

A VÖRÖSVÉRSEJT MEMBRÁN FEHÉRJESZERKEZETÉRŐL

SZELÉNYI JUDIT

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet
Haemoglobin és Sejtmembránkutató Osztály, Budapest

A legtöbb plazma membrán határfelület a sejt és környezete között, amely más sejtek, vírusok, hormonok, fehérjék felismerésére alkalmas receptor helyekkel rendelkezik, másrészt biztosítja az enzimek topológiai rendeződését. A vörösvérsejt membrán, ha nem is tekinthető a membránok reprezentásának, mégis mindig a membránkutatások központjában állott. Ezt nemcsak egyszerű módon és tiszta állapotban való könnyű kinyerhetősége magyarázza, hanem az is, hogy a legtipikusabb plazmamembrán funkciókat, mint pl. az ozmótikus egyensúly fenntartása, aktív és passzív iontranszport, szubsztrát transzport, antigén és receptor tulajdonságok stb. tanulmányozni lehet rajta. Eléggé komplex struktúra ahhoz, hogy érdekes és fontos legyen, de eléggé egyszerű is ahhoz, hogy analizálható és elsőként megismerhető legyen. A membrán alkotórészeinek szerveződése a vörösvérsejt membrán esetén ismert a legjobban, de mai tudásunk szerint a többi, eddig vizsgált membránra is érvényesek a vörösvérsejt membrán felépítésére vonatkozó alapelvek.

A legújabb vizsgálati eredmények alapján a membránok nagymértékben aszimmetrikusan felépített határfelületek, amelyek hidrofób, belső lipid kettős-rétegébe ékelődnek bele a két felszín irányában hidrofil fehérjék. SINGER és NICOLSON (38) e vizsgálatok alapján feltételezett „fluid mosaic” modellje a membrán dinamikus szerveződésére fekteti a fő súlyt, amelynek részletesebb kísérleti adatait a későbbiekben részletezni fogom. A „fluid mosaic” modell fő jellemzői a következők:

1. A membránfehérjék túlnyomórészt alfa helix, vagy „random coil” konformációjúak.
2. A membrán lipidek testhőmérsékleten folyékony állapotban vannak.
3. A membrán lipidek fő tömege nincs fehérjéhez kötve és nincs direkt kölcsönhatásban velük.
4. Bizonyos fehérjék be vannak ékelve a membrán lipid részébe, sőt keresztülhatolnak a membránon és hozzáférhetők ennek mindkét oldalán.
5. A membrán molekulák mobilisak a membránban és oldalirányú elmozdulásra képesek, amelyek alapján antigének, receptorhelyek és intramembrán részecskék átcsoportosulása lehetséges a membránt érő hatások következtében.

* * *

A membrán vizsgálatok túlnyomó többsége a membrán előállításával kezdődik, — csak kevés vizsgálatot végeztek intakt sejten. A membrán preparálásának külön nagy irodalma van, így erre nem térek ki, csak annyiban, hogy az eredmények értékelésénél mindig figyelembe kell vennünk azt, hogy a preparált membrán = műtermék, és hogy mennyiben az, az a preparálás módjától nagymértékben függ.

A vörösvérsejt membrán esetén a „tisztaság” egyik jellemzőjéül a hemoglobin mentességet szokás tekinteni, kérdés viszont, hogy az ilyen „ghost” mennyire reprezentálja az intakt sejtmembránt. Noha a hemoglobint nem szokás a membrán esszenciális alkotórészének tekinteni MARFEY (26) vizsgálatai szerint a membrán felszínétől \AA távolságig orientált hemoglobinsréteg helyezkedik el, amelyeknek legalábbis a lehetősége meg van arra, hogy kötődjön a membránhoz. Eltávolítása a struktúra átrendeződésével járhat, amint erre a későbbiekben visszatérek. A membrán műtermék jellegét hangsúlyozzák ZWAAL és munkatársai (34, 50) akik szerint igen nagy tisztaságú foszfolipáz C-vel szembeni érzékenység szempontjából a visszazárt ghost nem tekinthető az intakt sejt megfelelőjének. A foszfolipáz C ugyanis az intakt vörösvérsejt foszfolipidjeit nem hidrolizálja, a visszazárt ghostét viszont igen (és a hipotónián duzzasztott sejtét is). Tehát a lipidek hozzáférhetősége szempontjából sem tekinthetők a ghostok és az intakt membránok azonosnak. Ettől függetlenül a preparálás során a membránfehérje elveszthet ligandokat, szubsztráthiányossá válhat, ami a stabilitását ill. konformációját befolyásolja, strukturálisan átrendeződhet, felvehet olyan molekulákat, amelyek normálisan nincsenek kötve rajta, valamint egyes részeit más membrán részekkel kicserélheti.

A vörösvérsejt membrán alkotórészei

A hemoglobinmentes vörösvérsejt membrán tömege 11—12. 10^{-13} g. (8). Ha sűrűségét 1.15 g/cm³-nek tekintjük (51) és felületét 140 μm^2 -nek (48), vastagsága 75 \AA -nek adódik, ami jól megfelel az elektronmikroszkópiásan mértnek (33). A membrán tömegének kb. 52%-a fehérje, 40%-a lipid és 8%-a szénhidrát. A szénhidrát tartalom 7%-a a glikoszfingolipidekben van, míg a többi a membrán-glikoproteinekben szerepel (43).

A lipidek kb. 30%-a a koleszterin, szemben a belső membránok szinte kizárólagos foszfolipid felépítettségével. A vörösvérsejt membrán fehérjéinek aminosav összetétele nem tér el nagyon más membránokétól, vagy akár szolubilis fehérjéktől. Viszont az egyes polipeptidek, sőt ezek bizonyos részeinek aminosav összetétele igen erősen eltérhet. Mindenesetre egyik jellemzője a savanyú aminosavak túlsúlya (21% szemben a 12% bázikussal (35)). A vörösvérsejt membrán fehérjéinek másik jellemzője a viszonylag nagymennyiségű, nagymolekulású fehérje. A membránnak kb. egyharmada 220—255 ezer molekulású, másik harmada pedig 90 ezer Dalton körül van. Az összes

fehérjének csak egyharmada esik 70 ezer molekulasúly alá, pedig más membránokra (pl. mitokondrium) ez a molekulasúly-tartomány jellemző.

