

Kandidátusi értekezés

ld.

KÖLCSONHATASOK A T LIMFOCITÁK JELÁTVITELI RENDSZEREI KÖZÖTT:
A CINK IONOK SZEREPE

ld.

ld.

ld.

ld.

dr. Csermely Péter

ld.

d.

d.

d.

d.

d.

Tudományos vezető: Dr. Somogyi János

d.

d.

Kutatóhely: Semmelweis Orvostudományi Egyetem
1.sz. Kémiai-Biokémiai Intézete

d.

d.

Budapest

d.

1987

d.

d.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	1. old.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
2.1. A T limfociták aktivációjának kezdeti lépései	
2.1.1. Receptorok és receptorkötött folyamatok.....	3. old.
2.1.2. Az ionkoncentrációk változásai a T limfociták aktivációja során.....	6. old.
2.1.3. Változások a plazmamembrán lipidösszetételében a T limfociták aktivációja során.....	11. old.
2.1.4. A fehérje kinázok szerepe a T limfociták aktivációjában.....	12. old.
2.2. Kölcsönhatások a T limfociták jelátviteli rendszerei között.....	17. old.
3. CÉLKITÜZÉSEK.....	24. old.
4. MÓDSZEREK	
4.1. Sejtek izolálása és sejtkultúra elegyek.....	27. old.
4.2. Sejtfrakciók izolálása.....	28. old.
4.3. T limfociták és sejtfrakcióik elemi összetételének meghatározása	
4.3.1. Röntgenfluoreszcencia vizsgálatok.....	28. old.
4.3.2. Plazma emissziós spektrofotometria.....	30. old.
4.4. A kalcium ionok koncentrációjának és transzportjának mérése	
4.4.1. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció meghatározása.....	30. old.
4.4.2. ^{45}Ca felvétel és leadás mérése T limfocitákon.....	43. old.
4.5. Fluoreszcenciás vizsgálatok	
4.5.1. A23187 fluoreszcenciájának vizsgálata.....	45. old.
4.5.2. Emissziós anizotrópia mérése.....	45. old.
4.5.3. Tirozin, triptofán $\rightarrow$ A23187 energiatranszfer mérése.....	46. old.
4.6. Ca^{2+} - és foszfolipid-függő fehérje kináz (fehérje kináz C) aktivitásának meghatározása...	46. old.
4.7. 3H -forbol-dibutirát kötődés vizsgálata.....	52. old.

4.8.	³ H-uridin beépülés vizsgálata.....	53. old.
5. EREDMÉNYEK		
5.1.	Forbol észter hatása a nehézfémionok mennyiségére és megoszlására T limfocitákban	
5.1.1.	A nehézfémionok mennyiségének és megoszlásának röntgenfluoreszcenciás vizsgálata.....	55. old.
5.1.2.	A nehézfémionok mennyiségének és megoszlásának vizsgálata plazma emissziós spektrofotometriával.....	58. old.
5.2.	A nehézfémionok zavaró hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció fluoreszcenciás meghatározásában.....	63. old.
5.3.	Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásainak összefüggése a T limfociták aktivációjával	
5.3.1.	A Ca^{2+} szint emelkedése, mint aktiváló és gátló tényező.....	68. old.
5.3.2.	Limfociták intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja az emberi életkor határán.....	71. old.
5.4.	Forbol észter hatása a Ca-ionofórok működésére	
5.4.1.	Forbol észter gátolja a Ca-ionofórok által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedést és Ca^{2+} transzportot.....	73. old.
5.4.2.	Nhézfémionok szerepe a forbol észterek (diacil-glicerolok) és a Ca-ionofórok antagónizmusában.....	78. old.
5.4.3.	Forbol észter nem gátolja a Ca-ionofórok mozgékonyságát.....	80. old.
5.5.	Cink ionok hatása a Ca^{2+} - és foszfolipid-függő fehérje kináz aktivitására és lokalizációjára	
5.5.1.	Cink ionok hatása a fehérje kináz C aktivitására.....	87. old.
5.5.2.	Cink ionok hatása a fehérje kináz C forbol észter kötő képességére.....	91. old.
5.5.3.	Cink ionok hatása a fehérje kináz C reverzibilis membránkötődésére.....	92. old.
5.5.4.	Cink ionok szerepe a fehérje kináz C forbol észter és antigén által elősegített membránkötődésében.....	93. old.
6. ÖSSZEFOGLALÁS, AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE		
6.1.	A cink szerepe a Ca^{2+} ionokon alapuló másodlagos hírvivő rendszer és a fehérje kináz C enzimén keresztül megvalósuló aktivációs út kölcsönhatásaiban -- az eredmények összefoglalása.....	97. old.

7. A KÍSÉRLETES MUNKA TOVÁBBI IRÁNYAI..... 105. old.
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS
9. IRODALOMJEGYZÉK

ROVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BSA:	marha szérum albumin
Cai:	sejten belüli szabad Ca^{2+} koncentráció
Cao:	sejten kívüli Ca^{2+} koncentráció
CHAPS:	3-(3-kolamidopropil)-dimetilamino-propánszulfon-sav
DMSO:	dimetil-szulfoxid
DTPA:	dietilén triamin pentaecetsav
DTT:	dithio-treitol
EDTA:	etilén-diamin tetraecetsav
EGTA:	etilénglikol-bisz(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
Hepes:	4(2-hidroxietil)-1-piperazinszulfonsav
H-7	1-(5-izokinolin-szulfonil)-2-metil-piperazin
OAG:	oleoil-acetil-glicerol
PMSF:	fenil-metil-szulfonil-fluorid
TMB-8:	3,4,5-trimetoxi-benzoesav-8-dietilamino-oktil észter
TPA:	12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát
TPEN:	N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil)etiléndiamin

1. BEVEZETÉS

A szervezet immunrendszere rendkívül sokféle sejt működésének egymásraépülésével fejti ki hatását. A T (timusz eredetű) limfociták a sejtes, a B (burza eredetű) limfociták pedig a humorális immunválasz kialakításában vesznek részt.

Amennyiben a szervezetet fertőzés éri, azaz a véráramban idegen (vagy az immunrendszer által idegennek minősített) anyagok, antigének jelennek meg, az immunrendszer aktiválódása következik be. Sejtbiológiai szempontból ennek az aktiválódásnak az első szakasza a sejtdifferenciálódás rendkívül jó példájának tekinthető. T limfociták esetén e sejtdifferenciálódási szakasz második részében jónéhány sejtfelszíni receptor (pl. interleukin-2 receptor, transzferrin receptor, stb.) számának jelentős növekedése figyelhető meg. E receptorok és a hozzájuk kötődő anyagok (interleukin-2, transzferrin, stb.) nélkülözhetetlenek a T limfociták aktivációjához. Az aktiválódás következő szakaszában a differenciálódott sejtek rohamos osztódása következik be. A sejtek osztódását megelőző lépésként az RNS és DNS szintézise, illetve az ehhez szükséges prekursorok (uridin, timidin) fokozott felvétele tapasztalható. Értekezésem tárgyköre csak a T limfociták aktivációjának kezdeti, azaz az említett sejtfelszíni receptorok, pl. interleukin-2 receptor megjelenését megelőző lépéseire terjed ki.

A sejtek aktiválódásának biokémiai mechanizmusa számos elemében igen hasonló a különböző sejttípusok esetén. Jónéhány jelátviteli rendszer, így: a különböző ionoknak a sejten belül mérhető koncentrációja, több lipidnek a sejtmembránban előforduló mennyisége, illetve számos fehérje kináz aktivitása hasonlóképpen változik az egyes sejttípusok aktiválódása során. Mégis, az aktiválódás eredményeként a sejtek erőteljes differenciálódása figyelhető meg. Ennek a nagymértékű hasonlóságnak és mégis különbözőségnek a magyarázata egyelőre ismeretlen. Számos kutató csoport keresi azt a lépést (fehérjefoszforiláció, génkifejeződés stb.), amely az adott sejtet immár megfordíthatatlanul elkötelezi a sejtdifferenciálódás egyik, vagy másik irányába. Ugyanakkor legalább ilyen valószínűséggel elképzelhető az is, hogy mindkét kitüntetett lépés nélkül a különböző jelátviteli rendszerek bizonyult kölcsönhatása az, amelyik megszabja a sejtdifferenciálódás útját.

mechanizmusát más-más oldalról közelítik meg. Az immunológia főként a sejtek kölcsönhatását és az egyes sejtfelszíni receptorokat vizsgálja. A molekuláris biológia az aktiválódás során bekövetkező génkifejeződés szabályszerűségeit és mechanizmusát kutatja. A jelátviteli mechanizmusok kutatásával foglalkozó biokémikusok e két folyamatsorozat közötti láncszemeket igyekeznek felderíteni. A legutóbbi évek kutatásai során számos áttörő eredmény született az egyes immun-receptorok szerkezetének és biokémiai működésének a megismerésében, megértésében. Ugyanakkor a biokémikusok által felderített jelátviteli folyamatok és a génkifejeződés kapcsolatáról még igen kezdetlegesek az elképzeléseink. Bár a jelátviteli rendszerek egyikének-másikának elkülönített aktiválásával egy-egy fehérje szintézise szelektíven elősegíthető volt, bizonyosra vehető, hogy a génkifejeződés in vivo a jelátviteli rendszerek kölcsönhatásának eredményeként valósul meg.

A limfociták aktivációja során számos egy és kétértékű kation (így pl.: Na^+ , H^+ , Ca^{2+}) sejten belüli szabad koncentrációja megváltozik (ld. 2.1.2. fejezet). E folyamatokról való tudásunk azonban korántsem nevezhető lezártnak. Sem az ionkoncentrációk változásainak szerteágazó hatása nem tisztázódott még kellőképpen, sem a felsorolt ionok listája nem tekinthető teljesnek.

A cink ionok részvételét a limfociták aktivációjában már a hetvenes évek elején felismerték (Alford, 1970). A cink ionok szerepe számos fehérje DNS-hez való kötődésében feltételezett, illetve bizonyított (Berg, 1986/a-b; Sabbah és mtsai, 1987). A DNS, RNS szintézisben résztvevő enzimek közül jónéhány (DNS-, RNS-polimeráz, timidin kináz, stb.) cinket tartalmaz. A cink ion jelenléte számos esetben az enzim aktivitásához nélkülözhetetlennek bizonyult (Slater és mtsai, 1971; Yarom és mtsai, 1976). Így a cink ionok mennyiségében, koncentrációjában bekövetkező változások hatást gyakorolhatnak a génkifejeződés sebességére és specificitására.

A fentiek alapján az egyes jelátviteli rendszerek kölcsönhatásainak pontosabb ismerete elengedhetetlennek tűnik az immunrendszer működésének, illetve a sejtdifferenciálódási folyamatoknak a mélyebb megismeréséhez. Különös jelentőségre tehetnek szert azok a kutatások, amelyek az eddig ismert jelátviteli rendszerek kapcsolatát egy olyan szempontból vizsgálják, amely elvezethet a génkifejeződés szabályozásának pontosabb megértéséhez is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A T limfociták aktivációjának kezdeti lépései

A T limfociták aktivációja a T sejt receptor, illetve az újabban felfedezett, alternatív aktivációs utakat jelentő receptorok közvetítésével valósul meg. A receptorok aktiválódása változásokat okoz a sejten belüli ionkoncentrációkban, a plazma-membrán lipidösszetételében és számos fehérje kináz működésében. Az alábbiakban e változások rövid ismertetése következik.

2.1.1. Receptorok és receptorkötött folyamatok

A T limfociták tulajdonképpen a "szervezet karácsonyfájának" tekinthetők. Kis túlzással azt mondhatjuk, hogy kevés olyan hormon, vagy más, sejtközüti hatóanyag akad, amelyről sikerült azt bebizonyítani, hogy a T limfocita nem tartalmaz rá specifikus receptort (ld. 1. táblázat).

A T sejt receptor és a CD2 alternatív aktivációs út

A T limfociták immun-működése szempontjából azonban azok a receptorok a legfontosabbak, amelyek aktiválása a limfocita egészségének az aktiválódását vonja maga után. Jelenlegi ismereteink szerint a T limfociták aktiválódása alapvetően két úton következhet be: a CD3 (T3-Ti, egér esetén: T sejt receptor, TCR) receptoron és a CD2 (T11, Leu-5, E receptor, egér esetén: Thy-1) receptoron keresztül (Parnes, 1987). A T limfociták aktivációs utainak a száma az utóbbi időkben tovább gyarapodott. Yeh és mtsai (1987) egér T limfociták esetén egy harmadik aktivációs utat fedeztek fel, amely egy, a Ly-6 génhez tartozó, 10-12 kD molekulatömegű fehérje közreműködésével valósul meg. Egy újabb aktivációs útra mutathatnak rá Fleischer (1987) adatai, amelyek egy 103 kD molekulatömegű fehérjéről bizonyították be, hogy a humán limfociták aktivációjának kiindulópontjául szolgálhat.

A CD3 receptor, vagy más néven humán T sejt receptor öt fehérje alegységből áll. A receptor α és β alegysége az antigénprezentáló sejt (makrofág) felszínén lévő MHC-antigén komplex kötésére szolgál. Az α és β alegység génjei az immunoglobulinok nagy gén családjába tartoznak, így mindkét alegység egy-egy állandó és változó részből tevődik össze. A humán T sejt receptort alkotó három további alegység az előző 40-45 kD molekulatömegű fehérjéknél kisebb: a γ , δ és ϵ alegységek molekulatömege rendre 25, 20 és 20 kD. Az α és β alegységet diszulfid-hidak, a β és ϵ alegységet pedig erős hidrofób kölcsönhatások tartják össze (Parnes, 1987).

Az egér T sejt receptor esetén az α és β alegység mellett nem öt, hanem hét másik alegység található: a 26 kD δ , a 25 kD ϵ alegység, a humán γ alegység homológjának számító 21 kD molekulatömegű glikozilált alegység, egy nem glikozilált, 21 kD össztömegű dimer és egy 16 kD homodimer (Samelson és mtsai, 1986).

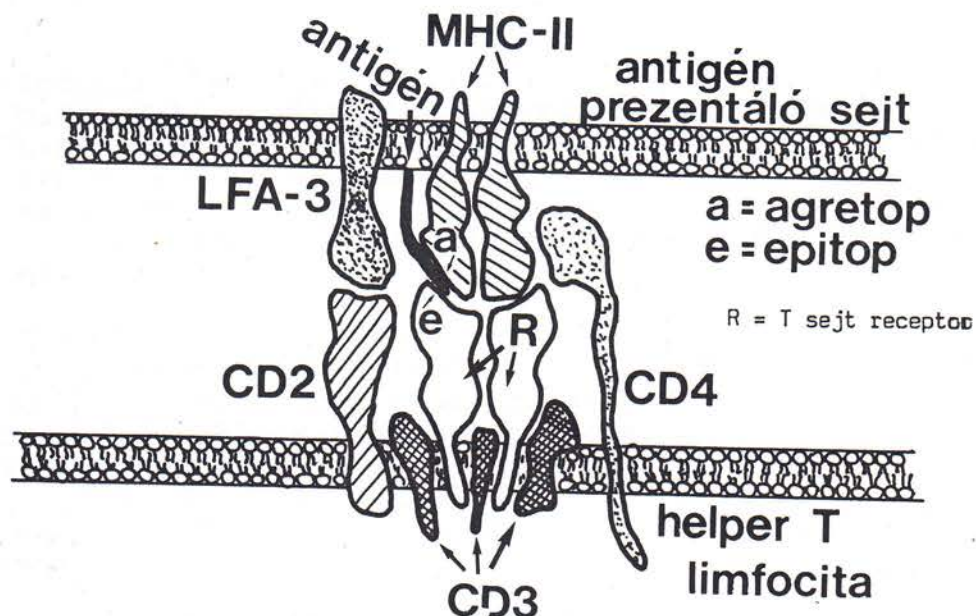
1. táblázat

A T limfociták sejtközötti hatóanyagokra specifikus receptorai (példák)

Receptor	Irodalmi hivatkozás
CD3 (T sejt receptor)	Parnes, 1987
CD2 (alternatív aktiválás)	Milanese és mtsai, 1986
CD8 (MHC I specifikus)	Parnes, 1987
CD4 (MHC II specifikus)	Parnes, 1987
interleukin 1	Dower és Urdal, 1987
interleukin 2	Greene és Leonard, 1986
CD9 (transzferrin)	Larrick és Cresswell, 1979
inzulin	Helderman, 1984
glükokortikoid hormon	Smith és mtsai, 1977
tiroid hormon	Segal és Ingbar, 1986
androgén receptor	Kovacs és Olsen, 1987
opiát receptor	Puppo és mtsai, 1985
szomatosztatin	Mascardo és mtsai, 1984
"substance P"	Payan és mtsai, 1983
vérlemezke-aktiváló faktor	Patrignani és mtsai, 1987
lipoprotein	Curtiss és Edgington, 1978

A limfocita-aktiváció alternatív útját jelentő CD2 receptor egy 50 kD molekulatömegű, egyláncú glikoprotein, amely korábban a birka-vörösvértest rozettát képző receptoraként volt ismeretes. E receptoron keresztül a T limfociták nem antigén specifikus aktiválása valósítható meg. Az aktiválás eredményeként a sejtfelszíni CD2 receptorok mennyisége 6-7-szeresére nő. A CD2 és a CD3 receptor közeli kölcsönhatásban állhat egymással, hiszen a CD3 receptor ellen termeltetett monoklonális antitestek egy része képes megakadályozni a CD2 aktiválását (Parnes, 1987). Ugyanakkor Milanese és mtsai (1986) a T limfociták CD3 receptoron keresztül történő (antigén specifikus) aktivációja során egy olyan fehérje eleresztését figyelték meg, amely a CD2 receptor nem antigén specifikus aktivációjához vezetett. Így a CD2 receptoron keresztül megvalósuló aktivációs út az antigén specifikus aktivációt felelősítő mechanizmus is lehet.

Az antigén-specifikus aktiváció során az antigén agretop-jával az antigén-prezentáló sejten található MHC I, vagy II komplexhez, epitop-jával pedig a T sejt receptorhoz köt (Schwartz, 1987). Az antigén-prezentáló sejt és a T limfocita között még egy "híd" teremtet kapcsolatot, amely az MHC komplex és a T limfocitán lévő CD4 (egér esetén: L3T4), illetve CD8 (egér esetén: Lyt-2,3) antigén között létesül. Az MHC I komplex kötésére a CD8, az MHC II típusú komplex kötésére pedig a CD4 sejtfelszíni antigén képes (ld. 1. ábra). A CD4 antigénnel rendelkező T limfociták általában "helper", a CD8 antigénnel rendelkezők pedig citotoxikus sajátágúak. A CD4 antigén kutatása a közelmúltban szomorú aktualitást nyert, hiszen e molekulát tartják az AIDS-t okozó HTLV-III vírus (egyik) receptorának (Parnes, 1987).



1. ábra A T limfociták és az antigén prezentáló sejtek kölcsönhatásai

Breitmeyer, 1987; Parnes, 1987, valamint Schwartz, nyomán.

A T limfociták aktiválásának igen gyakran alkalmazott eszközei a mitogén hatású lektinek, a Concanavalin A és a PHA. Az elmúlt években e lektinekről sorra bebizonyosodott, hogy a T sejt receptorral való asszociációra képesek, így elképzelhető, hogy hatásukat (legalábbis részben) az előzőekben ismertetett aktivációs úton fejtik ki (Sitkovsky és mtsai, 1984; Chilson és mtsai, 1984).

A receptorhoz szorosan kötődő jelátviteli folyamatok

Mind a CD2, mind a CD3 receptor aktiválódását a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció növekedése kíséri. Igaz ugyan, hogy e koncentráció növekedés jelentős része a sejten belüli Ca^{2+} -raktárakból származik (Imboden és mtsai, 1987; valamint 2.1.2. fejezet), de számos szerző a receptorhoz kötött Ca^{2+} -csatorna létét is feltételezi (Parnes, 1987).

Az aktiválódás következményeként a CD3 receptor többrendbeli foszforilációja zajlik le. A humán receptor γ és δ alegységét a fehérje kináz C enzim foszforilálja (Parnes, 1987). Az egér T sejt receptor glikozilált 21 kD alegysége szerint oldalláncokon, a nem glikozilált 21 kD heterodimer pedig tirozin oldalláncokon foszforilálódik az aktiváció hatására (Samelson és mtsai, 1986). E foszforilációs lépések következményei, funkciója ma még nem tisztázott.

A CD3 receptor a legújabb kutatások szerint (Cockroft, 1987; Mustelin, 1987) egy GTP-kötő fehérjével áll szoros kölcsönhatásban. A receptor aktiválódását követően a fehérjéhez kötött GDP GTP-re cserélődik, a GTP-kötő fehérje α alegysége a β - γ dimerről leválik és aktiválja a foszfatidil-inozitol (illetve foszfatidil-inozitol-bisz-foszfát, PIP_2) specifikus foszfodiészterázt. A foszfodiészteráz a PIP_2 -t inozitol-triszfoszfátra (IP_3) és dia-

cil-glicerolra hasítja. Az IP₃ az endoplazmás retikulumból Ca²⁺-ot szabadít fel; a diacil-glicerol pedig a fehérje kináz C aktiválásában játszik szerepet (ld. 2.1.2.-2.1.4. fejezet). A CD3 receptorhoz kötött GTP-kötő fehérje különbözik az adenilát ciklázt szabályozó, illetve a retina sejtjeiben megtalálható, valamint az inzulin receptorral asszociált GTP-kötő fehérjétől (Cockroft, 1987).

A GTP-kötő fehérjék regulációjában is számos foszforilációs lépés játszik szerepet. A fehérje kináz C a gátló hatású GTP-kötő fehérje α alegységének foszforilálásával e fehérje hatásának a megszüntetésére képes (Bauer és Jakobs, 1986); az inzulin receptor aktiválása pedig az α alegység tirozin-foszforilációjához vezet (O'Brien és mtsai, 1987). E foszforilációs lépések funkciójának és jelentőségének a feltárása is a legutóbbi időkben kezdődött meg.

2.1.2. Az ionkoncentrációk változásai a T limfociták aktivációja során

Na⁺ és K⁺

A limfociták aktivációját a sejtmembránon keresztüli Na⁺ és K⁺ fluxusok igen erőteljes növekedése kíséri (Szamel és mtsai, 1983 és az ott idézett közlemények). A Na⁺ beáramlásának az elsődleges oka a Na⁺/H⁺-csere rendszer aktiválódása, amely a fehérje kináz C általi foszforilációra vezethető vissza (Isakov és mtsai, 1986).

A K⁺ ionok fluxusának növekedését egyesek a Na⁺-K⁺-ATPáz enzim aktiválódása következményének tartják (Tandon és mtsai, 1983 valamint az ott idézett közlemények). Számos szerző szerint az enzim aktiválódása azonban csak másodlagos jelenség, amely a Na⁺/H⁺-csere rendszer aktiválódásából fakad (Macara, 1985). A Na⁺/H⁺-csere rendszer működésétől az enzim aktiválódása limfocitákban független lehet, hiszen a Na⁺/H⁺-cserét aktiváló forrás szterrel (Isakov és mtsai, 1986) a Na⁺-K⁺-ATPáz enzim aktivációja nem váltható ki (Kövecses, M., Csermely, P., Szamel, M. és Somyi, J. közlemény előkészületben).

A laboratóriumunkban folyó korábbi kutatások eredményei szerint ugyanakkor a Na⁺-K⁺-ATPáz a Concanavalin A mitogén-receptorral szoros kölcsönhatásban áll. Ezt igazolja együtt való izolálhatóságuk különböző affinitás-kromatográfiás eljárások segítségével, valamint az a tény, hogy a limfociták stimulációja a Na⁺-K⁺-ATPáz szelektív gátlószerével, a ouabainnal gátolható (Szamel és mtsai, 1980, 1981, 1985, 1987). Így a Na⁺-K⁺-ATPáz enzim aktivációja a receptor aktiválódásának közvetlen következménye lehet.

A Na⁺ ionok sejten belüli koncentrációját befolyásoló ellentétes hatások miatt (beáramlás a Na⁺/H⁺-csere rendszeren keresztül és kipumpálás az aktivált Na⁺-pumpával) sokáig vitatott volt, hogy ténylegesen változik-e ez a koncentráció a limfociták aktivációja során (Szamel és mtsai, 1981). A Na⁺ koncentrációjának megváltozását a membránpotenciál változása kell, hogy kísérje. A membránpotenciálnak a limfociták aktivációja során bekövetkező változásairól ellentmondásos adatok láttak napvilágot: a különbö-

reszcens, Na^+ szelektív indikátor segítségével vizsgálták. Ezzel az új módszerrel a sejten belüli Na^+ koncentráció egyértelmű növekedését mutatták ki a limfociták aktivációja során (R.T. Hesketh, személyes közlés).

H^+

A T limfociták aktivációja során a Na^+/H^+ -csere rendszer aktivációja zajlik le. Ez a sejten belüli pH megnövekedéséhez vezet. A növekedés mértéke kb. 0.1-0.15 pH egység (Isakov és mtsai, 1986).

Jelenlegi tudásunk birtokában nehéz választ adni arra a kérdésre, hogy az egyértékű kationok koncentrációjának az aktiváció során bekövetkező változása a limfociták aktivációjának szükséges feltétele, vagy csak kísérő jelensége. Az a tény, hogy a limfocita-aktiváció mind a Na^+/H^+ -csere rendszer inhibitorával, az amiloriddal, mind a $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPáz}$ inhibitorával, a ouabainnal gátolható (Macara, 1985; Szamel és mtsai, 1980), arra utal, hogy az ionkoncentrációk megváltozása szükséges feltétel. Ugyanakkor az amiloridról bebizonyosodott, hogy a Na^+/H^+ -csere rendszernek távolról sem szelektív gátlószere (Macara, 1985); a ouabain pedig a limfociták stimulációját egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban képes gátolni annál a koncentrációnál, amennyi a $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPáz}$ enzim gátlásához szükséges nyugvó sejtek esetén (Szamel és mtsai, 1981).

Ca^{2+}

Megbízható módszerek hiányában a limfociták intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának meghatározása sokáig nehézségekbe ütközött. Így, azon korai megfigyelések ellenére, amelyek a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételének növekedéséről számoltak be, sokáig nem született elfogadható válasz arra a kérdésre, hogy növekszik-e a limfociták intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja aktivációjuk alkalmával (Campbell, 1983). A kérdésre a választ a Tsien és munkatársai által kifejlesztett fluoreszcens mérési technika segítségével lehetett megadni (Tsien, 1980, 1981, Tsien és mtsai, 1982/a). Azóta számos kutatólaboratóriumban igazolták, hogy a limfociták sejten belüli Ca^{2+} koncentrációja mind mitogén lektinokkal, mind antigénnel történő aktiválás esetén a nyugalmi kb. 100 nM-os értékről kb. 200-500 nM-ra nő meg.

A Ca^{2+} -koncentráció növekedésének ismeretében a következő kérdés amit feltehetünk: mi az a mechanizmus, ahogyan a receptor aktiválódása e koncentrációnövekedéshez vezet? A receptorkötött folyamatokat a 2.1.1. fejezetben a GTP-kötő fehérje aktiválódásáig kísértük figyelemmel. Az aktiválódás hatására e fehérjéről leváló α alegység egy foszfatidil-inozitol (PI) specifikus foszfo-diészterázt aktivál (Cockcroft, 1987).

E foszfodiészteráz enzim aktivitása a Ca^{2+} koncentráció függ-

vénye. Sokáig csak a fiziológias körülményektől távoli tartományban, mM-os Ca^{2+} koncentráció esetén aktív alakot találták meg. Később kitudt, hogy az enzim e formájából limitált proteolízissal a fiziológias, szubmikromoláris Ca^{2+} koncentrációk esetén is aktív forma keletkezhet (Hirasawa és Nemoto, 1986). Azóta az enzimnek mind membránkötött, mind citoszolikus formáját kimutatták. Mindkét sejtfrakció számos izoenzimet tartalmaz, amelyek egymástól pH optimumukban, foszfatidil-inozitol mono-, illetve bisz-foszfátra (PIP, ill. PIP_2) mutatott specificitásukban, illetve Ca^{2+} -aktiválhatóságukban különböznek (Kamisaka és mtsai, 1986; Wang és mtsai, 1986; Carter és mtsai, 1986; Carter és Smith, 1987). Az egyes izoenzimek egymáshoz való viszonyát, illetve a limfociták aktivációjában való részvételük mértékét és módját még nem sikerült tisztázni.

Ezen foszfodiészteráz izoenzimek általános tulajdonsága azonban, hogy a fiziológias Ca^{2+} koncentrációtartományban (10^{-7} M) inkább a PIP_2 , semmint a PIP hidrolízisét katalizálják. A hidrolízis diacil-glicerol és inozitol-triszfoszfát (IP_3) keletkezéséhez vezet. Az IP_3 endoplazmás retikulumbeli receptoraihoz (Spät és mtsai, 1986) kapcsolódva az ott tárolt Ca^{2+} egy részét felszabadítja. Az IP_3 hatásmechanizmusát jelenleg inkább egy receptorkötött Ca^{2+} -csatorna megnyitásának, semmint valamilyen közben-ső lépés --pl. IP_3 -specifikus fehérje kináz, GTP, stb.-- segítségével lezajló folyamatnak gondolják (Putney, 1987). Mindazonáltal a GTP önmagában is képesnek tűnik a tárolt Ca^{2+} egy részének eleresztésére (Chueh és mtsai, 1987).

