

AZ IMMUNGLOBULINOK KONFORMÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

CSER LÁSZLÓ

MTA Központi Fizikai Kutató Intézete, Budapest

Bevezetés

A magasabbrendű szervezetek a számukra idegen anyagok ellen többfajta módon védekeznek. A védekezés egyik eszköze az immunglobulinoknak nevezett fehérjevegyület család. Az ellenanyagok mintegy 75%-a IgG típusú immunglobulin. A továbbiakban csak ennek a típusnak vizsgálatára fogunk szorítkozni. Az immunglobulinok „feladata” — felismerni, megkötni az idegen anyagot (antigént), továbbá kiváltani a megkötött ellenanyag eltávolításának folyamatát.

A fenti bonyolult funkció megértéséhez ismerni kell az immunglobulinok szerkezetét.

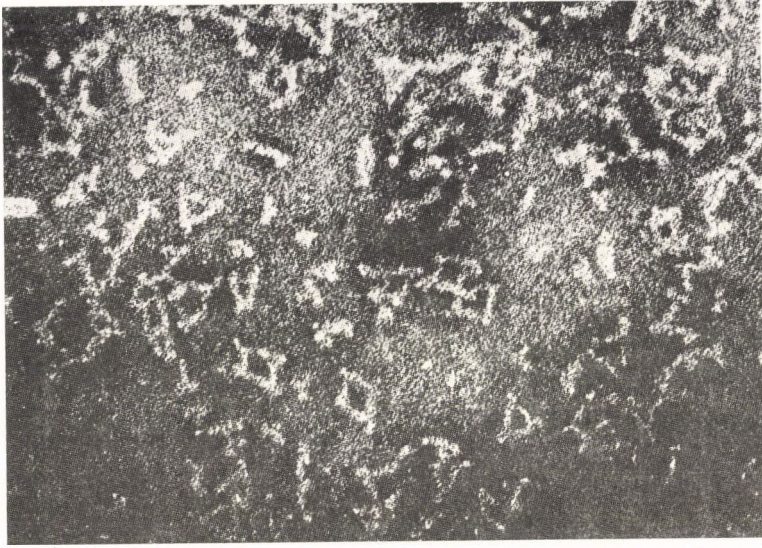
Szerkezetmeghatározási módszerek és az általuk nyert eredmények

I. Biokémiai módszerek

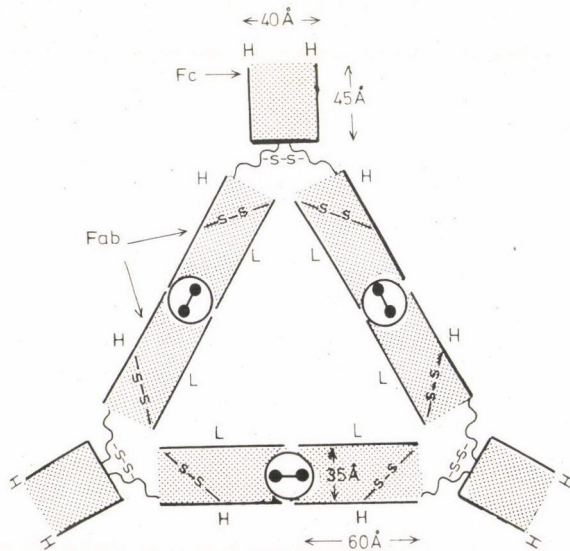
- 1959-ben PORTER kimutatta, hogy az IgG molekula cisztein jelenlétében papainnal három fragmentumra bontható szét (két Fab és egy Fc fragmentum), amelyek közül a Fab elnevezésűek megtartják az antigénnel való kapcsolódás tulajdonságát (PORTER 1959).
- Ugyancsak 1959-ben EDELMAN ismerteti eredményeit, miszerint az IgG-molekula felépítésében két ún. könnyű és két nehéz lánc vesz részt (EDELMAN 1973). 1970-ben EDELMAN megállapítja egy humán eredetű IgG láncainak aminosav-sorrendjét (EDELMAN 1973). Megválaszolatlan marad a kérdés a fragmentumok, illetve láncok térbeli elhelyezkedését illetően.

