffúziós együtthatójára meglepően alacsony érték (1000 s^{-1}) adódott. Meglepő, hogy az anizotrópia bomlás egy konstans értékre vezetett, más szóval még igen hosszú idők után sem állt be a teljes rendezetlenség. Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy több, különböző rotációs diffúziós állandóval jellemezhető alpopuláció található a Band 3 molekulák között, és egy lassú depolarizációjú komponens kizárja a mért idők alatti teljes depolarizációt. A mérések nagyobb időfelbontással való megisméltése szerint az anizotrópia időbeli csökkenése két szimultán folyamatra enged következtetni. A gyorsabb, $200 \mu\text{s}$ körüli relaxációs idő a Band 3 fehérje dimérjeihez rendelhető, míg a 2–5 ms-os időállandóval jellemezhető folyamat egy nagy mértékben gátolt rotációs mozgásra utal.

Érdekes, hogy a cholesterol, amely tudvalevően növeli a lipid mikroviszkozitását (35), gyakorlatilag nem befolyásolja a Band 3 rotációs diffúzióját a 0,34–1,66 cholesterol/foszfolipid moláris koncentrációarány tartományban. Ez azt jelenti, hogy legalábbis bizonyos membránfehérjék rotációs mobilitása független a membrán fluiditástól. Ilyen esetekben feltételezhető, hogy a rotációs Brown-mozgás gátlásában nem a viszkozitás a meghatározó, hanem esetleg valamely, a fentiekben felsorolt egyéb gátló tényező (33).

Sapkaképződés („Capping”)

A sejtfelületi immunglobulinok (Ig) eloszlása a legtöbb limfoid sejten megváltozik, ha a fiziológiához közeli hőmérsékleten anti-Ig molekulák kötődnek hozzájuk. Elsőként TAYLOR és mtsai (46) figyelték meg, hogy ha anti-Ig-k kötődnek a B sejtek felületi Ig receptoraihoz, azok aggregálódnak. A folyamat során először a kezdeti mikroaggregátumok („cluster”-ek) nagyobb kiterjedésű foltokká („patch”) alakulnak, végül a receptorok túlnyomó többsége a sejtfelület egy meghatározott helyére vándorol és ily módon egy ún. sapka („cap”) alakul ki. A jelenséget több típusú ligand-receptor kölcsönhatás kiválthatja (46). Az Ig receptorokon kívül cap-képződést észleltek, többek között lektin (konkanavalin A, fitohemagglutinin) receptorok (29, 50), H-2 (13), C₃ (15), F_c (38), HLA (24): β_2 mikroglobulin (36), poli-L-lizin (47) stb. receptorok és a megfelelő ligandok kapcsolódását követően. A sapka általában a sejtfelületnek a Golgi-féle szervhez közeli helyén alakul ki (12), de a pontos hely a sejt és a receptor típusoktól függően változhat (14). Hasonlóan, sejt és receptor típusoktól függően bizonyos receptorok meghatározott körülmények között egymástól függetlenül produkálhatnak cap-képződést (27), ugyanakkor előfordulhat, hogy különböző receptorok, ún. co-capping jelenséget produkálva közös cap-kialakulást eredményezhetnek (14). A kialakult cap általában nem stabil, az anti-Ig-Ig komplex egy része pl. endocitózis révén a sejt belsejébe kerül, más része leválik a sejt felszínéről és az extracelluláris térbe jut (3, 46, 47). Ezután a felületi Ig-k újrászintetizálásához 6–20 órára van szükség (28).

Alacsony hőmérsékleten a patch és cap kialakulás általában egyaránt gátolt, valószínűleg az anyagcsere-folyamatok leállítása miatt. A citoskeletonra ható citokalazin B esetenként semmilyen vagy elhanyagolható, máskor számottevő, de korántsem teljes gátlást eredményez. Mindmáig nem tisztázott, hogy a sejtekben fiziológiás körülmények között lejátszódó folyamatokban van-e a capping folyamatának valamilyen szerepe vagy jelentősége.

