

MEMBRÁN GLIKOPROTEINEK STRUKTURÁLIS ÉS FUNKCIONÁLIS SAJÁTSÁGAI

HRABÁK ANDRÁS

(Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. Kémiai—Biokémiai Intézete,
Budapest)

I. Bevezetés

A biológiai membránok szerkezetének felépítésében a lipideken és fehérjéken kívül szénhidrátok is részt vesznek. Ezek a szénhidrátok részben a glikolipidek, részben a glikoproteinek szénhidrát-egységeinek alkotórészei. A szénhidrátot tartalmazó molekulák azon kívül, hogy a membránok struktúrájában fontos felépítő szerepet játszanak, egyéb biológiai funkciókkal is rendelkezhetnek, például a glikolipidek között találjuk meg az ABH vércsoport-antigéneket, a glikoproteinek között pedig transzplantációs antigéneket, felületi lectin-, vírus-, immunoglobulin- és egyéb receptorokat. A glikoproteinek szénhidrát részének a legtöbb esetben meghatározó szerepe van a biológiai funkcióban, ezért szerkezetük ismerete igen fontos. A felületi glikoproteinek elhelyezkedése, szerkezete a sejt transzformációja során jelentősen megváltozik, és ez a változás az egész sejtmembrán struktúráját érinti.

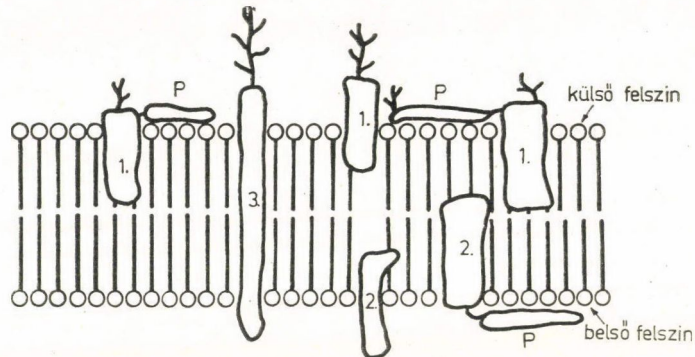
Az utóbbi években tisztázták a sejtek oldható glikoproteinjeinek szerkezetét, funkcióját, sőt szintézisének mechanizmusát is. Ezért jelenleg a strukturálisan kötött membrán-glikoproteinek kutatása került előtérbe. Tiszta formában történő előállításuk, oldatba vitelük sok problémát vetett fel, és kapcsolatos a sejtmembránok preparálási problémáival is. A vizsgálatok jelentős eredményei és a kidolgozott számos új módszer ellenére a kérdések még messze vannak a megoldástól. A plazma-membrán tiszta formában történő előállítása, a fehérjék szolubilizálása csak kevés esetben oldható meg. Az eddigi eredményekről és néhány saját kísérletünkről szeretnék beszámolni, összehasonlítva azokat az irodalomból ismert tényekkel. Ezek a kísérletek a limfociták plazma-membrán glikoproteinjeivel kapcsolatosak, ezért a továbbiakban elsősorban a plazma-membránokkal szeretnék foglalkozni, különös tekintettel a limfocitákkal kapcsolatos próbálkozásokra.

2. A plazma-membránok szerkezete

A plazma-membrán izolálás technikai problémái és módszerei

A membránok szerkezetével kapcsolatban többféle modellt dolgoztak ki, és egyelőre nincs még egyértelműen elfogadott változat. Az utóbbi időben egyre elfogadottabbá válik az ún. fluid-mozaik modell, amelyet először SINGER

és NICOLSON írt le 1972-ben [21, 67, 87, 99, 119]. A modellt vázlatosan mutatjuk be az 1. ábrán. Látható, hogy a membrán alapját egy fluid szerkezetű lipid kettősréteg mátrix alkotja, és ebbe ágyazódnak, illetve ehhez kapcsolódnak a fehérjék (1., ill. 2. ábra). A fehérjék egy része csak laza, elektrosztatikus kötésekkel kapcsolódik a lipidek poláros végeihez, ezért már alacsony ionerősségű oldatokkal lemosható. Ezek az ún. perifériális fehérjék, pl. a mitokondrium esetén a citokróm c vagy a vörösvértestek spektrinjei. A fehérjék másik

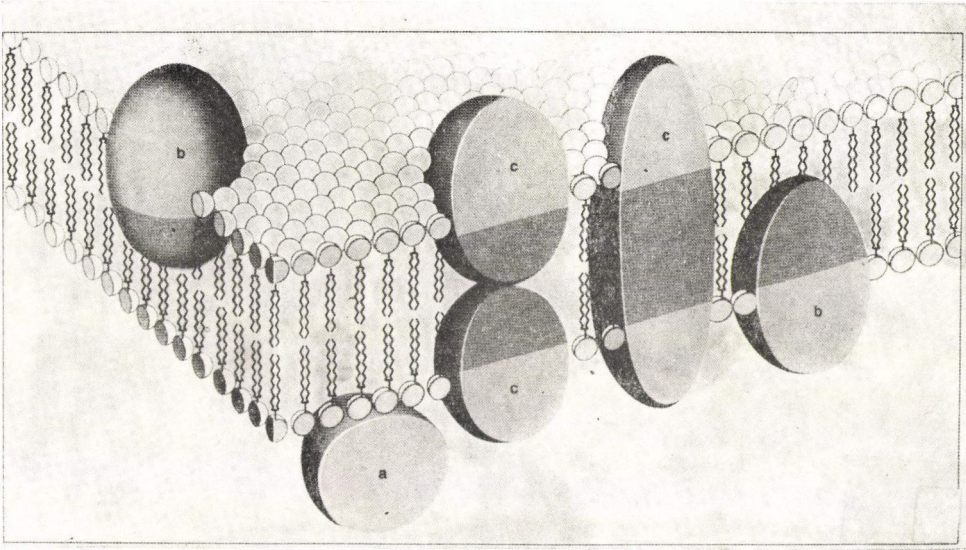


FLUID - MOZAIK MEMBRÁNMODELL

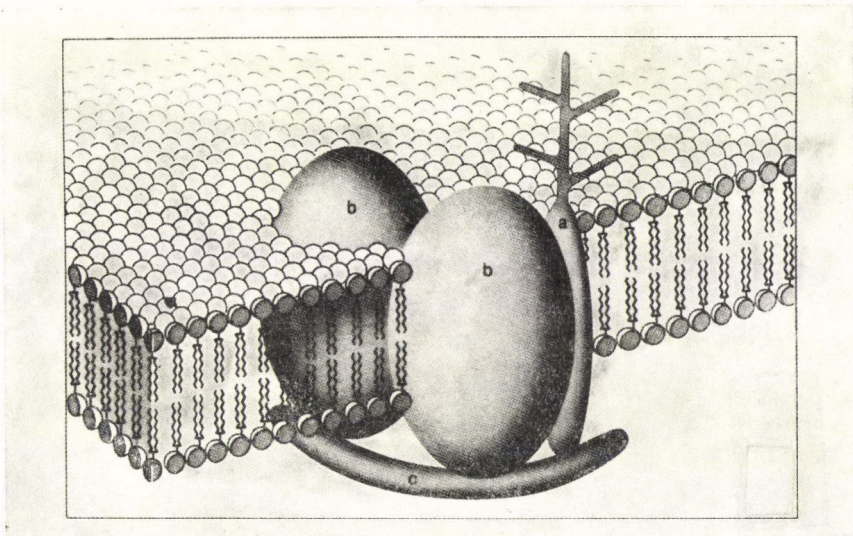
- P - perifériás fehérjék
1. 2. 3. - különböző integrált fehérjék

1. ábra. A fluid-mozaik membránmodell vázlatos rajza. P = perifériás fehérjék 1.2.3 = integrált fehérjék különböző típusai. A külső felszín fehérjéi szénhidrátot tartalmaznak, ezt az elágazó ágacsókák jelzik

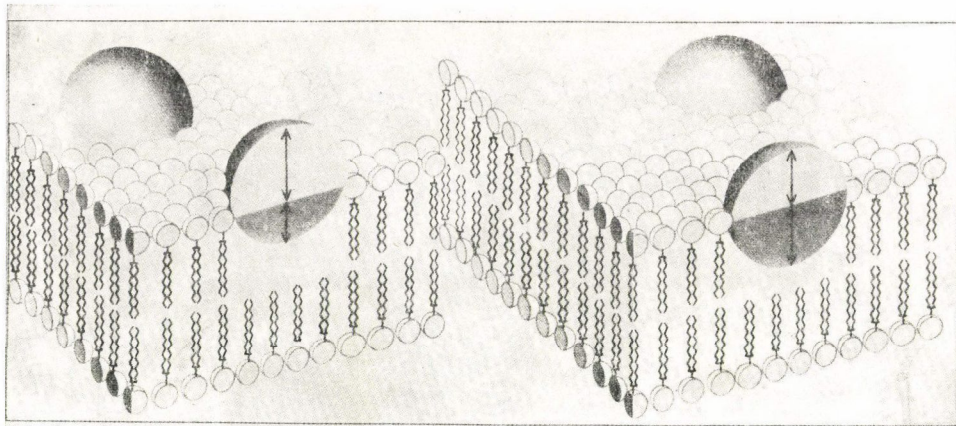
csoportja viszont mélyen beágyazódik a lipid-rétegbe, ahhoz apoláros kölcsönhatások révén erősen hozzákapszolódik. Ezek az ún. integrált fehérjék, amelyek csak erélyes szolubilizálási módszerekkel vihetők oldatba. Ezek egy része teljesen beágyazódik a lipidbe, mások a membrán egyik oldalán kilógnak a lipidből, de előfordulnak a membránon átnyúló és annak mindkét oldalán kilógó fehérjék is (1–3. ábra). Ilyenek pl. a plazma-membrán $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ aktivált ATPáza, a mitokondriális elektrontranszport enzimeit stb. A fehérjék beágyazódásának mértéke változó, pl. a rodopszin beágyazottsága függ a megvilágítástól (4. ábra). Egyes modelleken feltüntetnek egy ún. kötő-lipid-réteget, amely monomolekuláris réteggként veszi körül a beágyazott fehérjét, és feltételezhetően ez létesíti a lipid – fehérje kötést (5. ábra). A membránfehérjék a 2. ábrán látható módon aggregátumokat is alkotnak, egy ilyen aggregátum bármely alkotórészének változása az egész aggregátum elhelyezkedését, funkcióját is érinti. Gyakorlatilag bármely fehérje változása az egész membránt befolyásolhatja, éppen az aggregátumok miatt.



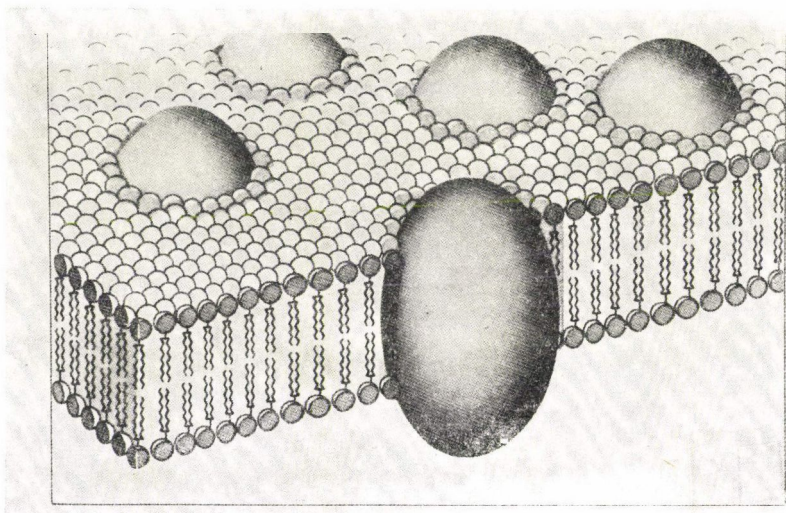
2. ábra. A fluid-mozaik membrán vázlatos térbeli ábrázolása, a lipid kettősrétegbe ágyazódó különféle fehérjékkel. a) periferiális fehérje, b) részlegesen beágyazódó fehérje, c) a membrán teljes vastagságában beágyazódó fehérjék, párokban, ill. egyszerű molekulákként [CAPALDI, 1974 után (22)]



3. ábra. A vörösvértest membrán egyik fehérje-aggregátuma, amely két, a membránon keresztülnyúló fehérjéből áll (egy glikoproteiból, a) és egy 87 000-es molekulású fehérjéből, b) amelyhez egy spektrin-molekula c) csatlakozik.) [CAPALDI 1974 után (22)]

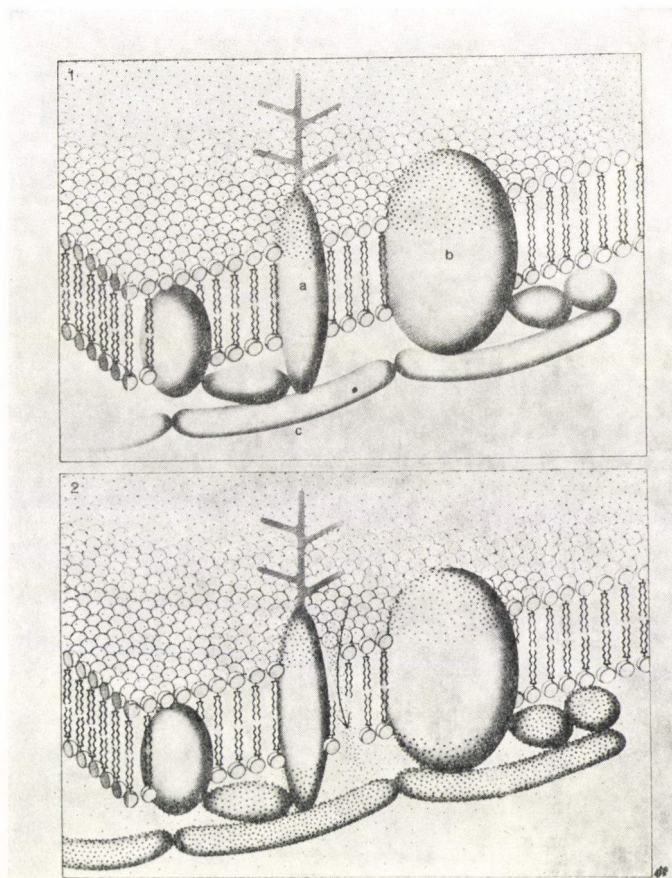


4. ábra. A rodopszin beágyazottságának függése a megvilágítástól. Baloldalt a megvilágítatlan állapot látható, itt a molekula egyharmada ágyazódik be, míg a jobboldali képen a megvilágított állapotban a molekula félig süllyed a lipid matrixba. [CAPALDI 1974 után (22)]



5. ábra. A „kötő” lipidréteg. A lipid matrixba ágyazódott fehérjemolekulákat egy molekula rétegvastagságban lipid veszi körül, amely az apoláros kapcsolatért felelős. [CAPALDI 1974 után (22)]

A plazma-membránok tiszta előállítása és a preparátumok tisztaságának ellenőrzése komoly feladat. Teljesen tiszta plazma-membránt eddig csak a vörösvértestekből tudtak izolálni, mivel az emlős eritrociták hemolízise után a hemoglobint alaposan kimosva tiszta membrán, az ún. ghost marad vissza [36]. A magvas sejtek membránjának tisztítása ennél sokkal problematikusabb, munkaigényesebb és a preparátumok tisztasága és kitermelése ritkán opti-



6. ábra. Intakt(1) erithrocita és ghost(2) membránfehérjéinek jódozhatósága. Az intakt sejt csak a külső felületén jódozódik, míg a ghost mindkét felületén. A jódozást Na^{131}I -dal, laktoperoxidáz enzim segítségével végezhetik el. [CAPALDI 1974 után (22)]

mális. A membrán-preparátumok tisztaságát elektronmikroszkópos és biokémiai módszerekkel ellenőrzik. Az elektronmikroszkópos képek jellemzők az egyes membránfészeségekre, míg a biokémiai vizsgálatok azon alapulnak, hogy bizonyos enzimek adott ultrastruktúrához kötöttek [26], és így jellemző, hogy milyen membránokban mérhető magas specifikus enzimaktivitás. A kémiai összetétel is jellemző lehet, pl. a plazma-membránt a magas szíalsav-tartalom és magas koleszterol—foszfolipid arány jellemzi. A kémiai, biokémiai és elektronmikroszkópos adatok együttesen már kielégítően jellemzik az adott preparátum tisztaságát.