II.

Az elektronmikroszkóppal kapott felvételek egyike (lásd I. ábrát), amelyet VALENTINE és GREEN készített (VALENTINE 1967) háromszögletű és négyt szögletű alakzatokat tartalmaz. A szerzők ezen alakzatokat úgy értelmezték, hogy azok bivalens, kis molekulásúlyú antigének által összekötött IgG-molekulák trimér, illetve tetramér konglomerációi. A második ábra mutatja be ezt az interpretációt, s ugyanott vannak feltüntetve a molekulák főbb méretei is. A molekulák alakját Y betűhöz hasonlíthatjuk.



1. ábra. Bivalens antigénnel összekötött IgG molekulák elektronmikroszkóp felvétele



2. ábra. Az elektronmikroszkóp felvételen látható háromszögletű alakzatok interpretációjának sematikus ábrája

III.

A molekulák atomjainak helyzetét a *röntgen-diffrakció* módszerével lehet megállapítani, amennyiben a vizsgálandó anyag kristályos alakban előállítható. SARMA és munkatársai 1971-ben elvégezték a Dob IgG röntgendiffrakciós vizsgálatát (SARMA 1971). A harmadik ábrán látható a kérdéses molekula balsafa modelljének fényképe. A mintegy 10 nm magas T-alakú molekula törzse az Fc fragmentumnak a 18,5 nm „feszítávolságú” felső szár a két Fab fragmentumnak felel meg.



3. ábra. A Dob IgG modellje. (Az ábrán látható skála hossza 3 nm)

Látható a bemutatott példából, hogy a két módszer az IgG molekulát más alakúnak és különböző méretűnek látja. Megjegyzendő, hogy az előbbi két módszer alkalmazásához előkészített mintákban a molekulák nincsenek természetes körülmények között, s ez felveti annak a kérdésnek megválaszolását, hogy természetesebb közegben, pl. fiziológiás oldatban vajon milyen alakú az IgG molekula és milyen méretekkkel rendelkezik.

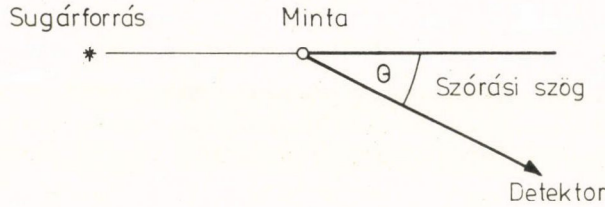
IV.

A szóródási kísérletekben használt röntgen vagy neutronsugárzás tipikus hullámhossza néhány tized nanométer. A szórási szög nagyságrendjét a hullámhossz (λ) és a részecske globális méretének aránya szabja meg:

$$\theta \sim \frac{\lambda}{l} \ll 1 \quad (1)$$

A fenti feltételből következik, hogy makromolekulák (így az IgG) esetében a szórási szög értéke általában kicsi. (Ezért szokás a módszert *kisszögű szórásnak* nevezni.

A kísérleti elrendezést az alábbi sematikus ábrán érzékeltetjük (4. ábra).



4. ábra. A kisszögű szórásvizsgálat mérésösszeállításának sematikus ábrája

Az egységes leírás kedvéért bevezetjük a szórási vektor abszolútértékének (κ) fogalmát.

$$\kappa = \frac{2\pi}{\lambda} \theta \quad (2)$$

s a szórt intenzitást e paraméter függvényének fogjuk tekinteni.

Oldatban lebegő részecskék természetesen véletlenszerűen orientáltak, s emiatt a kisszögű szórás mérésből nem nyerhető teljes információ a részecskék szerkezetét és alakját illetően. E rendezetlenség az oka annak, hogy a szórt intenzitást elegendő, mint a $\vec{\kappa}$ abszolút értéke függvényeként kezelni.

A teljességre való törekvés nélkül felsorolunk néhány alapvető információt, amelyet a kisszögű szórás segítségével nyerhetünk. (Lásd pl. JACROT összefoglaló cikkét (JACROT, 1976)).