A cap-képződésben megnyilvánuló felületi receptor mozgékonyság aránylag kicsi és fluoreszcenciás mikroszkóp segítségével kényelmesen tanulmányozható (30). Novikoff hepatoma és normális patkány máj sejtek konkanavalin A receptorainak cap-képzését vizsgálták fluoreszcenciás (fluoreszcein izotiocianáttal jelölt) konkanavalin A segítségével. Megállapították, hogy Novikoff-sejtek esetén a cap kialakulásához 37 °C-on a lektin koncentrációtól függően 20–60 perc szükséges. A cap-képződés alacsony (3 °C) hőmérsékleten, valamint glutáraldehydes fixálás után nem figyelhető meg. Ugyanakkor normális hepatocitákon sem 3 °C-on, sem 37 °C-on nem észleltek sapkakialakulást. Figyelembe véve, hogy a normális és transzformált sejtek alacsony konkanavalin A koncentrációk mellett egyaránt agglutinálhatók, arra következtettek, hogy — legalábbis ebben a konkrét esetben — a sejtagglutinálás és a konkanavalin A receptorok nagy távolságokra vonatkoztatott laterális mobilitása között nincs közvetlen kapcsolat. A lektin receptorok mozgékonyságának normális és malignus májsejtek esetén észlelt különbsége a transzformáció markeréül szolgálhat.

Fotodekompozíciót követő fluoreszcencia intenzitás regenerálódás („Fluorescence photobleaching recovery”)

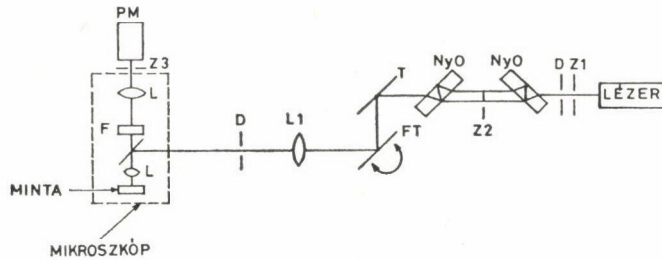
Integrális membránfehérjék laterális mozgását első ízben FRYE és EDIDIN (20) észlelték, amikor megállapították, hogy sejtek fúzióját követően a két sejt felületi komponensei egyenletesen eloszlanak a fúzió eredményezte sejt egész felületén. FOWLER és BRANTON (19) később lényegében ugyanilyen technikával vizsgálták a sejtmembrán komponenseinek a humán eritrociták fúziója utáni újraeloszlást. Fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelölt vörösvértesteket jelöletlen eritrocitákkal fuzionáltattak Sendai vírus vagy polietilén glikol alkalmazásával. A fúzió után előálló sejt fele részben sötét (nem fluoreszkáló), fele részben világos volt. Ez a nem egyenletes eloszlás bizonyos idő elteltével egyenletes fluoreszcencia intenzitás eloszlásba ment át. A jelenség magyarázata, a vörösvértest membránokkal („ghost”) végzett hasonló kontroll kísérletek eredményei alapján, egyértelműen a fluoreszcenciás módon jelzett integrális membránfehérjék diffúziója. Úgy találták, hogy az egyenletes eloszláshoz szükséges idő csökkenő hőmérséklettel növekszik. A mért időkből meghatározták a diffúziós állandók közelítő értékét.

A fotodekompozíciót követő fluoreszcencia intenzitás regenerálódás („fluorescence photobleaching recovery” — FPR) módszer alkalmazásakor a FRYE—EDIDIN, ill. FOWLER—BRANTON-módszerhez hasonlóan egy kezdeti, nem egyenletes eloszlást hoznak létre, majd az egyensúlyi eloszláshoz való közeledést vizsgálják időben. Bizonyos fluoreszcenciás festékek ismert saját-sága, hogy intenzív fényel történő besugárzás hatására fotodekompozíciót szenvednek. Különösen fotoérzékeny fluoreszcens marker a fluoreszcein izotiocianát. A szokásos fénymikroszkópos vizsgálatokban észlelték, hogy ez a festék igen gyorsan halványul. Ez adta az ötletet, hogy intenzív besugárzás segítségével a sejtek felületének egy kicsiny részén az egész ottlevő festék mennyiségét eliminálják és azt követően mérjék ugyanazon helyen az esetleges fluoreszcencia intenzitás növekedést. Tekintettel arra, hogy ha a fotodekompozíció az egész sejt felületére kiterjedt, a fluoreszcencia intenzitás csak minimális mértékben növekedett (37), az ennél lényegesen nagyobb mértékű fluoreszcenciás intenzitás növekedésnek csak az lehet a magyarázata, hogy a scannelt felületre a sejt felület azon részéről diffundálnak a fluoreszcein izotiocianáttal jelzett membránkomponensek, amely részek a primer fotodekompozíción kívül estek.