Az IP_3 -nak az először felismert (1,4,5) IP_3 formáján kívül még számos izomerje, metabolitja létezik. Hasonló hatékonyságú a ciklikus (1:2,4,5) IP_3 . Mivel a Ca^{2+} hosszabb időn keresztül magas (több mint 10^{-5} M-os) koncentrációja a sejtek számára toxikus, (Campbell, 1983) az IP_3 "hatástalanítására" a szervezetnek hatékony mechanizmusokkal kell rendelkeznie. A hatástalanítás egyik módja az "inozitol-ciklus", amely az IP_3 inozitollá való fokozatos defoszforilálásából és a keletkező foszfatidil-inozitol PIP_2 -vé való foszforilálásából áll. A folyamatsorozatban az inozitol-1-foszfátból inozitol keletkezését katalizáló enzimet Li^+ -mal szelektíven gátolni lehet, ezt a tényt gyakran alkalmazzák az inozitol-foszfátok mennyiségének mérhetővé tételére (Berridge, 1984). A hatástalanítás másik útja lehet az a nemrégiben felfedezett reakció, amellyel az (1,4,5) IP_3 először (1,3,4,5) IP_4 -gyé, majd (1,3,4) IP_3 -má alakul. A két utóbbi inozitolfoszfát ugyanis a Ca^{2+} eleresztését az (1,4,5) IP_3 -nál csak jóval kisebb mértékben tudja elősegíteni (Putney, 1987).

A sejten belüli Ca^{2+} koncentráció megnövekedésének az endoplazmás retikulumból kiáramló Ca^{2+} csak egyik forrása. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció tartós megemelkedését a sejt a sejten kívüli Ca^{2+} beeresztésével biztosítja. E Ca^{2+} beáramlás mechanizmusa mind a mai napig nem teljesen tisztázott. A 2.1.1. fejezetben szó esett az egyik lehetséges mechanizmusról: a receptorkötött Ca^{2+} csatornákról. Néhány kutató feltételezése szerint a citoszol Ca^{2+} szintjének növekedése csak az endoplazmás retikulumban tárolt Ca^{2+} mobilizálásából fakad. A sejten kívüli Ca^{2+} szerepe ezen elképzelések szerint csak az endoplazmás retikulumbeli raktárak feltöltése lenne (Putney, 1987).

A fentiekben láthattuk, hogy az IP_3 "hatástalanítására" bizonyult folyamatsorozat szerveződött. Amennyiben a Ca^{2+} túlzottan magas koncentrációja a sejt halálához vezet, nem csak felszabadulásának, de aktuális koncentrációjának is hatékony szabályozása kell, hogy legyen. A Ca^{2+} homeosztázis fenntartásában a plazmamembránban, az endoplazmás retikulumban és a mitokondriumban található Ca^{2+} -pumpa rendszerek vesznek részt. A mitokondriális Ca^{2+} -pumpa rendszerek kapacitása nagy, de működésük csak magasabb ($0.7-1.0 \mu M$ feletti) Ca^{2+} koncentráció esetén lesz számottevő (Campbell, 1983). A T limfociták viszonylag kis mennyiségű endoplazmás retikulumot tartalmaznak. Talán ezzel is magyarázható, hogy az endoplazmás retikulumban, illetve a plazmamembránban található Ca^{2+} -pumpa rendszerek elkülönítése T limfociták esetéig eddig nem sikerült. Mindazonáltal a limfociták aktivációjának esetén a $^{45}Ca^{2+}$ fluxusok korábban említett megnövekedésével összhangban a limfocita Ca^{2+} -ATPáz számottevő aktivitásnövekedését lehetett kimutatni (Averdunk és Günther, 1980).

Az eddigiekben az aktiváció során megnövekedett sejten belüli Ca^{2+} koncentráció keletkezéséről és szabályozásáról esett szó. A következő kérdés, amit feltehetünk: mit okoz, milyen folyamatok aktiválják ez a koncentrációnövekedés? Sajnos az értekezés terjedelme nem teszi lehetővé az e kérdésre adható akárcsak vázlatos válasz ismertetését sem. Néhány kiragadott példa: a megnövekedett Ca^{2+} koncentráció hatására aktiválódik a lipid metabolizmus számos kulcsenzimje (ld. 2.2.3. fejezet) és jónéhány fehérje kináz (ld. 2.2.4. fejezet). A kalmodulin segítségével az adenilát cikláz, a ciklikus nukleotid foszfodiészteráz, a kalcineurin, a Ca^{2+} -aktivált neutrális proteáz, a plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz aktiválódását írták le különböző szövetekben. A Ca^{2+} -kalmodulin szerepet játszik a mikrotubulin-asszociált fehérjék, a dinein ATP-áz, a fodrin, a kaldezmón, a gelsolin, a villin és a fragmin, azaz a mikrotubuláris és mikrofilamentáris rendszer működésében Ca^{2+} -aktivált enzimek pl.: a piruvát dehidrogenáz-foszfátáz, a NAD⁺ : izocitrát dehidrogenáz, a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz és az α -ketoglutarát dehidrogenáz, stb. (Campbell, 1983; Exton 1986).

Végezetül azt a kérdést kell megválaszolni, hogy a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció emelkedése szükséges és elégséges szükséges, de nem elégséges, vagy csupán velejáró tényezője a limfociták aktivációjának. A sejten belüli Ca^{2+} koncentráció emelése semmiképpen sem lehet szükséges és egyben elégséges feltétel, hiszen a Ca -ionofórok csak viszonylag gyenge mitogén hatással rendelkeznek. Ugyanakkor arra, hogy a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció növekedése a limfociták aktivációjának szüksége feltétele, egyre több megfigyelés utal:

- az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció $100 \mu M$ alá való csökkentése esetén a limfociták aktivációja nem következik be (Whitney és Sutherland, 1972; Abboud és mtsai, 1985);
- La^{3+} és a Ca^{2+} -csatorna blokkoló D-600 meggátolja a limfociták aktivációját (Campbell, 1983);
- újabb vizsgálatok tanulsága szerint a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció azon esetekben is emelkedik, amelyeket régebben éppen a Ca^{2+} szükségessége elleni bizonyítéknak hozták fel: pl. forbol-észterek hatása esetén (Klip és mtsai 1984; Ware és mtsai, 1985; Erne és mtsai, 1987).

Nehézfémionok

A nehézfémionok szerepét a limfociták aktivációjában már a hetvenes évek legelején felismerték (Alford, 1970). Arslan és mtsai (1985), valamint az 5.1. fejezetben bemutatott saját eredményeink alapján a T limfocitákban a leggyakrabban előforduló nehézfémek (csökkenő gyakoriságban): a cink, a vas és a réz. Így a továbbiakban e három fémnek a T limfociták aktivációjában betöltött lehetséges szerepe kerül vázlatos bemutatásra.

Cinkhiányos állapotban az immunfunkciók szinte kivétel nélkül csökkennek, visszaszorulnak (Fraker és mtsai, 1986). Cink ionok számos, a limfociták stimulációjában résztvevő enzim működéséhez nélkülözhetetlenek, illetve ezen enzimek aktivációját okozzák. Így a cink ionok szerepét kimutatták a DNS- és RNS-polimeráz, valamint a timidin kináz működésében (Slater és mtsai, 1971; Yarom és mtsai, 1976). Ujabban cink ionok jelenlétét feltételezik a IIIA fehérje transzkripció faktorban (Diakun és mtsai, 1986), valamint jónéhány hormonreceptor esetén (kortizol, ösztadiol, tiroid hormon receptorok; Weinberger és mtsai, 1986; Sabbah és mtsai, 1987). A cink szerepe különböző fehérjék és nukleinsavak kapcsolódásában általánosan is megfogalmazódott: Berg (1986/a-b) elmélete szerint a nukleinsavakhoz kötődő fehérjék egy speciális, ciszteincsoportokból összetevődő cink kötőhelyet, az ún. "cink-ujj"-at tartalmazzák. (Az elnevezés a Ca^{2+} kötőhelyekre született "E-F -hand" analógiájára született: "zinc-finger".) Különleges érdeklődésre tarthat számot az a tény, hogy ezen "cink-ujj" jelenlétét a limfocita jelátviteli mechanizmus egyik kulcsenzimében, a fehérje kináz C-ben is igazolták (Parker és mtsai, 1986).

Cink hiányában tehát a limfociták aktivációja nem következik be. Ennek egyik oka minden bizonnyal a fentiekben felsorolt számos enzim működésének a zavarában kereshető, keresendő. Mindazonáltal a T limfociták aktivációja során a cink ionok eloszlásának, koncentrációjának változásairól és ezzel összefüggésben a cink-tartalmú enzimek működésének módosulásairól eddig nincsenek adataink.

A vas szerepét is korán felismerték a limfociták proliferációjában (Alford, 1970; Bryan és Leech, 1983). A fém fontosságát szelektív komplexképzőjével, a deferoxaminnal végzett kísérletek fokozottan alátámasztották (Lederman, 1984). A proliferációs folyamatokban fontos szerepet játszó fehérjék közül a ribonukleotid reduktáz működéséhez az enzim vastartalma nélkülözhetetlen (Sato és mtsai, 1984). A vas felvételére a sejt külön rendszert épített ki a transzferrin/transzferrin receptor kettős révén. A transzferrin receptor egyike a legmobilisabb receptoroknak: a felszíni receptorok száma számos ágenssel (szérum, inzulin, IL-GF, IL-1, PDGF) növelhető (Ward és Kaplan, 1986), más anyagok (forbol észterek, A23187, IFN_γ) viszont számuk csökkenését idézik elő (Kohno és mtsai, 1986; Weiel és mtsai, 1985).

A réz szerepe kevésbé tisztázott a limfocita stimuláció folyamatában. Az irodalomban mind szükségességéről, aktiváló hatásáról (Flynn, 1985), mind az általa okozott proliferáció gátlásáról (Anderson és Tomasi, 1984) találhatók adatok. A jelátviteli folyamatokban szerepet játszó enzimek közül a guanilát ciklázról bizonyították be, hogy rezet tartalmaz (Gerzer és mtsai, 1981).

2.1.3. Változások a plazmamembrán lipidösszetételében a T limfociták aktivációja során

Foszfatidil-inozitol metabolizmus

Mint ahogyan az már a 2.1.2. fejezetben ismertetésre került, a limfociták aktivációja során a T sejt receptorral kölcsönhatásba kerülő foszfodiészteráz enzim a foszfatidil-inozitol-bisz-foszfátot (PIP₂-t) és kisebb mértékben a foszfatidil-inozitolt, illetve annak monofoszfátját diacil-glicerolra, illetve a megfelelő inozitol-foszfátokra hasítja (Berridge, 1984). Az inozitol-foszfátok egymásba való átalakulásáról, illetve a foszfatidil-inozitol foszforilálását biztosító "inozitol-ciklusról" az előző fejezetben esett szó.

A foszfodiészterázos hasítás másik terméke, a diacil-glicerol a Ca²⁺- és foszfolipid-függő fehérje kináz (fehérje kináz C) aktiválásában játszik szerepet (ld. 2.1.4. fejezet). A diacil-glicerol mennyiségét két folyamat szabályozza. Az egyik során a diacil-glicerol kináz a diacil-glicerolt foszfatidsavvá foszforilálja, amely egyes elképzelések szerint CDP-diacil-glicerolként a foszfatidil-inozitol re-szintézisére használná fel. A diacil-glicerol "hatástalanításának" másik útja a diacilglicerol lipázok által történő emésztése, amely során szabad zsírsavak és monoacil-glicerol keletkezik (Feinstein és Sha'afi, 1983).

Az arachidonsav-kaszád

Az arachidonsavból a lipoxigenáz, illetve a ciklooxygenáz útvonalon számos, nagyon erőteljes hatással bíró vegyület, így prosztaglandinok, tromboxánok és leukotriének keletkezhetnek. Bár a limfocitákban keletkezésük mértéke pl. a makrofágok, vagy a neutrofilek esetében tapasztaltnál jóval kisebb (Wedner, 1984), így is igen jelentős szabályozó szerepet töltenek be az immunfolyamatokban. A prosztaglandinszármazékok elszaporodása esetén a T limfociták proliferációja visszaszorul és viszont: a T limfociták aktivációja saját prosztaglandin termelésük visszaszorulásához vezet (Aussel és mtsai, 1987).

Az arachidonsav két fő úton keletkezhet. Az egyik az előbb ismertetett diacil-glicerol lipáz által történő emésztés, ugyanis a foszfatidil-inozitoltok (és így a belőlük keletkezett diacil-glicerolok is) 2-es pozíciójukban, amely a lipáz támadáshelye, nagy százaléokban arachidonsavat tartalmaznak. Az arachidonsav felszabadulásának másik fő útja a foszfatidil-inozitol foszfolipáz-A₂-vel való emésztése (Feinstein és Sha'afi, 1983).

Az előbb ismertetettekkel összhangban a T limfocitákban a foszfolipáz-A₂ aktivitása viszonylag kicsi (Trotter és mtsai, 1982; Goppelt-Strübe és mtsai, 1986; Aussel és mtsai, 1987). Így az arachidonsav felszabadulása mellett annak az acil-CoA:lizolecitin aciltranszferáz általi cseréje, sőt beépítése zajlik le a T limfociták aktivációja esetén (Szamel és mtsai, 1981; Trotter és mtsai, 1982; Behl és mtsai, 1987).

Változások a plazmamembrán fluiditásában

A T limfociták plazmamembránjában lévő acil-CoA:lizolecitil aciltranszferáz a többszörösen telítetlen zsírsav-CoA-kra nagy specificitást mutat. Az enzim aktivitása 2-3-szorosára nő a T limfociták aktivációjának egyik első lépéseként (Szamel és mtsai, 1981). Így az enzim működésének eredményeképpen nemcsak a szabad arachidonsav mennyisége csökken a limfociták aktivációja során, hanem a plazmamembrán feldúsul telítetlen zsírsavakban. Ezáltal a membrán fluiditása megnő (Goppelt-Strübe és Resch, 1987).

A Na^+ - K^+ -ATP-áz szelektív gátlószere, a ouabain képes meggátolni az acil-CoA:lizolecitil aciltranszferáz a limfociták aktivációja során bekövetkező aktiválódását (Szamel és mtsai, 1981). Ez arra utal, hogy az enzim mind a mitogén receptorral, mind a Na^+ - K^+ -ATP-ázzal szoros kölcsönhatásban áll.

Foszfolipid metiláció

Hirata és Axelrod (1980) a hetvenes évek végén fejlesztette ki a foszfatidil-etanolamin enzimatiszus metilezésén alapuló elméletét. Elképzelésük szerint a sejtek (ezen belül: a T limfociták) aktivációja során a foszfatidil-etanolamin (PE) sorozatos metilezés következtében foszfatidil-kolinná (PC-vé) alakulna át.

Hipotézisük azonban néhány, később megismert kísérleti ténnyel ellentmondásba került (csak az eddig felsoroltak közül: a lizolecitil-aciltranszferázzal kapcsolatos kísérletekben a $\text{PC} \rightarrow \text{PE}$ átalakulást lehetett kimutatni --Trotter és mtsai, 1982--; a feltételezett $\text{PE} \rightarrow \text{PC}$ átalakulás következtében a membrán fluiditásának nem növekednie, de csökkennie kellene --Goppelt-Strübe és Resch, 1987--).

2.1.4. A fehérje kinázok szerepe a limfociták aktivációjában

Fehérje kináz C

A hetvenes évek végén Nishizuka és munkatársai egy ciklikus nukleotidoktól független fehérje kinázt és annak Ca^{2+} -függő proteolízissel aktivált formáját mutatták ki az agyszövetben (Inoue és mtsai, 1977). Későbbi kutatásaik során bebizonyították, hogy a holoenzimet Ca^{2+} és foszfolipidek együttesen képesek aktiválni (Takai és mtsai, 1979). A Ca^{2+} - és foszfolipid függő fehérje kináz (fehérje kináz C) jelentőségének felismerésében az első áttörés akkor következett be, amikor bizonyítást nyert, hogy az enzimet a foszfatidil-inozitol hidrolízise során keletkező diacyl-glicerolok jelentős mértékben aktiválni képesek. Így a fehérje kináz C aktiválódása a receptorkötött foszfodiészteráz aktivációjának közvetlen következményévé vált (Nishizuka, 1984). Az enzim biokémiai jelentőségének felismerése után a sejtbiológiai és orvostudományi kutatásoknak akkor vált különösen érdekes elemévé, amikor kiderült, hogy a széleskörben ismert tumor promoterek, a forbol észterek a fehérje kináz C szelektív és igen hatékony aktiválószerai (Castagna és mtsai, 1982).

A T limfocitákban található fehérje kináz C-t diacyl-gli-

cerolokat nem tartalmazó foszfolipidek jelenlétében 0.1-1 mM Ca^{2+} -mal lehet teljes mértékben aktiválni. Diacil-glicerolok jelenlétében az enzim maximális aktivitása az előző érték többszörösére nő meg és az optimális Ca^{2+} koncentráció pedig 1-10 μM körüli értékre csökken. A diacil-glicerolok közül a többszörösen telítetlen 1,2-dióleil-glicerol az enzim leghatékonyabb aktivátora, a foszfolipidek hatékonysága pedig a foszfatidil-kolin < foszfatidil-etanolamin < foszfatidil-inozitol < foszfatidil-szerin sorrendben, azaz a lipidek negatív töltésének sorrendjében nő (Ogawa és mtsai, 1981; Ku és mtsai, 1981). Hannun és Bell (1986) szerint a fehérje kináz C aktiválásához legalább négy molekula foszfatidil-szerinre (PS-re) van szükség. Feltételezésük szerint az enzim először a Ca^{2+} PS-komplext köti meg, majd az enzimnek ezen "előaktivált" formája képes a diacil-glicerol (forbol észter) kötésére.

A fehérje kináz C két doménből, a katalitikus és a szabályozó doménből épül fel. A katalitikus domén tartalmazza az enzim ATP-kötő aktív centrumát, a szabályozó domén pedig a különböző aktivátorok (Ca^{2+} , foszfatidil-szerin, diacil-glicerol) kötőhelyeit. A két domén között a fehérje kináz C a Ca^{2+} -függő neutrális proteáz (calpain) segítségével hasítható, a hasítás következtében a katalitikus domén fehérje kináz aktivitása Ca^{2+} -tól és foszfolipidektől függetlenné válik (M kináz) (Kishimoto és mtsai, 1983). A fehérje kináz C elsődleges szerkezetének meghatározása során kiderült, hogy az enzim nem tartalmaz olyan hidrofób szekvenciát, amely a membránokhoz való kötődésében szerepet játszhatna (Parker és mtsai, 1986). Így az enzim *in vivo* lipidaktivációja más, bonyolultabb mechanizmus szerint kell, hogy történjen.

A fehérje kináz C nyugvó limfociták esetén döntő mértékben a citoszolban lokalizálható. A sejtek mind antigénnel, mind mitogén lektinokkal történő aktivációja során az enzim átmenetileg a palzmamembránhoz kötődik. A kötődés az aktiváció első néhány percének elteltével éri el maximumát, majd az aktiválás első órájának eltelte után az enzim ismét a citoszolban lesz megtalálható (Nishizuka, 1986; Farrar és Ruscetti, 1986; Nel és mtsai, 1987). Farrar és Ruscetti (1986) adatai szerint a fehérje kináz C membránhoz való kötődése interleukin-2 hatására is bekövetkezik. Így a fehérje kináz C enzim a T limfociták aktivációjának az interleukin-2 kötődésével beinduló második lépésében is fontos szerepet játszhat.

Nemrégiben megjelent közlemények a fehérje kináz C-nek a sejtmagokhoz való kötődéséről számolnak be (Kraft és mtsai, 1987; Misra és Sahyoun, 1987). Girard és mtsai (1987) és Cambier és mtsai (1987) pedig különböző aktiváló ágensek hatására az enzimnek a citoszolból a sejtmagba való áthelyeződéséről számolnak be. E felfedezések új fejezetet nyithatnak a fehérje kináz C további hatásmódjainak megismerésében.

A fehérje kináz C membránhoz való kötődése alapvetően két mechanizmus szerint játszódhat le. A Ca^{2+} által elősegített membránkötődés "reverzibilis"-nek tekinthető, mivel az enzim Ca^{2+} -komplexeik hatására a membránról leoldható. A kötődés e formája gyors, független a hőmérséklettől, nem mutat specifikitást semelyik szubcelluláris frakció membránjára sem, az enzim fiziológiás koncentrációival nem telíthető, valamint az enzim e

kötőhelyei tripszines emésztésre nem érzékenyek. A kötődés másik formája, a forbol észterek által elősegített membránkötődés általában a "reverzibilis" kötődést követően jön létre. A kötődés e formája hőmérsékletfüggő, a plazmamembránra többé-kevésbé specifikus, telíthető és az enzim e kötőhelyei tripszines emésztés hatására elvesztik kötőkéességüket (Wolf és mtsai, 1985/a-b; Gopalakrishna és mtsai, 1986). A forbol észterrel stabilizált kötődés jellemzőiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a fehérje kináz C a plazmamembránhoz valamiféle receptorfehérje közvetítésével kapcsolódhat. Az enzimnek a feltételezett receptorrához való kötődését a forbol észterek nagymértékben elősegítik.

A fehérje kináz C alapvető szerepet játszik a T limfociták aktivációjában (Isakov és mtsai, 1986; Dröge, 1986). Egy fehérje kináz funkciójának megértéséhez általában akkor juthatunk közelebb, ha az általa foszforilált fehérjéket megismerjük. A fehérje kináz C esetén a funkció szerint is azonosított szubsztrátok listája már 1986-ban kishíján félszáz tagot számlált (Nishizuka, 1986). Az azóta eltelt időszakban a feltérképezett szubsztrátok mennyisége csaknem hetente gyarapodott. Az intenzív kutatás ezen gyümölcseit szemlélve nagyon nehéz eldönteni, hogy melyek azok a fehérjék, amelyeket az enzim in vivo is foszforilálni -- regulálni képes, és melyek azok, amelyek az "aki keres, az talál" alapelv értelmében kerültek fel a listára. A fehérje kináz C-nek az egyes szubcelluláris frakciók közötti átrendeződései azonban minden bizonnyal nagy szerepet játszanak e lehetséges szubsztrátok egyikének-másikának in vivo bekövetkező foszforilációjában (Bazzi és Nelsestuen, 1987/a-b).

A számtalan vizsgálat közül Lee és mtsai (1987), valamint Angel és mtsai (1987) munkája emelhető ki, akik szakítottak a szokásos fehérje kináz C -> foszforilált fehérje -> ? -> génkifejeződés kutatási sémával és a folyamatsorozatot a másik oldalról, a génkifejeződés oldaláról kezdték vizsgálni. Eredményeik szerint az SV-40 fehérje és a metallotionein kifejeződését elősegítő AP-1-es transzkripciós faktor szoros kölcsönhatásban áll a forbol észterek által indukált gének promoter régiójával. E felfedezés (a fehérje kináz C sejtmagba való átrendeződésének felismerésével közösen) kiindulópontja lehet egy olyan vizsgálatsorozatnak, amely során elsőként nyílhatna lehetőség egy jelátviteli folyamat teljes lefutásának tisztázására a plazmamembrántól a génkifejeződésig.

A fehérje kináz C minden kétséget kizáróan a limfociták aktivációjának egyik kulcsenzime. Ezért is feltételezhető, hogy működése számos szabályozó folyamatnak alávetett. A továbbiakban e szabályozó lépések áttekintésére kerül sor.

- A fehérje kináz C aktivátorai közül az enzim a Ca^{2+} mennyiségének sajátos szabályozását valósítja meg. A fehérje kináz C tartós működése jónéhány szövet, illetve sejttípus esetén meggátolja az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnak az adott sejtre jellemző aktiváló ágens hatására bekövetkező növekedését. E hatás egyrészt a foszfatidil-inozitol bontás gátlásából, másrészt (pl. szív, neutrofilek és vérlemezkék esetén) a plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz aktiválásából fakad (Lagast és mtsai, 1984; Smith és mtsai, 1985; Nishizuka, 1986).

- A fehérje kináz C aktiválásában résztvevő diacil-glicerol termelődésének sebessége is csökken a foszfatidil-inozitol bontás gátlásával. Ugyanakkor azonban a diacil-glicerol mennyisége mégsem csökken, hiszen a forbol észter kezelés egy foszfatidil-kolin specifikus foszfolipáz C-t aktivál (Muir és Murray, 1987), és ugyanekkor mind a diacil-glicerol lipáz (Chabbott és Cabot, 1986), mind a diacil-glicerol kináz (Takuwa és mtsai, 1987) gátlása bekövetkezik. A diacil-glicerol tartalom növekedésének mechanizmusa azonban még nem tisztázott teljes mértékben, hiszen Mentlein (1986) szerint a diacil-glicerol lipáz gátlása csupán kompetitív jellegű, Besterman és munkatársai (1986), valamint Ishitoya és munkatársai (1987) pedig a diacil-glicerol kináznak a stimuláció során bekövetkező membránkötődését és aktivációját írták le. Ugyancsak nem tisztázott, hogy a foszfatidil-kolin specifikus foszfolipáz C által felszabadított diacil-glicerol mennyire tartalmaz telítetlen zsírsavakat, azaz mennyire alkalmas a fehérje kináz C aktiválására.
- Többszörösen telítetlen szabad zsírsavak (pl. arachidonsav) a fehérje kináz C-t aktiválják (Dröge, 1986). Így az enzim aktivációja a foszfolipáz A₂ aktiválódásával is bekövetkezhet.
- A fehérje kináz C (forbol észterrel elérhető) tartós aktiválódása esetén jónéhány sejttípusban az enzim "down-regulációja" figyelhető meg (Nishizuka, 1986). Az enzimnek a plazmamembránból való eltűnését fokozott degradációja kíséri (Young és mtsai, 1987).
- Az utóbbi időkben a fehérje kináz C-t kódoló gén α , β és γ változatát derítették fel (Carpenter és mtsai, 1987). Erre is visszavezethetően az enzimnek számos izoenzimét sikerült elkülöníteni a különböző sejtekben, szövetekben (Jaken és Kiley, 1987; Sekiguchi és mtsai, 1987; Woodgett és Hunter, 1987). Az izoenzimek mind Ca^{2+} -mal (Jaken és Kiley, 1987), mind szabad zsírsavakkal való aktiválhatóságukban (Sekiguchi és mtsai, 1987) különböznek egymástól. Így ezen izoenzimek egymáshoz viszonyított arányának változásai is hozzájárulhatnak a fehérje kináz C aktivitásának szabályozásához.
- A fehérje kináz C-nek mind fehérje (Hucho és mtsai, 1987), mind nem fehérje természetű endogén inhibitora ismeretes (Balazovich és mtsai, 1986). Ezen inhibitorok mennyisége és affinitása is változhat a sejt aktivációjával. Az enzimet a hosszúláncú szfingozidok szintén gátolni képesek (Hannun és mtsai, 1986). Kolesnick (1987) adatai szerint e gátlás fiziológiailag is szerepet játszhat, hiszen diacil-glicerolok a szfingomielin fokozott hidrolízisét idézik elő.
- Poliaminok (Moruzzi és mtsai, 1987) és gangliozidok (Kreuter és mtsai, 1987; Vaccarino és mtsai, 1987) képesek meggátolni az enzim membránhoz való kötődését.
- Forbol észter kezelés (azaz a fehérje kináz C tartós aktivációja) az enzim fokozott proteolíziséhez vezet (Murray és mtsai, 1987; Buday és mtsai, 1987). A proteolízissel az en-

zim egyrészt elveszti membránkötő képességét, másrészt megszűnik a Ca^{2+} -mal és foszfolipidekkel való aktiválhatósága. Így az enzim kettős mértékben is kontrolálatlanná válik. Jelenleg e proteolitikus folyamat fiziológiai jelentősége még nem tisztázott.

- A fehérje kináz C autofoszforylációra képes. Az autofoszforyláció esetén az ATP-re mutatott K_m érték a más szubsztrátok esetén tapasztalt értékek mintegy egytizede, így az enzim intramolekuláris autofoszforylációja nagy valószínűséggel lezajló folyamat. Az autofoszforyláció során a hisztionra mutatott K_m és v_{max} némiképp lecsökken, az enzim affinitása ugyanakkor mind Ca^{2+} -ra, mind forbol észterre megnő (Huang és mtsai, 1986; Mochly-Rosen és Koshland, 1987). Parker és Goris (1986) bizonyították, hogy az enzim autofoszforylált formáját a polikation-aktivált foszfoprotein foszfatázok defoszforylálják. Ez a reguláció egy új lehetőségét tárja fel.

Látható tehát, hogy a fehérje kináz C regulációjának számos útja lehetséges és még több olyan lehetőség adódik, amelynek regulációs szerepe csak a jövőben tisztázható.

cAMP és cGMP függő fehérje kinázok

A cAMP és cGMP a T limfociták stimulációjában csak másodlagos, szabályozó szerepet tölt be. Mindkét ciklikus nukleotid szintje a limfociták aktivációjának kezdeti szakaszában átmenetileg megnő, bár e koncentráció növekedés nagyságáról és időtartamáról eltérő adatok láttak napvilágot. Ugyancsak ellentmondásos a kép abban a tekintetben, hogy a két ciklikus nukleotid segíti, vagy gátolja a limfociták stimulációját (Ralph, 1983; Wedner, 1984).

Wedner és munkatársai felhívták a figyelmet arra, hogy a cAMP szint megnövekedésének a limfociták stimulációjára gyakorolt ellentmondásos hatása a sejtmagban, illetve a plazmamembránban található adenilát cikláz és cAMP-függő fehérje kináz eltérő viselkedéséből fakadhat (Wedner, 1984).

A cAMP szint tartós megnövekedése gátolja a limfociták stimulációját. Emiatt a cAMP-t bontó foszfodiészteráz fontos szabályozó szerepet tölt be. Az adenilát cikláz mellett ezen enzim aktivitásának növekedését is megfigyelték a limfocita stimuláció során (Epstein és Hachisu, 1984). A cGMP keletkezését katalizáló guanilát cikláz aktiválódását elősegítik az arachidonsav oxidatív sajátságú termékei. Ennek funkcionális oka a cikláznak a 2.1.2. fejezetben ismertetett hemocianin, illetve réz tartalma lehet. Az arachidonsav-felszabadulás kicsiny mértéke (ld. 2.1.3. fejezet) összefüggésben állhat a guanilát cikláz viszonylag mérsékelt aktivációjával a limfociták stimulációja során (Coffey és mtsai, 1981).

Ca^{2+} -kalmodulin függő fehérje kinázok

A ciklikus nukleotid függő fehérje kinázokhoz hasonlóan e fehérje kinázok is alárendelt szerepet játszanak a limfocita stimuláció korai szakaszában. A kalmodulin függő foszforylációs folya-

matok különösen az idegsejtekben, illetve az izomsejtekben jelentősek (Campbell, 1983; Exton, 1986).