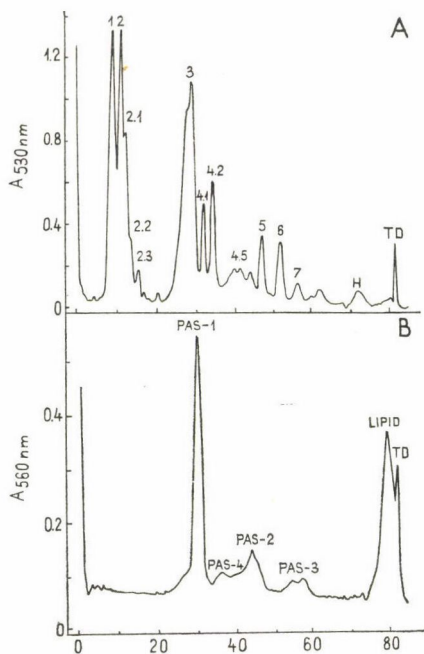
A membránfehérjék vizsgálatára az egyik legelterjedtebb módszer az SDS-ben (Sodium Dodecyl Sulfate) oldott membránfehérjék akrilamidgél elektroforézise. Az egyes membránfehérje komponenseket ennek alapján szokás számozni mobilitásuk (becsült molekulasúlyuk) sorrendjében, minthogy az SDS kötése folytán a vándorlási sebesség egy adott porozitású gélben az alegység molekulasúlyának függvénye. A módszernek határt szab egyrészt a glikoproteinek anomális vándorlása, másrészt az a tény, hogy feltétlenül denaturált komponensekkel állunk szemben (41). A denaturált fehérjék fokozottan érzékenyek a proteolízisra, az intracelluláris proteázokra. Az oligomerek tagjai különböző helyekre vándorolnak és utólag nem lehet eldönteni melyik alegységek tartoztak eredetileg egymáshoz.

Az SDS- akrilamid elektroforetogramon 7 főkomponenst szokás megkülönböztetni, ha fehérjére festjük (Coomassie Blue), ezen belül azonban a 2. és 4. zónák minorkomponenseit, mint 2,1; 2,2; 2,3; és 4,1; 4,2; 4,5; is megkülönböztetik (11, 12). A legkisebb molekulasúlyt a hemoglobin reziduális része mutatja, ez körülbelül 17 ezernek felel meg, mint alegységsúly (1. ábra). Minthogy az SDS hatására a fehérjék monomerjeikre disszociálnak az összes közölt molekulasúly a monomer minimális molekulasúlya (kivéve az egy erősen negatív glikoforint). Az így szétválasztott komponenseket már nem lehet tovább disszociáltatni más ágensekkel sem, így elfogadhatjuk, hogy ezek nem aggregátumok, vagy asszociátumok. Különböző módon preparált ghostok elektroforetogramja megegyezik (19). Az emlős speciestek fehérjeösszetétel szempontjából nagy hasonlatosságot mutatnak a humánhoz, míg glikoprotein összetételük már nagyobb variációt mutat (21).

A Coomassie Blue-val festett fehérjék az összfehérjének főtömegét képviselik, azonban a nagymértékben glikoszilált fehérjék ezzel a módszerrel nem detektálhatók (kb. 7%), (12). Ezeket PAS technikával mutathatjuk ki, és megoszlásukra jellemző az, hogy megfelel a szialsav megoszlásának a membránfehérjék között. Ezeknek a fehérjéknek a vándorlása „anomális” a nem glikoszilált referens fehérjékhez viszonyítva, a szénhidrát és szialsav részek „extra” negatív töltése miatt (1/B ábra).

Az I. táblázat a vörösvérsejt membrán fő fehérje polipeptidláncokat, valamint glikoproteineket foglalja össze. Ezek közül néhánynak a struktúrájáról már részletes adatok is állnak rendelkezésünkre, míg másokról úgyszólván semmit sem tudunk.

Az egyik legrégebben vizsgált membránfehérje a MARCHESI és mtsai által leírt spektrin (23). Egyike a fő membránfehérjéknek, a ghost fehérjéinek 20%-a. Nem tartalmaz sem szénhidrátot sem lipidet, két nagymolekulasúlyú polipeptidláncból áll. (240 ezer és 215 ezer, ez utóbbi a miozin-jellegű polipeptid; lásd 1/A ábra, 1. és 2. zónák). Kis ionerejű pufferrel oldható ki, különösen



I. ábra. Vörösvérsejt membrán poliakrilamidgél elektroforetogramjának denzitometriás értékelése.

A.) Coomassie blue festés után

B.) PAS festés után

H = a hemoglobin polipeptidláncainak helyzete

TD = a marker festék helyzete

I. táblázat

A vörösvérsejt membrán főbb polipeptidjei és glikoproteinjai

Komponens	Mol. súly* (Dalton)	Festődött fehérje %	Polipeptid* Ghost	Elnevezés
A. Polipeptidek				
1	240 000	15,1	216 000	Spektrin Tektin A
2	215 000	14,7	235 000	Miozin szerű polipeptidek
3	88 000	24,1	940 000	Komponens a Protein E Minor glikoprotein
4,1	78 000	4,2	180 000	
4,2	72 000	5,0	238 000	
5	43 000	4,5	359 000	Aktin-szerű polipeptid
6	35 000	5,5	540 000	G3PD
7	29 000	3,4	403 000	
B. Glikoproteinek				
PAS-1	55 000	6,7	500 000	Glikoforin
PAS-2				Sziálglikoprotein ABH és MN izoantigén

* FAIRBANKS, G., T. L. STECK és D. F. M. WALLACH: *Biochemistry* **10**, 2606 (1971). cikke alapján.

magasabb pH-n és kelátképzők jelenlétében. Oldáskor az 5. SDS frakció 43 000 molekulásúlyú polipeptid is kioldódik a két nagymolekulásúlyú polipeptiddel; ez az aktin-jellegű komponens, amely — amint a későbbiekben ezt még tárgyalom — funkcionális egységet képez az előző kettővel, mint a vörösvérsejt aktomiozin-szerű fehérjéje.