Az FPR módszer alkalmazása szükségessé teszi meghatározott membrán komponenseknek megfelelő fluoreszcens markerekkel való jelzését. Erre a célra legelterjedtebben fluoreszcein vagy rodamin származékokat használnak. A mérések során a fluoreszcens mikroszkóp látóterében egyetlen sejtet vizsgálnak. A sejt felület egy kicsiny hányadát (néhány μm^2) rövid időre igen intenzív, fókuszált fényel világítják meg. Ezt követően a megvilágítás erősségét neutrális szűrőkkel igen nagy mértékben csökkentik, hogy a fluoreszcencia intenzitás változásának mérése idején számottevő fotodekompozíció ne léphessen fel. A fluoreszcencia intenzitás időben növekszik, amint a kiválasztott felületre az azt környező területekről fotodekompozíciót nem szenvedett fluoreszcens festékkel jelzett membránkomponensek diffundálnak. A fluoreszcencia intenzitás időbeli változásából diffúziós együtthatók határozhatók meg.

Az ilyen mérések kiértékeléséhez, az abszolút transzport paraméterek meghatározásához a fénynyaláb pontos geometriájának és azon belül a fényintenzitás eloszlásának ismerete szükséges. A módszer hátránya, hogy nem képes különbséget tenni a random diffúzió és a sejt felületen többek által feltelezett szisztematikus áramlások miatti fluoreszcencia intenzitásváltozások között. Ezen okok miatt a diffúziós paraméterek ilyen módon meghatározott értéke a valódi értéktől esetenként eltéréseket mutathat.

A 3. ábrán egy módosított FPR kísérleti elrendezés látható (37). Az L1 egy speciális mikroszkópjektiv, amely a lézernyalábot a mintára fókuszálja. Ez előtt a lencse előtt el lehet helyezni egy hengerlencsét, ilyen esetben az elhalványított felület megnyúlt téglalap alakú. A két nyalábeosztó szerepe, hogy kényelmesen lehessen a fényintenzitást a fotodekompozíciót produkáló



3. ábra. FPR vizsgálatok céljára alkalmas mérőrendszer. Bővebb magyarázatot l. a szövegben

(„bleaching”) és a mérési célokat szolgáló („monitoring”) értékekre beállítani, miközben a nyaláb helyzete nagy pontossággal változatlan. Ha a Z2 reteszt zárják, a fény csak négyszeres visszaverődés után jut a minta megfelelő helyére. Mivel minden visszaverődés mintegy 10% hatásfokú, ezért az intenzitásváltozás $\sim 10^{-4}$ -szeres. A nyitás—zárás 1 ms alatt elvégezhető.

A nyaláb helyzete az FT forgótükör forgatásával változtatható. A fotodekompozíció több mint 10, nagy pontossággal beállítható pozíció bármelyikén, esetleg mindegyikén létrehozható, és ezt követően egymás után mérik az összes pozícióban a fluoreszcenciás intenzitás időbeli változását. Ilyen módon kényelmesen el lehet különíteni a szisztematikus áramlások és a random diffúzió miatti intenzitásváltozásokat. A különböző módon kivitelezett FPR mérések eredményeiből a diffúziós állandók meghatározására több matematikai módszer áll rendelkezésére (5, 25, 26).

Sejtfelületi receptorok eloszlása

A sejtmembrán felületén elhelyezkedő receptorok eloszlását, valamint annak időbeli változását illetően elvileg két szélsőséges felfogás lehetséges.

- i., a receptorok eloszlása determinisztikus és egyszersmind statikus;
- ii., az eloszlás teljesen véletlenszerű (egyenletes) és bármely kiválasztott receptor tökéletesen random diffúziós mozgást végez.

Az előző fejezetekben kifejtett tények mindkét extrém elképzelést kizárják. A statikus kép teljesen tarthatatlan, ez az előzőek ismeretében nem szorul további indokolásra. Hasonlóképpen elvethető a bármiféle restriktiót nélkülöző sztochasztikus modell is (l. a folyékony mozaik membránmodellel kapcsolatos megjegyzéseket). A valóságot jobban közelítő modellek ezen két szélsőséges modell „között” keresendők. Ilyen és ehhez hasonló megfontolásokból kiindulva a sejtfelületi receptorok eloszlására az alábbi modellt javasoltuk (11).