Az utóbbi időben sokféle sejtből próbáltak plazma-membránt preparálni. Megemlíjtjük a májsejtek [37, 100], fibroblasztok [71], élesztősejtek [108], idegsejtek [48], izomsejtek [63], thymociták [2, 69, 137], limfociták [1, 34, 40],

különféle tumor sejtek [55, 89, 139, 140], trombociták [88] membránjainak izolálását. A módszerek eléggé eltérőek, azonban alapelvük azonos. Először valahogyan feltárják a sejteket (izotóniás homogenálás, hipotóniás lízis, fagyasztás-felolvasztás, nitrogénes robbantás, ultrahang-kezelés stb.), a sejt alkotórészeket differenciál-centrifugálással szétválasztják és a kapott mikroszómális üledékből gradiens ultracentrifugálással különítik el az egyes membránokat. A kapott frakciókat a korábban említett módszerekkel analizálják, tisztaságukat meghatározzák. Mind a membránok szennyezettsége, mind kitermelése függ a preparálási módszertől, legtöbbször a kétértékű kationok koncentrációjától, amely a plazmamembrán és az endoplazmatikus retikulum frakciók szétválasztását befolyásolja. A legkritikusabb az optimális Mg^{2+} -koncentráció megválasztása, amely döntően befolyásolja a kísérlet sikerét. A kapott plazma-membrán a leoptimálisabb kitermelés esetén is csak a sejt összes fehérjetartalmának 1–5 százalékát képviseli.

A sejtek plazma-membránjainak vizsgálatára ötletes izotópos módszereket is alkalmaznak. $^{131}I^-$ -ionokkal a fehérjék csak akkor jódózhatók, ha laktoperoxidáz katalizálja a folyamatot, az enzim azonban a sértetlen plazma-membránon nem képes áthatolni, ezért csak a lipidből kilógó terminális jódózódik. Sérült membránok esetében azok a fehérjék is jódózódnak, amelyek a membrán belső oldalán helyezkednek el (6. ábra). A módszer alkalmazásának optimális feltételeit is kidolgozták [54, 78, 91, 134]. A tripszinnel előkezelt sejtek jódózhatósága megnő, ezt temetett tirozin-oldalláncok felszínre kerülésével magyarázzák [92, 93]. A módszer lehetővé tette a plazma-membrán fehérjék exponáltságának, felületi elhelyezkedésének vizsgálatát, ezzel jelentősen hozzájárult a membránfehérjék és glikoproteinek sikeres vizsgálatához. A vörösvértest membránon pl. 5×10^5 molekulából kb. 15 ezer, vagyis 3% jódózható meg, tehát ezek helyezkednek el exponált helyzetben.

3. A membránfehérjék és glikoproteinek izolálása

Az integrált fehérjék membránokból történő extrakciójára a kutatók igen változatos módszereket dolgoztak ki. Ezekkel a módszerekkel szemben az alábbi legfontosabb követelményeket támasztjuk:

a) a fehérjét teljes mértékben szolubilizálják, tehát 100 000 g-vel kiülepíthető részecskéket az oldat ne tartalmazzon [101, 104], amely feltétel egyúttal azt is jelenti, hogy a membránt stabilizáló fehérjelipid kapcsolatokat a reagensnek meg kell bontania;

b) a reagens ne változtassa meg a fehérje primer szerkezetét, tehát ne bontsa meg a peptidkötéseket;

c) a reagens ne változtassa meg a fehérje térszerkezetét, vagyis a biológiai hatását, illetve funkcióját.

A fenti követelményeknek egységesen eddig egyetlen módszerrel sem lehet eleget tenni. Általában ragaszkodni szoktak az *a)* pontban megfogalmazott feltételhez, amely a szolubilizációra vonatkozik, és többé-kevésbé a biológiai funkció sértetlenségéhez, hiszen a fehérjét ennek alapján lehet kimutatni, mérni. Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a legelterjedtebben alkalmazott szolubilizációs módszereket.

1. Az ionerősség és a pH megváltoztatása [43, 62, 64, 102–104, 109]:

Az ionerősség jelentős megemelésével bizonyos integrált fehérjék is oldatba vihetők. Ennek legismertebb példája a hisztokompatibilitási antigének szolubilizációja 3 M KCl-dal [103, 104] emberi limfociták felületéről. Az extrakciót azzal magyarázzák, hogy a Cl^- -ion ún. chaotrop ágens, amely elősegíti a fehérjeláncok szétcsavarodását és az aggregált fehérjekomplexek disszociációját, és ez az apoláros kölcsönhatások felbomlásához vezet. Ismert próbálkozás még az EDTA használata [65, 76] is. A pH-megváltoztatáson alapuló módszerek közül megemlítjük a 0,1 M sósavas extrakciót, amelyet eritrocita membránok esetében alkalmaztak [109].

2. Részleges proteolitikus bontás fehérjebontó enzimekkel:

Rendkívül elterjedt módszer, alapja, hogy a proteolitikus emésztés során a membránból kiálló fehérjéről még biológiailag többé-kevésbé aktív fragmentumokat lehet lehasítani és oldatba vinni. A módszer erősen kritizálható, hiszen a *b)* pontban megfogalmazott alapfeltételt sérti meg, és felmerül a gyanú, hogy — mivel nem intakt fehérjemolekulával dolgozunk — a biológiai funkció is károsodhatott. Széles körű alkalmazását a módszer egyszerűsége indokolja, valamint az a tény, hogy a kapott fragmentumoknak bizonyos biológiai aktivitása mégis van. A legelterjedtebben használt enzimek a papain [27, 28, 90, 114], a tripszin [24, 58, 92, 147] és a pronáz [9, 42, 70]. Papainnal a hisztokompatibilitási antigéneket, pronázzal a vörösvértestek PHA (fitohemagglutinin) — receptorait, tripszinnel idegsejtek, vörösvértestek, limfociták membránfehérjéit és glikoproteinjeit távolították el.

3. Reverzibilis denaturáló ágensek használata:

Elsősorban a 6 M guanidin-hidrokloridot alkalmazták [125, 133], azonban a fehérje denaturációja, alegységekre történő szétesése miatt a módszer alkalmazását vitatják [75].

4. Szerves oldószerek használata:

Rendkívül kiterjedten használják. Vízzel nem elegyedő szerves oldószerek használatán alapul, mert ilyenkor a szolubilizált lipidek elsősorban a szerves fázisba, a fehérjék és glikoproteinek elsősorban a vizes fázisba kerülnek, és ezt követően egyszerűen elválaszthatók. Legismertebbek a butanol—víz [74, 76], fenol—víz [76], piridin—víz [11, 12, 150], kloroform—metanol—víz [21, 42, 45] elegyek segítségével végzett szeparálások. A módszer használhatóságát erősen korlátozza a szerves oldószerek denaturáló hatása.

5. Mechanikai módszerek alkalmazása:

Ritkábban alkalmazzák, mivel megfelelő készüléket igényel. A hisztokompatibilitási antigének izolálása alacsony frekvenciájú hangrezgésekkel érhető el [104], kb. 12–15%-os kitermeléssel. A pontos szolubilizációs mechanizmus nem ismert, feltételezik, hogy itt is nem-kovalens jellegű kötések bomlanak meg a szonikus energia hatására. Az ultrahang denaturálhatja az antigéneket pl. a H-2 antigént [104].

6. Szolubilizálás detergensekkel:

Ugyancsak igen elterjedt módszer, ionos és nem-ionos detergenseket egyaránt alkalmaznak. Az ionos detergensnek hátránya, hogy gyakran okoznak denaturációt, míg a nem-ionos detergensek kíméletes hatását rendkívül leontja, hogy a szolubilizálás után csak igen nehezen távolíthatók el a fehérje mellől [101]. Ezért a detergenses módszer használata igen nagy körültekintést igényel. A módszer segítségével mindenféle membránfehérje oldatba vihető és az oldatból kell azokat különféle módszerekkel tovább tisztítani. A legelterjedtebben használt ionos detergens a nátrium-dodecilszulfát (SDS) és a nátrium-dezoxikolát (DOC), a nem-ionosak közül a Triton-X-100 és a Nonidet P-40 (NP-40), ezekkel a detergensekkel többek között vörösvértestek, vese glomerulus sejtek, limfociták, vírusok, fibroblasztok membránjából szolubilizáltak fehérjéket, glikoproteineket [31, 38, 47, 56, 64, 65, 85, 107, 112, 117, 133].

7. Speciális szolubilizációs módszerek alkalmazása:

Egyes esetekben különböző vegyületekkel, sokszor ismeretlen mechanizmus alapján szolubilizálhatók a fehérjék. Ilyenkor általában összetett hatásokról van szó. Az általunk is felhasznált egyik ilyen módszer a membrán-glikoproteinek szolubilizációjára lítium-dijódszalicilátot (LIS) alkalmaz. Erről feltételezik, hogy részben mint ionos detergens, részben mint „chaotrop”-agens működik [59, 79–81, 113].

4. A membrán-glikoproteinek szerkezetének és funkciójának kapcsolata

A membránfehérjék általános kémiai és fizikai-kémiai sajátosságai nagyrészt a membrán-glikoproteinekre is érvényesek. A membránfehérjék apoláros aminosavai általában egy nagyobb, összefüggő apoláros régiót képeznek, és ez a hidrofób régió a lipid—fehérje kapcsolatban fontos szerepet játszik. Ennek a hidrofób régióknak a létezését a vörösvértest membrán esetében az aminosavszekvencia meghatározása is igazolta [81, 113]. A fehérjerész poláros régiója a membrán felszínén orientálódik. Vannak olyan glikoproteinek, amelyek átnyúlnak a membránon, és két poláros régiójuk is van, az egyikhez, amely a sejt felszínén helyezkedik el, a szénhidrát-egységek is hozzákapcsolódnak [81]. A szénhidrát-egységek felszíni elhelyezkedése a plazma-membrán glikoprotei-

nek esetében általánosnak mondható, mivel csak így képesek ellátni antigén, receptor és egyéb biológiai funkcióikat.

A membrán-glikoproteinek szerkezetében nem tapasztaltak különösebb eltéréseket a már megismert glikoproteinek szerkezeti alapelveitől. A leggyakrabban előforduló szénhidrátok: glukóz, mannóz, galaktóz; glukózamin, mannozamin, galaktózamin N-acetilált származékai; fukóz; N-acetil-neuroaminsav. A két utóbbi szénhidrát rendszerint a szénhidrát-egységek terminális szénhidrátja, így a szialsavnak fontos szerepet tulajdonítanak a felület negatív töltésének biztosításában [138]. A szénhidrát-rész rendszerint meghatározza a receptor, illetve antigén funkcióját, bár ez nem feltétlenül van így minden esetben. A fehérjerész antigénsajátságait különféle módosításokkal vizsgálták, pl. kicseréltek egyes aminosavakat. Ezek a vizsgálatok bebizonyították, hogy a legtöbb esetben tirozin oldalláncok vesznek részt az antigén-sajátság meghatározásában. Meghatározták az antigénhelyek méreteit is. Ezek általában egy hexaszaharid ($34 \times 12 \times 7 \text{ \AA}$) vagy egy pentapeptid ($25 \times 11 \times 6,5 \text{ \AA}$) méreteinek felelnek meg. Mivel egy oktapeptid minimálisan szükséges az alfa-helix kialakulásához, feltételezik, hogy az antigén-helyek nem mutatnak helikális struktúrát [97].

A szénhidrát- és a fehérjerész kapcsolata kovalens. A két legelterjedtebb kötéstípus az aszparagin-oldalláncok és az N-acetil-glukózamin közti N-glikozidos, illetve a szerin és treonin hidroxilok, valamint az N-acetil-galaktózamin között kialakuló O-glikozidos kötés. A további szénhidrátok egyszerű glikozidos kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz és az első szénhidráthoz.

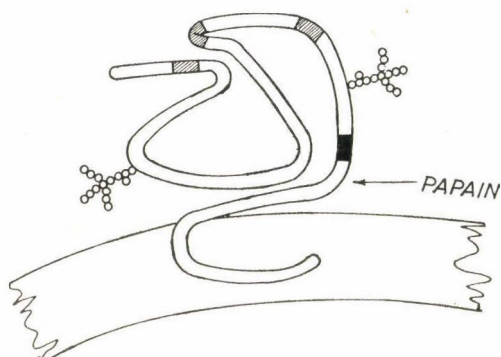
A felületi glikoproteinek legtöbbszörre antigén- vagy receptor-funkciót látnak el. A vörösvértest-membrán vércsoport-antigénjei közül az ABH vércsoport-antigének funkciója glikolipidhez kötött [44, 61, 127, 143], bár MARCHESI és mtsai szerint a vörösvértest-membrán fő glikoproteinje, a glikoforin AB antigén sajátságokat is mutat [59, 81]. Ez a jelenség nehezen értelmezhető, hiszen vagy azonos szénhidrát-determinánsokat kell feltételezni, vagy a glikolipid funkcióban szereplő része asszociál a glikoforinnal, és az asszociátum a LIS-kezelés hatására is sértetlen marad.

A glikoforin MN-antigén sajátságokat is mutat [59, 80, 81]. Az MN-antigént más módszerekkel is lehet szolubilizálni, így dezoxikoláttal [119], kloroform-metanollal [45], sőt tripszines emésztéssel is [58]. A dezoxikoláttal szolubilizált antigén azonban csak a lipidfrakció jelenlétében lesz teljesen aktív. A vizes piridinnel extrahált MN-glikoprotein a vizes fázisba kerül [12]. Az MN-antigénre vonatkozó analitikai adatok alapján világosnak látszik, hogy a sajátság szialsav-determinánshoz kötött, tehát az MN-antigének szialoglikoproteinek [60].

Bonyolultabb a hisztokompatibilitási antigének problémája. Izolálásuk a limfociták felületi membránjából történhet, mivel felületi membránhoz kötöttségük sokoldalúan bizonyított [46, 47, 50, 51, 96]. A plazma-membránok

preparálása azonban limfociták esetében is igen nehéz, sőt az izolált membránfragmentumokból is rosszak a kitermelési eredmények, legalábbis a HL-A antigének esetében [104]. A hisztokompatibilitási antigének szolubilizációjára kidolgozott módszerek közül jelenleg a legmegfelelőbb a REISFELD és mtsai által kidolgozott 3 M KCl-os módszer [43, 102–104]. Emellett a papainos emésztés [27, 28, 90, 135] és a detergens segítségével történő szolubilizálás a legfontosabb [31, 33, 124], bár megpróbálkoztak egyéb módszerekkel is. Ezek általában azért nem alkalmasak, mert a szolubilizált antigén denaturálódott, elvesztette aktivitását.