A natív spektrin molekula nagymértékben aszimmetrikus rúd (6). Polimerizációra képes, kétértékű kationok és megfelelő ionerő (0,1 M NaCl) jelenlétében fibrilláris struktúrát alkot (46). A natív spektrin dimer (a két nem azonos láncból), de a membránban a dimereknek az 5. zó nával alkotott asszociátumai vannak jelen valószínűleg. Mint aktomiozinszerű fehérje a membrán rigiditását, ill. a sejt mechanikai tulajdonságait befolyásolja. Kisfokú, Ca^{++} aktiválható ATPáz aktivitással bír (28), de az kisebb, mint a miozintól várható. Oldhatósága jobban megfelel az aktinénak, mint a miozínénak, vagy aktomiozínénak. Az aktomiozinhoz való hasonlóságot az aminosav összetétel, méret és ATPáz aktivitás alapján mondták ki (16). Mindenesetre a spektrin komponensek asszociáltan a membrán belső felén helyezkednek el (14), hasonlóan a Ca^{++} ATPáz aktivitáshoz (ami csak nyitott ghostok esetén mérhető).

3. zóna. (100 000 molekulásúlyú fehérjék).

A membránfehérje körülbelül 25%-a. 6–8% szénhidrátot tartalmaz, mégis alig látszik a PAS festés során (csak, mint egy váll a PAS-1 frakción), mert szialsav tartalma alacsony (15). Molekulásúlya gélkromatográfiával magasabb (150 000). Szorosan kötődik a membrán lipidekhez, és így elsősorban olyan oldószerekkel oldható ki, amelyek a lipideket micellásan oldatba viszik, és így a fehérje hidrofób részéről leválasztják (44). Ez a polipeptid sok apoláris aminosavat tartalmaz, szénhidrátja a fehérjéhez kötött hexóz). Könnyen képződik diszulfid híd alegységei között és a membránban, mint dimer van jelen. A különböző kutatócsoportok, amelyek vizsgálták, eltérően nyilatkoznak N terminálisáról: TANNER és BOXER (44) szerint ez blokkolva van, ROSENBERG és mtsai (36) szerint legalább egy N terminális van szabadon. Feltehetően részt vesz az aniontranszportban és glukóztranszportban. Erre utal ezek SH gátlókkal való blokkolhatósága. Tartalmazza a konkanavalin A kötőhelyet és a Na^+ K^+ ATPáz foszforilált intermedierjét.

A 3. zóna elektroforetikusan komplexen festődő sávot ad, lehet, hogy nem homogén. (KNÜFERMANN 20) munkacsoportja pl. több danzilezett végcsoportot talált, míg keresztökötés szempontjából, proteolízis szempontjából homogénnek látszik, így elektroforetikus heterogenitását a különböző szénhidrát-komplement tartalom indokolhatja. Ma még nem eldöntött, hogy homogén, vagy egy-máshoz nagyon hasonló polipeptid láncok családja.

Sziálglikoprotein (glikoforin PAS-1)

Az összes membránfehérjéknek csak néhány százaléka. 60% szénhidrát és 40% fehérje alkotja. Molekulasúlya 50—55, 46 ill. 31 ezer attól függően, hogy elektroforézissel, gélszűréssel, vagy ultracentrifugálással határozták meg. A szénhidrát komponens N-acetil-glukózamin, N-acetil-galaktózamin, mannoz fukóz és sziálsav tartalmú. MARCHESI szerint (24) leucin az N terminálása, TANNER (44) szerint viszont blokkolva van. Magányos polipeptid lánc nem asszociálódik sem önmagával, sem másokkal. Primer szerkezete azt mutatja, hogy N és C terminálisai főként hidrophil aminosavakból állanak, míg van egy középső része, amely mintegy 30 poláros aminosavból áll és a membrán lipid részébe ékelődik bele.

A szénhidrát rész acetilgalaktózaminon keresztül szerin, vagy treonin OH-n keresztül kötődik a polipeptid lánchoz (alkáli labilis) vagy aszparaginsavon át, amely acetilglukózamint köt, amely kötés alkáli stabilis. Az alkáli labilis szénhidrát oldalláncok elágazó tetramerek, amelyek sziálsavban végződnek, míg az alkáli stabilak hosszabbak és komplexebbek. A sziálsav a felelős a vörösvérsejtmembrán felületi negatív töltésének legnagyobb részéért (49).

A sziálglikoprotein hordozza a membrán ABO, MN vércsoport antigéntulajdonságait, lektinkötő helyeit, influenzavírus receptorát, stb. (25).

Az egyes komponensek elhelyezkedése a membránban.

Az egyes fehérjekomponensek elhelyezkedésének vizsgálatára számos módszer ismeretes. Az egyik legegyszerűbb ezek közül a külső felületen levő fehérjék hozzáférhetőségének vizsgálata biztosan nem penetrálódó reagensekkel. Azok a fehérjék, amelyek az intakt sejten reagálnak, biztosan a külső felszínen foglalnak helyet (legalábbis részben) (II. táblázat). Így pl. nyilvánvaló, hogy a proteázokkal inaktiválható acetilkolinészteráz, vagy az így eltávolítható sziálsav a külső felületen foglalnak helyet. A külső felületen való elhelyezkedést egyértelműen bizonyítja az, ha a citoplazma oldalról nem hozzáférhető a kérdéses molekula.

II. táblázat

Néhány membrán marker elhelyezkedése

<i>Külső felületen</i>	<i>Belső felületen</i>
Acetilkolinészteráz	NADH* diaforáz
Sziálsav	G3PD** és kötőhelye
Nikotinamid-adenin-dinukleotidáz	CAMP* kötőhely
Oubain kötőhely	Protein kináz
Szénhidrátok	ATPáz****

* nikotinsavamid-dinukleotid (redukált)

** gliceraldehid- 3- foszfát

*** ciklikus adenzin-monofoszfát

**** adenzintrifoszfát

A citoplazma oldal reakcióját egyrészt az intakt sejt és a nyitott ghost reakciójának összehasonlításával lehet elvégezni. De vannak ennél direktebb módszerek is. Pl. a nyílt ghostot megtölteni a reagenssel, visszazárni és ezután elvégezni a reakciót úgy, hogy a reagens csak a belső oldalon van jelen. Másrészt meg van a lehetőség a „kifordított” membránvezikulumok vizsgálatára az ún. „inside out” és „right side out” vezikulumok szétválasztásával.