Tirozin támadáspontú fehérje kinázok

A hetvenes évek közepétől a tirozin kinázok két ok miatt kerültek a figyelem középpontjába. Egyrészt a retrovírusok által aktivált onkogénekről sorra derült ki, hogy tirozin kinázokat kódolnak, másrészt a növekedési hormon receptorok egész soráról (pl.: epidermal growth factor, inzulin receptor) bizonyosodott be, hogy tirozin kináz aktivitással rendelkeznek. A későbbi kutatások tisztázták, hogy minden sejtben számos tirozin kináz található. Ezek egy része a már említett növekedési hormon-receptorokhoz asszociált, más részük az említett onkogének sejtbe épült változatainak a terméke, megint más részük pedig az előző két típustól (egyelőre?) független tirozin kináz.

A T limfociták is számos tirozin kinázt tartalmaznak. Nyugvó limfocitákban a tirozin kinázok aktivitása a perifériális, illetve a malignusan transzformált limfocitákban találhatóénál szignifikánsan magasabb (Swarup és mtsai, 1983; Piga és mtsai, 1984). Ez ellentétben áll azzal a korábbi feltételezéssel, hogy a malignus transzformációt a tirozin-foszforiláció egyértelmű növekedése kíséri. Ugyanakkor a limfocitákban található tirozin kinázok aktivitása jelentősen megnövekedik a sejtek aktivációja során (Fischer és mtsai, 1984; Wedner és Bass, 1986).

A T limfocitákban is megtalálható tirozin kinázok közül az inzulin receptorról vannak a leggazdagabb ismereteink. Az inzulin receptor nyugvó állapotban lévő, perifériális limfocitákon viszonylag kis számban fordul elő. A sejtek aktiválódásával a sejt-felszíni receptorok száma megnő. Az inzulin hatásmechanizmusának a receptor tirozin kináz aktivitásán kívül még számos más eleme ismeretes, így a receptor által aktivált nem ciklikus nukleotid függő szerin-kináz, a receptorhoz kötődő speciális GTP-kötő fehérje és a feltehetőleg e fehérjével asszociált foszfatidilinozitol specifikus foszfolipáz C, amely egy glikolipidet hasítva egy reguláló sajátosságú oligoszacharidot tesz szabaddá (Houslay, 1985; Saltiel és mtsai, 1986).

2.2. Kölcsönhatások a T limfociták jelátviteli rendszerei között

Az ionkoncentrációk változásainak kölcsönhatásai

A Ca^{2+} sokrétűen befolyásolja az egyértékű kationok sejten belüli koncentrációjának változásait. A megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció maga után vonja a Na^+/H^+ -csere rendszer aktiválódását, valamint a $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPáz}$ enzim gátlásához vezet. Növekvő Ca_i tehát a sejten belüli Na^+ koncentráció növekedését vonja maga után. Az e hatással járó harmadik mechanizmus, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere rendszer T limfocitákban csak igen alárendelt szerepet játszik (Macara, 1985).

Az egyértékű kationoknak a Ca^{2+} koncentrációjára gyakorolt hatásáról vita bontakozott ki az irodalomban. Az egyik feltételezés szerint az extracelluláris Ca^{2+} egy potenciálfüggő K^+ -csatornán keresztül áramlik be a sejtbe az aktiváció folyamán. A legújabb

megfigyelések azonban a potenciálfüggő Ca^{2+} beáramlást nem látszanak igazolni (Weiss és mtsai, 1986; Gelfand és mtsai, 1987).

A nehézfémek kölcsönhatása mind az egy-, mind a kétértékű kationok koncentrációját szabályozó mechanizmusokkal elképzelhető. Cink ionok kiszoríthatják a Ca^{2+} -ot különböző kötőhelyeiről (Brewer, 1981; Habermann és Richardt, 1987), valamint a Na^+ - K^+ -ATPáz enzim gátlására képesek (Segel és mtsai, 1981).

Kölcsönhatások a lipidösszetétel változásai között

A lipidek metabolizmusában résztvevő összes enzim aktivitása függ az őt körülvevő membránlipidek összetételétől. Így pl. általánosan elmondhatjuk, hogy a limfociták aktivációjakor bekövetkező membránfluiditás növekedés a lipidek metabolizmusának általános felgyorsulásához vezet (Trotter és mtsai, 1982). Ugyanakkor a lipid-metabolizmusban résztvevő enzimek esetén sok esetben nagyon nehéz különbséget tenni a szubsztrát prezentálásának kedvező, illetve kedvezőtlen változásai és az enzim lipidek által történő allosztérikus aktivációja, illetve gátlása között. Ez a tény is magyarázhatja azt, hogy a lipid metabolizmus lipidekkel való szabályozásáról igen kevés adat áll rendelkezésünkre.

A fehérje kinázok működésének kölcsönhatásai

A fehérje kináz C sokrétű hatást gyakorol a cAMP-függő fehérje kináz működésére. A fehérje kináz C az adenilát cikláz általánosan szétkapcsolja a vele összefüggésben álló receptoroktól. E szétkapcsolást az enzim mind a receptor érzéketlenségével, mind pedig a receptorhoz kötődő stimuláló, illetve gátló GTP-kötő fehérje foszforilálásával éri el. Ezen hatások eredőjeként az adenilát cikláz aktivitása nőhet is és csökkenhet is az adott rendszerben. A fehérje kináz C a sejt cAMP szintjét a cAMP-foszfodiészteráz aktiválásával is befolyásolhatja (Anderson és mtsai, 1985).

Az adenilát ciklázra gyakorolt sokrétű hatásával ellentétben a guanilát cikláz esetén a fehérje kináz C-nek csak stimuláló hatását tárták fel eddig (Nishizuka, 1986).

A fehérje kináz C a kalmodulin függő rendszerek szabályozásában is részt vesz. Az enzim a miozin könnyű lánc kináz foszforilálásával elősegíti az izomrelaxációt (Nishizuka, 1986). Tung (1986) pedig a kalmodulin függő foszoprotein foszfatáz fehérje kináz C által történő foszforilációjáról számolt be.

A fehérje kináz C nagymértékben lecsökkenti a növekedési hormon receptorok (epidermal growth factor, inzulin receptor, stb.) tirozin kináz aktivitását (Houslay, 1985).

A cAMP szint növekedése B limfocitákban a fehérje kináz C-nek a sejtmagba való áthelyeződéséhez vezet (Cambier és mtsai, 1987). A cAMP függő fehérje kináz e folyamatban játszott szerepe még nem tisztázott. Ugyancsak nem áll kellő számú adat rendelkezésre ahhoz, hogy eldöntsük: játszanak-e a tirozin kinázok valamilyen szerepet a fehérje kináz C szabályozásában.

Eddig két kalmodulin függő fehérje kinázról bizonyosodott be, hogy a cAMP függő fehérje kináz szubsztátja. A cAMP függő fehérje kináz a foszforiláz kináz aktivációjára és a miozin könnyű lánc kináz gátlására képes (Cohen, 1985).

A cAMP függő fehérje kináz számos tirozin kináz foszforilációjában vesz részt (Houslay, 1985). Kevés adat áll rendelkezésünkre a foszforilációk szabályozó szerepéről.

A kölcsönhatás megfordításáról, a tirozin kinázoknak a cAMP függő fehérje kináz szabályozásában betöltött szerepéről többet tudunk. Tirozin kinázok mind a cAMP függő fehérje kináz endogén inhibitora, mind pedig a vele ellentétes hatású foszoprotein foszfataz I. enzim inaktiválására képesek (Van Patten és mtsai, 1987).

Nemrégiben két kutatócsoport is beszámolt a kalmodulin tirozin foszforilációjáról (Meggio és mtsai, 1987, valamint a benne lévő hivatkozások). E hatás szabályozó szerepének a feltárása azonban a jövő feladata.

Az ionkoncentrációk változásainak és a lipidösszetétel alakulásának kölcsönhatásai

Sokrétű összefonódást tapasztalhatunk a lipidek (különösen a foszfatidil-inozitolok) és a Ca^{2+} metabolizmusa között. A foszfatidil-inozitol-bisz-foszfát hasítása során keletkező inozitol-trisz-foszfát hatására szabadulnak fel az endoplazmatikus retikulumban tárolt kalcium ionok (ld. 2.1.2. fejezet). A foszfatidil-inozitolok reguláló hatását a plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz működésében is kimutatták (Berridge, 1984). A foszfolipázok szinte mindegyike, így a Ca^{2+} metabolizmusban nagy szerepet játszó foszfatidil-inozitol specifikus foszfodiészteráz, illetve a foszfolipáz-A2 Ca^{2+} -függő enzim (Berridge, 1984; Feinstein és Sha'afi, 1983).

A foszfolipid- és a Ca^{2+} -metabolizmus kölcsönhatásainak érdekes megközelítését jelentik Utsunomiya és mtsai (1986) vizsgálatai, akik gyorskinetikai mérésekkel kimutatták, hogy a plazmamembrán fluidizációja megelőzi a Ca^{2+} sejten belüli raktárakból való eleresztését, ami viszont a sejten kívüli Ca^{2+} beáramlása előtt zajlik le.

A membrán foszfolipideknek mind összetétele, mind telítettsége érzékenyen befolyásolja a Ca^{2+} -ATPáz és a Na^{+} - K^{+} -ATPáz aktivitását (Stubbs és Smith, 1984; Nishikawa és mtsai, 1985). A sejten belüli pH természetszerűleg a lipidek metabolizmusában résztvevő összes enzim aktivitását befolyásolja, de a limfociták aktivációjánál során bekövetkező 0.1-0.15 pH egységnyi változás általában ahhoz túl kevés, hogy szignifikáns eltérést okozzon az egyes enzimek aktivitásában. Mindazonáltal Sweatt és mtsai (1986) szerint a $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -csere rendszer aktiválódása és így a sejt belsejének alkalinizálódása a foszfolipáz-A2 aktiválódását vonja maga után.

Kölcsönhatások a lipidösszetétel alakulása és a fehérje kinázok működése között

A Ca^{2+} - és foszfolipid-függő fehérje kináz --nevéből is következően-- csak foszfolipidek jelenlétében fejti ki hatását. Az enzim foszfolipid specificitása már a 2.1.4. fejezetben említésre került. Az ott leírtakból kitűnik, hogy különböző foszfolipidek más és más mértékben aktiválják az enzimet. Így a fehérje kináz C in vivo aktivitása a plazmamembrán adott pillanatban -- és helyen -- érvényes foszfolipid összetételének érzékeny függvénye.

A fehérje kináz C-t a szabad zsírsavak (így pl. a felszabaduló arachidonsav) is aktiválják (Dröge, 1986). Ugyanakkor szfin-gozinnal (Hannun és mtsai, 1986), illetve gangliozidokkal (Kreutter és mtsai, 1987) az enzim jelentős mértékben gátolható.

A fehérje kináz C csökkenti a foszfatidil-inozitol lebontásának sebességét. E hatásának legvalószínűbb mechanizmusa a GTP-kötő fehérje "hatástalanítása" révén a foszfatidil-inozitol hasító foszfodiészteráznak és az antigén receptornak a szétkapcsolása lehet (Nishizuka, 1986).

A foszfatidil-inozitol specifikus foszfolipáz-C gátlásával párhuzamosan a fehérje kináz C aktivál egy foszfatidil-kolin specifikus foszfolipáz-C-t (esetleg "csupán" megváltoztatja a specificitását az előző enzimnek...?) (Muir és Murray, 1987). A foszfatidil-kolin bontásának ilyenén meggyorsulását a foszfatidil-kolin bioszintézisének aktiválása követi. A fehérje kináz C e bioszintézis sebességmeghatározó enzimének, a CTP:foszforil-kolin citidil transzferáznak a plazmamembránhoz való kötődését és jelentős mértékű aktiválódását idézi elő (Wertz, 1985).

A fehérje kináz C a foszfatidil-kolin hasításával képződött diacil-glicerolt bomlását is megakadályozza a diacil-glicerol lipáz és a diacil-glicerol kináz gátlása révén, bár az irodalomban e folyamatok ellen szóló adatok is találhatók (ld. 2.1.4. fejezet Chabbott és Cabot, 1986; Takuwa és mtsai, 1987 illetve Mentlein, 1986; Besterman és mtsai, 1986; Ishitoya és mtsai, 1987).

A foszfolipáz-C aktiválása mellett a fehérje kináz C a foszfolipáz-A₂-t is aktiválni képes. Az enzim aktiválásával megvalósuló arachidonsav felszabadulást jónéhány sejttípusban kimutatták (Wertz, 1985). A foszfolipáz-A₂ a fehérje kináz C aktiválódásának hatására a citoszolból a plazmamembránhoz kötődik (Schonhardt és Ferber, 1987, valamint Szamel M. személyes közlés). A foszfolipáz-A₂ aktiválása a feltételezett közvetlen foszforiláció mellett a lipomodulin segítségével is megvalósul. A fehérje kináz C ugyanis aktivál (a cAMP függő fehérje kináz pedig inaktivál) egy tirozin kinázt, amely aktivált állapotában a lipomodulint foszforilálja. A lipomodulin foszforilált állapotában nem képes a foszfolipáz-A₂ gátlására. Így a foszfolipáz-A₂ aktiválása tulajdonképpen a lipomodulin okozta gátlás alóli felszabadulás révén is elképzelhető (Anderson és mtsai, 1985).

A tirozin kinázok a foszfatidil-inozitolok metabolizmusában is jelentős szerepet játszanak úgy is, mint foszfatidil-inozitol kinázok és úgy is, mint a foszfatidil-inozitol kinázokat aktiváló fehérje kinázok (Macara, 1985). A tirozin kinázok és a lipidek

kölcsönhatásának még egy érdekes példája van. Számos tirozin kinázról kimutatták, hogy az N terminálisán lévő glicin mirisztillódik. E poszt-transzlációs kovalens módosítás szerepe még nem teljesen tisztázott (Cohen, 1985).

A fehérje kinázok működésének és az ionkoncentrációk változásainak kölcsönhatásai

Az ioncsatornák foszforiláció útján történő gátlása általános jelenségnek tűnik. Így a fehérje kináz C és a cAMP függő fehérje kináz mind a K^+ , mind a Na^+ csatorna foszforilálására és gátlására képes az idegsejtekben (Levitan, 1985; Nishizuka, 1986). T limfocitákban e szabályozási mechanizmus létezése még vitatott. A megnövekedett cAMP szint a Na^+/H^+ -csere rendszer gátlására is képes (Grinstein és mtsai, 1987).

Hasonló a helyzet a $Na^+-K^+-ATPáz$ enzim aktivitásának szabályozásával is. Fibroblasztok esetén az enzimet mind a fehérje kináz C, mind pedig a cAMP függő fehérje kináz aktiválni képes. A fehérje kináz C által bekövetkező aktiváció a fibroblaszt aktiválódás első szakaszára jellemző, a cAMP függő aktiváció elnyújtottabban jelentkezik (Rozengurt, 1985). Saját kísérleteink szerint T limfocitákban a fehérje kináz C-t aktiváló forból észterrel végzett kezelés nem vezet a $Na^+-K^+-ATPáz$ aktivációjához (Kövecses, M., Csermely, P., Szamel, M. és Somogyi, J., nem közölt adatok).

Egy korai cikkünkben Hadden és mtsai (1972) a limfocita $Na^+-K^+-ATPáz$ inzulinval való aktiválhatóságáról számoltak be. Bár az észlelt aktivitásnövekedés viszonylag csekély volt, de ez betudható lehet a nyugvó limfociták felszínén lévő inzulin receptorok viszonylag csekély számának is. Így e kísérleti adatok felvetik a limfocita $Na^+-K^+-ATPáz$ tirozin kinázokon keresztül megvalósuló szabályozásának kérdését.

A Na^+/H^+ -csere rendszernek a fehérje kináz C által való foszforilációjáról és aktiválódásáról (Isakov és mtsai, 1986) már a 2.1.2. fejezetben történt említés.

A különböző ionok közül a Ca^{2+} metabolizmusának tárták fel a legtöbb összefüggését a fehérje kinázok működésével. A Ca^{2+} koncentráció változásai értelemszerűen befolyásolják a Ca^{2+} - és foszfolipid függő fehérje kináz, valamint a Ca^{2+} kalmodulin függő fehérje kinázok működését. A cAMP-t termelő adenilát cikláz Ca^{2+} ionok által megvalósuló regulációja már ellentmondásosabb: agyban az adenilát cikláz Ca^{2+} függő aktiválódását írták le, más szövetekben, sejtekben azonban a Ca^{2+} éppen ellentétes hatást, gátlást okozott (Anderson és mtsai, 1985).

A cAMP függő fehérje kináz és a Ca^{2+} függő jelátviteli rendszer kölcsönhatásainak eddigi legteljesebb és legszemléletesebb képét Rasmussen (1981) állította fel. Összefoglaló elméletében "amplitúdó-" és "érzékenység-szabályozott" rendszereket különböztet meg aszerint, hogy az adott rendszer aktiválódását (illetve gátlását) a Ca^{2+} ionok koncentrációjában bekövetkezett egyszerű mennyiségi változásból vagy az adott rendszernek a Ca^{2+} -ra mutatott affinitásnövekedéséből lehet levezetni. T limfociták esetén e két jelátviteli rendszer kölcsönhatása nem olyan egyértelműen

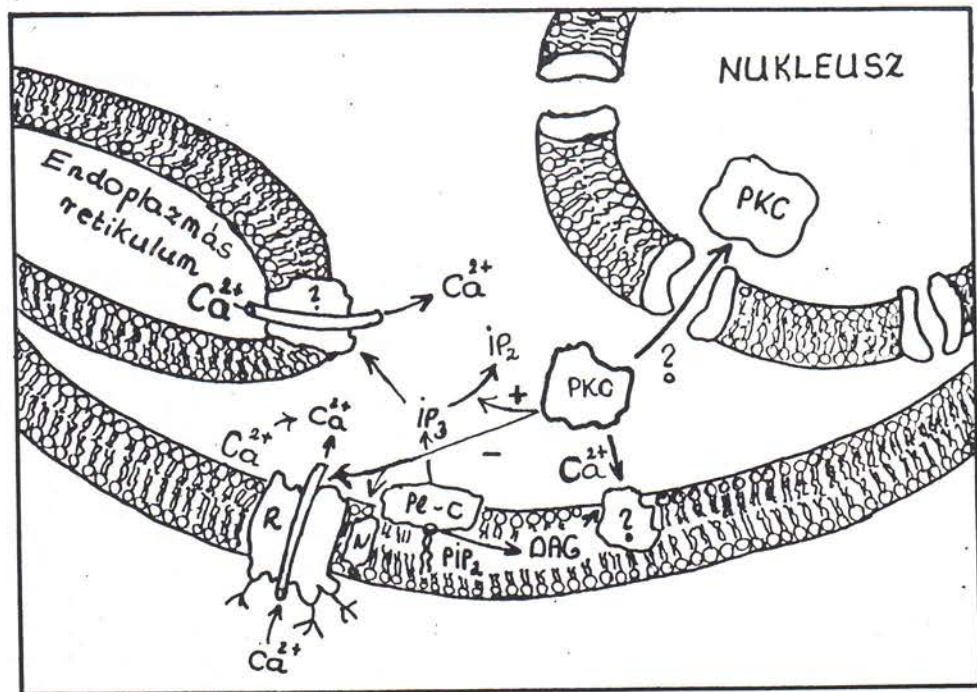
szinergisztikus, mint ahogy azt a Rasmussen által felhozott példák döntő többségében bizonyítani lehetett. T limfociták esetén a megnövekedett cAMP szint egyrészt a Ca^{2+} beáramlás gátlása, másrészt a Ca^{2+} kiáramlás aktiválása révén egyaránt csökkenti a rendelkezésre álló Ca^{2+} mennyiségét (Ralph, 1983).

A fehérje kináz C érdekes, kettős hatást fejt ki az intraceluláris Ca^{2+} koncentrációra. Forbol észterek, bizonyos újabb eredmények szerint, a Ca_i emelésére képesek (Klip és mtsai, 1984; Ware és mtsai, 1985; Erne és mtsai, 1987). E hatást idegsejteken is megfigyelték, ahol a jelenséget a Ca^{2+} csatornák egy olyan osztályának aktiválásával magyarázzák, amely nyugvó sejtek esetén teljesen zárt állapotban van (Levitan, 1985). Ez a magyarázat arra is fényt derítene, hogy miért válik a forbol észterek okozta Ca_i növekedés észrevehetetlenné a komplexképző sajátságokkal rendelkező Ca^{2+} indikátor (quin2, ld. 4.4.1. fejezet). nagyobb sejten belüli koncentrációi esetén.

A fehérje kináz C aktiválódása igen sok sejttípusban megakadályozza a Ca_i különböző agonisták által kiváltott növekedését. E hatását egyrészt a receptorfüggő Ca^{2+} csatorna feltételezett foszforilálásával (gátlásával), a receptorhoz kapcsolt GTP-kötő fehérje inaktiválásával, másrészt a plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz aktivitásának fokozásával éri el (Nishizuka, 1986). A GTP-kötő fehérje inaktiválása a foszfatidil-inozitol bontását végző foszodiészterázt szétkapcsolja az aktivált receptortól (ld. 2.1.2. fejezet). A fehérje kináz C által közvetített szabályozás egy újabban leírt, érdekes esete szerint a fehérje kináz C aktiválja az inozitol-triszfoszfát (IP_3) inaktiválásában résztvevő 5-foszfataz enzimet. Így az IP_3 jóval kevésbé lesz képes az endoplazmatikus retikulumban tárolt Ca^{2+} felszabadítására (ld. 2.1.2. fejezet; Putney, 1987).

Összefoglalás

Az eddigiekből látható, hogy a T limfociták aktivációjának kezdeti szakasza számos elemi lépésre bontható. E lépések, az aktivációs mechanizmus különböző alkotóelemei bonyolult kölcsönhatásban állnak egymással. E szerteágazó rendszerről jelenlegi ismereteink alapján eléggé mozaikszerű képet alkothatunk. A további kutatások feladata az eddigieknél egyértelműbben tisztázni, hogy az aktiváció egyes lépései milyen sorrendbe állíthatók (illetve: felállítható-e egyértelmű sorrend egyáltalán). E munka során feltehetően számos lépésről fog bebizonyosodni, hogy a limfociták aktivációjának nem oka, csak kísérőjelensége. Ugyanakkor minden bizonnyal sor fog kerülni jónéhány, ma még nem ismert folyamat beillesztésére is az aktiváció lépései közé. E kérdések megválaszolásához nagy segítséget nyújthat a különböző jelátviteli mechanizmusok kölcsönhatásainak vizsgálata. A jelátviteli rendszerek közül az utóbbi évek intenzív kutatásai révén a Ca^{2+} -függő és a fehérje kináz C-hez kötődő rendszerről vannak a leg részletesebb ismereteink.



2. ábra A Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszer és a fehérje kináz C kölcsönhatásai

Az ábrán alkalmazott rövidítések: DAG, diacil-glicerol; IP_3 , inozitol-triszfoszfát; IP_2 , inozitol-biszfoszfát; N, GTP-kötő fehérje; PIP_2 , foszfatidilinozitol-biszfoszfát; PKC, fehérje kináz C; Pl-C, foszfatidilinozitol specifikus fosfolipáz C (foszfo-diészteráz); R, T sejt receptor.

A Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszer és a fehérje kináz C működésének összefüggései vázlatosan a 2. ábrán láthatók. Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a megnövekedett sejten belüli Ca^{2+} koncentráció mind az enzim közvetlen aktiválása, mind membránköltődésének elősegítése révén részt vesz a fehérje kináz C aktivációjának korai szakaszában (ld. 2.1.4. fejezet). A fehérje kináz C tartós aktiválódása azonban a legtöbb esetben a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció csökkenéséhez vezet. A Ca^{2+} koncentráció csökkenésének számos mechanizmusát sikerült feltárni, azonban a folyamat teljes tisztázása a jövő feladata. A fehérje kináz C aktivált állapotát ilyen körülmények között még egy ideig a diacil-glicerolok mennyiségének megemelésével tudja biztosítani (ld. 2.1.4. illetve 2.2. fejezet). Tartós aktiválásához azonban más mechanizmusok is szükségesek lehetnek.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A T limfociták aktivációjának kezdeti szakaszában jónéhány másodlagos hírvivő rendszer aktiválódik (így például: Ca^{2+} -függő rendszerek, fehérje kináz C útvonal, cAMP/cGMP rendszer, arachidonsav kaszkád, lipid- és ionösszetételbeli változások, stb; ld. 2.1. fejezet). E rendszerek bonyolult kölcsönhatásokban állnak egymással (ld. 2.2. fejezet).

A másodlagos hírvivő rendszerek közötti kölcsönhatások közül talán a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció változásainak és a fehérje kináz C útvonal összefüggéseinek szentelték a legtöbb figyelmet az elmúlt években. A kísérleti adatok halmozódásával az a kezdeti elképzelés, amely szerint a sejten belüli Ca^{2+} szint növekedése és a fehérje kináz C köré szerveződő hírvivő rendszer egymással egyértelműen szinergista viszonyban állnak, mára megoldottnak tekinthető.

Jelenlegi képünk szerint a fehérje kináz C szelektív aktivátorai (diacil-glicerolok, forbol észterek) jelenlétében a sejten belül uralkodó nyugalmi Ca^{2+} koncentráció elegendő a fehérje kináz C teljes aktiválódásához, sőt az enzim (tartós) aktiválódása sok esetben a Ca^{2+} szignál megszűnéséhez, néha a sejtprolifráció leállításához vezet. Ez az ellentmondásos kép számtalan kutatócsoportot a lehetséges magyarázatok keresésére serkentett. Az eddig feltárt magyarázatok sokasága a Ca^{2+} jel keletkezésének szinte minden szakaszát felöleli (ld. 2.2. fejezet) tovább bonyolítva e jelenségek összefüggéseiről alkotott képünket.

A legutóbbi években néhány olyan adat, feltételezés látott napvilágot, amely arra utal, hogy a nehézfémionok (különösen a cink) mind a Ca^{2+} koncentráció változásait, mind a fehérje kináz C enzim működését befolyásolhatják.

(1) Egyre több fehérje Ca^{2+} -kötő helyéről bizonyosodik be, hogy nehézfémionok sokkal nagyobb affinitással képesek hozzá kötődni, mint a Ca^{2+} maga. Így a nehézfémionok a Ca^{2+} kiszorítására, helyettesítésére képesek ezen fehérjék esetén. Nehézfémek kötődése esetén a fehérje konformációja azonban megváltozhat, a nehézfémionok nagyobb affinitása miatt az addigi reverzibilis

kötődés $\rightleftharpoons$ fém-fehérje komplex bomlás

közötti egyensúly erőteljesen a kötött állapot felé tolódhat el. E változások a fehérje funkciójának módosulásához vezethetnek (ld. 2.2. fejezet).

(2) A fehérje kináz C enzim elsődleges szerkezetének felderítése során Parker és mtsai (1986) egy (két?) nehézfém (cink) kötőhely jelenlétét feltételezték az enzim szabályozó alegységében. Így elképzelhető, hogy nehézfém (cink) ionok e jelátviteli rendszer működésének befolyásolására is képesek.

Ezen kísérleti tényekből és feltételezésekből kiindulva az értekezésben bemutatott kísérletekkel arra a kérdésre szerettem volna választ kapni, hogy **játszanak-e valamilyen szerepet a nehézfém (cink) ionok a Ca^{2+} - és fehérje kináz C-függő jelátviteli rendszer kölcsönhatásaiban.**

A kémiával kapcsolatos természettudományok szinte egyik alap-törvénye lehetne, hogy kölcsönhatás csaknem minden, tetszőlegesen kiválasztott jelenségcsoport, anyagpár között létrehozható, kimutatható, csak a kellő (kellően szélsőséges) körülményeket kell megteremteni hozzá. Hogy kísérleti munkám ne egy erőszakolt elképzelés még erőszakoltabb bizonyítása legyen, vizsgálataim első részében egy látszólag független kérdésre kerestem a választ. Amennyiben ugyanis a két vizsgált (Ca^{2+} - és fehérje kináz C függő) jelátviteli rendszer bármelyike a nehézfémionok által képes a másik rendszer működésének befolyásolására, e jelenség szükségszerű velejárója kell, hogy legyen a nehézfémionok koncentrációjának, eloszlásának megváltozása ezen jelátviteli rendszer aktiválása esetén.

Amennyiben a Ca^{2+} -függő rendszer aktiválása során az intracelluláris Ca^{2+} szintet túlzottan emeljük, az előzőekben vázolt fehérje- Ca^{2+} fehérje-nehézfém csere fordítottja következhet be, és így a nehézfémek eloszlásában fiziológiásnak igen kevésbé nevezhető változásokat kaphatunk. Az intracelluláris Ca^{2+} szintnek szelektív, kismértékű változtatása alig megoldható feladat akkor, ha közben azt szeretnénk, hogy a kísérlethez szükséges segédanyagok, pl. Ca^{2+} -kelátorok önmagukban ne vezessenek a nehézfémionok sejten belüli átrendeződéséhez. Ez magyarázza, hogy a **nehézfémionok megoszlásának megváltozását csak a fehérje kináz C rendszer aktiválása esetén** vizsgáltam.

Mivel a fehérje kináz C forból észterrel történt szelektív aktiválása a nehézfémionok számottevő átrendeződéséhez vezetett (ld. 5.1. fejezet), második lépésként annak a kérdésnek a vizsgálatával foglalkoztam, hogy **játszanak-e a fehérje kináz C rendszer aktiválódásával mobilizált nehézfémionok valamilyen szerepet a Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszer gátlásában.**

E vizsgálatokhoz két kérdést kellett előzetesen tisztázni:

(1) meg kellett vizsgálnunk, hogy milyen hatással vannak a nehézfémionok a sejten belüli Ca^{2+} szint meghatározására leginkább használt fluoreszcens technikákra. (Ha a nehézfémionok koncentrációja megváltozik, a fent vázolt nehézfém/ Ca kicserélődés következtében a Ca^{2+} koncentrációját meghatározó eljárások pontosságát komoly veszély fenyegeti.)