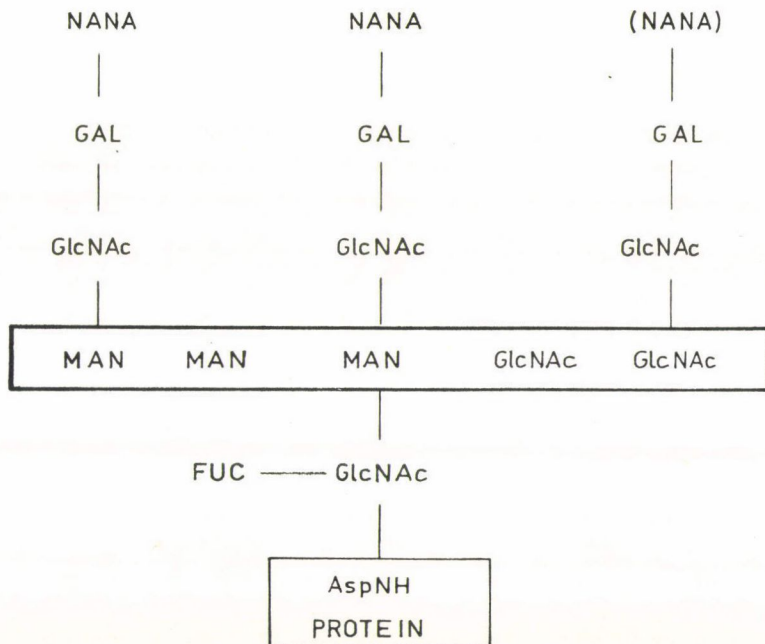
REISFELD és mtsai nem membránból, hanem intakt limfocitából indultak ki a preparálásakor. A 3 M KCl-t tartalmazó pH = 7,4-es hipertóniás puf-



7. ábra. A H-2 glikoprotein elhelyezkedése az egér limfocita membránban. A 45 000-es molekulású fehérje flexibilis rúd alakú, a sötét és sávozott részek az antigén-helyeket, a két függelék a két szénhidrát-egységet ábrázolja. Feltüntették a papainos kezelésre szenzitív helyet is [NATHENSON és CULLEN 1974 után (85)]

fer szolubilizálta az antigént, az oldatból a DNS-t eltávolították, és így a biológiai aktivitás 80%-át sikerült visszanyerni. A további tisztítás preparatív gél-elektroforézis segítségével történhet. Az ilyen módon szolubilizált HL-A antigén nem tartalmazott szénhidrátot. A detergenses és papainos módszerrel szolubilizált hisztokompatibilitási antigének viszont 3–10% szénhidrátot tartalmazó glikoproteinek. A szénhidrát-egységek enzimatiskus eltávolítása ugyanakkor nem befolyásolta érdemlegesen a biológiai funkciót, így a szénhidrát-rész szerepe nem ismert [85, 121]. A papainnal szolubilizált HL-A antigének alegység-szerkezete érdekes, mivel ezek két polipeptidből állnak [28], az egyik egy 31 ezres molekulású glikoprotein, a másik egy 11–12 ezres molekulású fehérje, amely nem glikoprotein. Erről az utóbbi fehérjéről azt feltételezik, hogy azonos a béta-2-mikroglobulinnal [90, 122]. A HL-A antigén izolálására újabban több módszert is leírtak, és a limfociták helyett más sejteket is használtak. Előállították a HL-A antigént lépéből papainnal [106], trombocita membránokból NP-40 detergenssel [31], sőt kromatográfiás tisztítással normál sérumból is [10].

A HL-A antigén mellett az egér H-2 antigénjeit is kiterjedten vizsgálták. A detergenses [112] és a proteolitikus emésztéssel [32, 83, 114, 115] kapott H-2 antigének glikoproteinek bizonyultak, és 8–10% szénhidrátot tartalmaztak [85, 112]. Ma már a H-2 antigének szénhidrát-egységeit elég jól ismerjük,

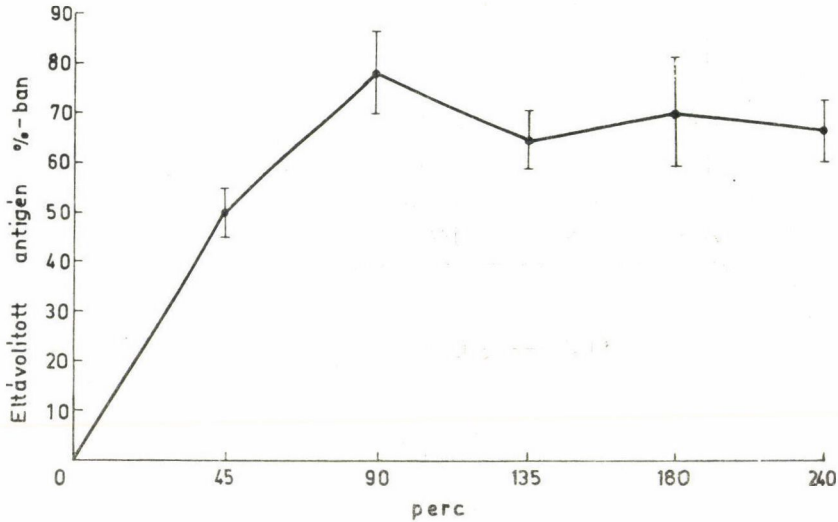


8. ábra. A H-2 antigén szénhidrát-egységeinek hipotetikus modellje. GlcNAc = N-acetilglukózamin, FUC = fukóz, MAN = mannóz, GAL = galaktóz, AspNH = aszparagin, NANA = N-acetil-neuraminsav [NATHENSON és CULLEN 1974 után (85)]

és nemcsak kémiai összetételük, hanem részletes szerkezetük is többé-kevésbé felderített [32, 52, 85, 115]. A H-2 antigén membrán-szerkezetbe ágyazódását vázlatosan a 7. ábra, egy szénhidrát-egységének hipotetikus modelljét a 8. ábra mutatja be.

A kétféle hisztokompatibilitási antigén-csoportra vonatkozó adatok összevetése, az antigének felületi elhelyezkedésére irányuló vizsgálatok eredményei alapján érdekes következtetésekre juthatunk. A H-2 antigének felületi elhelyezkedésére a csomókba rendeződés jellemző, és ez eltér az egér thymociták esetében a T-limfocitát jellemző teta-antigének szórt elhelyezkedésétől [4, 5]. A HL-A antigének felületi eloszlását jelentősen befolyásolja anti-HL-A antitestek membránhoz kötődése [66]. Az antigének topográfiájának vizsgálata jelentős alátámasztást ad a fluid-mozaik modell számára, amely a legjobban magyarázza az antigének beágyazódását a membránba, és az antitestekkel történő kölcsönhatás egész membránt befolyásoló hatását. A H-2 és HL-A antigének szerkezetének összehasonlítása sokat mondó következtetések levo-

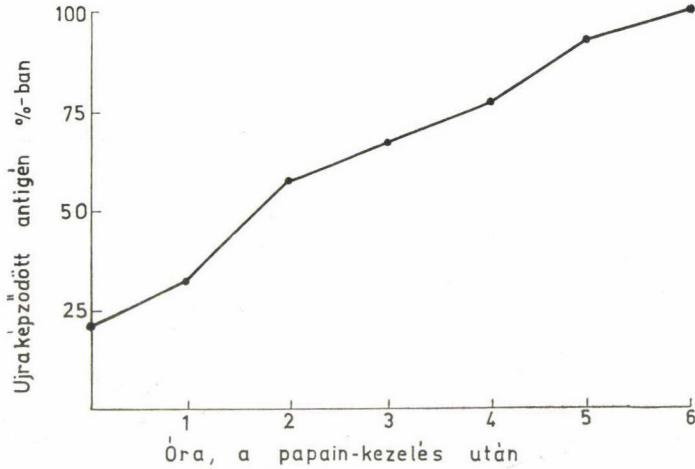
nására ad lehetőséget. A legtöbb vizsgálat szerint mindkét molekula egyláncú fehérje, tehát sem redukcióval, sem ureás kezeléssel nem esik szét alegységekre, ugyanekkor mindkét antigént nagyfokú mikroheterogenitás jellemzi [53]. Azonos módszerekkel preparált H-2 és HL-A antigének molekulásúlya és szénhidrát-összetétele is hasonló, így joggal feltételezhető, hogy ezek az antigének genetikailag és szerkezetileg is homológ fehérjék [53]. Mindkét hisztokompatibilitási antigén esetében felmerül a kérdés, hogy van-e más funkciójuk



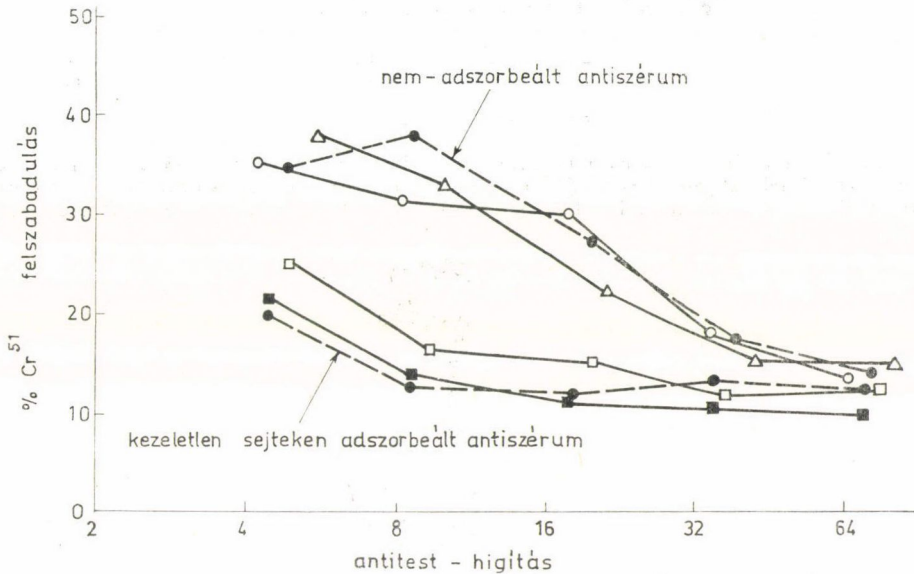
9. ábra. A HL-A 2 antigén papainos eltávolítása az idő függvényében, emberi perifériás vér limfociták felületéről. 25 l antiszérumot 10^6 sejtre adszorbeáltak 60 percig, az adszorbeált antiszérumot -90 C° -on fagyasztották, míg frissen preparált ^{51}Cr -jelzett limfocitákkal meg nem titrálták. Az értékek 8 mérés átlagát mutatják [TURNER és mtsai 1972 után (135)]

a hisztokompatibilitási antigén-funkción kívül. Erre vallanak ugyanis azok a kísérletek, amelyeket papainnal kezelt sejtekkel végeztek. A hisztokompatibilitási antigének papainos eltávolítása után perifériás vér limfociták felületén 6 óra alatt a teljes leemésztett antigén-mennyiség regenerálódik [111, 135]. A HL-A 2 antigén esetében végzett vizsgálatok azt is bebizonyították, hogy a fehérje de novo szintetizálódik, mert a szintézis puromicinnel gátolható, ugyanakkor aktinomicinnel csak részlegesen, amely arra utal, hogy egy 2 óráig stabilis preformált m-RNS van jelen a sejtekben. A kísérletek eredményeit láthatjuk a 9–12. ábrákon. A gyors szintézis arra utal, hogy ezeknek az antigéneknek más, nélkülözhetetlen biológiai funkciójuk is lehet, amely még egyelőre nem ismert. Erre utalnak a szénhidrát-egységek is, amelyeknek az antigén-funkcióban nincs szerepük.

Az antigén-determinánsok mellett a glikoproteinek a felületi receptorok specificitásában is fontos szerepet játszanak [136]. Elsősorban az ún. lectin-

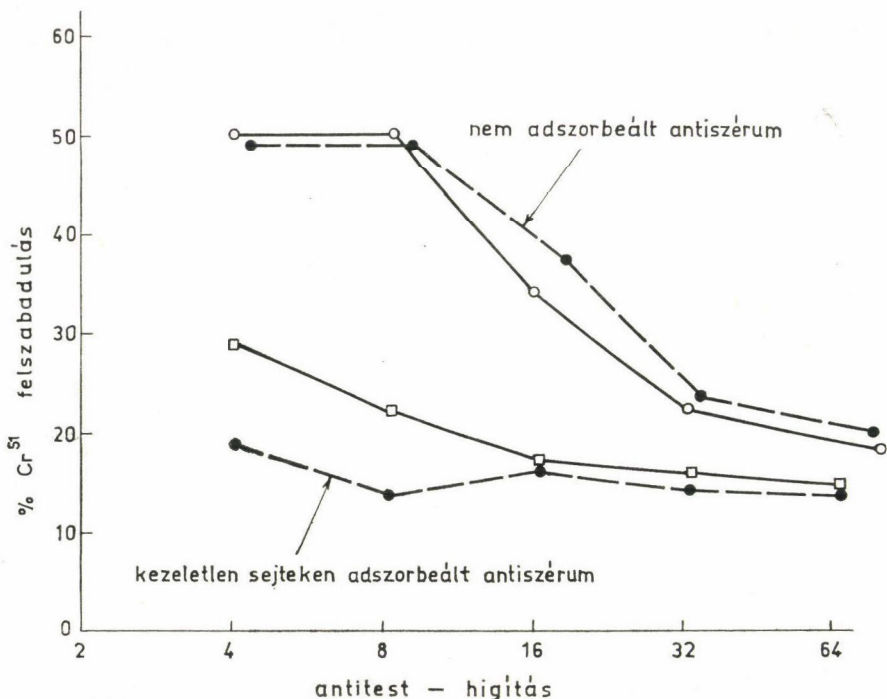


10. ábra. A HL-A 2 antigén újraképződése az idő függvényében. 90 perces papainos emésztés után kétszer mosták, majd 10^6 sejt/ml koncentrációban felfuszpendálták a sejteket. Az eredmények 3 kísérlet átlagából származnak [TURNER és mtsai 1972 után (135)]

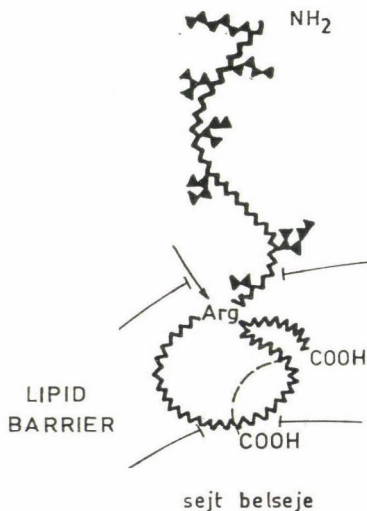


11. ábra. Puromicin hatása a HL-A 2 antigén újraképződésére. ○—○ 0 perccel a papainos inkubálás után; ■—■ 6 órával az újrainkubálás után; △—△ 6 órával az újra-inkubálás után puromicin jelenlétében; □—□ 6 óras puromicines reinkubálás és 6 óras újabb inkubálás után, mely már puromicin nélkül történt [TURNER és mtsai 1972 után (135)]

receptorokat emeljük ki, amelyek a különféle növényi agglutininek megkötésében vesznek részt. Az eddigi vizsgálatok szerint a szénhidrát-rész döntő szerepet játszik a lectinek funkciójában, és a lectinek — amelyek szintén glikoproteinek — maguk is szénhidrát-részükkel kötődnek a receptorokhoz.