Homogén monodiszperz részecskék oldata esetében a szórt intenzitás a

$$I(\kappa) = I_0 \cdot c \cdot v^2 \left[\frac{\sum a_i}{v} - \rho_s \right]^2 \cdot |F(\kappa)|^2 \quad (3)$$

kifejezéssel adható meg.

Itt c — a koncentráció, v — a részecske térfogata, a_i — az oldott molekula atomjainak szórási amplitúdója, ρ_s — az oldószer szórási amplitúdó sűrűsége.

$|F(\kappa)|^2$ — a részecske alakját, méretét jellemző form-faktor.

1. Kis κ esetén

$$|F(\kappa)|^2 = e^{-1/3\kappa^2 R_g^2}$$

$$R_g^2 = \frac{\int (\rho(\vec{r})) r^2 d\vec{r}}{\int \rho(\vec{r}) d\vec{r}} \quad (4)$$

ahol

az ún. girációs sugár négyzete s a részecske globális méretét, sűrűség eloszlását jellemző mennyiség.

2. Fontos a vékony hosszú rúd alakú molekula esete, ekkor

$$|F(\kappa)|^2 = \frac{1}{\kappa} e^{-1/2 \kappa^2 R_g^2} \quad (5)$$

ahol R_g — az ún. keresztmetszet girációs sugara.

A form-faktor előtti zárójel tüzetesebb vizsgálata adja meg a választ arra a kérdésre, hogy miért célszerű a drága és relative kis intenzitású neutron nyalábokkal végzett kisszögű szórásvizsgálat?

- a) A biológiai anyagokban rendkívül nagy mennyiségben jelenlevő hidrogént a neutron ugyanolyan jól érzékeli mint a többi atommagot, míg a röntgen-sugárzás számára a hidrogénatom szinte láthatatlan.
- b) A hidrogén szórási amplitúdója $a_H = -0,34 \cdot 10^{-12}$ cm, míg a nehéz-hidrogén (deuterium) szórási amplitúdója $a_D = 0,67 \cdot 10^{-12}$ cm, mint látjuk különböző előjelű. A víz és nehézvíz keverékének szórási amplitúdó sűrűsége ezért széles határok között mozog s igaz, hogy

$$\begin{array}{ccc} \rho_{H_2O} & \bar{\rho} \text{ fehérje} & \rho_{D_2O} \\ -0,6 \cdot 10^{14} \text{ cm}/\text{Å}^3 & < 2 \cdot 10^{14} \text{ cm}/\text{Å}^3 & < 6,4 \cdot 10^{14} \text{ cm}/\text{Å}^3. \end{array} \quad (6)$$

Így ρ_s megfelelő módon megválasztható s elérhető például a

$$\frac{\sum a_i}{v} = \rho_s \quad (7)$$

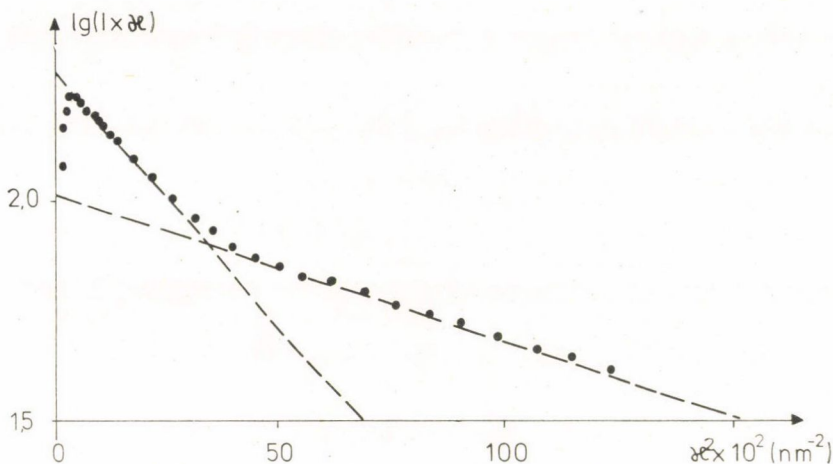
egyenlőség, ahonnan a molekula térfogata meghatározható.

Az oldószer szórási amplitúdó sűrűségének változtatását „kontraszt variáció” módszerének szokás nevezni, s a módszer különös jelentőséggel bír az inhomogén molekulák szerkezetének felderítése során.