A legszerencsésebb eset az, ha az egyes komponenseket elektronmikroszkóposan, vagy citokémiailag láthatóvá tudjuk tenni.

A fentiekben vázolt módszerek szerencsésen kiegészítik egymást és arra a megállapításra vezettek, hogy a fehérjekomponensek megoszlása abszolút aszimmetrikus, azaz egy komponens sincs azonosan jelen a membrán két oldalán.

Az egyes polipeptidek megoszlását részben proteázok (2) laktoperoxidáz és H_2O_2 jelenlétében végzett jódozás (30) galaktózoxidáz és bórhidrid alkalmazásával (13), valamint kis, nem penetráló ligandokkal (pl. S^{35} diazónium benzolszulfonát (3) való reakció utáni SDS elektroforézissel vizsgálták. Intakt sejt reakciója esetén csak a glikoproteinek (3. zóna és glikoforin, valamint egyes kis glikoprotein frakciók) mutattak reakciót.

Ha viszont nyílt ghostokat használtak, az összes fő polipeptid komponens reagált. Egyetlen rejtett, hozzáférhetetlen komponens sem volt, noha az egyes polipeptid láncok különböző mértékben reagáltak. A fentiekből az következik, hogy a 3. zóna, a PAS-1 zóna, valamint a minor glikoproteinek a külső felületen is vannak, míg 1; 2; 2,1; 2,2; 2,3; 4,1; 4,2; 5,6; 7 és néhány nyomnyi polipeptid csak a belső felszínen foglal helyet.

Ezek a vizsgálatok minthogy részben a ghostokon történtek, magukban foglalják azt a feltételt, hogy a nyílt ghoston való fokozott jelölődés nem a preparálás során megváltozott konformáció eredménye. Minthogy azonban nem találtak a ghost készítés során megnövekedett reakcióképességet az egyes fehérjékre vonatkozóan, ugyanis a nyílt ghostokból készített „right side out” vezikulumok reakciói egyeztek az intakt sejtével, másrészt sem szénhidrát, sem ATPáz, sem spektrin veszteséget nem észleltek, elfogadták, hogy az így nyert eredmények általánosíthatók, noha ez nyilvánvalóan csak első közelítésben lehet igaz (39).

A glikolitikus enzimek körülbelül ugyanolyan erősen vannak kötve a membránhoz, mint a hemoglobin. Ezeket DUCHON és COLLIER (9) „lazán kötött” enzimeknek tekinti. Ezzel szemben a fruktóz—bisz-foszfát-aldoláz és a G3PD* szorosan vannak kötve, a foszfoglicerátkináz pedig intermedier erősséggel kötődik. Ez az a pont, ahol a $Na^+ K^+$ transzport rendszer a sejt metabolikus állapotát befolyásolni képes. SCHRIER (37) szerint a PGK** a lipidek felé van orientálva, míg a G3PD a sejt belseje felé. TILLMANN (47) legújabb

* Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

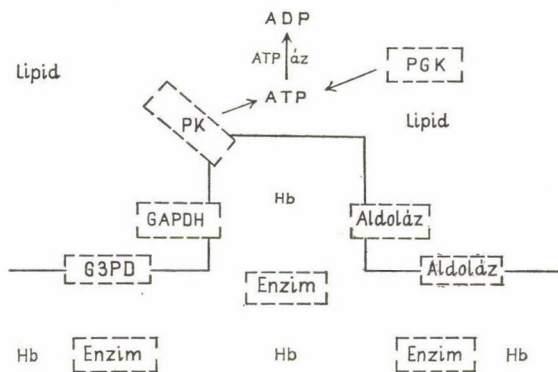
** foszfoglicerát-kináz

vizsgálatai alapján kis ionerejű pufferrel történő hemolízis során a hexokináz is szorosan kötöttnek nyilvánult, míg a többi 12 enzim lazán kötött. Feltűnő, hogy a PK*** aktivitása csak a membrán aprítása után mérhető. TILLMANN összehasonlította a fehér ghost (0,5 %-nál kevesebb hemoglobin; 5 imosM puffer) és a pink ghost (1% hemoglobin; 30 imosM puffer (toluolos feltárás utáni „reziduális” membrán enzimaktivitását, és megállapította, hogy míg a G3PD és aldoláz aktivitásai egyformán magasak mindkét készítményben, a PGK és PK aktivitása csak toluol után magas; a fehér ghostban ezek rejtve vannak.

DUCHON és COLLIER szerint (9) a laza és szoros kötésű csoportokban is részben maszkírozva vannak az enzimek. Ezt „Cryptic Enzyme Acticity”-nak nevezik. Valóban, toluolos extrakció után megnő aktivitásuk az oldatban, bár lehet, hogy ez csak a membrán belsejének jobb hozzáférhetősége miatt adódik.

A PK mély elrejtettsége a membránban alátámasztja PARKER és HOFFMANN (29), valamint SCHRIER (37) azon elképzelését, hogy a PK fontos a membrán ATP-szintje szempontjából.

A glikolitikus enzimek elrendeződését TILLMANN a következő képen képzei (2. ábra). A nagyobbik része lazán asszociál a belső felülethez úgy, mint a hemoglobin és 30 imosM pufferrel kioldható. A másik rész szorosan „eltemetve” van kötve és toluollal, vagy még alacsonyabb ionerővel (5 imosM puffer) oldható. Ilyen a G3PD, aldoláz, PK, PGK. Ezek nagy mennyiségben vannak jelen a reziduális membránokban, mechanikai feltárás után. Az, hogy G3PD és aldoláz kimutathatók a fehér ghostokban azt mutatja, hogy ezek inkább a sejt belseje felé irányulnak, mint a PK és PGK. PK intermedier helyzet: kis aktivitás mérhető a fehér ghostban is.



2. ábra. Néhány enzim elrendeződése a vörösvérsejt membránban. (Sematikusan ábrázolva TILLMANN W. (35) alapján)

*** piruvát-kináz

**** adenosin-trifoszfát

Így igazolták egy sor „markerről”, hogy a membrán melyik oldalán található. A külső félen lévőek csak az intakt sejten és a „right side out” vezikulumon reagáltak, míg a belsően levők az „inside out” vezikulumon.