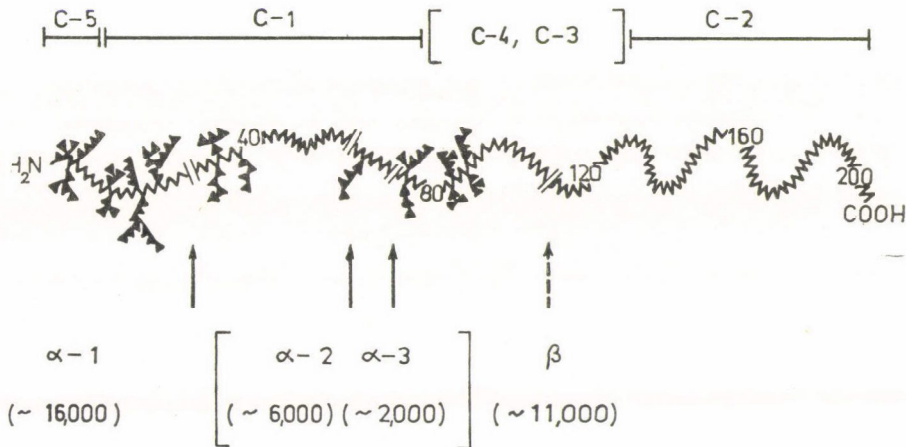


12. ábra. Aktinomicin D hatása a HL-A 2 antigén újraképződésére. A sejteket 2 órán át inkubálták aktinomicin D jelenlétében. ○--○ 0 perccel a papainos kezelés után; □--□ 6 órával az inkubálás után aktinomicin D-vel történt reinkubálással [TURNER és mtsai 1972 után (135)]



13. ábra. A glikoforin molekula elhelyezkedésének sematikus rajza. A molekula N-terminális része helyezkedik el a membrán külső oldalán, és ezen a részen helyezkednek el a megjelölt szénhidrát-egységek is. A C-terminális darab a membrán belső oldalán végződik, míg a középső, hidrofób rész a lipidbe ágyazódik (MARCHESI és mtsai 1972 után)

A vörösvértest membrán borsó-fitohemagglutinin (PHA) receptorát pronázos emésztéssel és más módszerekkel is izolálták [68, 70], ez lencse PHA-ra, concanavalin A-ra és anti-B-szérumra is aktív volt, amely hasonló szénhidrát-determinánsokra utal. A receptor a kémiai analízis szerint a ghost neutrális cukortartalmának 14,3%-át tartalmazza [70].



14. ábra. A glikoforin molekula primer szerkezetének vázlata. A nyilak a tripszin-szenzitív pontokat jelzik, míg a felül látható szakaszok a BrCN-kezelés után kapott fragmentumoknak felelnek meg. A szénhidrát-tartalmú peptidok az N-terminális részen helyezkednek el. (MARCHESI és mtsai 1972 után (81))

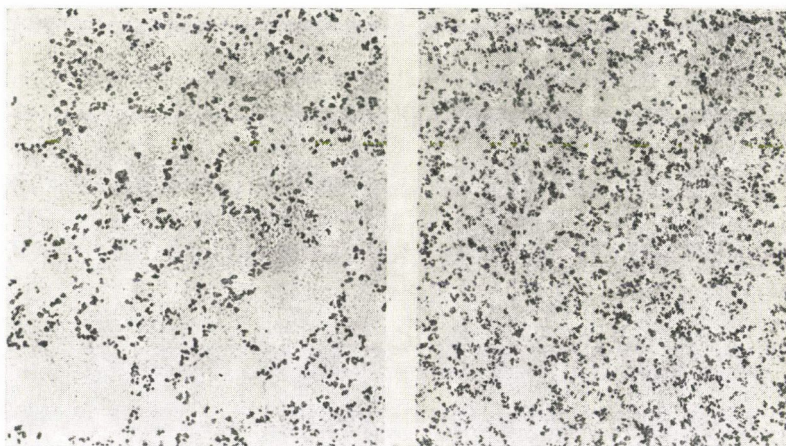
MARCHESI és mtsai a vörösvértest glikoforin esetében az MN-antigén sajátosság mellett lectinkötő tulajdonságot is tapasztaltak. A glikoprotein tartalmazta a PHA és a búzacsíra-agglutinin (WGA) kötőhelyet is [59, 81]. A glikoprotein szerkezetét és a PHA kötődés bizonyítékait a 13–15. ábrák mutatják. Zsírsejtek esetében CUATRECASAS és mtsai azt tapasztalták, hogy neuraminidázos kezeléssel a WGA-kötődés csökken, amely a szialsav szerepére utal [29]. A LIS-módszerrel egér leukémia sejtekből is izoláltak lectin-receptor sajátossággal rendelkező glikoproteineket, amelyek 33% neutrális hexózt és 15% szialsavat tartalmaztak [129].

A concanavalin A-kötőhelyekre vonatkozóan végezték el a legtöbb vizsgálatot. Lymphoma sejtek Con A-agglutinációja pl. glutáraldehiddel gátolható. Ez a fixálás egyúttal gátolja a szójabab-agglutinin (SBA) és a WGA hatását is [57]. További vizsgálatok szerint azonban nem a Con A-kötődés gátolódik, hanem az agglutináció, amelyet azzal magyaráztak, hogy a Con-A kötőhelyek mobilitása lecsökken, nem tudnak csomókat képezni az agglutinációhoz. Hasonló eredmények elérhetők tripszines emésztéssel is.

Egyre kiterjedtebben vizsgálják a lectinkötés és a malignáns transzformáció összefüggéseit is. A malignáns transzformáció és a proteolitikus kezelés



15. ábra. PHA-konjugált ferritinnel készült freeze-etching platinamásolata, humán 'ghost' esetében. A PHA-ferritin globulusok a membrán külső felületén helyezkednek el. Nagyítás: 110 000-szeres. [MARCHESI és mtsai 1972 után (81)]

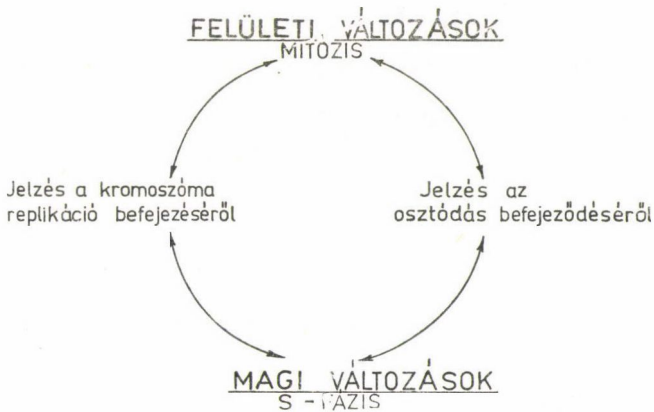


16. ábra. A spektrin-molekulák aggregációjának hatása a glikoprotein felületi eloszlására. Jobboldalt az aggregált spektrin esetében látható glikoprotein-eloszlást mutatja az ábra, baloldalt pedig az aggregációt megelőző egyenletes eloszlást [CAPALDI 1974 után (22)]

egyaránt a lectin-agglutinálhatóság megnövekedését eredményezi a kutatók többsége szerint. A vírus-transzformált sejtek Con A kötőhelyeinek mobilitása megnő [18, 19, 98]. A lectin-receptorok specificitása a szénhidrát-résztől függ, és csak részleges, tehát egy adott lectin többféle cukorhoz is kapcsolódhat (pl. a Con A glukózhoz és mannózhoz is [18, 19]), és ugyanazon cukor többféle lectin számára is lehet receptor. Így egyes glikolipidek is kötnek lectineket

[19]. A jelenség kapcsolatos a glikoproteinekre jellemző mikroheterogenitással. Meg kell jegyeznünk, hogy az optimálistól eltérő receptor—lectin pár kötése gyengébb.

A lectin-kötőhelyek vizsgálata sokat segíthet a normál és transzformált sejtek megkülönböztetésében. A lectin-kötőhelyek ugyanis a plazmamembránban helyezkednek el, és változásai tükrözik a plazma-membránt befolyásoló egyéb hatásokat, tehát a transzformált és tumoros sejtek megnövekedett agglutinálhatósága is ezzel függ össze. Egyre több kísérlet mutat arra, hogy a



17. ábra. A felületi és a magban lejátszódó változások összefüggésének vázlatos szemléltetése [BURGER 1973 után (19)]

transzformált sejt plazma-membránja a normálhoz képest jelentősen megváltozik [3, 116]. A 16. ábrán látható, hogy a spektrin-molekulák aggregációja a vörösvértest felületén mennyire megváltoztatta a membrán glikoprotein-molekuláinak elhelyezkedését is. Mindezen változások vizsgálatára az utóbbi időben transzformált és tumoros sejtek felületi membránjaiból is megpróbáltak lectinkötő receptorokat izolálni, így pl. AS-30 D patkány hepatoma sejtek WGA és Con A-kötő glikoproteinjeit [120], trombociták vírus-hemagglutinin receptor jellegű makroglikoproteinjeit [72, 88], limfociták különböző PHA-kötő glikoproteinjeit [132].

A plazma-membrán változásai [128, 142] a sejt növekedési kontrollját is befolyásolják. Az adenilcikláz ugyanis plazma-membránhoz kötött enzim, és a membránt ért változások befolyásolják az aktivitását, ezzel a ciklusos AMP-szintjét a sejtben [17, 54, 128]. Így a lectin-membrán kötődés vizsgálata fontos adatokat szolgáltat a felületi változások molekuláris szintű követhetéséhez [18, 19]. A hőmérséklet hatását a Con A-kötésre, valamint a Con A kötőhelyek szerepét a sejt-adherencia jelenségeiben szintén vizsgálják [86, 127]. A plazma-membrán-változások és a sejt növekedési kontrolljának összefüggését a 17. ábra szemlélteti vázlatos formában.

A limfociták felületén autoantigén-receptorokat is kimutattak. Ezek a receptorok a saját szervezet fehérjéit is antigénként érzékelik, és blokkolást okoznak az autológ szérumból. Ezzel akadályozza meg a szervezet az autoimmun betegségek kialakulását [145].

Perifériás vér limfociták birka vörösvértestekkel sajátos képződmenyeket, ún. rozettákat képeznek [14, 25, 95, 118, 146]. Ez a jelenség a T-limfocitákra jellemző [8, 30], és a receptor itt is a plazma-membránban helyezkedik el. Elektronmikroszkópos felvételeken jól látható a limfocita plazma-membrán nyúlványa, amely a vörösvértesthez kapcsolódik. A spontán rozettaképzés számos módszerrel befolyásolható. Tripszines és foszfolipáz A-val történő kezelés hatására csökken a rozettaképzés [23], és ha a foszfolipázzal kivont anyagot visszaadjuk a rendszerbe, az gátolja a spontán rozettaképzést. A gátlás elérhető anti-T-sejt szérumból is, azonban anti-eritrocita, anti-immunglobulinok, anticitotoxikus B faktor hatástalan. A rozettaképzés blokkolható különféle vegyületekkel, ezek közül megemlíthetjük a jóacetátot (4×10^{-3} M, nyúlvér limfociták esetében [118]), a prednizolon-származékokat [39], az azatioprint [7]. A gátlások mechanizmusát, a szénhidrát-rész szerepét nem ismerjük.

5. A plazma-membránok rekonstrukciója alkotórészeikből

A plazma-membránok bioszintézise. Glikoprotein-szintézis

A disszociáltatott membránok újra-összerakása, a képződött új, mesterséges membrán vizsgálata külön ág a membrán-biokémiának. Általában a detergenssel szolubilizált membránokkal végezték a kísérleteket, de próbálkoztak ultrahanggal és más hangenergiával szolubilizált membrán-alkotórészekkel is. A detergenssel szolubilizált membránok rekombinációjához általában a detergens teljes eltávolítása szükséges, de sokszor a detergens jelenlétében is megtörténhet a membrán helyreállítása. A rekonstrukció általában kétértékű kationokat, elsősorban Mg^{2+} -ionokat igényel. Membrán-rekonstrukciós kísérletek során sikerült funkcióképes mitokondrium- és kloroplaszt membránokat rekonstruálni, amelyek képesek az elektrontranszportra [101], a plazma-membránnal végzett kísérletek száma csekély. TOSTESON és mtsai [131] egy vörösvértest membránból izolált fő glikoproteint rekombináltak lipid bilayerrel és a képződött membrán fizikai-kémiai sajátosságait vizsgálták meg.

A membránok bioszintézise több problémát vet fel. Kérdéses, hogy a keletkező membrán egyetlen helyen szintetizálódik-e, a sejtben, hogy a lipid és a fehérje külön szintetizálódik-e, és ha igen, akkor hogyan kapcsolódnak össze. Az egyes membránfrakciók eltérő morfológiai és kémiai összetétele, jellemző enzimeinek specificitása arra utal, hogy a különböző membránok különböző helyen szintetizálódnak a sejtben és egymásba nem képesek átalakulni [67].

A plazma-membrán bioszintézisére vonatkozó adatok alapján nem lehet a pontos mechanizmust megállapítani. In vivo kísérletekben lassú ^3H -leucin beépülést észleltek. Az egér fibroblasztokon végzett kísérletek általában arra utalnak, hogy a plazma-membrán fehérjéinek turnovera kicsi, és a membrán lipidjeinek, fehérjéinek és szénhidrátjainak turnovera gyakorlatilag megegyezik. Feltételezhetően a komponensek nincsenek közvetlenül egyensúlyban a prekursor-poolokkal. A plazma-membrán szintézis szabályozása is érdekes probléma, és ennek magyarázatára az endocitózis jelenségével kapcsolatban dolgoztak ki elméletet. Eszerint az endocitózis kezdetén valamilyen jelzésre az anorganikus foszfát beépülése fokozódik a foszfolipid prekursorokba, ezáltal a prekursorok mennyisége megnő, elegendővé válik az új membrán szintéziséhez, és valamilyen módon stimulálni fogja a plazma-membrán elhasználódását is az endocitózis megvalósítására. A plazma-membrán bioszintézisének helye nem ismert. Nem tudunk közelebbit a lipoprotein komplex keletkezéséről sem, és a szénhidrát-részek beépüléséről a membrán-glikoproteinekbe. Feltételezhető, hogy a korábban már megismert alapelvek szerint történik a szintézis, tehát az első cukormolekula valószínűleg már a fehérjeszintézis helyén hozzákapcsolódik valamelyik aszparagin, szerin vagy treonin oldallánchoz, ezzel kialakul a glikopeptid-kötés, és az első beépült cukormaradékokhoz kapcsolódik a szénhidrát-egységet alkotó többi cukor [123]. Legvégül a fukóz és a szialinsav épül be a lánc terminálisaira. Ezt a szintézis-modellt erősíti meg, hogy a membrán-glikoproteinek alapszerkezete hasonló az oldható glikoproteinekére, a szialinsav itt is terminális helyzetű.

6. Módszerek a limfocita plazma-membrán izolálására

Röviden összefoglaljuk a limfocita plazma-membránok izolálásával kapcsolatos főbb módszereket, miután saját vizsgálataink limfocita membránokkal kapcsolatosak.

Sertés nyirokcsomó limfocitáiból ALLAN és CRUMPTON izolált plazma-membrán frakciót. A nyirokcsomókat trisz-HCl ($\text{pH} = 7,4$) pufferben elhomo-genizálták, majd differenciál centrifugálással a mag és mitokondrium frakciót eltávolították. A 20 000 g-vel kapott mikroszomális csapadékot tovább tisztították gradiens ultracentrifugálással (80 000 g) és így a membrán a csapadékba került [1].

FERBER és mtsai 0,02 M HEPES-pufferben ($\text{pH} = 7,4$) nitrogén-kavitációs módszerrel feltárták a sejteket. A differenciál centrifugálással nyert mikroszóma frakciót 1,09-es sűrűségű dextransra rétegezték és 3 órán át ultracentrifugálták 400 000 g-vel, így a plazma-membránt szeparálták [40]. A preparálás menetét a 18. ábra mutatja. Az I. és II. táblázat a preparálás során kapott frakciók kémiai összetételét és enzimatis markereit mutatja.

Emberi tonsilla limfocitákból DEMUS preparált plazma-membránt.