(2) Egy olyan kísérleti rendszert kellett kidolgoznunk, ahol a fehérje kináz C enzim aktiválása a sejten belüli Ca^{2+} szint emelkedés gátlásához vezet. Ilyen fehérje kináz C/ Ca^{2+} antagónizmusra az irodalomban számtalan példa ismeretes. E kísérleti rendszerekben azonban a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció emelkedését antigének, mitogének, illetve más fiziológiás sejtaktiváló anyagok hozzáadásával váltják ki. Ilyen körülmények között a Ca^{2+} -függő rendszer aktiválódásában számtalan mechanizmus vehet részt, amelyek gátlása ugyancsak számtalan okra vezethető vissza. Ezen gátlási mechanizmusok nagyrésze a nehézfémek jelenlététől

függetlenül is bekövetkezhet. Így vizsgálataimhoz egy olyan kísérleti rendszert kellett keresnem, ahol a Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszert direkt módon, bonyolult mechanizmusok közbeiktatása nélkül lehet aktiválni. E rendszerben a nehézfémionok esetleges hatása a "zavaró" mechanizmusok tömegétől függetlenül, sokkal inkább kimutathatóvá válhat. A sejten belüli Ca^{2+} szintet (Ca_i -t) közvetlenül és szelektíven Ca-ionofórok alkalmazásával lehet emelni. Meg kellett vizsgálnom tehát, hogy a fehérje kináz C enzim forbol észterrel történő aktiválása képes-e a Ca-ionofórok által létrehozott sejten belüli Ca^{2+} szint növekedés visszafogására.

A kísérleti rendszer (forbol észter/Ca-ionofór antagonizmus a Ca_i változásában) kidolgozása után a nehézfémionok szerepét egy, a sejten belüli, nehézfémekre specifikus komplexképző (TPEN) alkalmazásával, azaz a nehézfémionok szelektív elvonásával vizsgáltam meg. Kísérleteket végeztem a forbol észter/Ca-ionofór antagonizmus más magyarázatainak megerősítésére, illetve kizárására is.

Az eddigi vizsgálatok a fehérje kináz C rendszernek a Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszerre gyakorolt hatásában a nehézfémionok szerepére irányultak. Az ismertetett vizsgálatok befejező részében e kérdés fordítottjára: **a nehézfémionok a Ca^{2+} -nak a fehérje kináz C-re gyakorolt hatásában játszott szerepére kerestem a választ.**

A Ca^{2+} a fehérje kináz C enzimet

- aktiválja
- reverzibilisen köti a membránokhoz és ezáltal
- "érzékenyíti" arra, hogy a pl. forbolészterrel kiváltott stabil membránkötődés megvalósulhasson.

Bemutatott kísérleteim befejező részében a nehézfémionok (leginkább cink) e folyamatokban játszott szerepét kívántam megvilágítani.

4. MÓDSZEREK

Megjegyzés: az áttekinthetőség kedvéért a módszerek című részben sorolok fel néhány olyan módszertani újítást (a quin2-vel történő intracelluláris Ca^{2+} koncentrációmérés finomítása, 4.4.1.; a fehérje kináz szolubilizálása CHAPS detergenssel, 4.6.1.; és a ^3H -forbol-dibutirát kötődésének mérése, 4.7.), amelyek az eredmények című részben is helyet kaphattak volna.

4.1. Sejtek izolálása és sejtkultúra elegyek

A nyúl (2 kg, hím) és egér (CLFP, 6-8 hetes, hím) timocitákat Kleiman és munkatársai (1984) módszere alapján izoláltuk. Röviden: az állatok tímuszából Eagle MEM, illetve RPMI 1640 médiumban laza üvegpotter segítségével, a dugattyú 2-4-szeri fel-le húzogatásával sejtsuszpenziót készítettünk. (A dugattyú és a potter fala közötti távolság 1.5 mm volt.) A kötőszöveti törmeléket steril gézen való átszűréssel távolítottuk el. 400 g-n, szobahőmérsékleten, 10 percen át történő centrifugálás után a sejteket kétszer mostuk Eagle MEM, illetve RPMI 1640 médiummal. A mosások után a sejtsűrűséget általában 5×10^6 sejt/ml értékre állítottuk be. Humán perifériás limfocitákat Ficoll gradiensen való centrifugálással különítettük el. Izolálásuk további lépései a timocitáéival megegyeztek.

Az izolálás után a sejtek vitalitását tripán kék kizáráson alapuló vizsgálattal ellenőriztük. A sejtsuszpenzió mindig 95 %-nál több (általában 98 %-nál több) élő sejtet tartalmazott.

Hosszabb (1 órát meghaladó) inkubálások esetén a sejtkultúra médiumot 10 mM Hepes-sel (pH 7.4), esszenciális aminosavakkal, penicillinnel és streptomocinnel (100-100 U/ml) egészítettük ki.

Fluoreszcenciás mérések esetén a sejtkultúra médium a Tsien által ajánlott, egyszerűsített Hank-féle médium volt (Tsien és mtsai, 1982/b). A médium összetétele: 143 mM NaCl, 1 mM Na_2SO_4 , 5 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 0.5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 5 mM glükóz és 10 mM Hepes (pH 7.4; módosított Hank-féle médium). Különösen quin2-vel való mérések esetén a médiumot a nehézfém-szennyezések eltávolítása miatt chelex 100 gyantával kezeltük. Egy liter Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes médiumhoz (pH 7.4) 7 g chelex 100 gyantát adtunk. A médiumot a gyantával egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. A használt gyantát szűréssel távolítottuk el. A CaCl_2 , MgCl_2 koncentrációt, a médium végleges térfogatát és a végleges pH-t (7.4) a gyanta eltávolítása után állítottuk be. A chelex 100 gyanta aktiválása 0.1 M HCl, bideszt. víz, 0.1 M NaOH, bideszt. viz., 1 mM EDTA, bideszt. víz és Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes módosított Hank-féle médiummal való egymásutáni mosással történt.

4.2. Sejtfrakciók izolálása

A limfocitákat 400 g-n szobahőmérsékleten, 10 percen át való centrifugálás után 140 mM KCl-ot, 0.25 mM $MgCl_2$ -ot és 20 mM Hepes-t (pH 7.0) tartalmazó izoláló pufferben szuszpendáltuk 5×10^8 sejt/ml sejtsűrűség mellett. A fehérje kináz C-vel kapcsolatos mérések esetén az izoláló puffer 1 mM EGTA-t, 2 mM EDTA-t, 5 mM DTT-t és 20 mM Hepes-t (pH 7.4) tartalmazott. A sejtek feltárása nitrogén kavitációval, egy Artisan (Farmingdale NY, USA) gyártmányú sejtfeltáró edényben történt a Resch és munkatársai által leírt módszer szerint (Ferber és mtsai, 1972; Resch és mtsai, 1981 és Kaever és mtsai, 1984). Differenciálcentrifugálással a limfociták négy szubcelluláris frakcióját különítettük el: a magfrakciót, a mitokondriális frakciót, a mikroszómákat és a citoszolt.

A különböző sejtfrakciók lipidösszetételét és számos markerenzim aktivitásának megoszlását vizsgálva a különböző sejtfrakciók tisztaságáról a következő megállapítások tehetők (Ferber és mtsai, 1972; Resch és mtsai, 1981; Kaever és mtsai, 1984):

(1) a magfrakció csak igen csekély mennyiségű mitokondriumot, lizoszómát és mikroszómát tartalmaz, e szennyezések a csak részben feltárt sejtekből származnak;

(2) a mitokondriális frakció mitokondriumokból, lizoszómákból és igen kis mennyiségű aggregált mikroszómából áll;

(3) a mikroszómális frakció túlnyomó többsége plazmamembrán eredetű, kisebb része az endoplazmás retikulumból származik;

(4) a citoszol mentes minden más szennyező frakciótól.

Az egyes frakciók fehérjekoncentrációját általában két módszerrel, a Lowry és munkatársai (1951) által kifejlesztett; illetve Bradford (1976) módszerével határoztuk meg. A Lowry módszer által kapott értékeket szulfhidril vegyületekre és Hepes-re, a Bradford módszer értékeit pedig az esetlegesen jelenlévő detergens mennyiségére korrigáltuk. Így a két mérés által meghatározott értékek jó egyezést mutattak.

4.3 T limfociták és sejtfrakciók elemi összetételének meghatározása

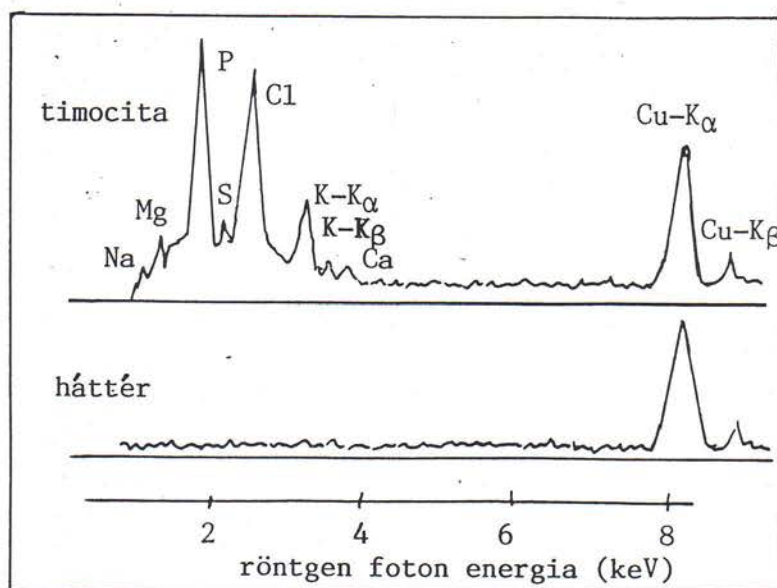
4.3.1. Röntgenfluoreszcencia vizsgálatok

A röntgenfluoreszcenciás vizsgálatok elve azon alapszik, hogy nagy energiájú γ -fotonoknak egy adott elem atomjába való ütközése esetén az elemre jellemző (karakterisztikus) röntgensugárzás keletkezik a K, illetve L héjról kilökött (gerjesztett) elektron üres helyének újra való betöltődésével. Amennyiben az L héjról kerül vissza egy elektron a K héjra, a kibocsátott karakterisztikus röntgensugárzást $K\alpha$ -nak nevezzük, amennyiben a K héjra való átugrás az M héjról következik be, a röntgensugárzás jele $K\beta$.

A röntgenfluoreszcenciás vizsgálatokhoz a 10^9 nyúl timocitából származó magfrakciót 5, a többi szubcelluláris frakciót pedig 1-1 ml izoláló pufferben szuszpendáltuk. Az egyes sejtfrakciókat liofilizáltuk és száraz tömegük meghatározása után 0.1 mm vastag polipropilén fóliára helyeztük őket. A "háttér" megfelelő korrekciójára az izoláló puffer azonos mennyiségeinek liofilizálásával készült "vak" minták szolgáltak.

A γ -fotonokat egy 200 MBq radioaktivitású ^{125}I izotóp szolgáltatta, a röntgenfotonok érzékelésére egy Si(Li) félvezető detektort használtunk. Az adatokat egy NTA (EMG, Budapest gyártmányú) 1024 csatornás analizátorral gyűjtöttük. A spektrumok felvételének átlagos ideje 24 óra volt. Az egyes csúcsokat a vizsgálni kívánt fémek tartalmazó etalon segítségével azonosítottuk.

Vizsgálataim kezdetén kísérletet tettem a timocitákban található nehézfémek elektron-mikropróbas (EDAX) analízisére. Az EDAX mérések esetén az elektronmikroszkópban lévő minta atomjaiban a K, illetve L héjról nem a γ -fotonok, hanem az intenzív elektronnyaláb löki ki az elektronokat. A karakterisztikus röntgensugárzás keletkezése a továbbiakban a röntgenfluoreszcenciás mérések-nél mondottaknak megfelelően megy végbe. Egy EDAX spektrumot a 3. ábrán mutatok be.



3. ábra Egér timociták elemi összetételének EDAX analízise

Az analízist egy JEOL 100B transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével végeztük, amelyhez egy EDAX 183B félvezető Si(Li) detektor és egy KFKI ICA 70 4048 csatornás analizátor kapcsolódott (Siklós, 1983).

Látható, hogy a mérés során Na, Mg, P, S, Cl, K és Ca jelenlétét lehetett kimutatni. A Cu K α és K β vonala a háttértől (a gridtől) származik. Sajnos a karakterisztikus röntgensugárzási spektrumokat csak 100 másodpercig tudtuk gyűjteni. További elektronbombázás hatására a minta "elégett". Ilyen kevés idő nem volt azonban elegendő a nehézfémek kimutatására, így az EDAX vizsgálatokat a továbbiakban nem folytattam.

4.3.2. Plazma emissziós spektrofotometria

Plazma emissziós spektrofotometriás vizsgálatok esetén a vizsgált minta porlasztás után egy plazmafáklyába kerül. A gerjesztésnek e módja minimalizálja a mátrixhatást és lehetőséget teremt arra, hogy a Rowland-körön elhelyezett több tucatnyi fotoelektron-sokszorozó segítségével több tucatnyi elem mennyiségét lehessen egyszerre, egy mintából meghatározni.

A plazma emissziós mérésekhez a nyúl timocitákat, illetve az 5×10^9 sejtből izolált szubcelluláris frakciókat az izoláló puffer megfelelő mennyiségeiben szuszpendáltuk. A timociták sejtsűrűsége 5×10^8 sejt/ml volt, a magfrakciót 5 ml, a mitokondriális és mikroszómális frakciót 1-1 ml izoláló pufferben szuszpendáltuk. A mintákat liofilizáltuk, majd 2-2 ml cc HNO_3 hozzáadása után kvarc csövekben 120°C -on 2 órán keresztül roncsoltuk. A minták térfogatát desztillált vízzel 5 ml-re egészítettük ki, majd az elemi összetételüket egy ICAP-9000 ICP spektrofotométer (Fisher Scientific Co., USA) segítségével határoztuk meg.

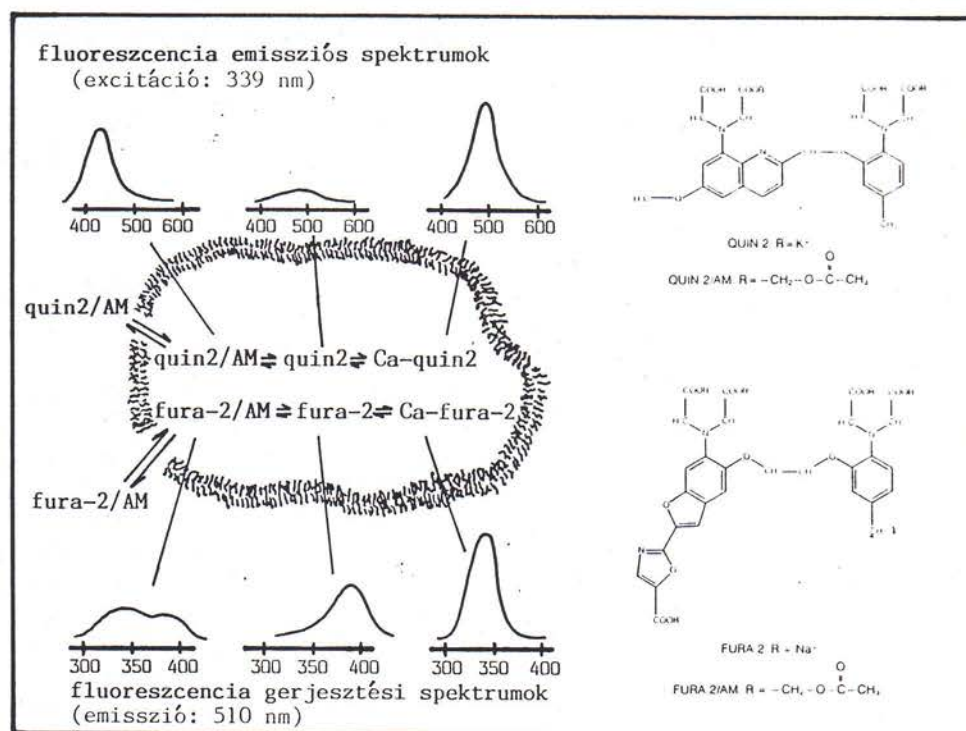
Az adatokat a megfelelő "vak" minták értékeire korrigáltuk. A "vak" minták az izoláló puffer azonos mennyiségeinek liofilizálásával és roncsolásával készültek. A citoszolhoz készült "vak" minta esetén az izoláló puffert végigvittük az izolálás összes lépésén, az esetleges szennyeződések korrekciója végett. A "vak" mintákból származó korrekció soha nem lépte túl az adott elem összes mennyiségének 10 %-át. E szabály alól három kivétel adódott. Vas esetén a korrekció kb. 50 % volt a HNO_3 viszonylag magas vastartalma miatt. Ca és Mg esetén a korrekció rendre 10-20 %-nak, illetve 40-80 %-nak adódott az izoláló puffer Ca^{2+} szennyezései, illetve Mg^{2+} tartalma miatt.

4.4. A kalcium ionok koncentrációjának és transzportjának mérése

4.4.1. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció meghatározása

Az elmúlt tíz-tizenöt évben a kalcium ionok sejten belüli koncentrációjának meghatározására jónéhány, igen érzékeny módszert fejlesztettek ki. A legismertebbek közülük a lipidoldékony fluoreszcens próbákat, pl. klórtetraciklint alkalmazók (Caswell, 1971), a metallokróm indikátorokon, pl. Arsenazo-III-on alapulók (DiPollo és mtsai, 1975), a Ca^{2+} hatására lumineszkáló fehérjéket, pl. aequorint alkalmazó eljárások (Ashley és Campbell, 1979; Blinks és mtsai, 1980; Cobbold és Rink, 1987). Azonban egyik felsorolt módszer sem igazán alkalmas kisméretű sejtek, pl. limfociták sejten belüli Ca^{2+} koncentrációjának meghatározására. A klórtetraciklin a Ca^{2+} -nak a membránhoz kötött részét mutatja ki, a módszer jobbára csak kvalitatív értékelésre alkalmas, az észlelt változások a citoszolikus szabad Ca^{2+} szint változásaival komplementer viszonyban állnak. A felsorolt másik három módszer esetén a sejtmembránt legalább átmenetileg meg kell nyitni, hogy a membránon egyébként át nem haladó molekula (Arsenazo-III, aequorin), illetve eszköz (mikroelektrod) a sejt belsejével érintkezésbe kerülhessen. Mivel a sejten kívüli tér és a sejt belseje között a Ca^{2+} koncentrációgradiense kb. négy nagyságrendnyi, a legkisebb membránsérülés nagy változásokat okozhat a sejt Ca^{2+} homeosztázisában.

A fluoreszcens kelátoroknak (quin2, fura-2) és acetoximetil észterüknek kifejlesztése Roger Y. Tsien és munkatársai nevéhez fűződik (Tsien, 1980; Tsien, 1981; Tsien és mtsai, 1982/a-b; Gryniewicz és mtsai, 1985). E kelátorok Ca^{2+} -komplexének kvantumhatásfoka és így fluoreszcenciája a szabad, Ca^{2+} -mentes forma fluoreszcenciájának sokszorosa. Fura-2 esetén a Ca^{2+} -komplex gerjesztési maximuma is eltolódik a szabad formához képest. E kelátorok tulajdonképpen az EGTA származékainak tekinthetők, így polikarbonsavak. (A quin2 négy, a fura-2 öt karboxilcsoportot tartalmaz, ld. 4. ábra.) Ahhoz, hogy a poláros vegyületek a sejtmembránon keresztüljussanak, apoláros származékaikat, tetra-, illetve penta-acetoximetil észterüket kellett előállítani (ld. 4. ábra). Az észteresített formát a sejtbejuttatás után aspecifikus észterázok elbontják, a Ca^{2+} -érzékeny polikarbonsav visszaképződik és poláros molekulaként a sejt belsejéből kijutni nem tudván, a sejten belül feldúsul. Így a szellemes módszer nemcsak egy poláros molekula sejtbejuttatására alkalmas, hanem az acetoximetil észter segítségével az indikátornak a sejten belüli kb. 100-szoros feldúsulása is elérhető.



4. ábra A sejten belüli Ca^{2+} koncentráció quin2, illetve fura-2 indikátorok segítségével történő meghatározásának elve

Fura-2 indikátorral töltött egér timociták fluoreszcenciáját mutatja az 5. ábra. Az ábrából látható, hogy a sejtek fluoreszcenciájának intenzitása nem egységes. Ez az egyes sejteken belül uralkodó Ca^{2+} koncentráció különbözőségére utalhat. Az eloszlás pontosabb jellemzésére a fejezet további részében ismertetendő áramlási citometrikus vizsgálatok során kerül sor.

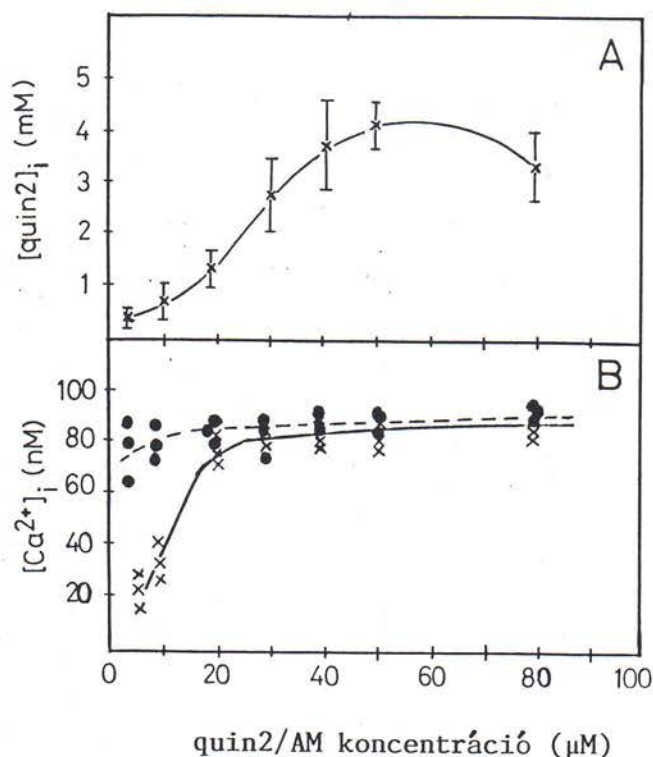
5. ábra Fura-2-vel töltött egér timociták

Az indikátorral való feltöltést a fejezetben leírtak alapján végeztük. Az ábrán látható felvételt egy Leitz Panfoth fluoreszcens mikroszkóppal készítettük UG1 gerjesztési és VG9 emissziós szűrők mellett.

A sejtek feltöltése a Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens indikátorral

Ahhoz tehát, hogy e fluoreszcens indikátorok bármelyikét a sejtbe juttassuk, a sejtet acetoximetil észterükkel (quin2/AM, illetve fura-2/AM) inkubálnunk kell. Az acetoximetil észtereket dimetilszulfoxidos (DMSO) törzsoldatból szokás adagolni (a törzsoldat koncentrációja quin2/AM esetén 10-50 mM, fura-2/AM esetén 1-5 mM között mozog). Mivel az észterek végső koncentrációja soha nem haladja meg a 100 (fura-2 esetén a 10) μM -t, a DMSO végkoncentrációja 0.1-1 térf. % közötti értékeket vesz fel. A DMSO ilyen koncentrációk esetén alig, vagy egyáltalán nem toxikus, sőt 10-100-szor ekkora koncentrációkban (10-20 térf. %-ban) a limfociták fagyasztva tárolásánál gyakran alkalmazott védőanyag (Gray és Golub, 1984). Mindazonáltal 1-2 térf. %-nyi DMSO számos leukémiás sejttípus, így HL-60 sejtek (Collins és mtsai, 1979), valamint Friend sejtek (Mitsuse és Oishi, 1985) differenciálódásához vezet. Ezek a megfigyelések is hangsúlyozzák a csak dimetil-szulfoxiddal kezelt kontroll minták szükségességét akkor, ha a tervezett mérések során a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció meghatározásán kívül más adatokra is kíváncsiak vagyunk.

Az indikátor acetoximetil észtere végkoncentrációjának megválasztásánál is óvatosan kell eljárni. A 6. ábra különböző quin2/AM koncentrációnál elvégzett mérések eredményeit mutatja. Az ábra A részéből leolvasható, hogy a sejten belüli quin2 koncentráció csak a 10 és 40 μM közötti quin2/AM koncentrációtartományban lineáris függvénye az alkalmazott quin2 acetoximetil észter koncentrációnak. A görbe 40 μM quin2/AM koncentráció felett fokozatosan letörik. E jelenség oka abban kereshető, hogy a quin2 acetoximetil észter hidrolízise során észterkötésenként két



6. ábra A sejten belüli quin2 (A) és Ca^{2+} (B) koncentráció függése az inkubálás során alkalmazott quin2/AM koncentrációjától

A nyúl timocitákat quin2/AM-rel inkubálva az acetoximetil észter végkoncentrációját a feltüntetett értékekre állítottuk be. A sejten belüli quin2/AM koncentrációt ^3H -quin2/AM segítségével határoztuk meg. A nyúl timociták sejten belüli térfogatát 158 fl-nek vettük (Eurenius és mtsai, 1969). Az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt Tsien és mtsai (1982/b) alapján számoltuk. A rész: sejten belüli quin2 koncentráció (x). Az adatok három mérés átlagértékei $\pm$ SD. B rész: a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció az intracelluláris nehézfém kelátor, TPEN távollétében (x—x), illetve hozzáadása után (●---●). A TPEN végkoncentrációja 20 μM volt. Az adatok három különálló kísérletsorozatból származnak (Csermely és Somogyi, 1987/b).

molekula ecetsav (egy a quin2-höz kötötten és egy szabadon), valamint egy molekula formaldehid keletkezik. A formaldehid nagyobb koncentrációban sejtméreg, de már kis mennyisége is számottevően csökkenti a sejt redukált glutation tartalmát (Jones és mtsai, 1978). Ebből következően a sejteket nem lehet quin2-vel korlátlan mennyiségben feltölteni (Tsien és mtsai, 1982/b; Hesketh és mtsai, 1983; Rink és Pozzan, 1985 valamint Abboud és mtsai, 1985).

A sejten belüli quin2 koncentráció túlzottan magas értékeinek beállítása már csak azért sem ajánlatos, mert a quin2 komplexképző tulajdonságú. Magas intracelluláris koncentrációja esetén a sejten belül a natív állapothoz képest rendkívül megnövekedett Ca^{2+} -pufferoló hatás érvényesül, amely a különböző agonisták által okozott intracelluláris Ca^{2+} szint változásokat igen le-

csökkentheti, adott esetben észrevehetőtlenné teheti. Ez leginkább fura-2-vel, illetve aequorinnal párhuzamosan végzett kísérletekből derült ki, ahol a másik két indikátor olyan Ca^{2+} transzienseket is kimutatott, amelyek érzékelésére a quin2 nem volt képes (Johnson és mtsai, 1985; Pollock és mtsai, 1986; Goligorsky és mtsai, 1986; Erne és mtsai, 1987).

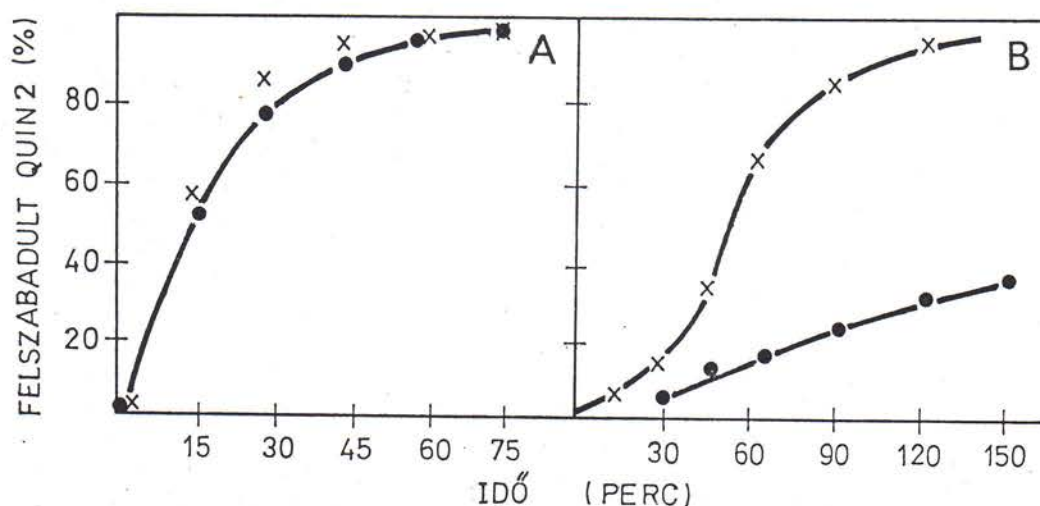
A 6. ábra B része az intracelluláris quin2 koncentrációnak a quin2/AM koncentrációjától való függését mutatja be. A kapott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció értékek 1 mM-os intracelluláris quin2 koncentráció (20 μM -os quin2 acetoximetil észter koncentráció) alatt erőteljes csökkenést mutatnak. E csökkenés látszólagos: az oka a sejteken (nyúl timocitákon) belüli, intracelluláris nehézfémion tartalom. A nehézfémionok affinitása a quin2 indikátorhoz a Ca^{2+} ionok affinitásánál több nagyságrenddel nagyobb. A quin2 nehézfémekkel képzett komplexe fluoreszcenciára képtelen, így a nehézfémionok kioltják a Ca-quin2 komplex fluoreszcenciáját (Hesketh és mtsai, 1983 és 5.2.1. fejezet). E fluoreszcencia-kioltó hatás kis quin2 koncentrációk esetén (értelemszerűen) jobban érvényesül. A quin2 fluoreszcencia ezen esetekben a sejtmembrán permeabilis, nehézfémionokra szelektív komplexképző, TPEN (Arslan és mtsai, 1985) hozzáadásával a "normális" értékre visszaállítható, mint ahogy azt az ábra B részén a szaggatott vonallal összekötött mérési pontok is igazolják. E méréseink megerősítik az Arslan és munkatársai (1985) adatait.