S most példaként tekintsünk három olyan kérdést, amelyre a kisszögű szórás módszerével kaptunk választ.

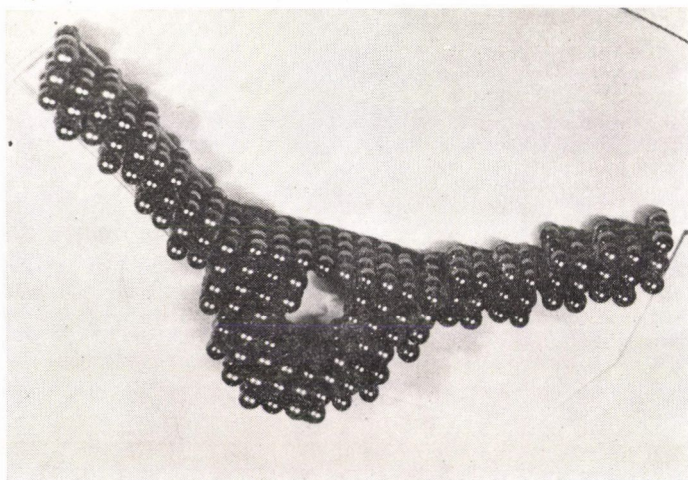
1. Milyen az IgG molekulát alkotó három fragmentum relatív térbeli helyzete, ha a molekula oldatban — természetes közegben — van?

A kisszögű szórás módszerével mért intenzitás eloszlást az ún. „keresztmetszet” koordinátákban, azaz a $\lg(I(\kappa) \times \kappa)$ görbét a κ^2 függvényében ábrázolva az 5. ábrán látható, s az IgG molekulára jellemző, szórási intenzitás eloszlást kapjuk (CSER). Mivel a szórási intenzitás és a molekula alakja, valamint szerkezete között nincs egyértelmű megfeleltetés, így a kísérleti eredmények révén csak szétválaszthatjuk a lehetséges molekula alakokat a nem lehetségesektől. Ezt a következő módon tehetjük meg.

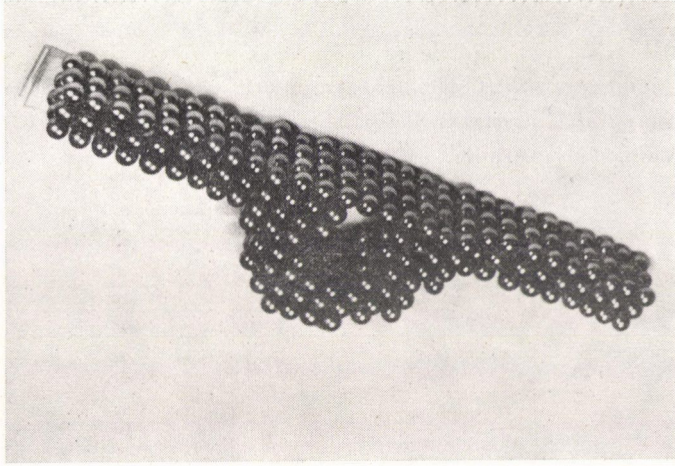


5. ábra. Az IgG molekulák jellegzetes kisszögű szórási intenzitás eloszlási görbéje. $\lg(I \times r)$, r^2 koordináta rendszerben