I. táblázat

A) A szubcelluláris frakciók kémiai összetétele

Frakció	Fehérje mg	DNS	RNS	Koleszterol	P-lipid
		$\mu\text{g}/\text{mg}$ feh.		nmól/mg feh.	
Homogenátum	165,2	142,0	41,3	104,0	90,3
Magfrakció	32,4	504,6	70,1	130,4	171,8
Nagy granulum	22,2	270,7	37,7	155,0	210,8
Mikroszóma	7,7	70,2	56,5	227,2	211,0
Felülűszó	50,0	7,3	67,3	137,4	44,6

A teljes fehérje-érték 10^{10} sertés limfocitára vonatkozik.

B) A szubcelluláris frakciók enzimatis markerei

Frakció	5'-AMPáz	β -glukuronidáz	Szukeinát- dehidrogenáz	Lizolecitin-acil- transzf.
Homogenátum	5,0	0,7	8,3	2,9
Magfrakció	2,4	0,6	3,8	6,2
Nagy granulum	6,7	1,5	48,0	6,2
Mikroszóma	60,2	0,2	0	8,0
Felülűszó	2,3	0,8	0	0,3

A fenti táblázatban a specifikus aktivitási adatokat adták meg, amelyeket nmol/mg fehérje · perc egységekben adtak meg. Az értékek FERBER és mtsai közleményéből származnak (40).

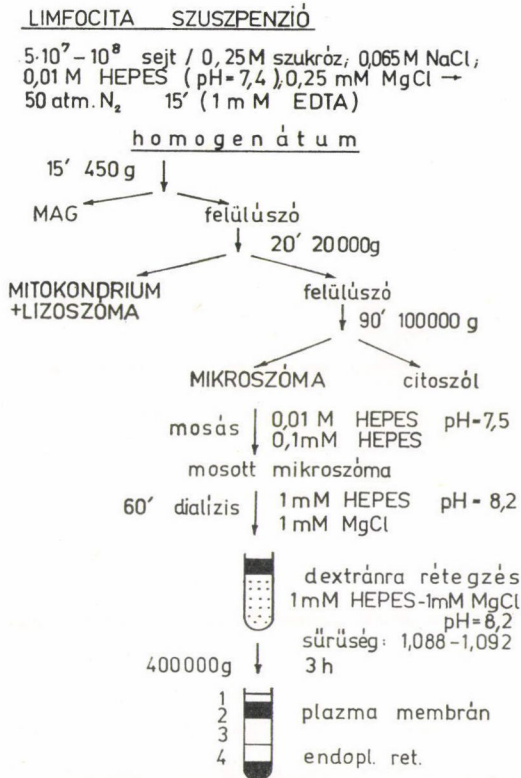
II. táblázat

A mikroszóma-alfrakciók enzimatis és kémiai markerei

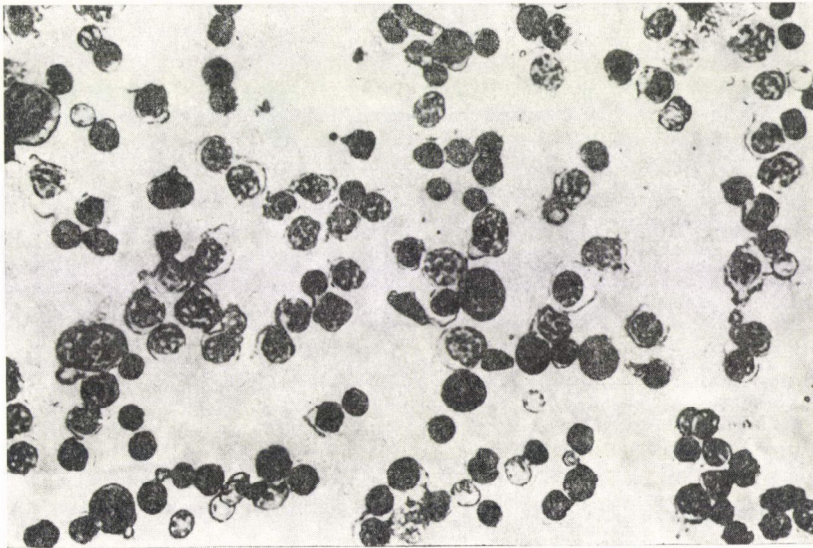
Frakció	Fehérje	5'-AMPáz	NADH oxido- reduktáz	Lizolec- acil-transzf.	Koleszt.	P-lipid
Mikroszóma	5,62	58,5	282,8	8,5	468	479
1. frakció	0,54	8,7	0	0,2	170	124
2. frakció (pl. memb.)	2,09	125,4	687,2	10,0	751	727
3. frakció	0,96	22,2	140,2	5,1	131	102
4. frakció (end. ret.)	1,07	25,9	336,4	4,2	314	199

A fehérjét mg-ban, a kémiai markereket nmol/mg fehérje egységekben, az enzimek specifikus aktivitását nmol/mg fehérje · perc egységekben adták meg. Az adatok FERBER és mtsai közleményéből származnak (40).

A tonsillából kirázatta a sejteket (19. ábra), izotóniás NaCl-Trisz-HCl (pH = 7,4) pufferrel, majd homogenizálta őket, és a homogenátumot differenciál centrifugálással mag, mitokondrium és mikroszóma frakciókra választotta szét. A két utóbbit tovább tisztította diszkontinuus szaharóz gradiensen, 22



18. ábra. Limfocita plazma membrán izolálás [Ferber és mtsai 1972 (40) szerint]



19. ábra. Tonsillából kirázott sejtek fénymikroszkópos képe, 100-szoros nagyítás. 90%-uk limfocita, a többi monocita, plazmasejt és eritrocita [DEMUS 1973 után (34)]

órák, 75 000 g-s ultracentrifugálással, és két plazma-membrán frakciót nyert. A könnyű frakció a mitokondriális és mikroszomális frakcióból is kinyerhető, a nehéz frakció csak a mikroszomálisból. A nehéz frakció lizoszóma-szennyezést, a könnyű frakció endoplazmatikus retikulum és citoszól-szennyezést tartalmaz. A limfocita plazma-membránt a magas 5'-nukleotidáz aktivitás és koleszterol-foszfolipid arány jellemzi [34]. A preparálás részleteit a 20. ábra, a frakciók összetételét a III. táblázat mutatja.

III. táblázat

A) Humán tonsilla limfociták szubcelluláris frakcióinak kémiai összetétele

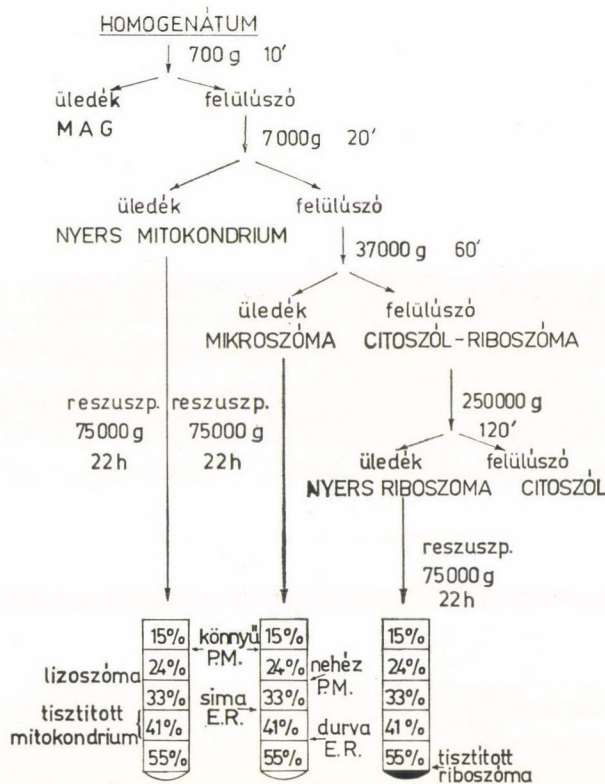
Frakció	Fehérje	DNS	RNS	Koleszterol	Lipid-P	Foszfolipid	Koleszterol-P-lipid arány (M/M)
Homogenátum	1150	126	59	33			
Mag	255	400	64	17			
Nyers mitok.	85	21	56	72			
Tiszt. mitok.	55	23	60	69	12,9	324	0,43
Lizoszóma	6	11	12	145	16,9	422	0,68
Könnyű Pl. Memb.	2	8	20	263	28,2	706	0,75
Nehéz pl. memb.	8,5	10	15	210	24,3	608	0,69
Sima end. ret.	16	19	70	106	15,7	393	0,54
Durva end. ret.	7	11	159	43	11,5	287	0,30
Riboszóma	24	40	360	31			
Citoszól	400	4	20	5			

A fehérje-érték mg-ban van megadva, 20 g tonsillából származó limfocitára. A komponensek adatai $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje egységekben szerepelnek.

B) Humán tonsilla limfocita szubcelluláris frakciók enzim-markereinek specifikus aktivitásai $\mu\text{mol}/\text{mg}$ fehérje \cdot óra egységekben

Frakció	5'-AMPáz	Glukóz-6-foszfátáz	Szucínát-dehidrogenáz	Savas NPP-áz	Savas GP-áz	LDH
Homogenátum	1,02	0,80	0,19	2,19	0,81	25,2
Mag	0,78	0,71	0,12	1,99	0,75	10,5
Nyers mitok.	3,77	1,19	0,98	13,40	3,27	6,4
Tisztított mitok.	2,11	1,23	1,06	7,34	3,29	4,0
Lizoszóma	8,36	0,87	0,05	15,23	3,05	0,2
Könnyű plazma-m.	14,60	1,05	0,04	3,75	1,02	0,3
Nehéz plazma-m.	13,48	0,98	0,01	6,08	1,51	0,1
Sima end. ret.	2,37	1,82	0,14	5,92	1,75	0,6
Durva end. ret.	1,14	1,10	0,17	3,14	0,86	0,5
Riboszóma	0,20	0,34	0	0,82	0,38	0,4
Citoszól	0,63	0,80	0,01	1,38	0,76	51,3

NPPáz: p-nitrofenil-foszfátáz; GPáz: béta-glicerofoszfátáz; LDH: tejsav-dehidrogenáz. Az adatok DEMUS közleményéből származnak (34).



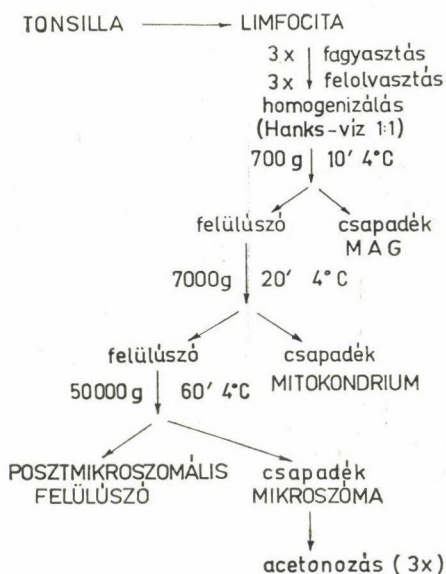
20. ábra. Tonsilla limfociták szubcelluláris frakcionálása [DEMUS 1973 után (34)]

7. A limfocita mikroszómából és plazma-membránból kivonható LIS-glikoprotein jellemzése

A tonsillákból a sejteket PIFFKÓ és mtsai szerint [94] rázattuk ki. A nyert sejtszuspenziót tovább nem tisztítottuk.

Kísérleteink során a MARCHESI és mtsai által leírt lítium-dijódszalicilátos kivonást alkalmaztuk. Néhány kísérletben a DEMUS módszere szerint preparált plazma-membránból, általában azonban mikroszóma-frakcióból indultunk ki, melynek preparálását a 21. ábra mutatja. Ennek oka, hogy a mikroszóma további tisztítása jelentős anyagvesztéshez vezet, és a kapott plazma-membrán kb. 1%-a a sejt összes fehérjéjének [34], ez pedig a további munkát jelentősen megnehezítette volna. A mikroszómafrakció összetételét enzimatis és kémiai módszerekkel vizsgáltuk meg, és azt találtuk, hogy az elsősorban plazma-membránt és sima endoplazmatikus retikulumot tartalmaz (5'-AMPáz, szialinsav, glukóz-6-Páz markerek), a mitokondriális szennyezés (citokrómozxidáz) elhanyagolható. A mitokondriális frakció viszont szemcsés endoplaz-

matikus retikulumot, riboszómákat, lizoszómákat, és plazma-membránt is tartalmaz (RNS, foszfatázok, 5'-AMPáz). A fenti eredmények nagy része jól összeegyeztethető DEMUS eredményeivel [34] is. A mikroszóma-frakcióból a lipideket többszörös hideg acetonos kezeléssel távolítottuk el, az acetonozott port felhasználásig hidegen tároltuk. Az egyes sejtfrakciók kémiai összetételét és enzimatis markereinek specifikus aktivitását mutatja a IV. és V. táblázat.



21. ábra. Mikroszóma acetonozott por preparálása emberi tonsilla limfocitákból differenciá centrifugálással

IV. táblázat

Humán tonsilla-limfociták szubcelluláris frakcióinak kémiai összetétele

Frakciók	Fehérje (össz-sejt %-ában)	DNS	RNS	Hexóz	Hexózamin	Sziálsav
		µg/mg fehérje egységekben				
Teljes sejt	100	189	62,5	18,6	2,92	5,36
Magfrakció	50,7	779	67	27,2	5,65	5,04
Mitokondrium	7,1	88	105	50,5	5,02	8,9
Mikroszomális fr.	5,0	44,6	88,8	57	15,7	19,4
Citoszól	37,2	28,9	10,5		1,66	

A hexózt, hexózamint és a sziálsavat acetonozott porból mértük.

Az acetonozott porból és a plazma-membránból MARCHESI módszerével az alábbiak szerint preparáltuk a glikoproteint: először 0,3 M lítium-dijód-szaliciláttal 15 percig szobahőmérsékleten kevertük a homogén szuszpenzió formájában 0,06 M trisz-HCl (pH = 7,5) pufferben felvett anyagot, ezt vízzel

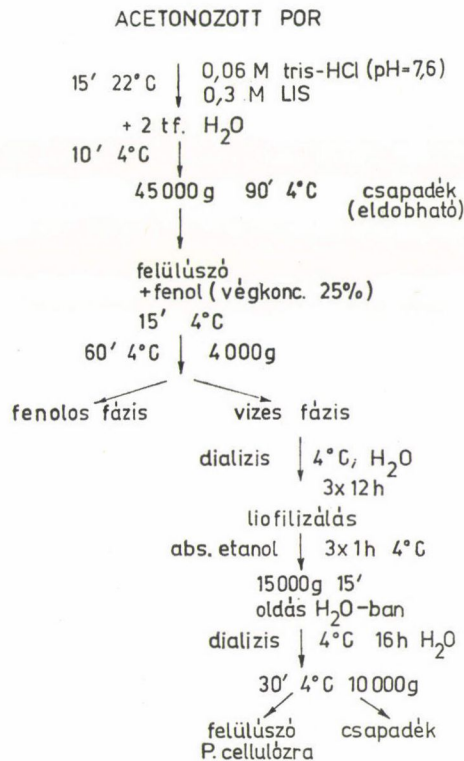
V. táblázat

Humán tonsilla-limfociták szubcelluláris frakcióinak enzim-markerei. Spec. aktivitás egységeit I. a táblázatban

Frakciók	¹⁴ C-valin inkorporáció (dpm/mg. feh.)	Citokró-m-oxidáz U/mg feh. h	μMP/mg feh. h		
			Gl-6-Páz	Savas foszfatáz	5'-AMPáz
Homogenátum (teljes sejt)		0,027	0,278	1,029	1,63
Magfrakció	4910	0,112	0,310	0,855	1,44
Mitochondrium	7720	0,340	0,241	1,862	2,32
Mikroszóma	45900	0,036	0,340	1,030	2,82
Citoszól	34400	0,01	0,348	1,170	1,45