Összefoglalóan megállapítható, hogy az intracelluláris quin2 koncentráció viszonylag szűk tartományában várható zavarmentes, hihető mérési adatok. Ez a koncentrációtartomány T limfociták esetén 1 és 3-4 mM közé tehető.

Fura-2 indikátor esetén a kiindulási acetoximetil észter koncentráció megválasztása jóval kisebb problémát okoz. A fura-2 indikátor kvantumhatásfoka a quin2-ének kb. tízszerese (Gryniewicz és mtsai, 1985). Emiatt tízszer kisebb koncentrációkban is számottevő fluoreszcenciával rendelkezik. Így fura-2 esetén a quin2-nél említett toxikus, illetve Ca^{2+} -pufferoló hatások csak igen kis mértékben jelentkeznek. Az indikátor a nehézfémekre kevésbé érzékeny, mint a quin2 (Gryniewicz és mtsai, 1985; Cobbold és Rink, 1987 valamint az 5.2. fejezet), így kis koncentrációi esetén sem kell számolni a nehézfémek fluoreszcencia-kioltó hatásával. Ujabban megjelent közlemények a fura-2 részleges hidrolíziséről, illetve különböző membránokkal való aggregálódásáról számolnak be (Highsmith és mtsai, 1986; Scanlon és mtsai, 1987; Cobbold és Rink, 1987). Mindezidáig azonban e jelenségeknek a kezdeti fura-2 acetoximetil észter koncentrációtól való függése nem tisztázott.

Az intracelluláris indikátor koncentráció beállítása a kiindulási indikátor acetoximetil észter koncentráció és a sejtsűrűség függvénye. E paramétereken túl az inkubálás (feltöltés) időtartamának megválasztása is fontos tényező lehet.

A quin2 acetoximetil észter hidrolízisének időfüggését a 7. ábra mutatja be. A felszabadult quin2 mennyiségét a quin2 acetoximetil észterre jellemző 425 nm-es emissziós maximum és a quin2-re jellemző 492 nm-es emissziós maximum fluoreszcenciaará-



7. ábra A quin2 acetoximetil észter hidrolízisének időfüggése különböző sejtkoncentrációk esetén

A quin2 acetoximetil észterrel történő inkubálás során a nyúl timocita szuszpenzióból a feltüntetett időpontokban alikvotokat vettünk. A kezdeti quin2/AM koncentráció $20 \mu\text{M}$ volt. Az egyes alikvotok fluoreszcenciáját 425 és 492 nm emissziónál mértük. A felszabadult quin2 mennyiségét e két fluoreszcencia arányából számoltuk, a tiszta quin2 acetoximetil észter 425/492 fluoreszcenciaarányának 4.0-et, a hidrolizált quin2-ének pedig 0.6-ot tekintve. A sejtsűrűség 5×10^6 sejt/ml ($\bullet$), illetve 5×10^7 sejt/ml (x) volt. Az ábra B részén feltüntetett értékek mérése előtt a sejteket $100 \mu\text{M}$ digitoninnal permeabilizáltuk. Az adatok három, eredményeiben hasonló kísérlet egyikének mérési eredményei (Csermely és Somogyi, 1987/a-b).

nyából lehet kiszámítani (Tsien és mtsai, 1982/b). Az ábra A részéből leolvasható, hogy T limfociták esetén 45 percig történő 37°C -os inkubálás elteltével a hidrolízis kb. teljesnek mondható. Ugyanakkor az alkalmazott quin2 acetoximetil észter koncentráció ($20 \mu\text{M}$) esetén 30 percnél kevesebb inkubálás 1 mM-nál kisebb intracelluláris quin2 koncentrációhoz vezet (vö. a 6. ábrával), ahol a quin2 fluoreszcencia az intracelluláris nehézfémionok által eltorzított. Így az adott kísérleti körülmények között a 45-60 perces inkubálási idő bizonyult optimálisnak.

A 7. ábra A részéből az is kitűnik, hogy a quin2 acetoximetil észterének hidrolízise során a hidrolízis sebességét a sejtsuszpenzió sűrűsége nem befolyásolja. Amennyiben a sejteket a quin2/AM hozzáadása előtt digitoninnal lizáltuk (ld. a 7. ábra B részén) a hidrolízis sebessége jóval kisebbnek bizonyult 5×10^6 sejt/ml sejtsűrűségnél, mint 5×10^7 sejt/ml-es, azaz tízszeres sejtkoncentráció esetén. A sejtsuszpenzió koncentrációjának változásával természetesen az adott sejtmennyiségre jutó digitonin koncentrációja is változik. Ez azonban a kísérlet eredményét

nem befolyásolja, ugyanis igen hasonló adatokat kaptunk 10 μM , illetve 1 mM digitonin alkalmazása esetén is (nem bemutatott adatok).

Mi lehet a magyarázata az észlelt különbségeknek? Az aspecifikus észterázok digitonin által okozott denaturációja alapján a különbségek nem magyarázhatók, hiszen az észlelt különbségek hasonlóak voltak a digitonin koncentrációjának nagyságrendi változásai esetén is. Ha ép sejtek esetén a quin2 acetoximetil észter megoszlása a sejten kívüli és a sejten belüli tér között egy gyorsan beálló egyensúlyként jellemezhető, akkor a quin2/AM az észterázokhoz közeli, lokális koncentrációja nem sokat változik a digitoninos permeabilizálás során. Ez esetben az észterázok "felhígulása" a hidrolízis sebességcsökkenésének jó magyarázatát adja. Ha viszont az ellenkező eset áll fenn: ép sejtek esetén nem a quin2 hidrolízise, hanem felvétele a sebességmeghatározó folyamat, akkor a permeabilizálással ugrásszerűen megnő az észterázok által elérhető acetoximetil észterek mennyisége és így a hidrolízis sebességének is növekedni és nem csökkenni kellene.

A 7. ábrából az is kitűnik tehát, hogy a quin2 acetoximetil észterének hidrolízise során egy viszonylag gyorsan beálló megoszlási egyensúlyt egy sebességmeghatározó észterhidrolízis követ. E kísérlet igazolja Rink és Pozzan (1985) korábbi, szintén az észterhidrolízist sebességmeghatározó lépésnek gondoló feltételezését.

Fura-2 indikátor esetén az acetoximetil észter hidrolízise a tízszer kisebb végkoncentráció miatt már 20 percen belül teljesen mondható (nem bemutatott adatok).

Az alábbiakban az eddigi tapasztalatok hasznosításával a limfociták fluoreszcens indikátorokkal való feltöltésének egy szokásos menetét adom meg:

az 5×10^7 sejt/ml sejtsűrűségű limfocitákat 37 °C-on 20 percen át inkubáltuk az indikátor acetoximetil észterével módosított Hank-féle médiumban. A quin2/AM és a fura-2/AM végkoncentrációja rendre 20-30, illetve 1-4 μM volt. Quin2 esetén az inkubálást 20 perc után is folytattuk 5×10^6 sejt/ml sejtsűrűségnél a 60. perc eléréséig.

Fluoreszcenciamérés

Az acetoximetil észterrel történő inkubálás után az indikátor feleslegben maradt acetoximetil észterét, valamint az extracelluláris szabad quin2-t, illetve fura-2-t a sejtek lecentrifugálásával távolítottuk el (400 g, 10 perc, szobahőmérséklet). A fluoreszcenciamérésig a sejteket újra szuszpendálva 25, illetve 37 °C-on tároltuk. A tárolás során (különösen 37 °C-on) a sejten belüli szabad indikátor fluoreszcenciája a mérés során irreálisan magas intracelluláris Ca^{2+} koncentrációértékeket eredményez. Ezért az elszabadult, extracelluláris indikátort közvetlenül a mérés előtti újracentrifugálással /szuszpendálással távolítottuk el. Az extracelluláris quin2, illetve fura-2 kimutatására Hesketh és munkatársai (1983), valamint Pollock és munkatársai (1986) módszerét alkalmaztuk. Ép, indikátorral töltött sejtekhez 10-20 μM -os koncentrációban Mn^{2+} ionokat adtunk. Az indikátor fluo-

reszcenciájának a hozzáadást követő azonnali zuhanása az extracelluláris szabad indikátor mennyiségével arányos. E vizsgálat az extracelluláris indikátor fluoreszcenciájának korrekcióként való számításbavételére is alkalmas volt. (Ez különösen azokban az esetekben bizonyul fontosnak, amikor az extracelluláris térrel összeköttetésben lévő indikátor mennyisége centrifugálással el nem távolítható; kötött.) A felszabadult extracelluláris indikátor mennyisége soha nem haladta meg a teljes fluoreszcencia 5 %-át. Amennyiben azonban ez az érték a 2 %-os határ fölé emelkedett, az előzőekben említett újracentrifugálási/szuszpendálási lépést alkalmaztuk.

A fluoreszcencia méréseket Varian SF-330 (USA), illetve Jobin Yvon Spectrofluor JY3 (Franciaország) készülékekkel végeztük. Az excitációs/emissziós hullámhossz quin2 esetén 339/492 nm, fura-2 esetén 340/510, illetve 380/510 nm volt. Az alkalmazott rések 4 nm-esek voltak. A mintákat 1 cm-es, négyzetes, 37 °C-on termosztált kvarc küvetákban vizsgáltuk.

A fluoreszcencia értékeket mind a minta higulására, mind a hozzáadott anyagok autofluoreszcenciájára, illetve fényszórásnövelő hatására korrigáltuk. (Az utóbbi értékeket fluoreszcens indikátor nélküli, csak DMSO-val inkubált minta vizsgálatával határoztuk meg.)

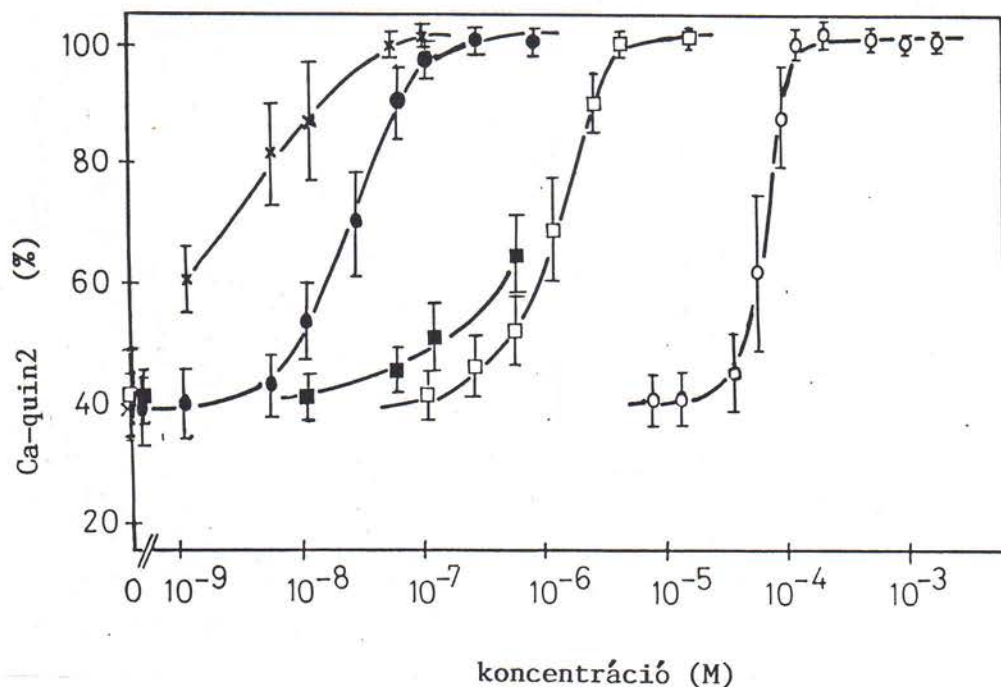
A vizsgálni kívánt anyagok hozzáadása után minden mintát az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció kiszámításához kalibrálni kell. A kalibráció során a mintában lévő quin2, illetve fura-2 fluoreszcenciáját legalább két ismert Ca^{2+} koncentrációnál kell megmérni. Célszerűen az egyik érték a külső közeg mM-os Ca^{2+} koncentrációjánál mutatott maximális, a másik érték a nM-os Ca^{2+} koncentráció esetén mutatott minimális fluoreszcenciaszint lehet.

Ahhoz, hogy a sejtbe juttatott quin2, illetve fura-2 az általunk beállított (sejten kívüli) Ca^{2+} koncentrációt mutassa, a sejteket permeabilizálni kell. A 8. ábrán ionomicin, A23187, X537-A (Lasalocid-A), digitonin és Triton X-100 növekvő koncentrációinak a quin2 fluoreszcenciájára gyakorolt hatását mutatombé.

A 8. ábrán látható adatokból az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

(1) az X537-A ionofór nem alkalmas a Ca^{2+} koncentráció mérés során szükséges sejt-permeabilizálásra, hiszen legkisebb hatékony koncentrációja (azaz azon koncentrációja, ahol a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció egyenlővé válik a külső, mM-os Ca^{2+} koncentrációval) esetén autofluoreszcenciája összemérhető, illetve meghaladja a quin2 összes fluoreszcenciáját (8. ábra, illetve nem bemutatott adatok);

(2) az ionomicin, A23187, digitonin és Triton X-100 legkisebb hatékony koncentrációja rendre 50 nM, 200 nM, 5 μM és 200 μM (0.012 súly %) módosított Hank-féle médiumban, 5×10^6 sejt/ml sejtsűrűség esetén. Meg kell, hogy jegyezzem, ez az érték nagymértékben függ az alkalmazott sejtsűrűségtől és a sejtkultúra elegy esetleges hidrofób összetevőitől. Szérummal, illetve marhaszérumalbuminnal kiegészített médiumok esetén a legkisebb haté-

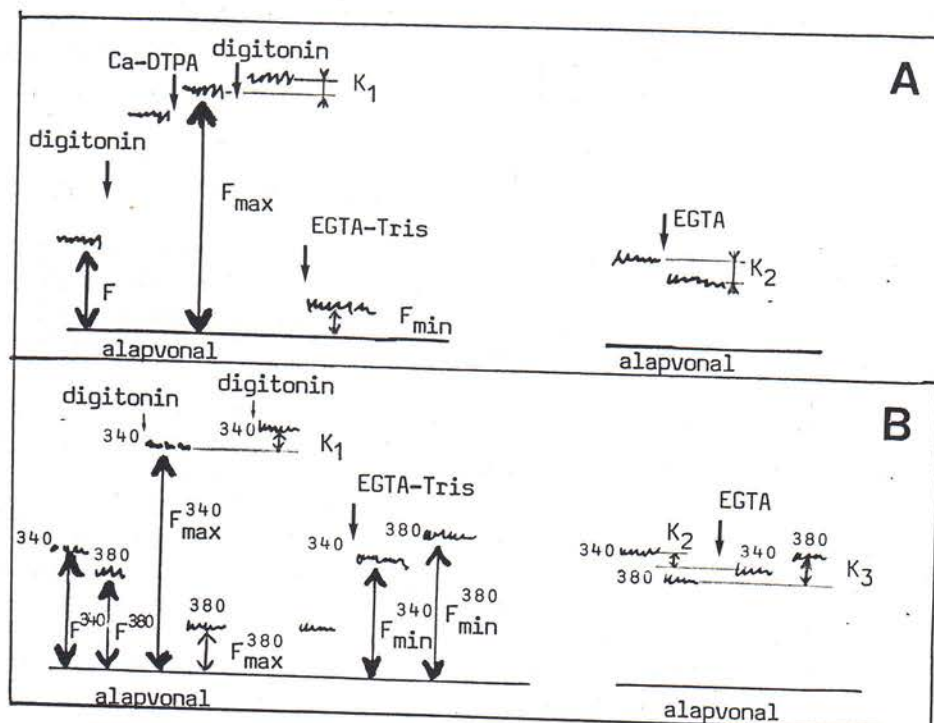


8. ábra T limfociták permeabilizálása különböző ionofórokkal és detergensekkel

A quin2-vel töltött nyúl timocitákhoz különböző koncentrációkban ionomicint (x), A23187-et (●), X537-A-t (■), digitonint (□) és Triton X-100-at (○) adtunk. A Ca-quin2 komplex százalékos arányát a 3-5 perc után mért, állandósult fluoreszcencia értékekből Tsien és munkatársai (1982/b) módszere alapján számoltuk. A Triton X-100 átlagmólsúlyát 620 D-nak vettük. A quin2 sejten belüli koncentrációja 3 mM volt. Az értékek három mérés átlagértékei $\pm$ SD (Csermely és Somogyi, 1987/b).

kony koncentráció értékei akár az itt megadottak tíz-, sőt százszorosát is elérhetik.

Az indikátorok fluoreszcenciája kalibrálásának és a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció kiszámításának két módszere ismeretes. A Tsien és munkatársai (1982/b) által alkalmazott módszer szerint a quin2-t először detergens-permeabilizálással hozzuk egyensúlyba a sejten kívüli, 1 mM-os Ca^{2+} koncentrációval, majd a nM-os Ca^{2+} koncentrációt EGTA hozzáadásával és a pH (Tris lúggal történő) 8.0-8.5-re való eltolásával állítjuk be. Hesketh és munkatársai (1983) módszere szerint a quin2 maximális fluoreszcenciáját Ca-ionofórok segítségével érjük el, a rendszer autofluoreszcenciáját pedig Mn^{2+} ionok hozzáadásával határozzuk meg, amelyek az előzőekben ismertetett módon kioltják a Ca-quin2 komplex fluoreszcenciáját. A kalibrációs eljárás e két módszerével analóg eljárások születtek fura-2 indikátor esetén is (Gryniewicz és mtsai, 1985; Pollock és mtsai, 1986).



9. ábra A quin2 és fura-2 mérések kalibrálása (szemléltető ábra)

A hozzáadott anyagok szokásos végkoncentrációi: digitonin, 10 μM (vagy A23187, 200 nM); Ca-DTPA, 100 μM (vagy Ca-EGTA, 250 μM); EGTA-Tris, 5 mM EGTA + 10 mM Tris (vagy MnCl_2 , 5 μM). A fluoreszcencia jelek a minta higulására korrigáltak.

A kalibrációs eljárás e két módjának illusztrálását a 9. ábra szolgálja. Az ábra A részén a quin2 fluoreszcenciájának Tsien-féle kalibrációja látható. A sejten belüli Ca^{2+} koncentráció értékét ezen esetben a

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = 115 (F' - F'_{\min}) / (F'_{\max} - F') \quad (\text{nM})$$

egyenlet alapján lehet kiszámolni (Tsien és mtsai, 1982/a-b). Az egyenletben F' az aktuális fluoreszcencia korrigált értéke, $F'_{\max}$ és $F'_{\min}$ rendre az elérhető fluoreszcencia maximum, illetve minimum értékének korrigált formája. 115 a Ca-quin2 komplex disszociációs állandója nM-ban. Az egyes fluoreszcencia értékeket az autofluoreszcenciára, az extracelluláris indikátorok mennyiségére és a nehézfémekre kell korrigálni. Mivel a digitonin második hozzáadása esetén (ld. 9. ábra A része) az észlelt fluoreszcencia változás már csak az autofluoreszcenciából származik, K_1 az autoszintézisével nincs szükség a csak DMSO inkubált "autofluoreszcencia-kontroll" vizsgálatára.) K_2 a sejten kívüli indikátor mennyiségének figyelembevételére szolgáló korrekciós faktor. E két korrekció figyelembevételével a 9. ábra A részén szereplő fluoreszcencia értékekből a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció kiszámításánál

használható, a fenti egyenletben szereplő értékeket a következőképpen kaphatjuk:

$$\begin{aligned} F' &= F - K_2 \\ F'_{\min} &= F_{\min} - 2 K_1 \\ F'_{\max} &= F_{\max} - K_1 - K_2 \end{aligned}$$

A Ca-DTPA hozzáadására a nehézfémionoknak az 5.2. fejezetben részletezendő zavaró hatása miatt van szükség. A DTPA nehézfémekre specifikus komplexképző, Ca-komplexe a quin2-vel komplexet képzett nehézfémeket Ca^{2+} -ra cseréli.

A Hesketh-féle kalibrálási eljárás során (Hesketh és mtsai, 1983) a detergenst Ca-ionofórral, az EGTA-Tris keveréket MnCl_2 -dal kell helyettesíteni. A nehézfémek korrekciójára szolgáló Ca-DTPA lépés a minimális fluoreszcencia meghatározásától értelemszerűen csak elkülönítetten végezhető (a Mn^{2+} is nehézfém). A Mn-quin2 komplex kismértékű fluoreszcenciája miatt a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció meghatározására az alábbi képlet szolgál:

$$\text{Cai} = 115 (F' - F'_{\min} - 0.16(F'_{\max} - F'_{\min})) / (F'_{\max} - F') \quad (\text{nM})$$

ahol a vesszős értékek értelmezése a fentiekkel megegyező.

Fura-2 indikátor esetén a kalibrációs eljárás a quin2-ével megegyező abban az esetben, ha csak 340 nm-en gerjesztettük a vizsgált mintákat. A kalibrálás menetéből a nehézfémek hatásának vizsgálata (Ca-DTPA hozzáadása) elhagyható, az egyenletekben pedig a Ca-quin2 komplex disszociációs állandójául szolgáló 115 nM 226 nM-lal (a Ca-fura-2 komplex disszociációs állandójával) helyettesítendő.

A 9. ábra B része egy olyan fura-2 mérés kalibrálási eljárását mutatja be, ahol a Ca^{2+} mentes indikátor (szabad fura-2) 380 nm-en mutatott fluoreszcenciáját is követjük. Ez esetben a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció kiszámítására szolgáló képlet a következő (Gryniewicz és mtsai, 1985):

$$\text{Cai} = \frac{K_d}{(R' - R'_{\min}) / (R'_{\max} - R')} R_{380} \quad (\text{nM})$$

ahol az egyes értékeket a 9. ábra B részében szereplő adatokból a következőképpen kaphatjuk:

$$\begin{aligned} R' &= (F_{340} - K_2) / F_{380} \\ R'_{\min} &= (F_{340, \min} - 2 K_1) / (F_{380, \min} - K_3) \\ R'_{\max} &= (F_{340, \max} - K_1 - K_2) / F_{380, \max} \\ R'_{380} &= (F_{380, \min} - K_3) / F_{380, \max} \end{aligned}$$

A fura-2 kalibrálásának e módszere az előzőnél láthatóan sokkalta bonyolultabb. Alkalmazása mégis számos előnnyel jár abban az esetben, ha a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció értékei távolabb esnek a Ca-fura komplex 226 nM-os disszociációs állandójától (pl. a sejtek 100 nM körüli nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja). Ezen esetekben a 380 nm-es fluoreszcenciát is számításban vevő kalibrációs eljárás sokkal megbízhatóbb Cai értékeket szolgáltat.

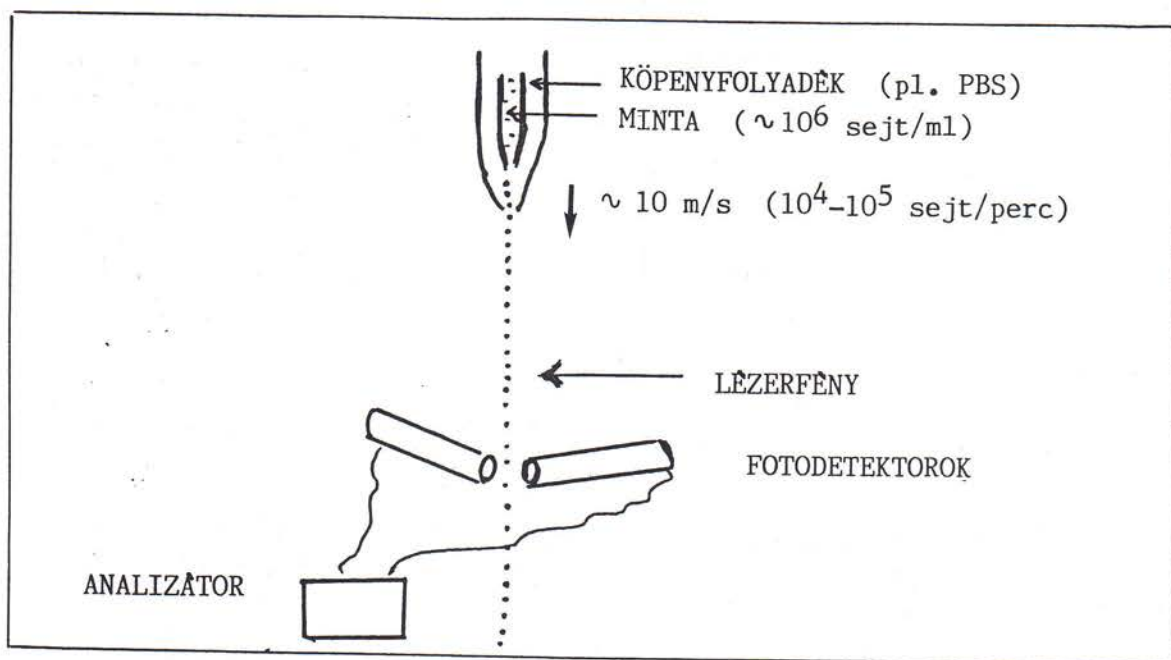
A kalibrációs eljárás lehetőséget ad a sejten belüli indikátor-koncentráció közelítő meghatározására is. A maximális és a

minimális fluoreszcencia közötti különbség arányos a sejtekbe bezárt indikátor koncentrációjával. E fluoreszcenciakülönbségnek a szabad indikátor fluoreszcencia-kalibrálósorozatához való hasonlításával, az intracelluláris térfogat ismeretében a sejten belüli indikátor-koncentráció számolható. Quin2 esetén sokkal pontosabb eredményre juthatunk triciált quin2/AM alkalmazásával, ahol a sejtek által felvett, majd a sejtek lizálásakor eleresztett radioaktivitás mennyiségéből a quin2 sejten belüli koncentrációja meghatározható.

Mennyiben befolyásolják a nem élő sejtek az átlagos fluoreszcenciát? (Áramlási citometrikus vizsgálatok)

A 4.1. fejezetben már említésre került, hogy a tripán kékkel áteresztő (nem élő) sejtek aránya maximálisan 2-5 % volt az általunk izolált mintákban. E sejtek azonban Ca^{2+} -ra nézve is áteresztőek. Így a bennük lévő Ca^{2+} -érzékeny indikátor maximális fluoreszcenciát mutat. Maximális fluoreszcenciával bíró sejtek (kis arányuk ellenére) jelentősen torzíthatják a Ca_i fluoriméterben mérhető átlagértékeit. Ezért vált fontossá annak a megállapítása, hogy ezek a Ca^{2+} és tripán kék számára átjárható sejtek hogyan vesznek részt az átlagos fluoreszcencia-jel kialakításában. E kérdést áramlási citometrikus vizsgálatokkal tudtuk eldönteni.

Egy áramlási citométer vázlatos felépítését mutatja a 10. ábra.

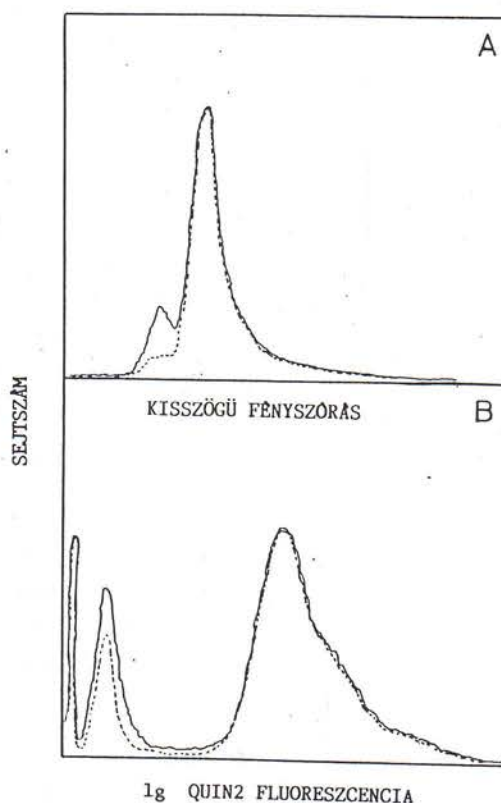


10. ábra Áramlási citométer felépítésének elvi vázlata

A mintaként vizsgálni kívánt sejtszuszpenzió a nagy sebességű porlasztás után olyan cseppecskékre válik szét, amelyek maximálisan egy sejtet tartalmaznak. A kb. 10 m/sec sebességgel haladó sejtek útját egy lézersugár keresztezi, amely a megfelelően megválasztott fluoreszcens jelzőanyagot gerjeszteni képes. Röviddel

később a fluoreszkáló sejtek fotosokszorozók előtt haladnak el, és így a sejtek fluoreszcenciájának egyenként való meghatározása lehetővé válik. A módszer hatalmas előnye, hogy néhány perc alatt több mint százezer sejt egyenkénti analizisét képes elvégezni és így a fluoreszcencia-jel megoszlása vizsgálatának leghatékonyabb eszköze.

Az áramlási citometrikus vizsgálatokat egy FACS II (Beckton and Dickinson, USA) készülékkel végeztük. A gerjesztő lézerfényt egy Spectra-Physics 2000 kripton-argon gázlézer szolgáltatta. A quin2 gerjesztésére a 351.1-363.8 nm-es ultraibolya sugárcsoport használtuk 160 mW energiakibocsátás mellett. A vizsgált minta sejtsűrűsége $2-3 \times 10^6$ sejt/ml volt, módosított Hank-féle médiumban. A mérések megkezdése előtt a sejteket egy 25μ -os szűrőn a lehetséges aggregátumok eltávolítása végett átszűrtük. Egy kísérlet folyamán 10^5 sejtet vizsgáltunk meg (kb. 50 μ l minta), kb. 5 perces időtartam alatt. A mintát izotóniás sóoldat lamináris



11. ábra A propidium jodid-negatív (élő) sejtek hozzájárulása nyúl timociták kiszögű fényszórásához (A), illetve quin2 fluoreszcenciájához (B)

A nyúl timociták quin2-vel való feltöltését a fejezetben leírtak alapján végeztük el. A quin2 intracelluláris koncentrációja 3 mM volt. A timocitákat 0.01 súly % végkoncentrációjú propidium jodiddal festettük meg. Az ábra A részén a kiszögű fényszórás, B részén pedig a quin2 fluoreszcenciájának logaritmusa látható. Az egész sejtpopulációra jellemző értékeket folyamatos vonallal, az élő sejtekre jellemző értékeket szaggatott vonallal kötöttük össze (Csermely és Somogyi, 1987/b).