Ezek a vizsgálatok azt is megmutatták, hogy a 3. zóna és glikoforin aszimmetrikusan hatolnak át a membránon. Szénhidrátészük és pl. a glikoforin N-terminálisa csak a külső felületen hozzáférhető a laktoperoxidázos jódozás részére, míg más részek (pl. a glikoforin C terminálisa) csak a belső oldalon. A belső oldalon való jelenlétüket igazolja a kifordított membrán proteolízise is, amely eltér a normálisétól, de mindkét esetben érinti a két komponenst (39).

A 3. zóna pl. tripszin részére csak „inside out” esetben hozzáférhető és hasonlóképpen oxidáló szerek hatására csak „inside out” esetben képez diszulfidot, „right side out” esetben nem.

A 3. zóna citoplazma felőli oldalon való előfordulását igazolja az is, hogy a G3PD kötés és a foszforiláció részére csak itt vannak kötőhelyei (18, 54). A szénhidrát résznek a külső felületen való elhelyezkedését igazolja az is, hogy „inside out” vezikulumban rezisztens a szialidáz, galaktozoxidáz és egyes proteázok hatásával szemben (17). Az összes major polipeptid tehát vagy egyik, vagy másik oldalon fordul elő. A két fő glikoprotein áthatol a membránon, cukorrészükkel kifelé. A glikoproteinek aszimmetrikus penetrációja azt a lehetőséget veti fel, hogy ezek hidrofób részükkel szorosán kötődnek a lipidekhez, másrészt, mint transzmembrán komponensek alkalmasak transzport folyamatok lebonyolítására.

Az egyes membránfehérjék lokalizációjára és más komponensekkel való kapcsolatára jó felvilágosítást nyújt az izolálására alkalmas módszer.

Egyes glikolitikus enzimek, valamint a hemoglobin híg sóoldatokban nem specifikus elektrosztatikus erővel adszorbeálódnak a membránra. Az ionerő növelésével ezek leoldhatók (45). Ide tartozik azonban a specifikusan kötődő G3PD is, (6. zóna), amely a 3. zónán keresztül specifikusan kötődik a membrán citoplazma felőli oldalára. Alacsony ionerő, enyhén alkálikus közeg és különösen kelát-képzők jelenlétében az 1,2,5, komponensek szelektíven kioldódnak. Ezek a spektrin alkotórészei és a belső oldal fibrilláris anyagát alkotják, mivel kioldásukkor ez a fibrilláris szerkezet eltűnik, másrészt az oldott spektrin az ionerő növelésével ismét fibrilláris alakul (22).

Fehérje denaturáló (perturbáló) szerek hatására egy sor membránfehérje kioldódik, csak a lipidhez, szénhidráthoz kötöttek nem (3, 7 4,5 és a teljes PAS profil). Ezek guanidin HCl, 0,1 N NaOH ill. HCl, maleinsavanhidrid és PCMB) segítségével a membránfehérjék kb. felét fel lehet oldani, úgymint 1,2; 2,1; 2,2; 2,3; 4,1; 4,2; 5; 6; komponensek) amiből 1,2,5 és 6 már egyszerűen az ionerő növelésével is kioldódik (42). Ez azt jelenti, hogy a membránfehérjék nem glikoszilált fele helyspecifikusan kötött, amely kötés a denaturáló ágens hatására felbomlik. Az összes idetartozó fehérje perifériásan helyezkedik el, nem hatol be a lipidrétegbe és mind a citoplazma felőli oldalon van.

Ezzel szemben a glikoproteinek, amelyek mélyen lehorgonyoztak a lipid régiókba, nem oldódnak ilyen módon ki. Az egyetlen komponens, amely nem oldódik a denaturáló szerekkel és mégis a citoplazma felőli részen van a 7; az összes többi rezisztens komponens a külső felszínen van, ill. hozzáférhető ott.

Az eddigiekben rezisztensnek mutató komponenseket (PAS profil és 3. zóna), nem ionos detergensekkel lehet feloldani, amelyek a lipiddel detergens komplexet (micellát) képeznek és így a protein-lipid apoláros kötéseket megszüntetik anélkül, hogy a protein konformációt vagy asszociációt megváltoztatnák (Triton.X100), (52).

A PAS festődő komponenseken és 3. zónán kívül a 4,2 és 6 komponensek is kioldódnak így, a foszfolipidok felével együtt. Oldhatatlanul maradnak az 1; 2; 4,1; 5 és 7 komponensek és megmarad a ghost-szerű alak.

Ez a filamentáris matrix valószínűleg a spektrin, mert: legalább a fele az összfehérjének, másrészt nincs ilyen maradék ha 1,2 és 5 komponenseket előbb kioldjuk. A filamentáris szerkezet a spektrin sajátja.

A 3; 4,2; és 6 komponensek mindig megtartják tritonos közegben specifikus kvaterner asszociációikat. A 3. zóna dimerként viselkedik, a 6., mint tetramer, amely G3PD aktív. Az összes 6. zóna mobilitású polipeptid specifikusan és kooperatíván kötődik a 3. zónához (2 G3PD tetramer) ennek dimer alakjában. A 4,2 szintén tetramer és 270 ezer molekulasúlyú a tritonos oldatban csak úgy, mint a ghostban (53), szorosán kötődik a 3. zónához, ezzel együtt preparálható és tisztítható, ha csak nem választják el denaturációval hamarabb.

A membránban valóban jelenlevő asszociációk vizsgálatára a legmegfelelőbb *in situ* láthatóvá tenni elektronmikroszkóposan a megfelelő fehérjét. A ferritinnel jelzett antitestek kolloidális vashidroxid kötése igen alkalmas erre a célra. Újabb hasznos információkat nyújtott ezen a téren a „freeze etch” technika, amelynek segítségével a membrán strukturális diszkontinuitásait ismerték fel, amelyeket membránba ékelt részecskéknek (membrane intercalated particles) neveztek el. Ghostonként kb. 500 ezer db. észlelhető, átmérőjük kb. 80 Å (48). Friss membránban rendezetlenek és nem bizonyított, hogy valóban képesek-e elmozdulni, vagy sem.