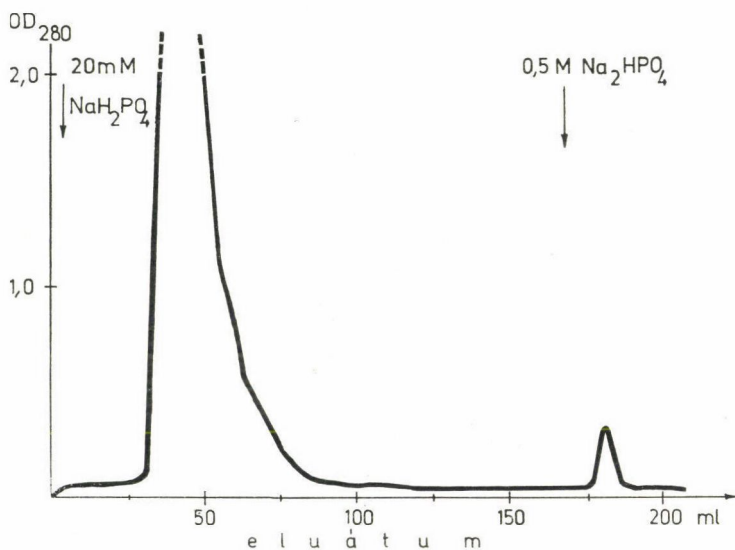
A savas foszfatázt béta-glicerofoszfát bomlás alapján mértük.

háromszorosára hígítottuk és 10 percig 4 C°-on továbbkevertük. A kapott szuszpenzióból a szolubilizálatlan anyagot 45 000 g-vel 90 perc alatt kiülepítettük 4 C°-on, majd a felülúszót hidegen 1 : 1 arányban 50%-os fenollal kevertettük (végkoncentráció 25%). 15 perces keverés után 5000 g-vel 60 perc



22. ábra. A lítium-dijódszalicilátos kivonás menete acetonozott mikroszóma-porból

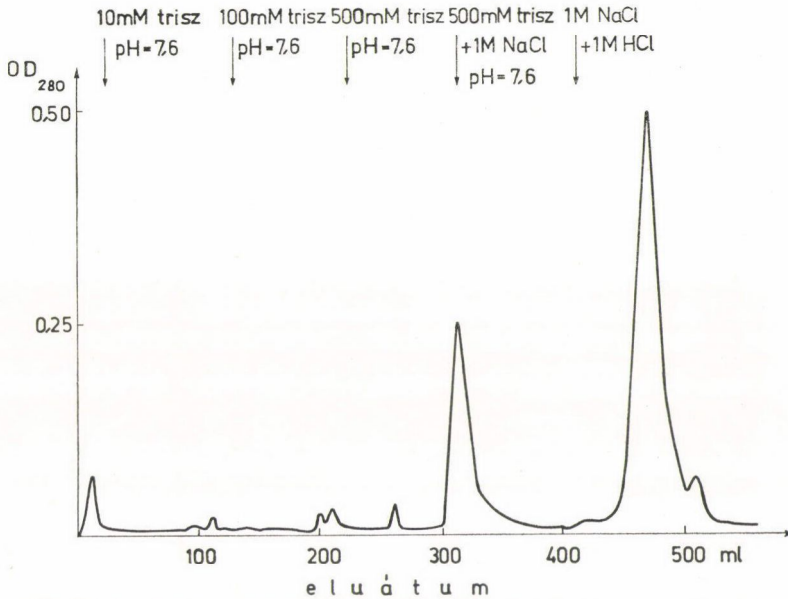
alatt a két fázist elkülönítettük, és a vizes fázist leszívtuk. A leszívott vizes oldatot 3×12 órán át hidegen vízzel szemben dializáltuk, majd beliofilizáltuk. A port 3×1 órán át mostuk abszolút alkohollal, és a végső csapadékot desztillált vízben felvettük, majd egy éjszakán át vízzel szemben dializáltuk. A fel nem oldódott csapadékot kicentrifugáltuk [81]. Ezután, kissé módosítva az eredeti eljárást, cellulózfoszfát oszlopon kromatografáltuk az oldatot, $0,02$ M NaH_2PO_4 -tal, és az oszlopon ragadt kevés fehérjét $0,5$ M Na_2HPO_4 -tal eluáltuk. Kísérleteinkben csak az első frakciót vizsgáltuk meg. A LIS-kivonás menete a 22. ábrán, a cellulóz-foszfát kromatográfia eredménye a 23. ábrán látható.



23. ábra. A lítium-dijodszalicilátos kivonat oszlopkromatográfiája cellulóz-foszfát oszlopon

A $0,02$ M foszfáttal eluált frakciót analitikai vizsgálatoknak vetettük alá. Először a töltését és a homogenitását vizsgáltuk DEAE-cellulóz oszlopon (24. ábra), lépcsőzetes elúcióval. A glikoprotein frakció két nagyobb csúcsban eluálódott, mindkettő erősen negatív töltésű, a második csak drasztikus pH-csökkenés után eluálódott. Az eluátum megjelenését a 280 nm-es fényelnyelés alapján követtük, akárcsak a többi oszlopkromatográfia esetében.

A frakció homogenitását és a fehérjék molekuláúlyát gélszűrőssel és SDS-poliakrilamid gél-elektroforézissel próbáltuk meghatározni. A gélszűrést Sephadex G 150 oszlopon, szérumalbumin és ribonukleáz kalibráló fehérjék segítségével végeztük, eluáló pufferként $0,1$ M ammónium-formiátot használtunk. Mivel csak egyetlen, kb. $50\,000$ -es molekulásúlyú frakció eluálódott, megvizsgáltuk, redukcióval szétesik-e alegységekre. Így $0,1$ M ammónium-formiát $0,1$ M merkaptotanol pufferrel eluáltuk a fehérjét, azonban a kapott



24. ábra. A LIS-kivonat ioncserélő kromatográfiás vizsgálata DEAE-cellulóz oszlopon, lépcsőzetes elúcióval

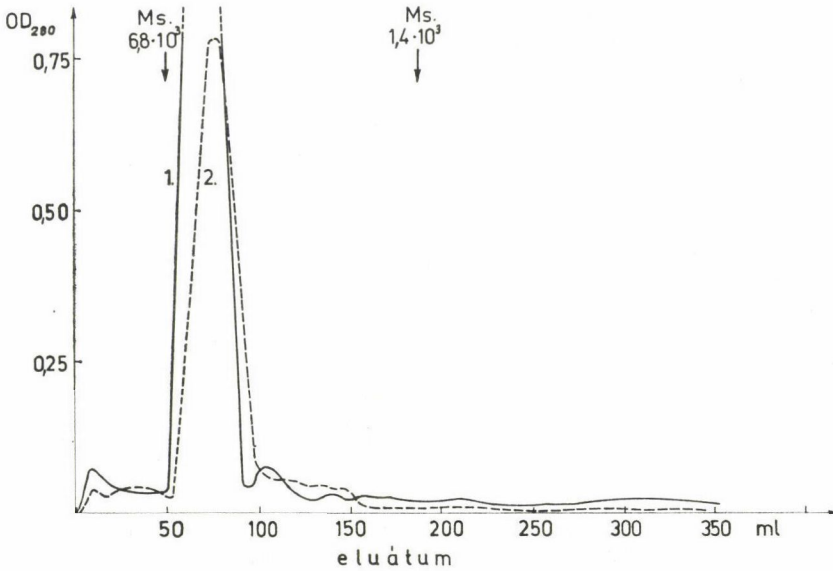
csúcs az előző módszer esetében nyert csúccsal megegyező volt, tehát diszulfidhíddal összekötött alegységeket a frakció nem tartalmazott (25. ábra).

Az SDS-gélelektroforézist disc-elektroforézis módszerrel végeztük, 7% poliakrilamid gélben, 0,1% SDS jelenlétében, pH = 8,3 mellett [144]. A futató puffer trisz-HCl-glicin volt, és ez is 0,1% SDS-t tartalmazott. A frakció legalább 3 individuális fehérjéből állt, ezek festődtek coomassie blue-val. Molekulasúlyuk 40, 46 és 49 ezer. A molekulasúlyok értékelésekor a csíkok relatív mobilitását brómfenolkék jelzőfestékre vonatkoztattuk és a kalibrációs görbe elkészítésekor dietilpirokarbonáttal polimerizált ribonukleázt használtunk [148]. PAS-festéssel nem kaptunk értékelhető csíkokat, valószínűleg a kevés fehérje, ill. szénhidrát miatt. Az egyes módszerekkel összehasonlított frakció-összetételt a VI. táblázat mutatja.

VI. táblázat

A LIS-glikoprotein frakció szénhidrát-összetétele

Preparátum	Fehérje (teljes sejt %)	Hexóz	Hexózámin	Sziálsav
		µg/mg fehérje		
Teljes sejt	100	18,6	2,92	5,36
Mikroszóma frakció	5,1	57	15,7	19,4
LIS-frakció, a cellulóz-P krom. előtt		520		95,5
LIS-frakció, cellulóz-P I. csúcs	0,035	278	39,5	122,0



25. ábra. Gélzűrés Sephadex G 150 oszlopon. A molekulásúlyok kalibrálása szérumalbuminnal és ribonukleázzal történt. Az oszlop méretei: 1×80 cm

A glikoprotein-frakció kémiai analízise során többféle szénhidrátot mérünk. A glikoprotein elsősorban neutrális cukrot és szíalsavat tartalmaz nagy mennyiségben, hexózamin tartalma kisebb. A frakció a teljes sejtfehérje 0,035%-át és — az 1%-os membrán-adatot [34] figyelembevéve — a plazma-membrán fehérje 3,5%-át tartalmazza. A frakcióban van a sejt teljes szíalsav tartalmának több mint 8%-a és a mikroszóma-frakció teljes szíalsav tartalmának mintegy 20%-a. A magas szíalsav-tartalom magyarázza a fehérje erős negatív töltését, bár ehhez hozzájárul a frakcióban talált glukuronsav és a savanyú aminosavak magas aránya is. A hexózamin nagy része — ioncserélő vékonyréteg-kromatográfia alapján — galaktózamin (illetve valószínűleg ennek N-acetilált formája) alakjában van jelen. A kémiai összetételt a VII. táblázat mutatja.

VII. táblázat

A LIS-glikoprotein frakció fontosabb tulajdonságai, a fizikai-kémiai vizsgálatok alapján

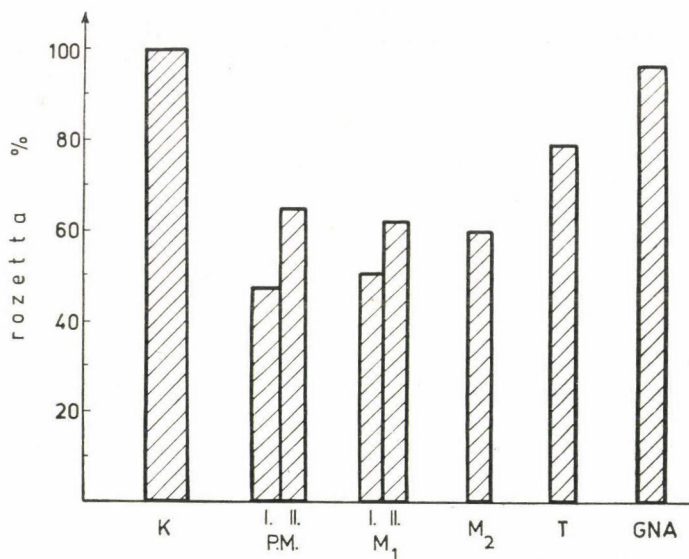
Ioncserélő kromatográfia szerint	Gélzűrés alapján	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis	Kémiai analízis
Két, erősen negatív töltésű alfrakció	egyetlen frakció, diszulfidkötés nincs Molekulásúly: kb. 50 000	három individuális fehérje Molekulásúlyok: 40 000 46 000 49 000	savanyú aminosavak jelentős mennyiségben, a hexózamin galaktózamin

Az enzimikus és kémiai vizsgálatokat az alábbi módszerekkel végeztük el: az 5'-nukleotidázt HEPPEL és HILMOE szerint [49], a glukóz-6-foszfát SWANSON szerint [130], a citokróm-oxidázt Nadi-reakció alapján, a savanyú és a neutrális foszfátot béta-glicerofoszfát bomlása alapján mértük. Az anorganikus foszfát mérését MARINETTI és mtsai szerint [82], a fehérje meghatározását LOWRY módszerével végeztük [73]. A szénhidrátok közül a szíálsavat WARREN szerint [141], a hexóزامint BOAS [13], illetve DISCHE és BORENFREUND [35] szerint, a neutrális cukrot antron-reagenssel [105] mértük és határoztuk meg. A DNS méréséhez BURTON [20], az RNS méréséhez SCHNEIDER [110] módszerét használtuk, a DNS és RNS elkülönítéséhez pedig FLECK és MUNRO [41] módszerét. A ^{14}C -aminosav-beépülés mérése ^{14}C -leucin-nal történt, a sejteket (kb. 10^8) $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 60 percig inkubáltuk, leállítás után fagyasztás—felolvasztással feltártuk őket, az egyes frakciókat triklórecetsavval kicsaptuk, a TCA-s csapadékot $0,5\text{ M NaOH}$ -ban felvettük, és ebből $0,1\text{ ml}$ -eket Packard-Tricarb folyadék-szcintillációs műszerrel, dioxános koktéliban elkeverve megmértünk, a fehérjét pedig LOWRY módszerrel meghatároztuk. Az inkorporációt dpm/mg fehérje egységekben fejeztük ki.

A glikoprotein-frakció kísérleteink szerint gátolja a spontán rozettaképzést humán perifériás vér limfociták és birka vörösvértestek között. A plazma-membrán és a mikroszóma acetonozott por LIS-kivonata, amely kb. $50\text{ }\mu\text{g}$ mikrogramm fehérjét tartalmaz, körülbelül 50% -os gátlást eredményez, de a mitokondriumból kivont LIS-glikoprotein is mutatott 20% -os gátlást, amely megerősíteni látszik a plazma-membrán szennyezést a mitokondrium-frakcióban. Az N-acetil-glukózamin nem okozott gátlást. Az eredményeket a 26. ábra mutatja be.

A rozettaképzés gátlását a következő módszer segítségével vizsgáltuk: $0,1\text{ ml}$ birka vörösvértest-szuszpenziót (2×10^8 sejt Hanks médiumban) és $0,1\text{ ml}$ glikoproteint összekevertünk és $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 60 percig inkubáljuk. Előzőleg a glikoproteint egy éjszakán át dializáltuk Hanks oldattal szemben, hogy a megfelelő pH-értéket beállítsuk. A $37\text{ }^\circ\text{C}$ -os inkubálás után $1\text{ óráig } 4\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartjuk, majd $0,1\text{ ml } 10^7$ vér-limfocitát tartalmazó szuszpenziót adunk hozzá és lecentrifugáljuk. Ezután $1\text{ óráig } 4\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartjuk, majd mikroszkóp alatt megszámloljuk a képződött rozettákat. A rozettaképződés kritériumának tekintettük, hogy egy limfocita legalább 4 birka eritrocitát kössön meg. A kontroll minta $0,1\text{ ml}$ dializáló Hanks oldatot tartalmazott a glikoprotein helyett.

A gátlási mechanizmusról közelebbit nem tudunk. Feltételezzük, hogy a frakció azért képes gátolni a rozettaképződést, mert kötődik a vörösvértestek felületén levő olyan determinánsokhoz, amelyek a rozettaképződésben részt vesznek, tehát előfordulhat, hogy a limfociták felületén levő rozetta-receptorról vagy annak determinánsáról van szó. N-acetil-glukózamin nem gátolta a rozettaképződést, tehát a glikoprotein valószínűleg nem tartalmaz ilyen determinánst. A fehérjekonformáció szerepét még nem vizsgáltuk.