áramába fecskendeztük. A mérések folyamán a kisszögű fényszórást, a 408 és 550 nm félértékek közötti kék fluoreszcenciát és a 650 nm-nél nagyobb hullámhosszú vörös fluoreszcenciát párhuzamosan vizsgáltuk.

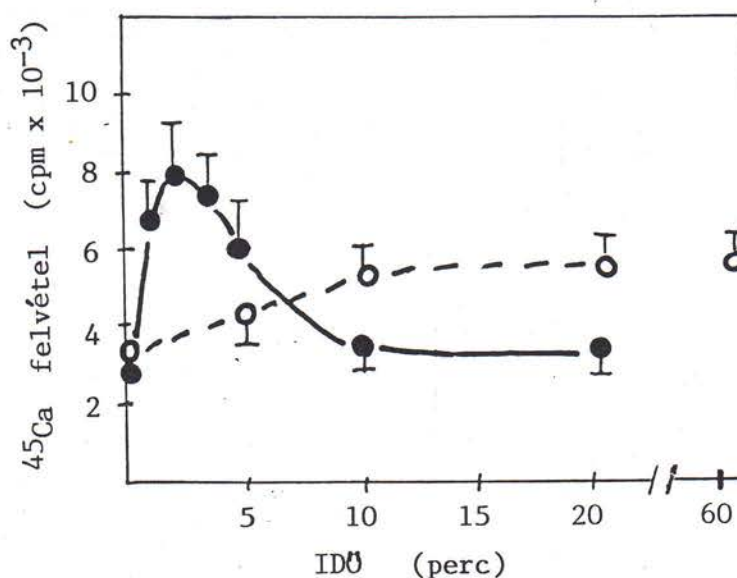
Vizsgálatainkban a nem élő sejteket propidium jodiddal jelöltük (Stöhr és Vogt-Schaden, 1980). A propidium jodid az élő sejtek membránján nem képes áthatolni, viszont DNS-sel érintkezve jellegzetes, vörös fluoreszcenciát mutat. Az áteresztővé vált, illetve a nem áteresztő (élő) sejteket így, vörös fluoreszcenciájuk alapján külön is vizsgálni lehet. A 11. ábrán e vizsgálatok eredményeit mutatom be. Azt, hogy a propidium jodid valóban a nem élő sejteket festette meg az is bizonyítja, hogy az ábra A részén a propidium jodid pozitív (a folytonos és a szaggatott vonal közötti) sejtek kisszögű fényszórása is a nem élő sejtekre jellemző, viszonylag alacsony érték (Loken és Herzenberg, 1975).

A 11. ábra B részéből kitűnik, hogy a propidium jodid pozitív sejtek hozzájárulása a teljes fluoreszcenciához viszonylag alacsony. A bemutatott kísérletben a sejtek 4 %-a volt tripán kékre átjárható (ez az arány megfelelt a propidium jodiddal festődő sejtek arányának is; nem bemutatott adatok), a 11. ábra B részén látható --logaritmikus-- quin2 fluoreszcencia megoszlásból pedig kiszámolható, hogy az összes fluoreszcenciához való hozzájárulásuk 1 %-nál is csekélyebb. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az átjárhatóvá vált (nem élő) sejtek nem tartalmazzak számottevő quin2 mennyiséget. Ez az eredmény várakozásainknak is megfelel, hiszen az áteresztővé vált sejtek észteráz aktivitása jelentősen lecsökken (Campbell, 1983), így nem képesek a quin2 acetoximetil észter hidrolízisére sem. Kísérleteink tanulságaként megállapíthatjuk, hogy tripán kék áteresztő sejtek jelenléte nem zavarja számottevően a Cai meghatározására szolgáló fluoreszcenciás eljárásokat.

A quin2 fluoreszcenciájának megoszlását mutató fő csúcs a 11. ábra B részén aszimmetrikus alakú. Ez az aszimmetria több, különböző intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjú sejtpopuláció jelenlétéből fakadhat. Aszimmetriához vezethetne persze az is, ha a quin2 eloszlása az egyes sejtekben meghatározott szintek szerint változna. A quin2-nek ilyen eloszlása azonban semmiképpen sem lehet általános jelenség, hiszen egér lép B limfociták (Ransom és mtsai, 1986), illetve 9H5 T limfociták (Weiss és mtsai, 1984/b) esetén szimmetrikus eloszlást sikerült kimutatni.

4.4.2. ^{45}Ca felvétel és leadás mérése T limfocitákon

A ^{45}Ca felvételt 10 mM Hepes-sel (pH 7.4), esszenciális aminosavakkal, penicillinnel és streptomocinnel (100-100 U/ml), valamint 40 kBq/ml ($2-2.5 \times 10^6$ cpm/ml) $^{45}\text{CaCl}_2$ -dal kiegészített Eagle médiumban vizsgáltuk. Az 1.0 ml végtérfogatú, 5×10^6 sejt/ml sejtsűrűségű mintákat Eppendorf csövekben inkubáltuk 37 °C-on. A ^{45}Ca felvételének az inkubálás idejétől való függését a 12. ábra mutatja be.



12. ábra Egér timociták ^{45}Ca felvételének időfüggése

A ^{45}Ca felvételének vizsgálatát a fejezetben leírtak alapján végeztük. Az egér timocitákat A23187 nélkül (o - - o), illetve 5 nM A23187 jelenlétében (●—●) vizsgáltuk. Az egyes feltüntetett értékek három mérés átlagértékei $\pm$ SD.

A 12. ábrából látható, hogy ép sejtek esetén a felvett ^{45}Ca mennyisége kb. 10-20 perc alatt éri el a maximális szintet. Ca-ionofór jelenlétében a maximumot 2 perc elteltével tudtuk kimérni. Így az ionofórokkal végzett kísérletek esetén inkubálási időnek a 2 percet választottuk.

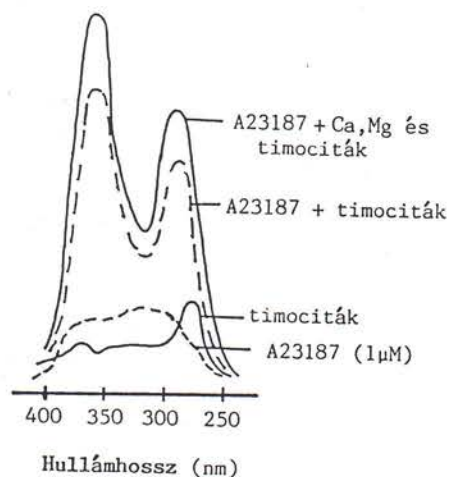
Az inkubálás befejeztével a mintákat egy mikrocentrifugában centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után az Eppendorf csöveknek a sejteket tartalmazó hegyét levágtuk és szcintillációs küvettkébe helyeztük. A minták radioaktivitását 5.9 g/l difenil-oxazol, 160 mg/l 1,4-di(2-(5-fenil)-oxazoil)benzol, 30 térf. % Triton X-100 és 70 térf. % toluol tartalmú szcintillációs koktél 5 ml-ében egy Beckman LS 7300 típusú szcintillációs számláló segítségével határoztuk meg.

A ^{45}Ca kiáramlásának meghatározásához az egér timocitákat 160 kBq (10^7 cpm) $^{45}\text{CaCl}_2$ -dal 30 percig inkubáltuk a ^{45}Ca felvétel körülményei között. A fel nem vett ^{45}Ca -ot centrifugálással (400 g, 5 perc, 4°C) távolítottuk el. A sejteket kétszer mostuk ugyanolyan térfogatú 4°C -os Eagle médiummal. Az egér timocitákat végül 37°C -os Eagle médiumban szuszpendáltuk újra (sejtsűrűség: 5×10^6 sejt/ml) és a kísérletekben meghatározott idő elteltével a szuszpenzió 0.5 ml-es alikvotjait Eppendorf csövekben egy mikrocentrifugában centrifugáltuk. A felülúszók 2 x 0.2 ml-ének radioaktivitását a fenti módszer alapján határoztuk meg.

4.5. Fluoreszcenciás vizsgálatok

4.5.1. Az A23187 fluoreszcenciájának vizsgálata

Az A23187 fluoreszcenciájának vizsgálatát Pfeiffer és munkatársai (1974) alapján végeztük. Az A23187 gerjesztési fluoreszcencia spektrumait a 13. ábrán mutatom be.



13. ábra Az A23187 gerjesztési fluoreszcencia spektrumai

A fluoreszcencia meghatározása 1 cm-es kvarc küvettában történt 430 nm emissziós hullámhossz és 4 nm-es rések mellett. A Ca^{2+} és Mg^{2+} végkoncentrációja 1-1 mM, a timociták sejtsűrűsége 5×10^6 sejt/ml volt.

A 13. ábráról leolvasható, hogy az A23187 a legnagyobb fluoreszcenciával 370 nm-es gerjesztés esetén rendelkezik. Így további méréseink esetén a gerjesztési hullámhosszat 370 nm-nek választottuk 430 nm-es emisszió és 4 nm-es rések mellett. A 13. ábrán az is látható, hogy az A23187 fluoreszcenciája érzékenyen függ a közeg polaritásától és a jelenlévő ionok mennyiségétől. A jelenség bővebb tárgyalására az 5.4.3. fejezetben fogok visszatérni.

4.5.2. Emissziós anizotrópia mérése

Az emissziós anizotrópia értéke érzékenyen jellemzi a fluoreszcens anyag mozgási szabadságát. A fluorofór szabad forgása esetén az emissziós anizotrópia viszonylag alacsony (negatív), a fluorofór immobilizálódása esetén azonban egyre magasabb értéket vesz fel (pozitívvá válik és 0.4-hez közelít) (Szalay és Damjanovich, 1983).

Különböző anyagok fluoreszcenciájának polarizációját, emissziós anizotrópiáját Chen és Bowman (1965) módszerével határoztuk meg. A mérés tulajdonképpen két polarizációs szűrő azonos, illetve keresztezett állásánál történő fluoreszcenciamérésre vezethető vissza. A polarizációs szűrők egyikét a gerjesztő, másikat az emittált fény útjába kell helyezni. A használt polarizációs szű-

rők az Oriel Co. (Stamford CT, USA) gyártmányai voltak. Az emissziós anizotrópia értékének meghatározásához Jablonski formuláját használtuk:

$$r = (I_{vv} - G \times I_{vh}) / (I_{vv} + 2G \times I_{vh})$$

ahol I_{vv} és I_{vh} rendre a függőleges-függőleges, illetve a függőleges-vízszintes polarizációs szűrők mellett mért fluoreszcencia értékei. G az úgynevezett rácsfaktor (grating factor), amely a vízszintes-függőleges és a vízszintes-vízszintes polarizációs szűrő állások mellett mért fluoreszcencia értékek hányadosa. G értéke a kísérleti összeállításra jellemző állandó, amely kísérleteinkben 0.90-nak adódott.

4.5.3. Tirozin, triptofán → A23187 energiatranszfer mérése

Energiatranszfer akkor jöhet létre két fluoreszcens csoport között, ha az egyiknek (a donornak) a fluoreszcencia emissziós spektruma átlapol a másik (az akceptor) gerjesztési spektrumával. A Tyr, Try csoportok fluoreszcenciájának emissziós maximumán (330 nm-en) az A23187 gerjeszthető. Az A23187 másodlagos emissziója 430 nm-en jelentkezik. Az energiatranszfer nagyságrendje a két fluorofór, a donor és az akceptor egymástól való átlagos távolságának szigorú függvénye. Ahogy a fluorofórok közelebb és közelebb kerülnek egymáshoz, az energiatranszfer mértéke egyre jelentősebb lesz.

A tirozin, triptofán csoportok és az A23187 közötti energiatranszfert Hyono és mtsai (1985) alapján mértük. A gerjesztési hullámhossz 270 nm volt. A fluoreszcencia emissziós spektrumokat az A23187 lépésenkénti hozzáadása után vettük fel 4 nm-es rések mellett. Az egér timociták sejtsűrűsége 2×10^6 sejt/ml volt.

Az emissziós spektrumokat az A23187 270 nm-nél történő gerjesztésekor észlelt fluoreszcenciájával korrigáltuk. Mint ahogy azt a 4.5.1., illetve az 5.4.3. fejezetben bemutatom, az A23187 fluoreszcenciája a közeg polaritásának igen érzékeny függvénye. Így az A23187 elsődleges (nem energiatranszferből származó) fluoreszcenciáját szója-lecitin liposzómák jelenlétében határoztuk meg. A liposzómákat Sonic 300 (Artex Inc., Farmingdale NY, USA) ultrahang generátorral végzett szonikálással állítottuk elő. A liposzómák optimális sűrűségét ($0.2-2 \mu\text{g lipid/ml}$) annak alapján határoztuk meg, hogy a hozzájuk adott A23187-nek a 4.5.1. fejezet alapján mért fluoreszcenciája mely liposzóma-sűrűségnél egyezik meg a 2×10^6 sejt/ml sűrűségű timocitákhoz adott ugyanolyan végkoncentrációjú A23187 fluoreszcenciájával.

4.6. A Ca^{2+} - és foszfolipid-függő fehérje kináz (fehérje kináz C) aktivitásának meghatározása

A membránkötött fehérje kináz C szolubilizálása

A fehérje kináz C enzim aktivitásának meghatározásához a 4.2. fejezet alapján izolált citoszolt, illetve mikroszómális frakciókat használtuk fel. Az enzimaktivitás méréseket az izolálástól

számított 2-4 órán belül végeztük el. A citoszolbeli fehérje kináz C aktivitást közvetlenül a citoszol alikvotjaiból határoztuk meg. A membránkötött fehérje kináz C aktivitásának méréséhez az enzimet a membránból szabaddá kell tenni, szolubilizálni kell. Ez leggyakrabban nemionos detergenssek, pl. Triton X-100 segítségével történik.

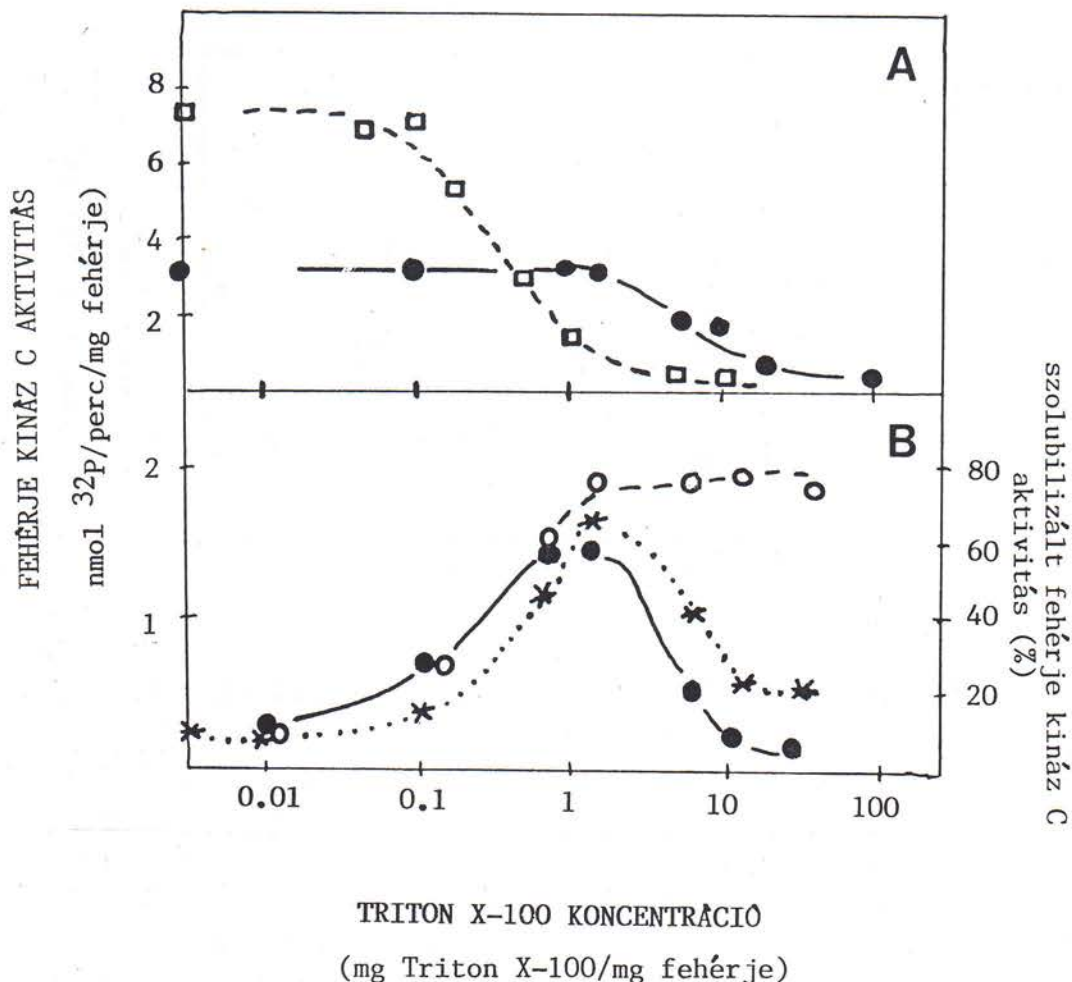
A 14. ábrán a fehérje kináz C szolubilizálhatóságának és aktivitásának a Triton X-100 koncentrációjától való függését mutatom be. Az ábra A részén a citoszolbeli és a membránkötött enzim aktivitásának változása látható. Az ábra B részének adatai alapján megállapíthatjuk, hogy a membránkötött enzim valamivel ellenállóbb a Triton X-100 gátló hatásával szemben mint a citoszolbeli forma. Ez a megfigyelés összhangban áll Wickremasinghe és munkatársainak (1986) megfigyeléseivel, akik szintén a membránkötött forma detergenssel szembeni nagyobb stabilitásáról számoltak be. Az ábra B részén a membránkötött enzim szolubilizálhatóságát mutatom be. Magasabb Triton X-100 koncentrációk esetén az enzim szolubilizációjának látszólagos mértéke (●—●) erős csökkenésnek indul. A felülúszóban megjelenő aktivitás csökkenésével párhuzamosan azonban a teljes minta összes enzimaktivitása is erőteljesen csökkenni kezd. Ez a jelenség a detergens által okozott gátlásra enged következtetni. A Pierce cég által forgalmazott Extracti Gel D oszloppal történő detergensmentesítés után kapott magas enzimaktivitás-értékek meggyőzően bizonyítják, hogy e koncentrációtartományban nem a szolubilizáció szorult vissza, hanem valóban az enzim reverzibilis gátása játszódtott le (14. ábra B. rész és nem bemutatott adatok).

Amennyiben a 14. ábra A és B részeit összehasonlítjuk, megállapíthatjuk, hogy a Triton X-100 közel azonos koncentrációtartományban szolubilizálja és gátolja az enzimet. Így Triton X-100-zal való szolubilizálás esetén a detergens eltávolításáról minden esetben gondoskodnunk kell.

Az alkalmazott detergens eltávolítására az irodalomban szinte kivétel nélkül a DEAE DE52 anioncserélő kromatográfiát alkalmazzák. A kromatográfiás elválasztás profilját a 15. ábrán mutatom be.

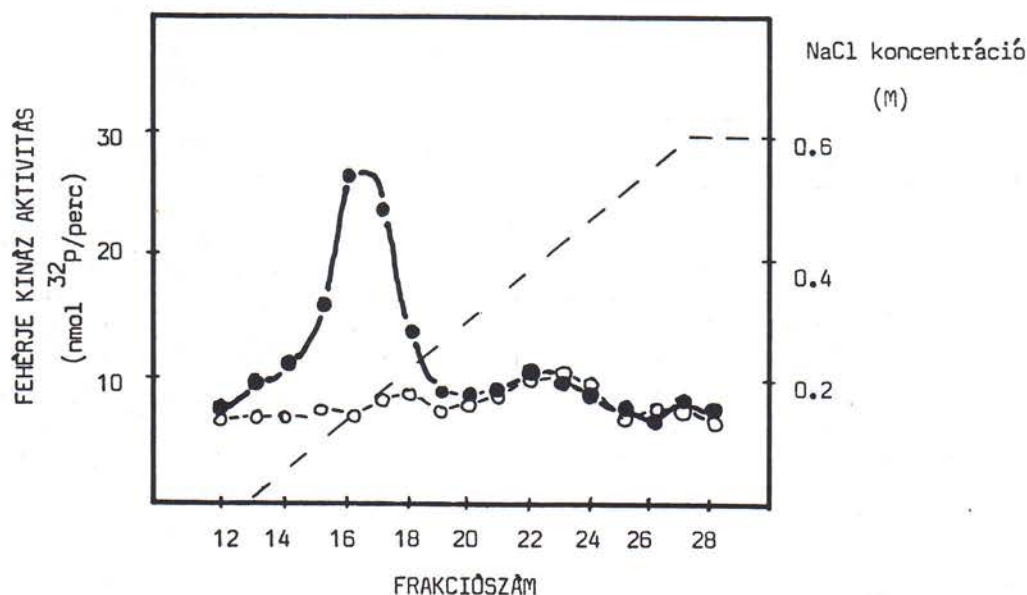
Az ábrán látható, hogy a fehérje kináz C-t 0.1-0.2 M-os NaCl koncentráció mellett lehet eluálni. Magasabb NaCl koncentráció esetén (kb. 0.3-0.4 M) egy Ca^{2+} -mal és foszfolipidekkel nem aktiválható fehérje kináz is eluálódik. Ez a csekély aktivitással bíró fehérje kináz esetleg az irodalomban M kinázként, a proteolitikusan hasított formaként ismert enzimmel lehet azonos.

A 15. ábra eredményeiből látható, hogy a DEAE kromatográfia után egy olyan detergensmentes enzim-preparátumhoz jutunk, amely kb. 0.1-0.2 M NaCl-ot is tartalmaz. A 16. ábrán bemutatott adatok, nevezetesen, hogy a fehérje kináz C enzim aktivitását NaCl-dal jelentős mértékben gátolni lehet, óvatosságra kell, hogy intsenek bennünket e széleskörben elterjedt módszer alkalmazásánál. (Igaz, hogy a 16. ábrán feltüntetett NaCl koncentrációkat a reakcióelegyre kell vonatkoztatni és így a DEAE eluátum NaCl koncentrációja kb. az ábra szerinti 0.01-0.05 M NaCl tartománynak felel meg, de a gátlás mértéke már ebben a



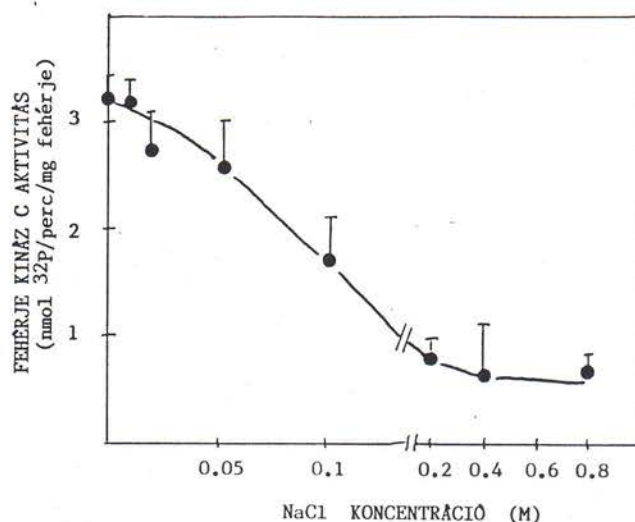
14. ábra A fehérje kináz C aktivitásának és szolubilizálhatóságának függése a Triton X-100 koncentrációjától

Nyúl timociták szubcelluláris frakcióit a 4.2. fejezetben leírtak alapján izoláltuk. A fehérje kináz C aktivitásának meghatározását a fejezetben ismertetett módszer alapján végeztük. A Triton X-100-zal való inkubálás (4°C, 20 perc) esetén a fehérjekoncentrációt minden esetben 1 mg/ml-re állítottuk be. A rész: a citoszolbeli (□- - -□), illetve membránkötött (●—●) fehérje kináz C aktivitásának függése a Triton X-100 koncentrációjától. A membránkötött fehérje kináz C-t 20 mM Hepes (pH 7.4), 5 mM DTT, 0.1 mM CaCl₂ és 50 µg/ml leupeptin tartalmú pufferben izoláltuk. Az enzimet 2 mg/ml fehérjekoncentráció mellett 1 térf. % Triton X-100 segítségével szolubilizáltuk. A detergenst egy Pierce Extracti Gel D oszlopon távolítottuk el. B rész: fehérje kináz C szolubilizálhatóságának függése a Triton X-100 koncentrációjától. A kísérlet során az EGTA-EDTA tartalmú izoláló pufferben izolált mikroszómákhoz növekvő koncentrációban Triton X-100-at adtunk. 20 perces, 4°C-os inkubálás után a mintákat 100 000 g-n centrifugáltuk. A felülúszóban megjelenő fehérje kináz C aktivitást, mint a szolubilizált minta összes (felülúszó + üledék) aktivitásának %-át ábrázoltam (●—●). Az üres körök a felülúszó Pierce Extracti Gel D-vel történő Tritonmentesítése utáni értékeket jelölik (○- - -○). *...*, a minta összes aktivitása nmol ³²P/perc/mg fehérje egységekben.



15. ábra Fehérje kináz C DEAE ioncserélő kromatográfiája

Nyúl timocitákból EGTA-EDTA tartalmú izoláló pufferben izolált mikroszómákat 1 térf. % Triton X-100-zal kezeltük (20 perc, 4°C). A minták fehérjekoncentrációja 2 mg/ml, végtérfogata 1 ml volt. Az inkubálás után a mintákat 100 000 g-n centrifugáltuk, a felülúszót egy 0.5 x 6 cm-es DEAE DE52 (Whatman) ioncserélő oszlopon 1 ml-es frakciókat szedve 0-0.6 M-os lineáris NaCl gradienssel eluáltuk. A NaCl mennyiségét az egyes frakciókban vezetőképesség-méréssel ellenőriztük. Az egyes frakciók fehérje kináz aktivitását EGTA (o - - o), illetve Ca²⁺ + foszfolipidek (●—●) jelenlétében a fejezet további részében ismertetett módszer szerint határoztuk meg.

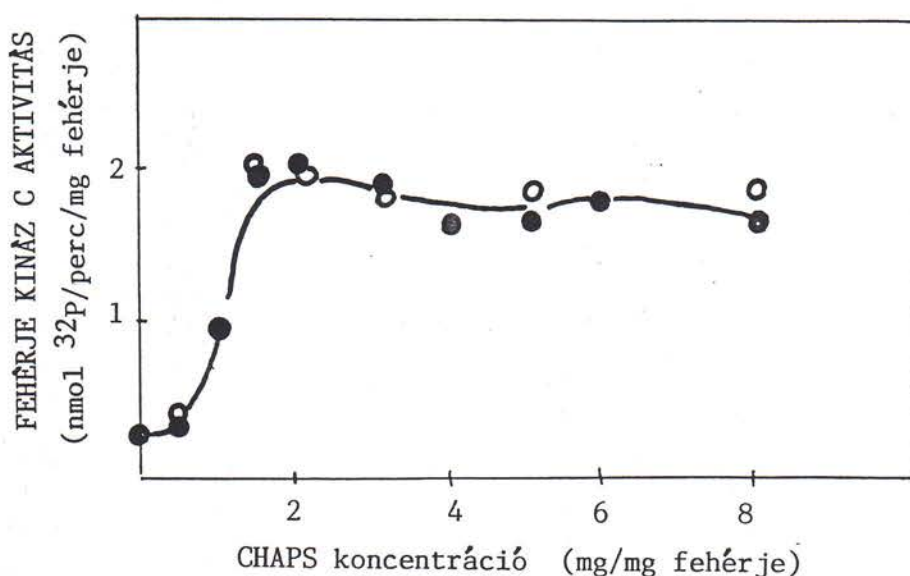


16. ábra NaCl hatása a fehérje kináz C aktivitására

A fehérje kináz C aktivitásának meghatározásakor a reakcióelegy NaCl koncentrációját az ábrán megjelölt értékekre állítottuk be. Az adatok két különálló mérés átlageredményei ($\pm$ a 3-3 paralelból származtatott SD).

tartományban is elérheti a 25 %-ot.) A NaCl gátló hatását bemutató adataink jó egyezést mutatnak a Bazzi és Nelsestuen (1987/a) által közölt értékekkel.

A fenti nehézségek (detergensmentesítés, amely során a minta hígul; az utána következő esetleges ionmentesítés) felvetik annak a szükségességét, hogy az enzimet egy másik, a Triton X-100-nál kíméletesebb detergenssel próbáljuk meg szolubilizálni. Az irodalmi adatok tanulsága szerint az ionos detergenssek (pl. Na-dezoxikolát), illetve egyes nem ionos detergensfajták (oktilglükozid) az enzim aktivitásának erőteljes gátlására képesek (Wolfson és mtsai, 1985; Fitzer és mtsai, 1987). Saját tapasztalataink szerint a Nonidet P-40 detergens a Triton X-100-hoz igen hasonlóan viselkedik (nem bemutatott adatok). A megfelelő detergens keresése során végül a választásunk egy új detergenscsalád, az ikerionos detergens azon tagjára, a CHAPS-ra (3(3-kolamido-propil)-dimentilamino-propánszulfonsav) esett, amely az ikerionos jelleget szerencsésen ötvözi a kolánváz amfifil tulajdonságai-
val (Hjelmeland, 1980).