Fehér ghostokban enzimekkel való kezelés hatására, vagy pH és ionerő (pH 5,5 mM CaCl₂ 8 mM foszfát) változtatására ezek a részecskék aggregálnak úgy, hogy az lehet egy meginduló mozgás is, de lehet, hogy az eredeti mozgás rendeződik csak. Ezekhez a részecskékhez társulnak az antigének, a lektin stb. kötőhelyek valamint savas csoportok (32). Ez a rájuk kötött, jelzett szubsztrát aggregációból következik. Ezekből a tulajdonságokból kiderül, hogy a membránba ékelt részecskék egy glikoforint tartalmaznak darabonként, mert ez hordozza a fenti tulajdonságokat. Másrészt a glikoforin, különösen a hidrofób része nem elég nagy ahhoz, hogy egymaga alkotassa a részecskét. Feltételezték, tehát, hogy a glikoproteinek laterális asszociációja alkot egy részecskét.

Az, hogy ezek tényleg asszociálva vannak-e, vagy csak az agglomerációkor jönnek létre, még nem tisztázott. A 3. zóna egymaga is alkothatná a membránba ékelt részecskét, valamint átmérőben is megfelel ennek.

A 3. zóna részvételét a membránba ékelt részecskékben NICOLSON és mtsai (32, 27) igazolták legújabban. Annak alapján, hogy a 3. zóna tartalmazza a membrán konkanavalin A kötőhelyet, ferritinnel kapcsolt konkanavalin A-val reagáltatták a vörösvérsejteket, majd ghostot készítettek belőlük. A ghostot pH 5,5-nél, 1 mM CaCl_2 jelenlétében reagáltatva a részecskék aggregációját idézték elő. A ferritin-konkanavalin A jelölés a membránba ékelt részecskék régiója felett következett be és ugyanolyan kontinuos hálóban aggregált, mint ezek. A jelölődést olyan részeken, amelyek nem tartalmaznak membránba ékelt részecskéket nem észlelték. A ferritin-konkanavalin A jelzett membránt alfa-metil-D-glukopiranoziddal kezelve az összes jelölődés lehasítható. A J^{125} konkanavalin A kötőhelyek száma megegyezik a membránba ékelt részecskék számával. Ezek alapján a membránba ékelt részecske, valóban oligomer struktúra, amelyben legalább egy 3 komponens és egy glikoforin van jelen. A 3. zóna dimerjeinek száma egyezik a membránba ékelt részecskék ill. a konkanavalin A kötőhelyek számával is.

Mi az ami helyén tartja a megfelelő funkcionális fehérje komponenseket a folyékony membránban? Hiszen a korábbi sejtfúziós kísérletek kimutatták, hogy testhőmérsékleten a fehérjék (két sejt különböző antigénjei) rövidesen random eloszlást vesznek fel. Minthogy a membránba ékelt részecske maga is képes elmozdulni laterálisan, kérdés, hogy egyáltalán létezik-e vagy csak mozgás közben keletkezik?

A szupramolekuláris szerveződés különböző formái ismertek, és ezek rendezetten helyezkednek el a membránban. Pl. mitokondrium belső membránban szinte mindegyik fehérje öt komplex valamelyikéhez kötődik: négy amelyik az elektron transzferben vesz részt és az ötödik az ATP szintézisben. A vörösvérsejtben valószínűleg az intrinsic és extrinsic fehérjék kölcsönhatása az, ami az egységet létrehozza. Ezt a kölcsönhatást alig egy éve igazolták, első-sorban NICOLSON kísérletei.

NICOLSON és mtsai (27) kimutatta, hogy a spektrin direkt kölcsönhatásban van a sziaáloglikoproteinnel. Antispektrinnel reagáltatott ghostokban kimutatta, hogy meggyorsult a sziaálsavhoz kötődő kolloid vashidroxid eloszláshoz vezető mozgása, ami arra mutat, hogy spektrin konformáció változása áttevődik a felületre és a glikoforint is mozgásba hozza.

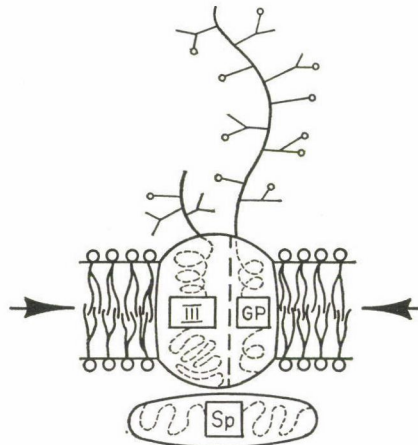
Hasonlóképpen ELGSAETER és BRAMTON (10) a ghostokat alacsony ionerő mellett enyhén alkálikus közegben kezelve (ami a spektrin szerkezetét modifikálja) a membránba ékelt partikulumok mozgásának gyorsulását volt képes előidézni (a megfelelő ionerő és alacsony pH mellett).

Lektineknek a felszínre való kötődésével a spektrin reorganizációját sikerült elősegíteni, amit a spektrinnek a belső felületen mutatott megnöveke-

dett reakcióképességével igazoltak. Tehát a glikoforin kötésbe lépése is visszahat a spektrinre.

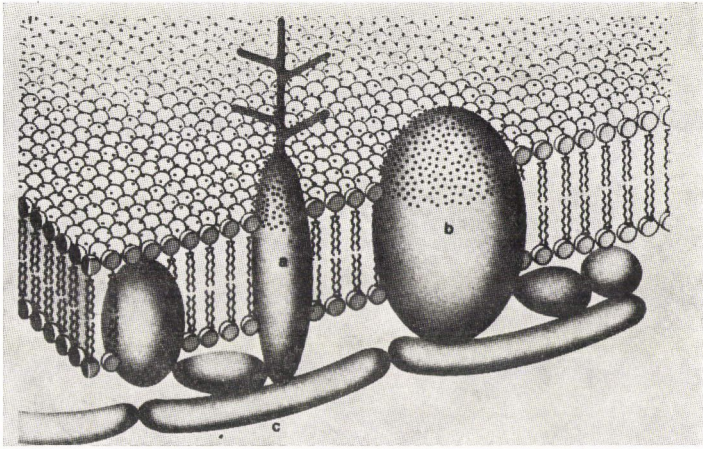
A fenti kísérletek alapján a következő szerkezetet tételezik fel a membránba ékelt részecskékre, amely egyben funkcionális egység is és mint ilyet permeafornak nevezik el (32) (3. ábra). Ez venne részt a különféle lektinek antigénjének kötésében és a transzmembrán funkcióban, amelyeket a 3. komponens(ek)-re és a glikoforinra már leírtak. Így pl. ez foglalná magában a Mg^{++} dependens $K^+ Na^+$ stimuláló ATPáz (1), a membrán foszforilált intermedierjét, a glukóz és anion transzport helyét (4). Sőt e részecske preferált helye lehet a víz szublimációnak is alacsony hőfokon (32). Ezeknek a funkcióknak a permeafor azért képes eleget tenni, mert amfipatikus, mert keresztülhatol az apoláris régiókon és poláris kontaktusban van a külső és belső felület hidrofíl komponenseivel.