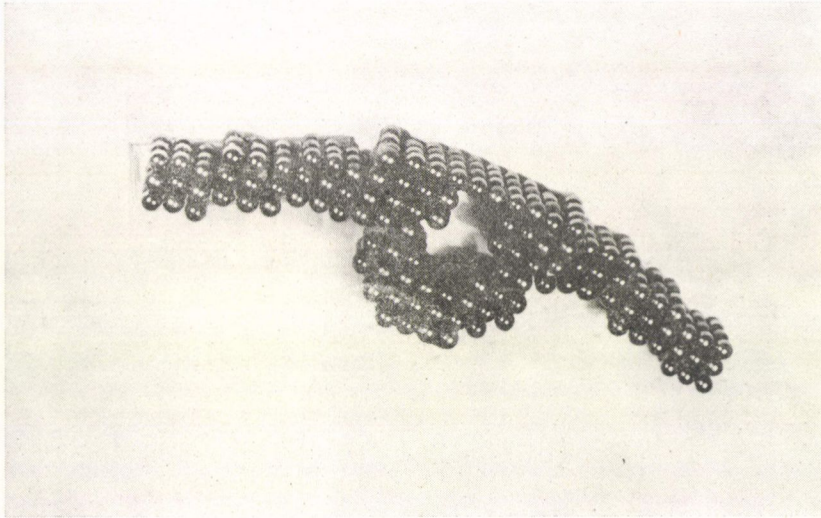
Az elektronmikroszkópia, a kristályszerkezet, valamint más információk alapján megszerkesztjük a molekula valószínű modelljeit és megfelelő számítástechnikai eljárással kiszámítjuk a modelleknek megfelelő szórási intenzitás görbéket, majd azokat összehasonlítjuk a mérési eredményekkel. A 6. ábrán az elektron mikroszkópsugallta Y modell (6a. ábra) és a röntgen-diffrakció alapján kapott T-modell (6b. ábra) láthatók. Az F_{ab} „karok” további lefelé hajlításával egy harmadik modellt is előállítottunk (6.c. ábra), hogy a Fab fragmensek különböző helyzetének a számított szórási intenzitás eloszlásra kifejtett hatását tanulmányozzuk.



6. ábra. a)



b)



c)

6. ábra. Az IgG molekula három jellegzetes modellje. a) Y — alakú, b) T — alakú, c) lefelé hajló karú

A számított és mért szórési intenzitás görbék összehasonlításából arra a következtetésre jutottunk, hogy az Y-alak kizárható a lehetséges modellek közül, mivel a vizsgált κ tartományban a számított görbe alakja erősen eltér a mért görbe alakjától (7a. ábra).

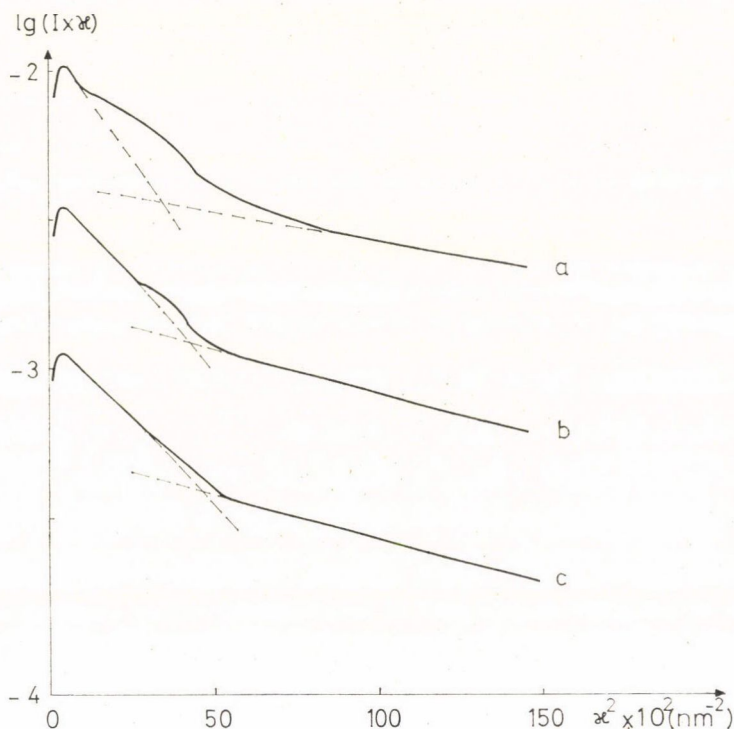
A T, valamint a lefelé hajló „karú” modellek eltekintve a κ^2 tartomány közepén látható kisebb domború kitüremkedéstől a mért intenzitás eloszlást jól közelítő számított intenzitás eloszlásra vezettek (7b és 7c ábrák).

Következésképpen az IgG molekulák alakja oldott állapotban nem lehet Y-alakú, de a T vagy a lefelé hajló karalak lehetséges.