A receptorok elhelyezkedése nem lehet teljesen egyenletes, azok mozgása nem lehet teljesen sztochasztikus. Erre utal, egyebek között, a különböző receptorok csatolt sapkaképzése („co-capping”) is (40). Bizonyítottnak tekinthető, hogy a receptorok (legalábbis egy részük) és a citoskeleton rendszer kö-

zött strukturális kapcsolat létezik. Mivel a mikrotubulus, a mikro- és vastag-filamentum rendszer a sejtek genetikusan meghatározott stuktúrái, az általuk „kihorgonyozott” receptoroknak a sejt felületén való eloszlása nagy valószínűséggel a fenotípusra, ill. a genotípusra (esetleg mindkettőre) jellemző karakterisztikus vonásokat hordoz. Bár a receptorok túlnyomó többsége (ha van egyáltalán kivétel) mérhető rotációs és laterális mozgékonyással bír, e folyamatok dinamikája megengedheti a receptorok egyes, fajra, ill. egyedre jellemző, topológiai sajátosságainak időbeli megmaradását. Az ilyen megmaradó jellegzetességek nem feltétlenül egyetlen, azonos típusú receptorokkal kapcsolatosak, hanem több, különböző ligandum receptoraira külön-külön vagy azok együttesére egyidejűleg fennálló közös törvényszerűségek lehetnek (40). A modell kísérletes ellenőrzése nem könnyű, ilyen célra az elektronmikroszkópos „freeze etching” (1) technikánál minden bizonnyal effektívebb módszert jelent a ligandumok egymás kötődését befolyásoló hatásának vizsgálata (8, 18), valamint a fluoreszcenciás energia transzfer módszer, amelynek segítségével az involvált különböző receptorok közötti átlagos szeparációs távolságokat szimultán lehet meghatározni (40). Az ilyen meghatározott receptor topológiát („receptor pattern”) leíró paraméterek a sejt felületét karakterizáló egyéb adatok (receptorok kvalitatív és kvantitatív jellemzése stb.) mellett hozzátartozhatnak az egyes sejtek teljes leírásához, maga a receptor pattern pedig a különböző felismerési folyamatokban játszhat szerepet.

Várható eredmények

A sejtfelületi receptorok integrális membránfehérjék, amelyek igen nagy affinitással kötnek meg különböző sejt-folyamatokat reguláló ligandokat. A receptorok működésére nem alkalmazható semmilyen univerzális modell. Ugyanakkor egyre több kísérleti adat utal arra, hogy a sejtfelületi komponensek aggregációs állapota és diffúziós sajátosságai bizonyos sejt-funkciókkal korrelációban állnak. Bár jelenlegi ismereteink távol állnak attól, hogy segítségükkel elfogadható módon magyarázni lehessen a sejtfelület dinamikáját meghatározó faktorok hatását, elképzelhető, hogy a témakörön belüli további kutatások a dinamikai sajátosságok megváltozásaiban egy-egy, sok elemi lépést tartalmazó sejt-válasz vagy membránon keresztül megvalósuló szignalizáció valamely kezdeti fázisát fogják azonosítani.

IRODALOM

1. ABBAS, A. K., AULT, K. A., KARNOVSZKY, M. J., UNANUE, E. R.: *J. Immunol.* **114**, 1197 (1975).
2. ANERSBERG, N.: *J. Cell. Biol.* **52**, 206 (1972).
3. ANTOINE, J. C., AVRAMEAS, S.: *Eur. J. Immunol.* **4**, 468 (1974).
4. AUSTIN, R. H., CHAN, S. S., JOVIN, T. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5650 (1979).