17. ábra A fehérje kináz C aktivitásának függése a CHAPS detergens koncentrációjától

Forbol észterrel kezelt (TPA, 40 nM, 20 perc, 37°C) humán perifériális limfociták mikroszómális frakcióját a 4.2. fejezetben leírtak alapján izoláltuk. A mikroszóma frakciót (1 mg/ml fehérjekoncentráció mellett) a megadott koncentrációjú CHAPS detergenssel kezeltük (20 perc, 4°C), majd 100 000 g-n centrifugáltuk. (A CHAPS kritikus micellaképző koncentrációja 10 mM, e felett szolubilizálási hatásfoka ugrásszerűen visszaesik; Roda és mtsai, 1983.) A felülúszó fehérje kináz C aktivitását Pierce Extracti Gel D-n történő detergensmentesítés előtt (●) és után (○) a fejezetben ismertetett módszer szerint határoztuk meg.

A 17. ábra adataiból kitűnik, hogy a fehérje kináz C enzim specifikus aktivitását a szolubilizáció okozta növekedés után a CHAPS detergens kevésbé befolyásolja. Különösen szembetűnővé válik az enzimaktivitás állandósága, ha figyelembe vesszük, hogy a detergens eltávolítása sem változtatta meg a szolubilizált fehérje kináz C aktivitását.

Igy a membránkötött fehérje kináz C-t általában CHAPS detergenssel szolubilizáltam. E detergens alkalmazása az enzimaktivitás megőrzésén (és így az időrabló ioncserélő-, vagy affinitáskromatográfiák elhagyásán) túl még egy nagy előnnyel jár: a CHAPS detergens --a Triton X-100-zal ellentétben-- nem zavarja a fehérje kináz C méréseknél elterjedten alkalmazott Bradford-féle fehérjemeghatározási módszert (Fanger, 1987).

A membránkötött fehérje kináz C szolubilizálásának szokásos menete

A szolubilizálás során a fehérjekoncentrációt általában 0.5 mg/ml-es értékre állítottuk be, az alkalmazott CHAPS koncentráció 3 mM volt (3 mg CHAPS/mg fehérje). A mikroszómákat a detergenssel 20 percig 4°C-on inkubáltuk, majd a mintákat 100 000 g-n 60 percen át (4°C) centrifugáltuk. A fehérje kináz C aktivitását általában csak az egyes minták felülúszójából határoztuk meg. Néhány esetben azonban az újrassuszpendált üledék fehérje kináz C aktivitását is megmértük.

A fehérje kináz C aktivitás mérése

A fehérje kináz C aktivitását az irodalom a Ca^{2+} , foszfátidilszerin és diolein jelenlétében mért "összes kináz" aktivitás és a mindezek távollétében mért "alap kináz" aktivitás különbségként definiálja.

Az "alap kináz" aktivitásának méréséhez használt reakcióelegy 10 mM MgCl_2 -ot, 0.4 mM EGTA-t, 400 $\mu\text{g/ml}$ hisztont (III-S típus, Sigma), 40 mM Hepes-t (pH 7.4) és 60 μM (γ - ^{32}P)-ATP-t (100 cpm/pmol fajlagos aktivitással) tartalmazott. A Ca^{2+} - és foszfolipid aktivált összes kináz aktivitásának mérése során a fenti reakcióelegyet 2 mM CaCl_2 -dal, 200 $\mu\text{g/ml}$ foszfatidilszerinnel és 20 $\mu\text{g/ml}$ 1,2-dioleinnel egészítettük ki. (A foszfolipideket kétszeres töménységű Hepes/EGTA/Mg pufferben, szonikálással diszpergáltuk.) A reakciót 100 μl reakcióelegy és 100 μl minta összekeverésével indítottuk el. A minta izoláló pufferben (1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM DTT és 20 mM Hepes, pH 7.4) lévő 4-6 μg fehérjét tartalmazott. Az enzimreakciót általában 3 percen át 37°C-on történő inkubálás után 200 μl frissen készített 1 mM ATP, 15 mM K_2HPO_4 tartalmú 10 súly %-os triklórecetsavval állítottuk le. A mintákhoz 100 μl 2 mg/ml koncentrációjú marha szérumalbumin oldatot adtunk hordozóként. A kicsapódott fehérjéket 0.45 μ -os Millipore szűrőkre gyűjtöttük. A csapadékot 5 x 5 ml 0°C-os 15 mM K_2HPO_4 -ot tartalmazó 5 súly %-os triklórecetsavval mostuk, a szűrőket megszárítottuk és radioaktivitásukat folyadékszcintillációs módszerrel határoztuk meg. A fehérje kináz C méréseket általában két, némely esetben három paralelben végeztük. Az egyedi értékek közötti eltérés nem haladta meg a 10 %-ot. Az enzim aktivitását, mint a Ca^{2+} és foszfolipidek jelenlétében mért "összes kináz" aktivitás és az ezek távollétében mért "alap kináz"

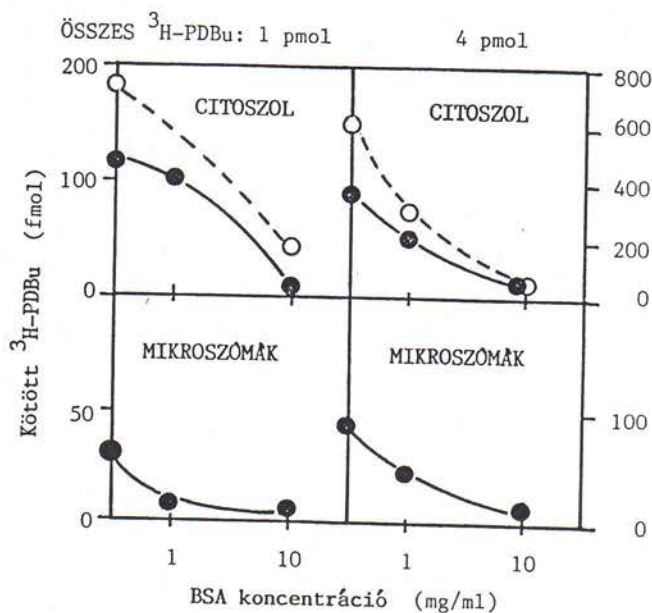
aktivitás különbségét adom meg nmol ^{32}P /perc/mg minta fehérje egységekben.

Az aktivitásmérésnél használt mintafehérje mennyiségét (4-6 μg) és a reakcióidőt (3 perc) úgy választottuk meg, hogy az enzimaktivitás ezen mérési pontok esetén a mintafehérje koncentrációjának és a reakcióidőnek még éppen lineáris függvénye legyen (nem bemutatott adatok).

4.7. A ^3H -forbol-dibutirát kötődés vizsgálata

Mivel kísérleteinkben nemcsak a kötött, de a szabad forbol-dibutirát mennyiségét is meg kívántuk határozni, ezért az irodalomban közölt sokféle módszer közül a Leach és munkatársai (1983) által kidolgozottat választottuk.

A módszer beállítása során annak a tisztázására fordítottunk különös figyelmet, hogy az irodalomban a kötés során általánosan alkalmazott marha szérumalbumin hogyan befolyásolja a radioaktiv forbolészter kötődését. A 18. ábrán bemutatott eredményeink alapján a kötési elegyhez adott marha szérumalbumin már 1 mg/ml-es koncentrációban is a kötött mennyiség jelentős csökkenéséhez vezet mind a citoszol, mind pedig a mikroszómák vizsgálata esetén. A jelenség értelmezhetővé válik, ha meggondoljuk, hogy az albuminok jelentős mennyiségű lipid megkötésére képesek, és hogy a hidrofób forbol észterek lipid-sajátságokkal rendelkeznek. Emiatt saját kísérleteinkben a marha szérumalbumint csak a kötődés után, hordozóként alkalmaztuk.



18. ábra Marha szérumalbumin hatása a ^3H -forbol-dibutirát kötődésére

A kötődési vizsgálatokat nyúl timocitából a 4.2. fejezet szerint izolált citoszollal, illetve mikroszómákkal végeztük. A minta fehérjetartalma a citoszol esetén 75, a mikroszómák esetén 100 μg volt. A kötési vizsgálatok leírását a szöveges részben adom meg.

A kötődéshez használt elegy 40 mM Hepes-t (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$ -ot, 2 mM $CaCl_2$ -ot és általában 10 nM (4 pmol, 2.8 kBq/minta) 3H -forbol-12,13-dibutirátot tartalmazott. Az Eppendorf csőben lévő elegy 200 μ l-éhez adtuk a vizsgált fehérje 20-100 μ g-ját 200 μ l EGTA-EDTA tartalmú izoláló pufferben. A citoszolikus minták vizsgálata esetén a kötőelegy 200 μ g/ml foszfatidilszerint is tartalmazott. 30 perces 37°C-on történő inkubálás után a mintákat 0°C-ra hűtöttük, 50 μ l 20 mg/ml koncentrációjú marha szérumalbumint és 200 μ l 30 súly %-os polietilén-glikolt (Ms.: 6000, Serva) adtunk hozzájuk. 15 perc állás után a mintákat egy mikrocentrifugában 2 percig centrifugáltuk. Centrifugálás után a felülúszó 100 μ l-es alikvotjait szcintillációs küvettkébe vittük. A maradék felülúszót eltávolítottuk, majd a csöveknek a csapadékot tartalmazó hegyét levágtuk és ugyancsak szcintillációs küvettkébe helyeztük. A radioaktivitás meghatározása a 4.4.2. fejezetben leírt Triton tartalmú szcintillációs koktéltban történt. Az aspecifikus kötődést 2 μ M nem jelzett forbol-12,13-dibutirát jelenlétében mértük. A közölt adatok mindegyike az aspecifikus kötődéssel korrigált érték. Az egyes mérések esetén két paralelt határoztunk meg, a paralelek értékei 15 %-nál kisebb mértékben tértek el egymástól.

Néhány minta 3H -forbol-dibutirát kötődését nem azonnal, hanem folyékony nitrogénben való lefagyasztás és -80 °C-on történő 1-2 hetes tárolás után mértük meg. Előzetes kísérleteink alapján a fagyasztási eljárás a 3H -forbol-dibutirát kötődés számszerű értékeiben változást nem okoz (nem bemutatott adatok).

4.8. 3H -uridin beépülés vizsgálata

Egér timocitákat a kísérletekben meghatározott anyagokkal 37°C-on 5×10^6 sejt/ml sejtsűrűség mellett két órán át inkubáltunk. Az egyes minták térfogata 1 ml volt, az inkubálás 10 mM Hepes-sel (pH 7.4), esszenciális aminosavakkal, penicillinnel és streptomocinnel (100-100 U/ml) kiegészített Eagle médiumban történt. A 2. óra elteltével mintánként 2 μ Ci (74 kBq) 3H -uridint adtunk a sejtekhez és további 30 percen át inkubáltuk őket. A 30. perc elteltével a sejteket 0°C-ra hűtöttük, és mintánként 1 ml 1 M perklórsavat adtunk hozzájuk. A perklórsavas mintákat 15 percig 0°C-on állni hagytuk, majd 3000 rpm-en lecentrifugáltuk (10 perc, 0°C). A csapadékot 3 x 2 ml 0.5 M perklórsavval mostuk, majd 0.5 ml 0.5 M perklórsavval 90 °C-on 30 percig inkubáltuk. Az így keletkezett minták 2 x 200 μ l-ének a radioaktivitását a 4.4.2. fejezetben ismertetett módon határoztuk meg.

4.9. Felhasznált anyagok

A felhasznált apronitin, ATP, benzamidin, BSA, calmidazolium (R24571), CHAPS, chelex 100, 1,2-dioktanoil-glicerol, 1,2-di-olein, DTPA, DTT, EDTA, EGTA, forbol-12,13-dibutirát, foszfatidilszerin, Hepes, hisztin (III-S típus), leupeptin, 2-merkaptó-etanol, Na_3VO_4 , Nonidet P-40, oleoil-acetil-glicerol, pepsztatin, PMSF, propidium jodid, quin2, quin2/AM, TMB-8, TPA, tripánkék, tripszin inhibitor és Triton X-100 a Sigma cég terméke volt.

Az A23187, fura-2, fura-2/AM, ionomicin és TPEN a Calbiochem-től származott.

H-7 inhibitort a Seikagaku America Inc. (St. Petersburg FL, USA) cégtől, a polietilén glikolt a Serva cégtől vásároltuk.

A HNO₃ a Carlo Elba cégtől származott, A CaCl₂, FeSO₄, MgCl₂ és ZnCl₂ nagy tisztaságú Merck készítmények voltak.

A difenil-oxazol és az 1,4-di(2(5-fenil)oxazoil)benzol a Koch Light Laboratories terméke volt.

Az X537-A a Hoffman La Roche-től a digitonin a Fisher Scientific Co.-től származott.

A BMA 030 anti-CD3 antitest (Kurrle és mtsai, 1985) dr. F. Seiler és dr. R. Kurrle (Behringwerke AG, Marburg, NSzK) ajándéka volt. Az antitestet ismertető közleményükben a szerzők az antitestnek a BW 264/56 elnevezést adták. Azóta az antitest a BMA 030 megjelölést kapta.

A ³H-quin2/AM (370 MBq/mmol) és a (γ-³²P)-ATP (110 TBq/mmol) az Amersham cég gyártmánya volt. Néhány kísérletben a (γ-³²P)-ATP-t az Izotóp Intézetből (Budapest) vásárolt ³²P-foszfátból (13 TBq/mmol) Glynn és Chappel (1964) módszere szerint állítottuk elő. A (20-³H(N))-forbol-12,13-dibutirátot (700 GBq/mmol) a New England Nucleartól, a ³H-uridint (742 MBq/mmol) az Inst. for Research, Production and Application of Radioisotopes-től (Prága, Csehszlovákia), a ⁴⁵CaCl₂-ot (4.3 GBq/mmol) az Izotóp Intézettől (Budapest) vásároltuk.

A felhasznált többi vegyszer mind legalább pro anal tisztaságú volt.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Forbol észter hatása a nehézfémionok mennyiségére és megoszlására T limfocitákban

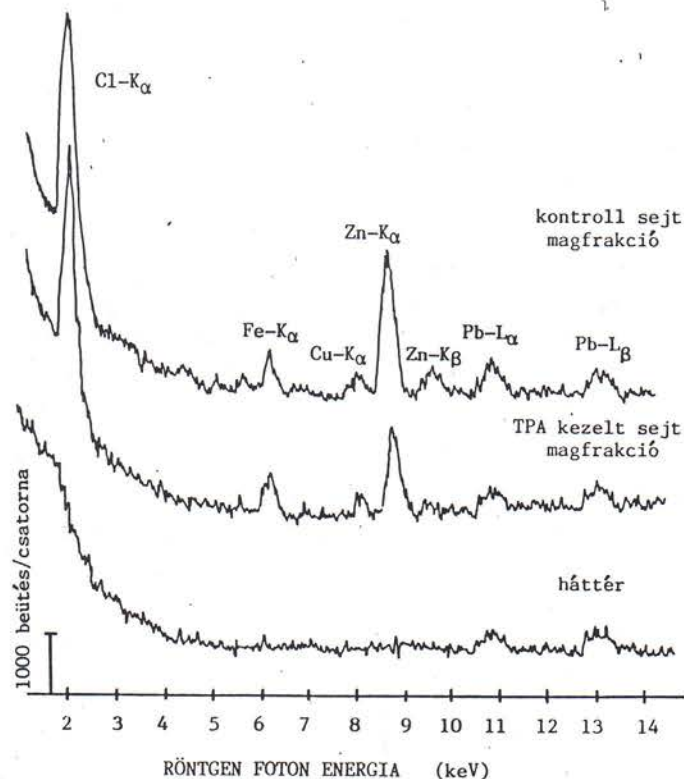
Ahhoz, hogy fő kérdéseinkre, "milyen szerepet játszanak a nehézfémionok a T limfociták két jeltovábbító rendszere közötti kölcsönhatásokban?" a választ keresni kezdhezzük, először arra a kérdésre kellett választ találnunk, hogy "van-e esély arra, hogy a nehézfémek egyike-másika ilyen szerepet betöltsön?". Emiatt szükségessé vált annak a megvizsgálása, hogy vajon kíséri-e a nehézfémek valamiféle koncentrációváltozása a vizsgálni kívánt egyik (Ca^{2+} -alapú), illetve másik (fehérje kináz C-alapú) jeltovábbító rendszer tartós aktiválását. A 3. fejezetben ("célkitűzések") részletezett okok miatt a nehézfémionok koncentrációjának változásait a fehérje kináz C rendszer aktiválásával összefüggésben vizsgáltuk.

A különböző sejtekben található nehézfémionok kimutatása és mennyiségi meghatározása sokáig igen nagy nehézségekbe ütközött. Csak a legutóbbi időkben a roncsolásmentes analitikai módszerek (pl. röntgenfluoreszcencia), illetve az atomabszorpciós eljárások fejlődésével vált lehetővé ezen igen kismennyiségű anyagok koncentrációjának meghatározása.

5.1.1. A nehézfémionok mennyiségének és megoszlásának röntgenfluoreszcenciás vizsgálata

A röntgenfluoreszcenciás mérések elvét és az általunk alkalmazott kísérleti körülményeket a 4.3.1. fejezetben ismerttettem. A ábra 10^9 nyúl timocitából izolált magfrakció röntgenfluoreszcenciás spektrumát mutatja be. Az alacsony energiájú (2-3 keV) röntgen fotonok igen kismértékű felbontása a levegőben való abszorpciójuk következménye. Így röntgenfluoreszcenciás méréseink alkalmával az alacsony rendszámú elemek közül csak a Cl-t tudtuk kimutatni. Azt, hogy méréseink ezen hiányossága valóban a levegőben való abszorpcióra vezethető vissza, az is igazolja, hogy a hasonló elven alapuló EDAX-os mérések esetén az elektronmikroszkópban uralkodó vákuum mellett a Cl-on kívül a Na, Mg, P, S, K és a Ca is kimutatható volt (ld. 4.3.1. fejezet 3. ábra). A nehézfémek közül a vas, réz és cink $K\alpha$ vonalát, valamint a cink kicsit kevésbé intenzív $K\beta$ vonalát tudtuk kimutatni. A mangán 5.9 keV-nál jelentkező $K\alpha$ és a vas 7.0 keV-nál megtalálható $K\beta$ vonala az esetek többségében a kimutathatóság határán mozgott. A réz $K\alpha$ vonala az alkalmazott kísérleti körülmények között egybemosódott a cink $K\alpha$ vonalával. Az ólom $L\alpha$ és $L\beta$ vonalai a mintatartóként alkalmazott ólom-kollimátorból származtak, mint ahogy azt a háttér-spektrumban való megjelenésük is igazolja.

A kísérletben a nyúl timocitákat előzetesen TPA-val (20 nM, 90 perc, 37 °C, "TPA kezelt sejtek"), illetve a TPA oldószereként használt DMSO-val (0.05 %, 90 perc, 37 °C, "kontroll sejtek") kezeltük. A TPA kezelés időtartamát (90 perc) azok alapján az előkísérletek alapján határoztuk meg, amelyek azt mutatták, hogy



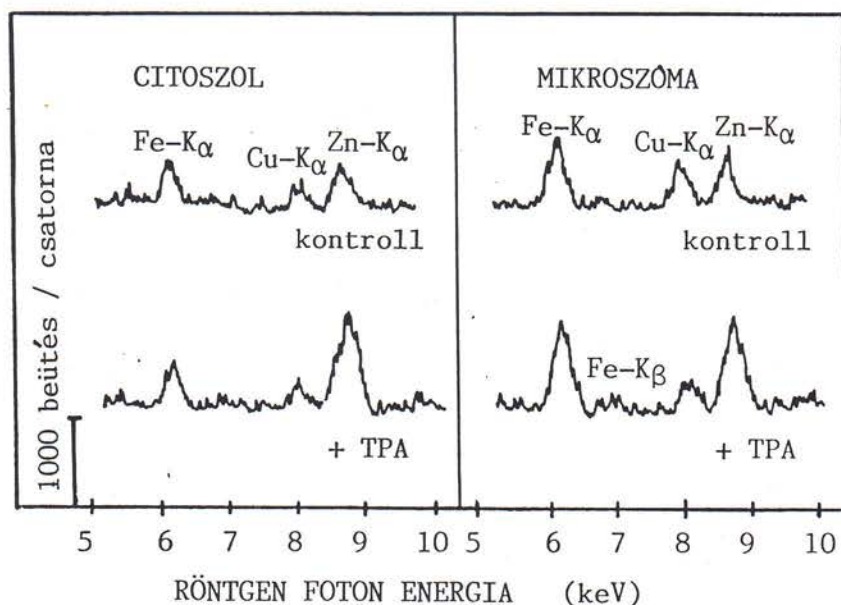
19. ábra Nyúl timociták magfrakciójának röntgenfluoreszcencia spektruma

A sejtek izolálása, 20 nM TPA-val 37°C-on 90 percig történő inkubálásuk, a nukleáris frakció izolálása, valamint a röntgenfluoreszcencia spektrumok felvétele a 4.3.1. fejezetben részletezett módon történt. Az egyes spektrumok három különálló mérés reprezentánsai (Csermely és mtsai, 1987/a).

a timociták sejten belüli Ca^{2+} szint emelkedését 90 perces TPA előinkubálás képes a leghatékonyabban gátolni (az eredmények részletesebb ismertetését ld. az 5.4.1. fejezetben). Mivel a nehézfémek szerepét elsősorban a Ca^{2+} -függő rendszer gátlásában feltételeztük (ld. "célkitűzések"), így logikusan adódott a következtetés, hogy a nehézfémek eloszlásának megváltozását elsősorban ott kell megvizsgálnunk, ahol a Ca^{2+} -függő rendszer gátlását maximálisnak találtuk.

A 19. ábrából látható, hogy TPA kezelés hatására a cinknek a $K\alpha$ és $K\beta$ csúcsa jelentősen lecsökken. Mivel (1) az egyes magfrakciók száraz tömege és fehérjekoncentrációja nem különbözött szignifikánsan, (2) az egyes mintáknak a detektortól mért távolsága és geometriája azonos volt, valamint (3) az egyes csúcsok alatti terület kb. arányos az adott elem mintabeli koncentrációjával kimondható, hogy a cink $K\alpha$ és $K\beta$ csúcsának csökkenése magfrakcióbeli koncentrációjának csökkenéséből fakad.

A tumor promotor forból észter által okozott magfrakcióbeli cink koncentrációcsökkenés érdekes hasonlóságot mutat Yarom és munkatársai (1976) eredményeivel, akik azt találták, hogy malignusan transzformált limfociták sejtmagjaiban a cink mennyisége a "normális" értéknél jóval kisebb.



20. ábra Nyúl timocita mikroszóma frakció és citoszol röntgenfluoreszcencia spektruma

A sejteket 20 nM TPA-val 37°C-on 90 percig inkubáltuk. A szubcelluláris frakciók izolálása és a röntgenfluoreszcenciás spektrumok felvétele a 4.3.1. fejezetben leírtak alapján történt. A bemutatott spektrumok három különálló mérés reprezentánsai (Csermely és mtsai, 1987/a).

A 20. ábrán a mikroszómális és a citoszolikus frakciók röntgenfluoreszcencia spektrumait mutatom be. Az adatokból megállapítható, hogy ezen szubcelluláris frakciók esetében a magival éppen ellentétes folyamat, a cinktartalom növekedése zajlott le.

A 2. táblázatban a Fe, Cu és Zn K α csúcsának korrigált területét adom meg. Az egyes területek jól jellemzik az adott elem relatív koncentrációját a mintában. Az adatok szerint a mag-, illetve a mitokondriális frakció cinktartalmának szignifikáns (30, illetve 60 %-os) csökkenése a citoszol, valamint a mikroszómák cinktartalmának jelentős (2.7-szeres, illetve 1.6-szeres) növekedésével párhuzamosan megy végbe TPA kezelés hatására. A módszer által kimutatott másik két nehézfém, a vas és réz igen hasonló (bár nem szignifikáns) változásokat mutat. (A 20. ábrán bemutatott mikroszómális röntgenfluoreszcencia spektrumok esetén a vas mennyisége --azaz a csúcs alatti terület-- számottevően nagyobb a forbol észter kezelt minta esetén a kontroll minta hasonló értékénél. E növekedés azonban az összes mérés átlagát tekintve nem szignifikáns --ld. 2. táblázat--.)

2. Táblázat

A nehézfémek egymáshoz viszonyított mennyisége kontroll és TPA-kezelt nyúl-timociták szubcelluláris frakcióiban

nehézfém	a K α csúcsok normalizált értéke							
	magfrakció kontroll +TPA		mitokondrium kontroll +TPA		mikroszómák kontroll +TPA		citoszol kontroll +TPA	
Fe	4.8 (0.3)	4.8 (0.5)	3.6 (0.2)	2.0 (0.5)	1.6 (0.1)	1.8 (0.1)	3.6 (0.2)	4.0 (0.5)
Cu	1.6 (0.4)	1.6 (0.6)	1.1 (0.2)	0.4 (0.1)	0.4 (0.3)	0.6 (0.4)	1.6 (0.4)	1.4 (0.4)
Zn	10.1 (0.2)	7.0** (0.3)	3.0 (0.3)	1.2* (0.4)	1.4 (0.2)	3.8** (0.2)	2.4 (0.3)	3.8* (0.2)

* szignifikáns különbség; $p < 0.005$

** szignifikáns különbség; $p < 0.001$

Az egyes számadatok a Fe, Cu és Zn K α csúcsának területét jelképezik a háttérre, a minta geometriájára és a γ -fotonforrás intenzitására való korrekció után. A Zn K α csúcsának területét a vele egybemosódó réz K β csúcs területével is korrigáltuk. Az adatok három mérés átlagértékei. A zárójelekben a vonatkozó standard deviáció értékeket tüntettük fel. A szignifikanciaszinteket a Student-féle t teszt alapján határoztuk meg (Csermely és mtsai, 1987/a).

5.1.2. A nehézfémionok mennyiségének és megoszlásának vizsgálata plazmaemissziós spektrofotometriával

Ugyan a röntgenfluoreszcenciás módszerek meggyőzően igazolták, hogy a TPA jelentősen megváltoztatja a nehézfémek eloszlását a nyúl timocitákban, mégis a kísérletek más módszerrel való megmértelése mellett döntöttünk, hogy a nehézfémek sejten belüli mennyiségére, ennek változásaira ne csak fél-kvantitatív, hanem valóban számszerű adatokat nyerjünk.

A plazmaemissziós spektrofotometriás mérések során a röntgenfluoreszcenciás mérésekkel megegyezően ugyancsak kontroll, illetve TPA előinkubált nyúl timocitákat és ezek szubcelluláris frakcióit vizsgáltuk. A TPA kezelés körülményei (20 nM, 90 perc, 37°C) megegyeztek a röntgenfluoreszcenciás méréseknél alkalmazottakkal, sőt volt olyan kísérlet, ahol a kétféle analízisre szánt mintát párhuzamosan készítettük el, illetve a röntgenfluoreszcenciás mintákat vetettük alá a plazmaemissziós méréshez szükséges salétromsavas roncsolásnak (ld. 4.3.2. fejezet).

Az 5×10^9 timocitából készült minták vizsgálata során As, Co, Ga, Hg, Li és Se jelenlétét nem sikerült kimutatnunk. A sejteknek és szubcelluláris frakcióiknak nyomnyi mennyiségű Al, B, Ba, Cd, Cr, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Ti és V tartalmuk volt, de ezen kis menny-

nyiségek nem változtak meg szignifikánsan ($p < 0.05$, Student-féle t teszt) forbol észter kezelés hatására egyik vizsgált frakcióban sem. A sejtek és egyes frakcióik által tartalmazott Na és K mennyisége sem mutatott szignifikáns változást a forbol észter kezelt mintákban a kontroll mintákhoz képest (nem bemutatott adatok).

A 3. táblázat a Ca, Cu, Fe, Mg, P és Zn nyúl timocitákban és azok szubcelluláris frakcióiban mért mennyiségét adja meg nmol/ 5×10^3 sejt egységekben. A táblázat első két oszlopa kontroll és TPA kezelt sejtek egészének elemi összetételére vonatkozik. A két oszlop adatainak összevetéséből kitűnik, hogy a timociták Ca, Cu, Fe, P és Zn tartalma nem változik számottevően TPA kezelés hatására. (A vas mennyiségének csökkenése a viszonylag nagy szórás miatt nem szignifikáns.)

Ezen eredményünk elég nyilvánvaló lenne abban az esetben, ha a sejtkultúra elegy nem tartalmazná a szóban forgó elemeket. Ebben az esetben a sejtek nyilvánvalóan nem lennének képesek felvenni ezeket az elemeket, az adott elemek (különösen a nehézfémek) leadása pedig sejten belüli komplexeik nagy stabilitása miatt lenne akadályozott. A sejtkultúra elegyeknek a Ca és P esszenciális alkotórészei. Az általunk használt elegyekben a 4. táblázat tanulsága szerint a nehézfémek koncentrációja igen számottevő, több mikromólnyi volt. Így a kísérleti körülmények között a vizsgált elemeknek mind leadására, mind felvételére sor kerülhetett volna.

Magnézium

A fenti példákkal ellentétben az egyetlen olyan elem, amelynek egész sejten mérhető mennyisége forbol észter kezelés hatására szignifikánsan megváltozott, a Mg volt. A kísérleti körülmények között 5×10^3 TPA-val kezelt timocita Mg tartalma több mint 100 nanomóllal volt több a kontroll sejtekénél. A felvett magnézium döntő mennyiségét a mikroszómális frakcióban tudtuk kimutatni. Eredményeink jó egyezést mutatnak Grubbs és Maguire (1986) eredményeivel, akik forbol észter kezelés hatására S49 limfóma sejtek magnéziumtartalmának növekedéséről számoltak be. Eredményeik szerint a növekedés szelektív volt, Ca-ra nem terjedt ki. E mérési eredmények is megegyeznek az általunk timocitákon kapottakkal.

Kalcium és foszfor

Noha a timociták összes Ca tartalma nem változik TPA kezelés hatására, a Ca sejten belüli eloszlásában számottevő változások tapasztalhatók (ld. 3. táblázat). Adataink tanulsága szerint a magfrakció Ca mennyisége csaknem kétszeresére nő, a mitokondriális frakció Ca tartalma pedig kevesebb mint felére csökken a timociták TPA kezelése során. A foszfor mennyiségében hasonló irányú változások tapasztalhatók azzal a különbséggel, hogy a mikroszómák foszfortartalma is nagyobb a kontroll értéknél TPA kezelt sejtek esetén. A mag- és mikroszómális frakció foszfortartalmának emelkedésébe bizonyára közrejátszik az itt található fehérjék TPA kezelés hatására bekövetkező intenzív foszforilációja is, noha az emelkedés döntő része minden bizonnyal más okokra vezethető vissza.