2. Az IgG molekula méretei közül ragadjunk ki egyet, nevezetesen a két Fab fragmentum együttes hosszát, amelyet jelöljünk l -lel. Az elektronmikroszkópiai felvételtől

$l = 12$ nm, míg a röntgendiffrakció

$l = 18,5$ nm értéket adott.



7. ábra. A 6. ábrán látható modelleknek megfelelő számított szórásintenzitás eloszlási görbék
a) Y — alakú modell, b) T — alakú modell, c) lefelé hajló karú modell
(A szaggatott vonal a mért görbe menetét jelzi)

Ezt a mennyiséget a kisszögű neutronszerzés segítségével a következő módon határoztuk meg. Készítettünk olyan monovalens antigéneket, amelyeknek a szórásamplitúdósűrűsége különbözött az IgG molekula átlagos szórásamplitúdósűrűségétől. Az oldószer összetételét nehéz és normál víz keverésével úgy választottuk meg, hogy annak szórásamplitúdósűrűsége viszont megegyezzen az IgG molekula szórásamplitúdósűrűségével (zérus kontraszt esete). A neutronok csak az IgG molekulák által megkötött antigéneket (esetünkben 40 000 d molekulásúlyú dextrán

molekulákat) érzékeljük. A szórási intenzitás eloszlás ekkor egy oszcilláló tagot tartalmaz.

$$I(z) = I_0(z) + A \frac{\sin \kappa l'}{\kappa l'} \quad (8)$$

amelynek argumentumában a két antigén súlypontjának l' távolsága szerepel. Az oszcilláló tag maximum és minimum helyeiből l' jól meghatározható, amelyből ha levonjuk az antigének más mérésekből ismert átmérőjét a kívánt $l - (F_{ab} - F_{ab})$ „feszítávolságot” kapjuk meg. A fenti eljárás segítségével két különböző, sertés IgG fenti jellemzőjét határoztuk meg. Ezekre $l_1 = 26,7 \pm 1,2$ nm és $l_2 = 20,8 \pm 1,4$ nm értékeket kaptunk (CSER 1978, 1980). Összevetve eredményeinket az elektronmikroszkópia, a röntgendiffrakció adataival, megállapíthatjuk, hogy oldatban az IgG molekulák nyúlánkabbak, mint kristályos közegben vagy az elektronmikroszkóp számára preparált állapotban. A két általunk kapott érték különbözőségéből pedig az egyes IgG-k méretbeli különbözőségére is következtethetünk. Ez a következtetés jó összhangban van más mérések (pl. girációs sugár mérései) eredményeiből levont hasonló tapasztalatokkal (CSER 1977).

3. Nem érdektelen kérdés pl. az IgG molekulák effektor funkciójának megértése szempontjából, hogy miként viselkedik a molekula antigén befogása során?

Ha igen kisméretű, néhány száz dalton molekulasúlyú antigéneket reagáltatunk az immunoglobulinokkal, akkor a kapott IgG-antigén₂ komplex méretei az IgG méreteivel lesznek azonosak.

Az előbb említett sertés IgG egyikét dinitrofenil-csoportot tartalmazó monovalens antigénekkal reagáltattuk. Az IgG-(Dnp antigén)₂ komplex szórási intenzitás eloszlását összehasonlítva az intakt IgG molekula szórási intenzitás eloszlási görbéjével (8. ábra) azt tapasztaltuk, hogy a két görbe alakja erősen hasonlít egymáshoz, de az egyenes szakaszokat jellemző $R_{q_{1,2}}$ -keresztmetszeti sugarak, valamint a girációs sugár (R_g) értékei azonos mértékben megváltoztak, mégpedig úgy, hogy az intakt molekulát jellemző paraméterek értéke volt a nagyobb.

$$\frac{\Delta R_g}{R_g} \approx \frac{\Delta R_{q_1}}{R_{q_1}} \approx \frac{\Delta R_{q_2}}{R_{q_2}} \approx -7\% \quad (9)$$