Ugyanezt térben ábrázolva és a 3. komponens dimenziójának figyelembe vételével láthatjuk CAPALDI modelljén (5) is (4. ábra).



3. ábra. A „permeafor” (PINTO DE SYLVA P. (45) modellje GP = glicoprotein, Sp = spektrin, III = 3. komponens

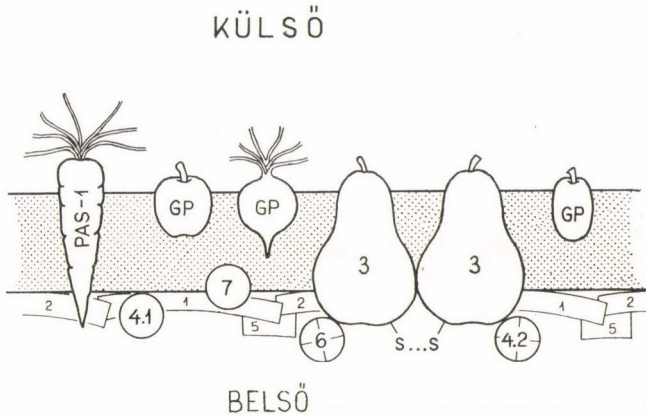
Valamivel komplexebb képet ad a funkcionális elrendezés igénye nélkül STECK ábrája (40) (5. ábra), amely az egyes membránfehérje komponensek lokalizációját kívánja szemléltetni. Itt 9–10 polipeptid van feltüntetve, a membránfehérjék kb. 80%-a, függetlenül mennyiségüktől, méretüktől és tulajdonságaiktól. Mindegyik polipeptid vagy egyik, vagy másik oldalon van. A két áthatoló polipeptid aszimmetrikusan helyezkedik el a szénhidrát résszel kifelé. Az összes külső felületen levő fehérje le van horgonyozva a hidrofób kettős-rétegbe. A belső felületen levők viszont lazábban asszociálódtak, feltehetően specifikus helyeken. Oligomerek képződését saját és más polipeptidekkel szintén figyelembe veszi.



4. ábra. A lipid kettődrétegen áthatoló membránfehérjék modellje [CAPALDI R. A. (53)]
 a. glikoforin, b. = 3. komponens, c. = spektrin

Amennyire tudjuk, az összes szénhidrát a felületen van, sőt az összes felületi fehérjének van szénhidrát komponense, úgyhogy pl. az acetilkolineszteráz esetén is felvetődik, hogy tartalmaz-e szénhidrátot. Kérdés az is, hogy a vörösvérsejt $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPáznak van-e a külső felületén szénhidrát része (ahol az ouabaint köti), mert viszont a nem glikoszilált része, (amely foszforilálódik) a belső felszínen mutatható ki. Az eddigiekből mindenesetre úgy tűnik, hogy általános az a megfigyelés, amely szerint a külső felület fehérjéi tartalmaznak szénhidrátot, míg a belsők nem.

A membrán éles aszimmetriája funkcionálisan is fontos. A külső felület enzimeji az egész organizmus felé működnek, míg a belső felületen levők a sejt intakt állapotát (homeosztázis) tartják fenn. Az előzőre példa az acetilkolineszteráz, amely a neurotranszmittereket bontja, vagy a NADáz, amely a per-



5. ábra. A vörösvérsejt membrán fehérjének elrendeződése. [STECK G. (51)]

meabilis molekulákká alakítja az impermeabilis nukleotidokat (7). A belső felületen levő G3PD viszont az alkáli ion transzport és a glikolízis sebességének összekapcsolásában vesz részt. Ez a kapcsolat ui. az ADP pool-on alapszik, amelynek szabályozását a foszfoglicerátkináz végzi. A PGK aktivitását viszont a G3PD befolyásolja azzal, hogy eltávolítja a PGK produktumát a difoszfoglucérotot.

A fentieket összefoglalva ma már számos adat áll rendelkezésünkre, a vörösvérsejt membránról, nemcsak összetételét, hanem az egyes összetevők struktúrává rendeződését és e struktúra működését illetően is. Noha vörösvérsejt membránra vonatkozó adatok nem általánosíthatók teljes egészükben a plazma membránokra, mégis számos információt és útmutatást adnak a többi biológiai membránok felismerésére és működésére vonatkozóan.