26. ábra. A LIS-glikoprotein gátló hatása a spontán rozettaképzésre. K = kontroll (100% spontán rozetta); P.M. = plazma-membrán LIS-kivonat, fehérjekoncentrációk: I. 50 μ g II. 25 μ g; M₁ = mikroszóma acetonozott por LIS-kivonat, fehérjekoncentrációk: I. 54,5 μ g II. 27,2 μ g. M₂ = mikroszóma acetonozott por LIS-kivonat, fehérjekoncentráció 52 μ g. T = mitokondrium acetonozott por LIS-kivonat, fehérjekoncentráció 29 μ g. GNA = N-acetil-glukózámin, 55 μ g. A fehérjekoncentrációk a bemért 0,1 ml glikoprotein-oldatra vonatkoznak

A frakció plazma-membrán jellegét igazolja, hogy plazma-membránból és mikroszómából egyaránt ugyanazon összetételben izolálható, emellett magas a szíálsav-tartalma (plazma-membrán marker!), és a rozettaképzés is plazma-membránhoz kötött. Az individuális fehérjék eredete és pontos funkciója még nem ismert, mivel eddig még nem szeparáltuk őket. Lehetséges, hogy a frakciónak más biológiai sajátosságai is vannak, ezeket is meg akarjuk vizsgálni, elsősorban a vörösvértest glikoforinnal összehasonlítva, hiszen a preparálás módszere megegyező.

Tekintettel a jelentős szénhidrát-tartalomra, elsősorban lectinreceptor funkciók jöhetnek számításba. A glikoforin ugyancsak mutat lectinreceptor aktivitást [59, 79–81, 113], a már említett MN-antigén sajátosságon kívül. Ez a glikoprotein a membránon keresztülnyúlik, és intakt sejtek esetében a laktoperoxidázos jódozással csak a szénhidrát-egységeket tartalmazó terminális része jódozódik [22, 81, 84]. A glikoprotein magas szíálsav-tartalma adhat magyarázatot a WGA-receptor sajátosságra, mivel zsírsejteken végzett kísérletek szerint a szíálsav-determináns felelős a WGA-kötésért [29]. Az egér L 1210 jelzésű leukémiás sejtjeiből izolált glikoprotein-frakció [55] concanavalin A, WGA és lencse PHA receptor, és ez a frakció is szíálsavat tartalmaz. Hasonló a helyzet a vörösvértestből izolált PHA-receptorral is [68].

A magas szíálsav tartalom a glikoforin esetében megmagyarázza az MN-antigén sajátosságát, amely korábbi adatok szerint is szíálsavhoz kötött [60]. Hasonlóan magyarázatot ad a vírus-receptor tulajdonságra, mivel a glikoforin receptora az influenza vírusnak is. Ez a tulajdonság szintén a szíálsav-determinánsokhoz kötődik [5, 6, 147].

A limfocita membránból, a vörösvértest membránból és az egér leukémia sejtekből izolált LIS-glikoprotein frakciók sok tekintetben hasonlítanak egymásra. Bár a molekulasúlyok között 30–80 ezerig többféle adatot találunk, a legtöbb individuális LIS-extrahált glikoprotein molekulasúlya 50 ezer körül van. Valamennyi LIS-frakció magas szénhidrát tartalmú, és kifejezetten jelentős a szíálsav tartalma, amely pl. a vörösvértest glikoforin esetében a teljes ghost szíálsav tartalmának nagyobbik részét jelenti. A LIS tehát az eddigi adatok szerint szialoglikoproteineket képes szolubilizálni. A pontos szolubilizációs mechanizmus ismeretlen, részben „chaotrop”, részben ionos detergens hatással magyarázzák.

A LIS-glikoproteinek membránon belüli elhelyezkedése sem pontosan ismert. A vörösvértest membránban a glikoforin úgy helyezkedik el, hogy középső, apoláros régiója a membrán lipid kettős rétegével létesít hidrofób kapcsolatot, a membrán belső oldalán egy rövidebb, kívül pedig egy hosszú hidrofílszakaszt találunk, amely utóbbihoz kapcsolódnak a szénhidrátok. Ezt aminosav-analízissel és a szekvencia meghatározásával is bizonyították [81, 113]. A vörösvértest-membrán fehérjéinek és glikoproteinjeinek topográfiájával részletesen is foglalkoztak [84]. A felületi szénhidrátok közül különösen az N-acetil-neuraminsav jelentős, amely a korábban említett antigén- és receptor funkciókon kívül a membrán negatív töltését is biztosítja, bár ebben a savanyú aminosav-oldalláncok is közrejátszanak [138]. Ez az erős negatív töltés valamennyi LIS-glikoproteinre jellemző volt. A fent említett glikoprotein beágyazódás feltételezése azért is vonzó, mert jól összeegyeztethető a fluid-mozaik membránmodellel [22, 119]. További vizsgálatainkban elsősorban a glikoforinnal próbáljuk meg összehasonlítani a limfocita LIS-glikoprotein-frakcióját, tehát vírus- és lectin-receptor sajátosságokat vizsgálunk. Mivel ez a frakció — eltérően a MARCHESI és mtsai által leírt glikoforintól, több individuális fehérjéből áll, tisztázni kell, hogy adott biológiai sajátosság melyik individuális komponenshez kötődik, tehát a szétválasztást is meg kell oldani.

A rövidítések magyarázata

AMP	= adenzin-5'-monofoszfát
ATP	= adenzin-5'-trifoszfát
Con A	= concanavalin A
DOC	= Na-dezoxikolat
HEPES	= 4-hidroxietil-1-piperazinil-etán-2-szulfosav
LIS	= lítium-dijódszalicilat
NP-40	= Nonidet P-40 (nem-ionos detergens)

PHA	= fitohemagglutinin
SBA	= szójabab-agglutinin
SDS	= Na-dodecilszulfát
TCA	= triklórecetsav
WGA	= búzacsíra-agglutinin (wheat germ agglutinin)

IRODALOM

1. ALLAN, D., CRUMPTON, M. J.: Preparation and characterization of the plasma membrane of pig lymphocytes. *Biochem J.* **120**, 133 (1970).
2. ALLAN, D., CRUMPTON, M. J.: Isolation and composition of human thymocyte plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **274**, 22 (1972).
3. ANTEUNIS, A.: Cytochemical and ultrastructural studies concerning the cell coat glycoprotein in normal and transformed human blood lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* **84**, 31 (1974).
4. AOKI, T., HÄMMERLING, U., DE HARVEN, E., BOYSE, E. A. and OLD, L. J.: Antigen structure of cell surfaces. An immunoferritin study of the occurrence and topography of H-2, theta and TL allonantigens on mouse cells. *J. Exp. Med.* **130**, 979 (1969).
5. AOYAGI, T., SUZUKI, J., NEROME, K., NISHIZAWA, R., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H.: Sialic acid residues exposed on mammalian cell surface: the effect of adsorption of denatured virus particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 271 (1974).
6. ATWELL, J. L., CONE, R. E., MARCHALONIS, J. J.: Isolation of theta antigen from the surface of thymus lymphocytes. *Nature N. B.* **241**, 251 (1973).
7. BACH, J. F., DARDENNE, M.: Activities of immunosuppressive agents in viro. I. Rosette inhibition by azathioprine. *Rev. Europ. Études Clin. et Biol.* **16**, 770 (1971).
8. BACH, J. F., DARDENNE, M.: Antigen recognition by T lymphocytes. III. Evidence for two populations of thymus-dependent rosette-forming cells in spleen and lymph nodes. *Cell. Immunol.* **6**, 394 (1973).
9. BENDER, W. W., GARAN, H., BERG, H. C.: Proteins of the human erythrocyte membrane as modified by pronase. *J. Mol. Biol.* **58**, 783 (1971).
10. BILLING, R. J., TERASAKI, P. I.: Purification of HL-A antigens from normal serum. *J. Immunol.* **112**, 1124 (1974).
11. BLUMENFELD, O. O.: The proteins of the erythrocyte membrane obtained by solubilization with aqueous pyridine solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 200 (1968).
12. BLUMENFELD, O. O., CALLOP, P. M., HOWE, C., LEE, L. T.: Erythrocyte membrane proteins. Their study using aqueous pyridine solutions. *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 109 (1953).
13. BOAS, N. F.: Method for the determination of hexosamine in tissues. *J. Biol. Chem.* **204**, 553 (1953).
14. BRAIN, P., GORDON, J., WILLETT, S.: Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin. exp. Immunol.* **6**, 681 (1970).
15. BRETSCHER, M. S.: Major human erythrocyte glycoprotein spans the cell membrane. *Nature N. B.* **231**, 229 (1971).
16. BRETSCHER, M. S.: A major protein which spans the human erythrocyte membrane. *J. Mol. Biol.* **59**, 351 (1971).
17. BUCK, C. A., FUHRER, J. P., SOSLAN, G., WARREN, L.: Membrane glycopeptides from subcellular fractions of control and virus-transformed cells. *J. Biol. Chem.* **249**, 1541 (1974).
18. BURGER, M. M.: Surface changes detected by lectins and implications for growth regulation in normal and in transformed cells. In *Biomembranes* **2**, 247 (1971). Edited by L. A. Manson, Plenum, New York (1971).
19. BURGER, M. M.: Surface changes in transformed cells detected by lectins. *Fed. Proc.* **32**, 91 (1973).
20. BURTON, K.: A method for the determination of DNA. *Biochem J.* **62**, 315 (1956).
21. CAPALDI, R. A.: Properties of the major glycoprotein of the beef erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 386 (1973).
22. CAPALDI, R. A.: A dynamic model of the cell membranes. *Sci. Amer.* **230**, 26 (1974).
23. CHAPEL, H. M.: Effects of papain, trypsin and phospholipase A on rosette formation. *Transplantation* **15**, 320 (1973).
24. COOK, G. M. W., HEARD, D. H., SEAMAN, G. V. F.: A sialomucoprotein liberated by trypsin from the human erythrocyte. *Nature* **188**, 1011 (1960).

25. COOMBS, R. R. A., GUMER, B. W., WILSON, A. B., HOLM, G., LINDGREN, B.: Rosette formation between human lymphocytes and sheep red cells not involving Ig receptors. *Int. Arch. Allergy* **39**, 658 (1970).
26. COLEMAN, R.: Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* **300**, 1 (1973).
27. CRESSWELL, P., TURNER, M. J., STROMINGER, J. L.: Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 1603 (1973).
28. CRESSWELL, P., ROBB, R. J., TURNER, M. J., STROMINGER, J. L.: Papain-solubilized HL-A antigens. Chromatographic and electrophoretic studies of the two subunits from different specificities. *J. Biol. Chem.* **249**, 2828 (1974).
29. CUATRECASAS, P.: Interaction of wheat germ agglutinin and Con A with isolated fat cells. *Biochemistry* **12**, 1312 (1973).
30. DARDENNE, M., BACH, J. F.: Thymus products. Modification of rosette-forming cells by thymic extracts. Determination of the target RFC-s subpopulation. *Immunology* **25**, 343 (1973).
31. DAUTIGNY, A., BERNIER, I., COLOMBANI, J., JOLLES, P.: Purification and characterization of HL-A antigens from human platelets, solubilized by the non-ionic detergent NP-40. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 783 (1973).
32. DAVIES, D. A. L.: The molecular individuality of different mouse H-2 histocompatibility specificities determined by single genotypes. *Transplantation* **8**, 51 (1969).
33. DAWSON, J. R., SILVER, J., SHEPPARD, L. B., AMOS, D. B.: The purification of detergent-solubilized HL-A antigens by affinity chromatography with the hemagglutinin from *Lens culinaris*. *J. Immunol.* **112**, 1190 (1974).
34. DEMUS, H.: Subcellular fractionation of human lymphocytes. Isolation of two plasma membrane fractions and comparison of the protein components of the various lymphocytic organelles. *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 93 (1973).
35. DISCHE, Z., BORENFREUND, E.: A spectrophotometric method for the microdetermination of hexosamines. *J. Biol. Chem.* **184**, 517 (1950).
36. DODGE, J. T., MITCHELL, C., HANAHAN, D.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochim. Biophys.* **100**, 119 (1963).
37. EMMELOT, P., BOS, J., BENEDETTI, E. L., RÜMKE, PH.: Studies on plasma membranes I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 126 (1964).
38. FAIRBANKS, G., STECK, T. L., WALLACH, D. F. H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606 (1971).
39. FEKETE, B., SZEGEDI, GY., GERGELY, P., SZABÓ, G., PETRÁNYI, GY.: Inhibition of immunospecific rosette formation for the study of two prednisolone derivatives. *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* **29**, 327 (1972).
40. FERBER, E., RESCH, K., WALLACH, D. F. H., INN, W.: Isolation and characterization of lymphocyte plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **266**, 494 (1972).
41. FLECK, A., MUNRO, H. N.: The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 571 (1962).
42. GOMBOS, G., HERMETET, J., REEBER, A., ZANETTA, J., TRESKA-CIESILSKI, J.: The composition of glycopeptides derived from neural membranes which affect neurite growth in vitro. *FEBS Letters* **24**, 247 (1972).
43. GÖTZE, D., REISFELD, R. A.: Immunogenicity and partial purification of soluble H-2 antigens extracted with hypertonic salt. *J. Immunol.* **112**, 1643 (1974).
44. HAKOMORI, S. I., SHYCHARZ, G. D.: Investigations on cellular blood group substances. I. Isolation and chemical composition of blood group ABH and Le^b isoantigens of sphingoglycolipid nature. *Biochemistry* **7**, 1279 (1968).
45. HAMAGUCHI, H., CLEVE, H.: Solubilization of human erythrocyte membrane glycoproteins and separation of MN glycoprotein from a glycoprotein with I, S and A activity. *Biochim. Biophys. Acta* **278**, 271 (1972).
46. HAUGHTON, G.: Transplantation antigen of mice: Cellular localization of antigen determined by H-2 locus. *Transplantation* **4**, 238 (1966).
47. HAYMAN, M. J., SHEKEL, J. J., CRUMPTON, M. J.: Purification of virus glycoproteins by affinity chromatography using *Lens culinaris* phytohemagglutinin. *FEBS Letters* **29**, 185 (1973).
48. HEMMINKI, K., SUOVANIEMI, O.: Preparation of plasma membranes from isolated cells of newborn rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 75 (1973).