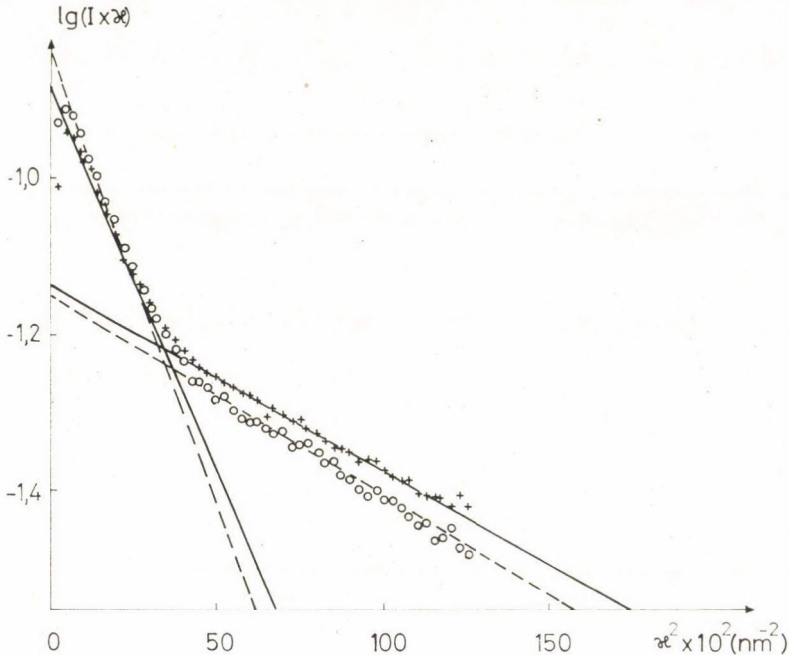
Durván szólva ez a következőket jelenti,

- a molekula egésze reagál az antigén megkötésére, azaz mind az F_{ab} , mind az F_c fragmens méretei csökkennek.
- a molekula alakja viszont lényegében nem változik meg.

A fentiek alapján feltételezhetjük, hogy az antigének megkötése után fellépő konformációs változás, amely végig fut az egész molekulán az F_{ab}

fragmensektől az F_C fragmensig, lehetővé teszi a komplement-rendszer aktiválódását.

Az itt elmondott három példa, amelyeket saját munkáinkból emeltünk ki, csak kiragadott reprezentánsa mindazoknak a lehetőségeknek, amelyekkel a kisszögű neutron és röntgenszórás rendelkezik, s amelyek természetesen nem szorítkoznak kizárólagosan az immunglobulinok szerkezetének felderítésére, hanem a legkülönbözőbb biológiai makromolekulák szerkezetének megismeréséhez nyújtanak egyedülálló segítséget.



8. ábra. Sertés anti-Dnp IgG molekula kisszögű szórás intenzitás eloszlás görbéje
 ○ — intakt IgG
 + — IgG-(Dnp-antigén)₂ komplex

IRODALOM

- CSER, L., FRANEK, F., GLADKIH, I. A., NEZLIN, R. S., NOVOTNY, J. and OSTANEVICH, Yu. M.: FEBS Letters **80**, 329 (1977).
 CSER, L., FRANEK, F., GLADKIH, I. A., NEZLIN, R. S., NOVOTNY, J. and OSTANEVICH, Yu. M.: FEBS Letters **93**, 312 (1978).
 CSER, L., FRANEK, F., GLADKIH, I. A., NOVOTNY, J. and OSTANEVICH, Yu. M.: Immunology Letters **1**, 185 (1980).
 CSER, L., FRANEK, F., GLADKIH, I. A., KUNCHENKO, A. B. and OSTANEVICH, Yu. M.: Eur. J. Biochem. Közlés alatt.
 EDELMAN, G. M.: Science **180**, 830 (1973).
 JACROT, B.: Rev. Progr. Phys. **39**, 911 (1976).
 PORTER, R. R.: Biochem. J. **73**, 119 (1959).
 SARMA, V. R., DAVIES, D. R., LALAW, L. W., SILVERTON, E. W. and TERRY, W. O.: Cold Spring Harbor Symp. Biol. **36**, 413 (1971).
 VALENTINE, R. C. and GREEN, N. M.: J. Mol. Biol. **27**, 615 (1967).