IRODALOM

1. AVRUCH, J., FAIRBANKS, G.: Proc. Nat. Acad. Sci. **69**, 1216 (1972).
2. BENDER, W. W., GARAN, H. and BERG, H. C.: J. Mol. Biol. **58**, 783 (1971).
3. BERG, H. C.: Biochim. Biophys. Acta (Amst). **183**, 65 (1969).
4. CABANCHIK, Z. I. and ROTHSTEIN, J.: J. Membrane Biol. **10**, 311 (1972).
5. CAPALDI, R. A.: Sci. Amer. **42**, 27 (1974).
6. CLARKE, M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **45**, 1063 (1971).
7. DEPIERRE, J. W. and KARNOVSKY, M. L.: Science (Wash). **183**, 1096 (1974).
8. DODGE, J. T., MITCHELL, C. and HANAHAN, D. J.: Arch. Biochem. Biophys. **100**, 119 (1963).
9. DUCHON, G., COLLIER, H. B.: J. Membrane Biol. **6**, 138 (1971).
10. ELGSAETER, A., BRANTON, D.: Control of Macromolecular Mobility in the Erythrocyte Membrane. Proc. Int. Conf. on Biol. Membranes. Aquasparta Italy. (1973).
11. FAIRBANKS, G. and AVRUCH, J.: J. Supramol. Struct. **1**, 66 (1972).
12. FAIRBANKS, G., STECK, T. L. and WALLACH, D. F. H.: Biochemistry **10**, 2606 (1971).
13. GAHBERG, C. G. and HAKAMORI, S. I.: J. Biol. Chem. **248**, 4311 (1973).
14. GUIDOTTI, G.: Arch. Intern. Med. **129**, 194 (1972).
15. GUIDOTTI, G.: Ann. Rev. Biochem. **41**, 231 (1972).
16. JULIANO, R. J.: Biochim. Biophys. Acta (Amst). **300**, 341 (1973).
17. KANT, J. A. and STECK, T. L.: Nat. New Biol. **240**, 26 (1972).
18. KANT, J. A., and STECK, T. L.: J. Biol. Chem. **248**, 8457 (1973).
19. KIRKPATRICK, F. H. and LACELLE, P. L.: Experientia (Basel) **30**, 140 (1974).
20. KNÜFERMANN, H., BHAKDI, S., SCHIMDT-ULLRICH, R. and WALLACH D. F. H.: Biochem. Biophys. Acta (Amst) **330**, 356 (1973).
21. LENARD, J.: Biochemistry **9**, 5037 (1970).
22. MARCHESI, V. T. and STEERS, E. Jr.: Science (Wash) **159**, 203 (1968).
23. MARCHESI, V. T., STEERS, E., Jr., TILLACK, T. W. and MARCHESI, S. L.: in Red Cell Membrane. Ed. Jamieson G. A. and Greenwalt, T. J.; Lippincott, J. B. Co USA Phil. 117. p. (1969).
24. MARCHESI, V. T., TILLACK, T. W., JACKSON, R. L., SEGREST, J. P. and SCOTT, R. E.: Proc. Natl. Acad. Sci. US. **69**, 1145 (1972).
25. MARCHESI, V. T., TILLACK, T. W. and SCOTT, R. E.: in Glycoproteins of Blood Cells and Plasma. Ed. Jamieson G. A. and Greenwalt, G. J.; Lippincott, J. B. Co. USA. Phil. 94. p. (1971).
26. MARFEY, P.: in Red Cell Membrane. Ed. Jamieson, G. A. and Greenwalt, T. J.; Lippincott, J. B. Co. USA. Phil. 112. p. (1969).
27. NICHOLSON, G. L. and PAINTER, R. G.: J. Cell. Biol. **59**, 395 (1973).
28. ONISHI, T. J.: Biochem. Tokyo **52**, 307 (1962).
29. PARKER, I. C. and HOFFMANN, F. F.: J. Gen. Physiol. **50**, 893 (1967).
30. PHILLIPS, D. R. and MORRISON, M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **40**, 284 (1970).
31. PINTO DE SILVA, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. **70**, 1339 (1973).

32. PINTO DE SILVA, P. and NICHOLSON, G. L.: *Biochim. Biophys. Acta* (Amst). **63**, 344 (1974).
33. ROBERTSON, J. D.: *Arch. Intern. Med.* **129**, 202 (1972).
34. ROELOFSEN, B., ZWAAL, R. F. A., COMFURIUS, P., WOODWARD, C. B. and VANDEENEN L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta* (Amst). **241**, 925 (1971).
35. ROSENBERG, S. A. and GUIDOTTI, G.: *J. Biol. Chem.* **243**, 1985 (1968).
36. ROSENBERG, S. A. and GUIDOTTI, B.: *J. Biol. Chem.* **244**, 5118 (1969).
37. SCHRIER, S. L.: *Am. J. Physiol.* **210**, 139 (1966).
38. SINGER, S. J. and NICHOLSON, G. L.: *Science* **175**, 720 (1972).
39. STECK, T. L.: in *Membrane Research*. Ed. Fox, C. E. Acad. Press. Inc. N. Y. 71. p. (1972).
40. STECK, G. L.: *J. Cell Biol.* **62**, 1 (1974).
41. STECK, T. L. and FOX, C. F.: in *Membrane Molecular Biology* Ed. Fox T. F. and Keith, A. D. I. Sinauer Ass. Inc. Stamford Conn. 27 (1972).
42. STECK, T. L. and YU, J.: *J. Supramol. Struct.* **1**, 220 (1973).
43. SWEELEY, C. C. and DAWSON, G.: in *Red Cell Membrane* Ed. Jamieson G. A. and Greenwalt, T. J.: Lippincott Co. USA Phil. 172. p. (1969).
44. TANNER, M. J. A. and BOXER, D. H.: *Biochem. J.* **129**, 333 (1972).
45. TANNER, M. J. A. and GRAY, W. R.: *Biochem. J.* **125**, 1109 (1971).
46. TILLACK, T. W., MARCHESI, S. L., MARCHESI, V. T. and STEERS, E. Jr.: *Biochim. Biophys. Acta* (Amst). **200**, 125 (1970).
47. TILLMANN, W., CORDUA, A. and SCRÖDER, W.: *Biochim. Biophys. Acta* (Amst). **382**, 157 (1975).
48. WEINSTEIN, R. S.: in *Red Blood Cell*. Ed. Surgenor, D. M. 2nd edition. Acad. Press Inc. N. Y. 213. p. (1968).
49. WINZLER, R. J.: in *Red Cell Membrane*. Ed. Jamieson, J. A. and Greenwalt, T. J. Lippincott, J. B. Co. USA Phil. 157. p. (1969).
50. WOODWARD, C. B. and ZWAAL, R. F. A.: *Biochim. Biophys. Acta* (Amst). **274**, 272 (1972).
51. ZÄHLER, P. and WEIBEL, E. R.: *Biochim. Biophys. Acta* (Amst). **219**, 320 (1970).
52. YU, J., FISCKAM, A. and STECK, T. L.: *J. Supramol. Struct.* **1**, 233 (1973).
53. YU, J. and STECK, T. L.: *J. Cell Biol.* **59**, 374 (1973). Abstr.
54. YU, J. and STECK, T. L.: *Fed. Proc* **33**, 1532 (1974).