49. HEPPEL, L. A., HILMOE, R. J.: 5'-nucleotidase assay. In *Methods in Enzymology* 2, 547 (1955). Ed. by Colowick S. P. and Kaplan N. O. Academic, N. Y.
50. HERBERMAN, R., STETSON, C. A.: The expression of histocompatibility antigens on cellular and subcellular membranes. *J. Exp. Med.* **121**, 533 (1965).
51. HERZENBERG, L. A. and HERZENBERG, L. A.: Association of H-2 antigens with cell membrane fraction of mouse liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **47**, 762 (1961).
52. HESS, M., DAVIES, D. A. L.: Basic structure of mouse histocompatibility antigens. *Eur. J. Biochem.* **41**, 1 (1974).
53. HESS, M., SMITH, W.: Comparative studies of house (H-2) and human (HL-A) histocompatibility antigens. *Eur. J. Biochem.* **43**, 471 (1974).
54. HOGG, N. M.: A comparison of membrane proteins of normal and transformed cells by lactoperoxidase labeling. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 489 (1974).
55. HOURANI, B. T., CHACE, N. M., PINCUS, J. H.: Plasma membrane glycoproteins from nucleated cells. I. Preparative techniques for isolation and partial characterization of a membrane glycoprotein extract from L1210 cells with lectin receptor activity. *Biochim. Biophys. Acta* **328**, 520 (1973).
56. HUDSON, B. G., SPIRO, R. G.: Fractionation of glycoprotein components of the reduced alkylated renal glomerular basement membrane. *J. Biol. Chem.* **247**, 4239 (1972).
57. INBAR, M., BEN-BASSAT, H., SACHS, L., HUET, C., OSEROFF, A. R.: Inhibition of lectin agglutinability by fixation of the cell surface membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 594 (1973).
58. JACKSON, L. J., SEAMAN, G. V. F.: Physicochemical properties of some glycopeptides released from human erythrocyte membranes by trypsin. *Biochemistry* **11**, 44 (1972).
59. JACKSON, R. L., SEGREST, J. P., MARCHESI, V. T.: Further characterization of the principal glycoprotein of the human red cell membrane. *Fed. Proc.* **30**, 1325 (1971).
60. JIRGENSONS, B., SPRINGER, G. F.: Conformation of blood group and virus receptor glycoprotein from red cells and secretions. *Science* **162**, 365 (1968).
61. KABAT, E. A.: *Blood group substances. Their chemistry and immunochemistry* Academic Press, New York (1956).
62. KAHAN, B., REISFELD, R. A.: Transplantation antigens. *Science* **164**, 514 (1969).
63. KIDWAI, A. M., RADCLIFFE, M. A., LEE, E. Y., DANIEL, E. E.: Isolation and properties of skeletal muscle plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 593 (1973).
64. KIRKPATRICK, F. H., SANDBERG, H. E.: Effect of anionic surfactants, nonionic surfactants and neutral salts on the conformation of spin-labeled erythrocyte membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 209 (1973).
65. KUBYKA, D., CARRAWAY, K. L.: Proteins and glycoproteins of the milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **288**, 282 (1972).
66. KOURILSKY, F. M., SILVESTRE, D., NEAUPORT-SAUTES, C., LOOSFELT, Y., DAUSSET, J.: Antibody-induced redistribution of HL-A antigens at the cell surface. *Eur. J. Immunol.* **2**, 249 (1972).
67. KORN, E. D.: Cell membranes: Structure and synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 263 (1969).
68. KORNFELD, S., KORNFELD, R.: Solubilization and partial characterization of a PHA receptor site from human erythrocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **63**, 1439 (1969).
69. KORNFELD, R., SIEMERS, C.: Large scale isolation and characterization of calf thymocyte plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **249**, 1295 (1974).
70. KUBÁNEK, J., ENTLICHER, G., KOCOUREK, J.: Studies on phytohemagglutinins. PHA-receptor from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **304**, 93 (1973).
71. LELEVRE, L.: Plasma membranes from fibroblastic cells in culture. Isolation, morphological and enzymatic identification. *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 662 (1973).
72. LOMBART, C., OKOMURA, T., JAMIESON, G. A.: Isolation of a surface glycoprotein of human platelets. *FEBS Letters* **41**, 30 (1974).
73. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
74. MADDY, A. H.: The solubilization of the protein of ox erythrocyte ghost *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 448 (1964).
75. MADDY, A. H., KELLY, P. G.: The inadequacy of 6 M guanidin HCl as a dispersive agent for membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 114 (1971).
76. MADDY, A. H., DUNN, M. J., KELLY, P. G.: The characterization of membrane proteins by centrifugation and gel electrophoresis. A comparison of proteins prepared by different methods. *Biochim. Biophys. Acta* **288**, 263 (1972).
77. MANDEL, T. E.: Intramembranous marker in T lymphocytes. *Nature N. B.* **239**, 112 (1972).

78. MARCHALONIS, J. J.: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.* **113**, 299 (1969).
79. MARCHESI, V. T.: Isolation and characterization of a sialic-acid-containing glycoprotein from red cell membranes. *Fed. Proc.* **29**, 600 (1970).
80. MARCHESI, V. T., ANDREWS, E. P.: Glycoproteins: Isolation from cell membranes with lithium diiodosalicylate. *Science* **174**, 1247 (1971).
81. MARCHESI, V. T., TILLACK, T. W., JACKSON, R. L., SEGREST, J. P., SCOTT, R. E.: Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1445 (1972).
82. MARINETTI, G. V., ERBLAND, J., STOTZ, E.: The quantitative analysis of plasmalogens by paper chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 251 (1959).
83. MCPHERSON, J. C., CLAMP, J. R., MANSTONE, A. J.: Carbohydrate analysis of membrane derived glycoproteins carrying some cell surface expressed antigens. *Immunochemistry* **8**, 225 (1971).
84. MORRISON, M., MUELLER, T. J., HUBER, C. T.: Transmembrane orientation of the glycoproteins in normal human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **249**, 2658 (1974).
85. NATHENSON, S. G., CULLEN, S. E.: Biochemical Properties and immunochemicalgenetic relationship of mouse H-2 alloantigens. *Biochim. Biophys. Acta* **344**, 1 (1974).
86. NICOLSON, G. L.: Temperature-dependent mobility of Con A-sites on tumour cell surfaces. *Nature N. B.* **243**, 218 (1973).
87. OSEROFF, A. R., ROBBINS, P. W., BURGER, M. M.: The cell surface membrane: Biochemical aspects and biophysical probes. *Ann. Rev. Biochem.* **42**, 647 (1973).
88. PEPPER, D. S., JAMIESON, G. A.: Studies on glycoproteins. III. Isolation of sialylglycopeptides from human platelet membranes. *Biochemistry* **8**, 3362 (1969).
89. PERDUE, J. F., WARNER, D., MILLER, K.: The isolation and characterization of plasma membrane from cultured cells. The chemical composition of plasma membrane isolated from chicken tumors initiated with virus-transformed cells. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 817 (1973).
90. PETERSON, P. A., RASK, L., LINDBLOM, J. B.: Highly purified, papain-solubilized HL-A antigens contain beta-2-microglobulin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 35 (1974).
91. PHILLIPS, D. R., MORRISON, M.: Radioiodination of cell membranes by using lactoperoxidase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **40**, 284 (1970).
92. PHILLIPS, D. R.: Effect of trypsin on the exposed polypeptides and glycoproteins in the human platelet membrane. *Biochemistry* **11**, 4582 (1972).
93. PHILLIPS, D. R., MORRISON, M.: Changes in accessibility of plasma membrane protein as the result of tryptic hydrolysis. *Nature N. B.* **242**, 213 (1973).
94. PIFFKÓ, P., KÖTELES, G., ANTONI, F.: *Pract. Otorhinolaryng.* **32**, 305 (1970).
95. POMPIDOU, A., VEYRAT, M., PROUDHOMME, J., LE GO, A.: Rosette forming cells in rabbit. Study of blood lymphocytes. *Compt. Rend. des Sci. Soc. Bio. Fil.* **167**, 855 (1973).
96. POPP, R. A., POPP, D. M., ANDERSON, N. G., ELROD, L. H.: Use of zonal centrifuge to separate particles containing transplantation antigen. *Biochim. Biophys. Acta* **184**, 625 (1969).
97. POPP, R. A.: Chemistry of specific antigenic sites on cell surfaces. In „Biomembranes” **2**, 223 (1971). Ed. by L. A. Manson. Plenum, New York (1971).
98. POSTE, G., REEVA, P.: Increased mobility and redistribution of Con A receptors on cells infected with Newcastle Disease Virus. *Nature* **247**, 469 (1974).
99. RAFF, M. C., DE PETRIS, S.: Movement of lymphocyte surface antigens and receptors: the fluid nature of the lymphocyte plasma membrane and its immunological significance. *Fed. Proc.* **32**, 44 (1973).
100. RAY, T. K.: A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 1 (1970).
101. RAZIN, S.: Reconstitution of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 241 (1972).
102. REISFELD, R. A., KAHAN, B. D.: Transplantation antigens. *Adv. Immunol.* **12**, 117 (1970).
103. REISFELD, R. A., PELLEGRINO, M. A., KAHAN, B. D.: Salt extraction of soluble HL-A antigens. *Science* **172**, 1134 (1971).
104. REISFELD, R. A., FERRONE, S., PELLEGRINO, M. A.: Isolation and serological evaluation of HL-A antigens solubilized from cultured human lymphoid cells. In *Methods in Membrane Biology* **1**, 143 (1974). Ed. by E. D. Korn, Plenum, New York (1974).
105. ROE, J. M.: The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* **212**, 335 (1955).
106. SANDERSON, A. R.: HL-A substances from human spleens. *Nature* **220**, 192 (1968).

107. SCHEID, A., CALIGUIRI, L. A., COMPANS, R. W., CHOPPIN, P. W.: Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with the larger SV 5 glycoprotein. *Virology* **50**, 640 (1972).
108. SCHIBECI, A., RATTRAY, J. B. M., KIDBY, D. K.: Isolation and identification of yeast plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 15 (1973).
109. SCHIECHL, H.: Investigation of HCl-extraction of human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **307**, 65 (1973).
110. SCHNEIDER, W. C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In *Methods in Enzymology* **3**, 680 (1957). Ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press New York (1957).
111. SCHWARTZ, B., NATHENSON, S. G.: The regeneration of transplantation antigens on mouse cells. Abstr. 3rd Intern. Congress of the Transpl. Soc. The Hague, The Netherlands Sept. 7—11. p. 275 (1970).
112. SCHWARTZ, B. D., KATO, K., CULLEN, S. E., NATHENSON, S. G.: H-2 histocompatibility alloantigens. Some biochemical properties of the molecules solubilized by NP-40 detergent. *Biochemistry* **12**, 2157 (1973).
113. SEGREST, J. P., JACKSON, R. L., MARCHESI, V. T., GUYER, R. B., TERRY, W.: Red cell membrane glycoprotein: amino acid sequence of an intramembraneous region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 964 (1972).
114. SHIMADA, A., NATHENSON, S. G.: Murine H-2 alloantigens. Purification and some chemical properties of soluble products from H-2^b and H-2^k genotypes released by papain digestion of membrane fractions. *Biochemistry* **8**, 4048 (1969).
115. SHIMADA, A., YAMANE, K., NATHENSON, S. G.: Comparison of the peptide composition of two H-2 alloantigens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **65**, 691 (1970).
116. SHOHAM, J., SACHS, L.: Different cyclic changes in the surface membrane of normal and malignant transformed cells. *Exp. Cell Res.* **85**, 8 (1974).
117. SHRAGER, P., TOSTESON, D. C., LAUF, P. C.: Biochemical characterization of a lipid-dependent membrane protein antigen in HK red (sheep) cells. *Biochim. Biophys. Acta* **290**, 186 (1972).
118. SEGEL, J., SHERMAN, W. B.: The interaction of lymphocytes with autologous red cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **50**, 65 (1972).
119. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science* **175**, 720 (1972).
120. SMITH, D. F., NERI, G., WARLBORG, E. F. JR.: Isolation and partial chemical characterization of cell-surface glycopeptides from AS-30D rat hepatoma which possess binding sites for wheat germ agglutinin and Con A, *Biochemistry* **11**, 2111 (1973).
121. SNARY, D., GOODFELLOW, P., HAYMAN, M. J., BODMER, W. F., CRUMPTON, M. J.: Subcellular separation and molecular nature of human histocompatibility antigens (HL-A). *Nature* **247**, 457 (1974).
122. SOLHEIM, B. G., THORSBY, E.: Beta-2-microglobulin is part of the HL-A molecule in the lymphocyte membrane. *Nature* **249**, 36 (1974).
123. SPIRO, R. G.: Glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 599 (1971).
124. SPRINGER, T. A., STROMINGER, J. L., MANN, D.: Partial purification of detergent-soluble HL-A antigen and its cleavage by papain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 1539 (1974).
125. STECK, T.: Selective solubilization of red blood cell membrane proteins with guanidin HCl. *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 553 (1972).
126. STEINBERG, M. S., GEPNER, I. A.: Are Con A receptor sites mediators of cell-cell adhesion? *Nature N. B.* **241**, 249 (1973).
127. STELLNER, K., WATANABE, K., HAKOMORI, S.: Isolation and characterization of glycosphingolipids with blood group specificity H, from membranes of human erythrocytes. *Biochemistry* **12**, 656 (1973).
128. STOKER, M.: Growth of virus transformed cells. In *Biomembranes* **2**, 271 (1971), ed. by L. A. Manson, Plenum, New York (1971).
129. SUSZ, J. P., HOF, H. I., BRUNNGRABER, E. G.: Isolation of Con A binding glycoproteins from rat brain. *FEBS Letters* **32**, 289 (1973).
130. SWANSON, M. A.: Glucose-6-phosphatase from liver. In *Methods in Enzymology* **2**, 541 (1955), ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press New York (1955).
131. TOSTESON, M. T., LAU, F., TOSTESON, D. C.: Incorporation of a functional membrane glycoprotein into lipid bilayer membranes. *Nature N. B.* **243**, 112 (1973).
132. TOYOSHIMA, S., FUKUDA, M., OSAWA, T.: Chemical Nature of the receptor site for various phytomitogens. *Biochemistry* **11**, 4000 (1972).
133. TRIPLETT, R. B., SUMMERS, J., ELLIS, E. D., CARRAWAY, K. C.: Solubilization, disaggre-

- gation and chromatography of erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **266**, 484 (1972).
134. TSAI, C. M., HUANG, C. C., CANELLAKIS, E. S.: Iodination of cell membranes. I. Optimal conditions for the iodination of exposed membrane components. *Biochim. Biophys. Acta* **332**, 47 (1974).
 135. TURNER, M. J., STROMINGER, J. L., SANDERSON, A. R.: Enzymic removal and re-expression of a histocompatibility antigen, HL-A2 at the surface of human peripheral lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 200 (1972).
 136. UNANUE, E. R., ENGERS, H. D., KARNOVSKY, M. J.: Antigen receptors on lymphocytes. *Fed. Proc.* **32**, 44 (1973).
 137. VAN BLITTERSWIJK, W. J. C., EMMELOT, P., FELTKAMP, C. A.: Studies on plasma membranes. Isolation and characterization of a plasma membrane fraction from calf thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 577 (1973).
 138. VASSAR, P. S., HARDS, J. M., SEAMAN, G. V. F.: Surface properties of human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 107 (1973).
 139. WALLACH, D. F. H., KAMAT, V. B.: Plasma and cytoplasmic membrane fragments from Ehrlich Ascites carcinoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **52**, 721 (1964).
 140. WALLACH, D. F. H., KAMAT, V. B.: Preparation of plasma membrane fragments from mouse ascites tumor cells. In *Methods in Enzymology* **8**, 164 (1966), edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press, New York (1966).
 141. WARREN, L.: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* **234**, 1971 (1959).
 142. WARREN, L., FUHRER, J. P., BUCK, C. A.: Surface glycoproteins of cells before and after transformation by oncogenic viruses. *Fed. Proc.* **32**, 80 (1973).
 143. WATKINS, W. M.: Blood group substances. *Science* **152**, 172 (1966).
 144. WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).
 145. WEKERLE, H., COHEN, I. R., FELDMAN, M.: Lymphocyte receptors for alloantigens, autologous serum inhibits self-recognition. *Nature N. B.* **241**, 25 (1973).
 146. WILSON, J. D.: The relationship of antibody-forming cells to rosetteforming cells. *Immunology* **21**, 233 (1971).
 147. WINZLER, R. J., HARRIS, E. D., PEKAS, D. J., JOHNSON, C. A., WEBER, P.: Studies on glycopeptides released by trypsin from intact human erythrocytes. *Biochemistry* **6**, 2195 (1967).
 148. WOLF, B., LAUSAROT, P. M., LESNAW, J. A., REICHMANN, M. E.: Preparation of polymerized protein markers and an investigation of their behaviour in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **200**, 180 (1970).
 149. WORTIS, H. H., COOPER, A. G., BROWN, M. C.: Inhibition of human lymphocyte rosetting by anti-T-sera. *Nature N. B.* **243**, 109 (1973).
 150. ZVILICHOVSKY, B., CALLOP, P. M., BLUMENFELD, O. O.: Isolation of surface sialoglycoproteins of human erythrocyte membranes. *Fed. Proc.* **30**, 1324 (1971).