5. AXELROD, D., KOPPEL, D. E., SCHLESSINGER, J., ELSON, E., WEBB, W. W.: *Biophys. J.* **16**, 1055 (1976).
6. BRETSCHER, M. S.: *Nature New Biol.* **231**, 229 (1971).
7. BRETSCHER, M. S.: *Science* **181**, 622 (1973).
8. BOYSE, E. A., OLD, L. J., STOCKERT, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 886 (1968).
9. CHERRY, R. J.: *Methods Enzymol.* **54**, 47 (1978).
10. CHERRY, R. J., BURKLI, A., BUSSLINGER, M., SCHNEIDER, G., PARIXH, G. R.: *Nature* **263**, 389 (1976).
11. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B., TRÓN, L.: *Macromolecular dynamics and information transfer. IUPS Symposium: Neural Communication and Control: Facts and Theories. Akadémiai Kiadó (megjelenés alatt).*
12. DEPETRIS, S., RAFF, M. C.: *Nature New Biol.* **241**, 257 (1973).
13. DEPETRIS, S., RAFF, M. C.: *Eur. J. Immunol.* **4**, 130 (1974).
14. DEPETRIS, S.: *J. Cell Biol.* **65**, 123 (1975).
15. EDEN, A., BIANCHE, C., BOGART, B., NUSSENZWEIG, V.: *Cell. Immunol.* **7**, 474 (1973).
16. EDIDIN, M.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **3**, 179 (1974).
17. FAIRBANKS, G., STECK, T. L., WALLACH, D. F. H.: *Biochemistry* **10**, 2606 (1971).
18. FLAHERTY, L., ZIMMERMAN, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1990 (1979).
19. FOWLER, V., BRANTON D.: *Nature* **268**, 23 (1977).
20. FRYE, L. D., EDIDIN, M.: *J. Cell. Sci.* **7**, 319 (1970).
21. JABLONSKI, A.: *Z. Naturforsch.* **A16**, 1 (1961).
22. JOHNSON, L. W., HUGHES, M. E., ZILVERSMIT, D. B.: *BBA* **375**, 176 (1975).
23. JOVIN, T. M.: 28. Nemzetközi Élettani Kongresszus, 1980. július 13—19. Budapest, Akadémiai Kiadó (megjelenés alatt).
24. KONRILSKY, F. M., SILVESTRE, E., NEAUPORT, SAUTES, C., LOOSFELT, Y., DANSSET, J.: *Eur. J. Immunol.* **2**, 249 (1972).
25. KOPPEL, D. E.: *Biophys. J.* **28**, 281 (1979).
26. KOPPEL, D. E.: *Biophys. J.* **30**, 187 (1980).
27. LOOR, F.: *Eur. J. Immunol.* **4**, 210 (1974).
28. LOOR, F., FORNI, L., PERNIS, B.: *Eur. J. Immunol.* **2**, 203 (1972).
29. LOOR, F., LOWLANTS, G. E.: *Eur. J. Immunol.* **4**, 649 (1974).
30. MATROMARINO, P., NERI, G., SERRA, A., WALBORG, E. F.: *J. Cell. Sci.* **42**, 169 (1980).
31. MORRISON, M., MUELLER, T. J., HUBAR, C. T.: *J. Biol. Chem.* **249**, 2658 (1974).
32. NICOLSON, G. L.: *BBA* **457**, 57 (1976).
33. NIGG, E. A., CHERRY, R. J.: *Biochemistry* **18**, 3457 (1979).
34. OESTERHELT, D., STOECKENIUS, W.: *Nature New Biol.* **233**, 149 (1971).
35. OLDFIELD, E., CHAPMAN, D.: *FEBS Lett.* **23**, 285 (1972).
36. PAULIK, M. D., BERNOCO, M., BERNOCO, D., CAPPELINI, R.: *Science* **182**, 1352 (1973).
37. PETERS, R., PETERS, F., TEWS, K. H., BAHR, W.: *BBA* **367**, 282 (1974).
38. RAMASAMY, R., LAWSON, J.: *Immunology* **28**, 301 (1975).
39. SAVIOTTI, M. L., GALLEY, W. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4254 (1974).
40. SCHREINER, G. F., UNANUE, E. R.: *Adv. Immunol.* **24**, 37 (1976).
41. SINGER, S. J.: *Adv. Immunol.* **19**, 1 (1974).
42. SINGER, S. J.: *Ann. Rev. Biochem.* **43**, 805 (1974).
43. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: *Science* **175**, 720 (1972).
44. STECK, T. L.: *J. Cell Biol.* **62**, 1 (1974).
45. TAO, T.: *Biopolymers* **8**, 609 (1969).
46. TAYLOR, R. B., DUFFUS, W. P. H., RAFF M. C., DEPETRIS, S.: *Nature New Biol.* **233**, 225 (1971).
47. UNANUE, E. R., PERKINS, W. D., KARNOVSKY, M. J.: *J. Immunol.* **108**, 569 (1972).
48. UNANUE, E. R., KARNOVSKY, M. J.: *Transplant. Rev.* **14**, 181 (1973).
49. YAHARA, I., EDELMAN, G. M.: *Exp. Cell. Res.* **81**, 143 (1973).
50. YAHARA, I., EDELMAN, G. M.: *Nature* **236**, 152 (1973).
51. YAHARA, I., EDELMAN, G. M.: *Exp. Cell. Res.* **91**, 125 (1975).
52. YGUERABIDE, J.: *Methods Enzymol.* **26**, 498 (1972).
53. WAHL, P.: in: *New Techn. Biophys. Cell Biol.* **2**, 233 (1975).
54. WEBER, G.: *Adv. Protein Chem.* **8**, 415 (1953).