3. Táblázat

Különböző elemek mennyisége és megoszlása kontroll és TPA-kezelt nyúl timocitákban

Elem	elemi összetétel (nmol/ 5 x 10 ⁹ sejt) ^a												Visszanyerés (%) ^b
	Egész sejt				Magfrakció		Mitokondriumok		Mikroszómák		Citoszol		
	Kontroll	+TPA	Kontroll	+TPA	Kontroll	+TPA	Kontroll	+TPA	Kontroll	+TPA	Kontroll	+TPA	
Ca	2010 (180)	2000 (190)	238 (20)	457 ^c (53)	451 (58)	198 ^c (19)	81 (10)	79 (13)	1020 (70)	1056 (59)	89	90	
Cu	177 (12)	177 (12)	65 (6)	59 (4)	20 (2)	13 ^c (1)	18 (1)	13 (0.6)	54 (3)	70 ^c (3)	89	88	
Fe	165 (51)	138 (59)	99 (4)	81 ^d (4)	15 (1)	12 (1)	1.3 (0.4)	3.6 ^c (0.6)	25 (16)	19 (11)	85	84	
Mg	2100 (40)	2230 ^d (70)	483 (24)	481 (22)	175 (18)	140 (15)	96 (4)	171 ^c (3)	1080 (60)	1170 (70)	87	88	
P	40000 (900)	39300 (1000)	22600 (500)	23800 ^d (500)	6300 (160)	3660 ^c (190)	2200 (50)	3200 ^c (60)	7190 (140)	7220 (120)	96	96	
Zn	1060 (60)	1000 (100)	700 (42)	469 ^c (36)	64 (3)	31 ^c (1)	20 (2)	35 ^c (2)	153 (7)	395 ^c (10)	88	93	

^a Az egyes minták elkészítése és elemi összetételük meghatározása a 4.3.2. fejezetben leírtak alapján történt. A sejteket 20 nM TPA-val 90 percen át, 37 °C-on kezeltük. A kontroll sejtekhez a TPA oldószerét, 0.02 térf. % DMSO-t adtunk. Az a-datok öt mérés átlagértékei (zárójelben a vonatkozó SD értékekkel).

^b A visszanyerés százaléka azt fejezi ki, hogy az adott elem teljes (az egész sejtben kimutatható) mennyiségének (ld. a táblázat 1.-2. oszlopa) hány százalékát sikerült visszanyerni az egyes szubcelluláris frakciókban kimutatott elemennyiségek összegeként.

c-d Szignifikáns különbség a kontroll és TPA kezelt minta között, ^c p < 0.001; ^d p < 0.01 (Student féle t teszt).

**Nehézfémionok koncentrációja néhány gyakrabban használt
sejtkultúra elegyben (μM)**

	Eagle MEM (OKI)	Eagle MEM (OKI) + 5 % FCS	RPMI-1640 (Gibco)	RPMI-1640 (Serva)
Zn	1.5	5.6	0.7	2.4
Fe	1.0	3.0	0.9	1.0
Cu	0.08	0.2	0.6	2.9
Mn	0.005	0.08	n.k.	0.05
Cd	n.k.	0.2	n.k.	n.k.
Mo	0.04	0.04	n.k.	0.01
Összesen:	2.6	9.1	2.2	6.4

n.k. = nem kimutatható

A fémek koncentrációját az egyes elegyek 20 ml-ének liofilizálása, kvarcedényzetben 2 ml koncentrált salétromsavval való roncsolása (120°C , 2 óra), valamint 5 ml-re való hígítás után ICAP 9000-es plazma emissziós spektrofotométeren mértük. Az értékek 3 mérés átlagértékei. Az SD-k a mért értékek 10 %-ánál kisebbek voltak. Az egyes értékek a megfelelő desztillált vizes kísérlet értékeivel helyesbítettek. A helyesbítés egy esetben sem haladta meg a mért érték 10 %-át.

A T limfocitákban mért összes Ca tartalom jó egyezést mutat a Waller és mtsai (1984) által meghatározott értékkel. Azon kísérleti adatunk, amely szerint a mikroszómák Ca tartalma nem változik TPA kezelés hatására összhangban áll Cox és Carroll (1986) eredményeivel, akik kimutatták, hogy TPA nem okoz semmiféle változást a membránkött klórtetraciklin fluoreszcenciájában. Mivel a klórtetraciklin fluoreszcenciája a membránhoz kött Ca mennyiségének függvénye, Cox és Carroll megfigyelése szintén azt támasztja alá, hogy a mikroszómák Ca tartalma TPA kezelés hatására nem változik meg számottevően.

Nehézfémek

TPA kezelés hatására a legkiterjedtebb változásokat a nehézfémek szubcelluláris megoszlása mutatja. A Cu, Fe és Zn mennyisége az egyes sejtfrakciókban hasonló módon változik: a mag- és mitokondriális frakcióban csökken, a mikroszómákban és a citoszolban pedig emelkedik. Cu és Fe esetén a változások kevésbé kifejezettek (bár szignifikánsak). Zn esetében viszont a fém nagyarányú átrendeződése következik be. Az 5. táblázat a limfocitákban található nehézfémek mennyiségére az irodalomban előforduló adatokat tartalmazza. Saját értékeinket (ld. 3. táblázat, 1. oszlop) az irodalmi adatokkal egybevetve megállapíthatjuk, hogy az általunk mért értékek az irodalomban közölt értéktartományon belül helyezkednek el.

**Különböző nehézfémek mennyisége limfocitákban
az irodalmi adatok szerint**

Zn	Fe	Cu	Irodalmi hivatkozás
(nmol/ 5 x 10 ⁹ sejt)			
1220			Vallee és Gibson, 1948
1720			Wolff, 1956
790			Fredericks és mtsai, 1960
1080			Dennes és mtsai, 1961
790			Whitehouse és mtsai, 1982
300-750			Kanter és mtsai, 1982
340-1230		20-185	Hinks és mtsai, 1982
2060		110	Ishigama és Nishi, 1985
430-730	40-360	30-310	Carpentieri és mtsai, 1986

A 3. táblázat utolsó két oszlopának %-os értékei arra vonatkoznak, hogy az egyes szubcelluláris frakciókban az adott elem egész sejtben lévő mennyiségének hány százalékát találtuk meg, nyertük vissza. A "visszanyerés százaléka" soha nem kisebb 80 %-nál, az egyes elemek esetén a kontroll és TPA kezelt sejtek visszanyerési százaléka pedig 5 %-nál többel egy esetben sem különbözik egymástól. Ez arra utal, hogy az elemek szubcelluláris megoszlásában TPA kezelés hatására megfigyelt változások nem tudhatók be az adott elem szelektív elvesztésének, illetve szennyyezésekből eredő szelektív feldúsulásának.

Mint ahogy az a 4.2. fejezetben említésre került, a mag- és mitokondriális frakció más sejtfrakciók kis mennyiségeit is tartalmazza. Az egyes szennyeződések mennyisége inkább az izolálás módjától, mint a sejt milyenségétől függ, hiszen a szennyeződések jelző enzimaktivitások nagyon hasonló megoszlást mutatnak különböző típusú T limfociták, EL4 limfóma sejtek, illetve kontroll és TPA kezelt limfociták esetén (Ferber és mtsai, 1972; Kaever és mtsai, 1984; Szamel és mtsai, 1985, illetve nem bemutatott adatok). Így ezek a kereszt-szennyeződések a szubcelluláris elem-mennyiségeket meghatározó adataink abszolút értékét befolyásolhatják ugyan, de a kontroll és TPA kezelt limfociták értékei közötti összehasonlítást nem zavarják.

Összefoglalás

Plazmaemissziós spektrofotometriával kapott kvantitatív eredményeink alátámasztják a röntgenfluoreszcenciás eljárással kapott fél-quantitatív képet. Mindkét módszer által kapott adatok arra utalnak, hogy TPA kezelés a nehézfémek számottevő átrendeződéséhez vezet a timocitákban. A mag-, illetve mitokondriális frakcióból a mikroszómákba és a citoszolba való nehézfém (különösen cink) áthelyeződés a TPA számos további hatásának forrása lehet.

5.2. A nehézfém ionok zavaró hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció fluoreszcenciás meghatározásában

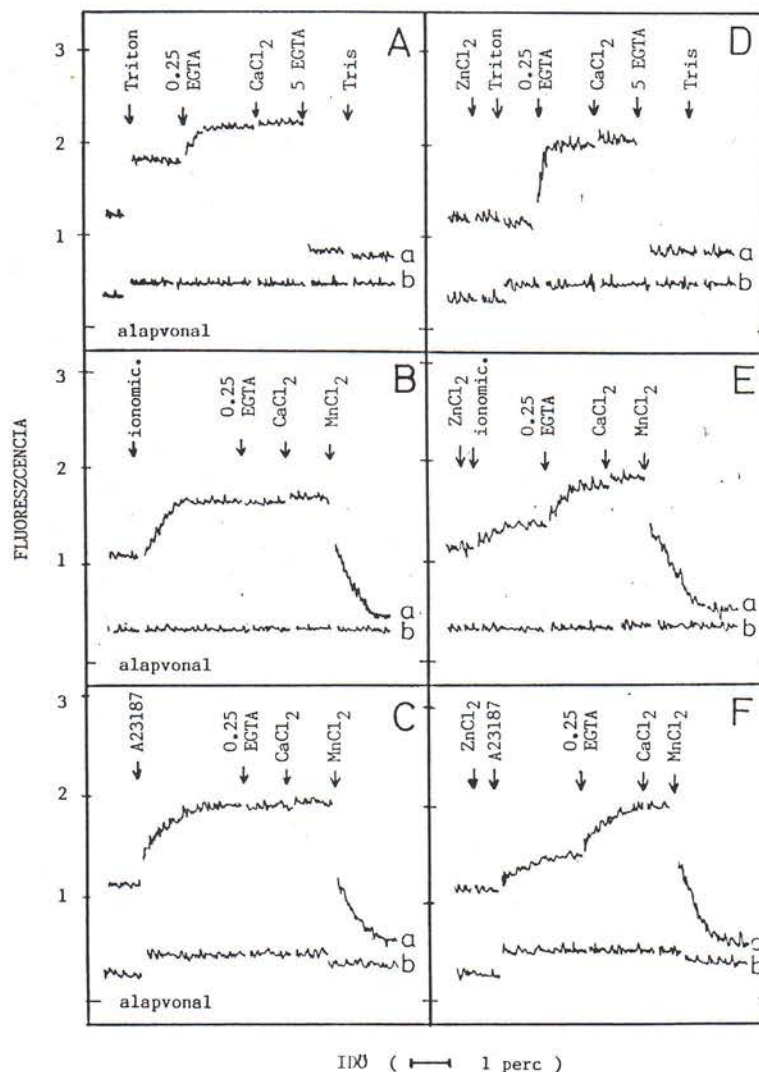
Miután bebizonyítottuk, hogy fennáll annak az elvi lehetősége, hogy a protein kináz C rendszer aktiválódása a Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszert a nehézfémek segítségével is befolyásolni (szabályozni?) képes (ld. 5.1. fejezet), a Ca^{2+} -függő rendszer aktiválódásának megbízható mérését kellett beállítanunk. A Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszer aktiválódásának legkézenfekvőbb jele a sejten belüli szabad Ca^{2+} koncentráció (Ca_i) emelkedése. E folyamat kimutatására érzékeny fluoreszcens technikák állnak rendelkezésünkre (ld. 4.4.1. fejezet). Az ezen technikák által kapott mérési eredményeket azonban a nehézfémionok jelenléte erőteljesen torzítja. A következőkben e torzító hatások csökkentésére, illetve kiküszöbölésére alkalmas eljárásokat mutatom be.

A nehézfémeknek a fluoreszcenciás méréseket torzító hatása abból a két tényből fakad, hogy

- a nehézfémek affinitása a Ca_i meghatározására szolgáló fluoreszcens kelátorokhoz a Ca^{2+} -énál nagyságrendekkel nagyobb, illetve, hogy
- e kelátorok nehézfémekkel nem-fluoreszkáló komplexeket képeznek, így a nehézfémek a Ca^{2+} -kelátor komplex fluoreszcenciáját kioltják (ld. 4.4.1. fejezet, illetve Hesketh és mtsai, 1983).

A fluoreszcens kelátorokkal kölcsönhatásba kerülő nehézfémek alapvetően két forrásból származhatnak: lehetnek extracelluláris, illetve intracelluláris eredetűek. Az extracelluláris eredetű nehézfémionok a kalibrálási eljárásnál okozhatnak zavarokat, az intracelluláris nehézfém-mennyiség a kezdeti fluoreszcenciát is torzíthatja. A továbbiakban először az extracelluláris nehézfémionok zavaró hatásait tekintjük át.

A sejtkultúra elegyek számottevő mennyiségű nehézfémion-szenyvezést tartalmaznak. A nehézfémek összesített koncentrációja $2\text{--}6\ \mu\text{M}$ között mozog (ld. 4. táblázat). A 21. ábrán $1\ \mu\text{M}$ Zn^{2+} hatása látható a quin2-vel történő intracelluláris Ca^{2+} koncentráció meghatározás különböző kalibrálási eljárásaira. Az ábra A-C részén a különböző sejtpерmeabilizálási módszereket (A: Triton X-100 detergens, B: ionomicin Ca -ionofór, C: A23187 Ca -ionofór, ld. 4.4.1. fejezet) alkalmazó kísérleteket chelex-kezelt, így gyakorlatilag nehézfémektől mentes közegben végeztük el. Az ábra D-E részén ugyanezen kalibrációs eljárásokat ismételtük meg úgy, hogy az A-C részen alkalmazott közeghez $1\ \mu\text{M}$ ZnCl_2 -ot adtunk. Az ábráról leolvasható, hogy ZnCl_2 -ot tartalmazó elegyek esetén (D-F) a quin2 maximális fluoreszcenciáját csak kismennyiségű EGTA kelátor hozzáadása után éri el. (Az EGTA kelátor a cink ionokat a Ca^{2+} -nál több nagyságrenddel erősebben köti, így már kis mennyisége is elegendő ahhoz, hogy az oldat szabad Zn^{2+} koncentrációja elhanyagolhatóvá váljon.) Az ábra A részén az EGTA utáni quin2 fluoreszcencianövekedés ("a" görbe) annak a következménye lehet, hogy a Triton X-100 felszabadítja a sejten belüli nehézfémionok egy részét. E folyamat a Ca^{2+} beeresztésére sokkal szelektívebb ionomicin, illetve A23187 esetén jóval kevésbé következik be.



21. ábra Zn^{2+} ionok hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció meghatározására szolgáló kalibrálási módszerekre quin2 indikátor esetén

Ugyanazon quin2-vel töltött sejtpreparátumon három különböző kalibrációs eljárást próbáltunk ki. A és D: kalibráció Triton X-100-zal, B és E: kalibráció ionomicinnel, C és F: kalibráció A23187-tel. Az első oszlopban lévő kísérleteket (A-C) chelex kezelt médiumban, a második oszlopbelieket (D-F) $1 \mu\text{M}$ ZnCl_2 -ot tartalmazó chelex kezelt médiumban végeztük. A nyíllal jelölt helyeken a következő addíciók történtek: 0.05 súly % Triton X-100, 50 nM ionomicin, 200 nM A23187, 0.25, vagy 5 mM EGTA, 0.25 mM CaCl_2 , 20 mM Tris, 10 μM MnCl_2 . Az "a"-val jelölt görbék a quin2 töltött sejtek fluoreszcenciáját, a "b" jelűek pedig a csak dimetilszulfoxiddal kezelt kontroll sejtek autofluoreszcenciáját jelölik (Csermely és Somogyi, 1987/a-b.)

A nehézfémionoknak az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációmérést torzító hatása még szembetűnőbbé válik akkor, ha a 21. ábra kalibrációs eljárásai alapján számolt Ca_i értékeket hasonlítjuk össze (ld. 6. táblázat).

Látható, hogy olyan esetben, ha a nehézfémionok hatására való korrekciót elfelejtjük (3. oszlop, "autofluoreszcencia korrigált"), a számolt intracelluláris Ca^{2+} koncentráció (ugyanazon minta esetén!) 80 és 280 nM között váltakozhat. A táblázatból azonban az is leolvasható, hogy a nehézfémionok hatásának korrekciója után (4. oszlop, "Ca-EGTA + autofluoreszcencia korrigált") Zn^{2+} jelenlététől, illetve a kalibrálási eljárástól függetlenül a Ca_i számolt értéke megegyezik.

A fenti kísérleti eredmények meggyőzően bizonyították, hogy nehézfémionok jelenléte a quin2-vel történő Ca_i meghatározást igen erőteljesen zavarja. Emiatt a méréseket cöltszerű nehézfémionmentes (chelex 100 kezelt) médiumban végezni, illetve a kalibrációs eljárás során Ca-EGTA, vagy Ca-DTPA hozzáadásával a nehézfémionok mennyiségét korrekcióba venni.

Az újabban alkalmazott fura-2 indikátor nehézfémionokra mutatott érzékenységről eltérőek az irodalmi közlések, adatok. Gryniewicz és mtsai (1985) a vegyületet leíró közleményükben a fura-2-t, mint a quin2-nél nehézfémionokra jóval kevésbé érzékeny indikátort mutatják be. Ugyanakkor röviddel ezutáni közleményükben Pollock és mtsai (1986) egy olyan fura-2-re alkalmazható kalibrálási eljárást írnak le, amely a fura-2 fluoreszcenciájának Mn^{2+} -nal való kioltathatóságán alapul.

A 22. ábrán bemutatott saját kísérleteink magyarázatot adnak az irodalomban tapasztalható ellentmondásokra. A kísérletek egyfelől igazolják, hogy a fura-2 indikátor fluoreszcenciája (a quin2-éhez hasonlóan, ld. Hesketh és mtsai, 1983) Cu^{2+} , Fe^{2+} és Mn^{2+} ionok hatására kioltódik, másfelől viszont fényt derítenek arra a fontos különbségre, hogy a Zn^{2+} a fura-2-vel erőteljesen fluoreszkáló komplexet képez. Quin2 esetén Zn^{2+} (a 21. ábra tanulsága szerint) fluoreszcencia-kioltó sajátssággal rendelkezik. Mivel a nehézfémek közül a sejten belül, illetve a citoszolban a cink fordul elő a legnagyobb mennyiségben (lásd 5.1. fejezet, illetve Arslan és mtsai, 1985), feltételezhető, hogy a citoszolban a nehézfémek közül a cink szabad koncentrációja a legnagyobb. Mivel a cink ionok a fura-2 fluoreszcenciáját szinte nem befolyásolják, így fura-2 a sejten belüli, illetve a sejt kultúra elegyekben előforduló nehézfémek közül a leggyakoribbra a quin2-nél jóval kevésbé érzékenynek mondható. Mindez azonban nem jelenti azt, hogy a kalibrációs eljárásnál a nehézfém-korrekcióról fura-2 esetén teljesen elfelejtkezhetnénk.

A nehézfémek hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció látványos értékre nem csak a kalibrációs eljárás során érvényesül. A nehézfémek sejten belüli mennyisége is a fluoreszcencia indikátor (leginkább: quin2) fluoreszcenciájának számottevő kioltásához vezethet. Különösen áttekinthetetlené válhat a helyzet akkor, ha a nehézfémek sejten belüli mennyisége a vizsgálat során változik. TPA kezelés hatására az 5.1. fejezetben ismertetett kísérletek tanulsága szerint ez a helyzet áll elő. Így ugrásszerűen megnő annak a fontossága, hogy a sejten belüli nehézfémek

6. Táblázat

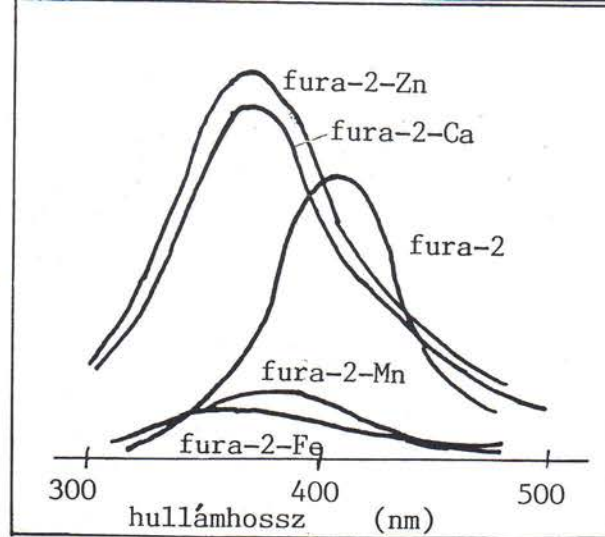
A különböző kalibrációs módszerek alapján számított intracelluláris kalciumkoncentrációk

Kalibrációs módszerek ^b	Intracelluláris Ca koncentráció (nM) ^a			
	Korrekciónélkül	Ca-EGTA korrigált	Autofluoreszcencia korrigált	Ca-EGTA + autofluoreszcencia korrigált
"Triton X-100"	70 ± 10	45 ± 4	132 ± 21	76 ± 11
"Triton X-100" + 1 μM ZnCl ₂	n.é. ^c	50 ± 5	n.é.	85 ± 9
"ionomicin"	83 ± 8	83 ± 8	83 ± 8	83 ± 8
"ionomicin" + 1 μM ZnCl ₂	306 ± 21	89 ± 7	306 ± 21	89 ± 7
"A23187"	63 ± 8	63 ± 8	80 ± 10	80 ± 10
"A23187" + 1 μM ZnCl ₂	141 ± 13	59 ± 7	280 ± 25	81 ± 8

^a Az értékeket a 21. ábrán feltüntetett adatokból számoltuk Triton-X-100 permeabilizálás esetén a $Ca_i = 115(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min})$ (nM), ionofór permeabilizálás esetén pedig a $Ca_i = 115(F - F_{\min}) / 0.16(F_{\max} - F_{\min})$ egyenlet alapján (ld. 4.4.1. fejezet). Az egyenlőségekben F a minta kezdeti fluoreszcenciája. A táblázat első oszlopában („korrekció nélkül”) $F_{\max}$ a permeabilizálás után kapott érték, $F_{\min}$ a végső fluoreszcencia. A második oszlopban („Ca-EGTA”) korrigált $F_{\max}$ a EGTA és 0.25 mM CaCl₂ hozzáadása után kapott fluoreszcencia ($F_{\min}$ ugyanaz, mint elöbb). A két utolsó oszlopban az első két oszlop $F_{\max}$ és $F_{\min}$ értékei rendre a minta autofluoreszcenciájára is korrigáltak (21. ábra „b” jel).

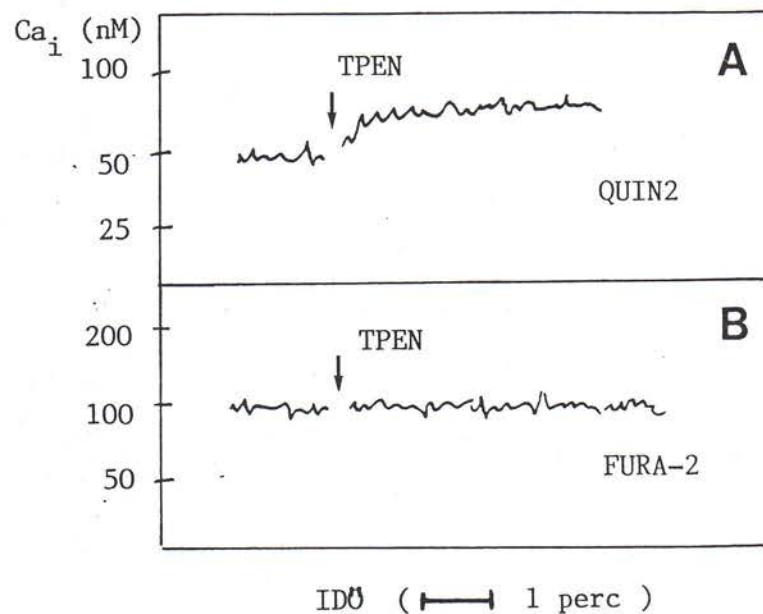
^b A különböző módszereket a permeabilizálásra használt vegyületekről neveztük el.

^c Nem értelmezhető (Csermely és Somogyi, 1987/b)



22. ábra Fura-2 gerjesztési spektruma különböző fémek jelenlétében

Az egyes gerjesztési spektrumokat 0.1 μM fura-2 jelenlétében chelex kezelt, módosított Hank-féle médiumban vettük fel. A médiumhoz 5 mM EGTA-t, 20 mM Tris-t, ill. 1-1 μM Cu^{2+} -t, Fe^{2+} -t, Mn^{2+} -t és Zn^{2+} -t adtunk. Az egyes spektrumok felvétele során az alkalmazott rések 4 nm-esek voltak, az emissziós hullámhossz 510 nm volt.



23. ábra TPEN hatása a quin2-vel (A), illetve fura-2-vel (B) töltött egér timociták sejten belüli (látszólagos) Ca^{2+} koncentrációjára

Az egér timociták izolálását, indikátorokkal való feltöltését, a fluoreszcenciámérést és a Ca_i kiszámítását a 4.1., ill. 4.4.1. fejezetekben ismertetett módon végeztük. Ugyanazon sejtpopuláció egy részét quin2-vel (A rész), másik részét fura-2-vel (B rész) töltöttük fel. A quin2 intracelluláris koncentrációja 0.5 mM, a fura-2-é 0.2 mM volt. A nyíllal jelölt helyen 50 μM végkoncentrációjú TPEN-t adtunk a két mintához.

hatását valahogy kompenzálni tudjuk.

A sejten belüli nehézfémionok megkötése egy olyan komplexképző segítségével lehetséges, amely a.) nehézfémionokra szelektív, b.) egyszerűen bejuttatható a sejtbe (pl.: hidrofób). E célra legalkalmasabbnak az N,N,N',N'-tetrakis-(2-piridilmetil)-etiléndiamin, azaz a TPEN bizonyult (Adrenegg és Wenk, 1987; Adrenegg és mtsai, 1977; Arslan és mtsai, 1985).

A 23. ábrán quin2-vel (A rész), illetve fura-2-vel (B rész) töltött egér timociták fluoreszcenciájának változása látható TPEN hatására. A quin2 esetén a TPEN a fluoreszcenciát megemeli, fura-2 esetén ez az emelkedés elmarad. Ezek az adatok is a fura-2-nek a sejten belüli nehézfémekre mutatott viszonylagos érzéketlenségét támasztják alá. A quin2-vel végzett Ca_i meghatározás TPEN-nel való korrigálhatóságára utal a 4.4.1. fejezetben közölt 6. ábra is. A 6. ábrán azon esetben, ha a sejten belüli quin2 koncentráció 1 mM-nál kisebb, a Ca_i -re irreálisan alacsony érték adódik. Ez az érték TPEN hozzáadásával az átlagos szintre (kb. 80 nM) korrigálható.

Összefoglalva a nehézfémek zavaró hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció meghatározására szolgáló módszerekre viszonylag egyszerűen, a sejtfalon át nem jutó (EGTA, DTPA), illetve átjutó (TPEN) komplexképzők segítségével kiküszöbölhető, ill. figyelembe vehető.

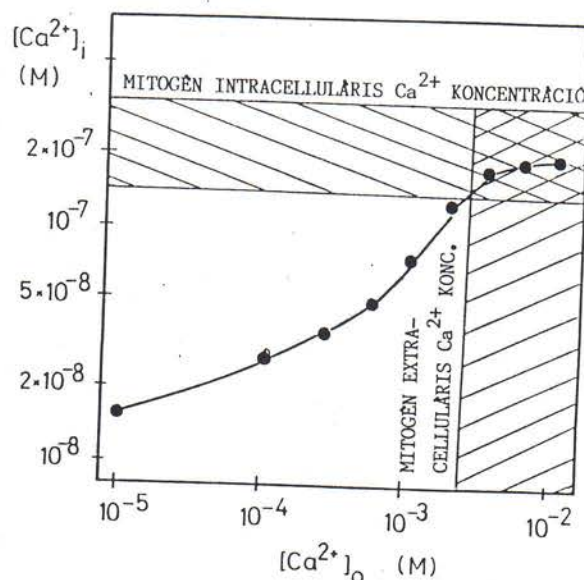
5.3. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásainak összefüggése a T limfociták aktivációjával

Az intracelluláris Ca^{2+} szint torzításmentes meghatározásának kidolgozása után a következőkben néhány olyan kísérlet kerül ismertetésre, amely alátámasztja azt, hogy az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése és a limfociták aktivációja egymással összefüggő események.

5.3.1. Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése, mint aktiváló és gátló tényező

Az irodalomban sokáig vita folyt azon, hogy a limfociták aktivációja vajon együttjár-e a sejten belüli Ca^{2+} szint emelkedésével (ld. 2.1.2. fejezet). Az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció meghatározására szolgáló módszerek kifejlesztésével már e feltevést adatok bősége megerősítette. A limfociták aktivációjakor bekövetkező Ca_i növekedést mind mitogének (Tsien és mtsai, 1982/a, Hesketh és mtsai, 1983), mind antigének (Weiss és mtsai, 1984/a-b; Shapiro és mtsai, 1985; Ledbetter és mtsai, 1986) esetén bizonyították.

Kísérleteink során először a közeg (sejtkultúra médium) Ca^{2+} koncentrációjának hatását vizsgáltuk. Ismeretes, hogy a közeg Ca^{2+} koncentrációjának 100 μM alá csökkenése erőteljesen gátolja a T limfociták aktiválódását (Whitney és Sutherland, 1972; Abboud és mtsai, 1985), ezzel szemben 2 mM-nál magasabb extracelluláris Ca^{2+} koncentráció önmagában is sejtaktiváló hatású (Whitfield és mtsai, 1973; 1979). E kísérleti eredmények még érdekesebbé teszik

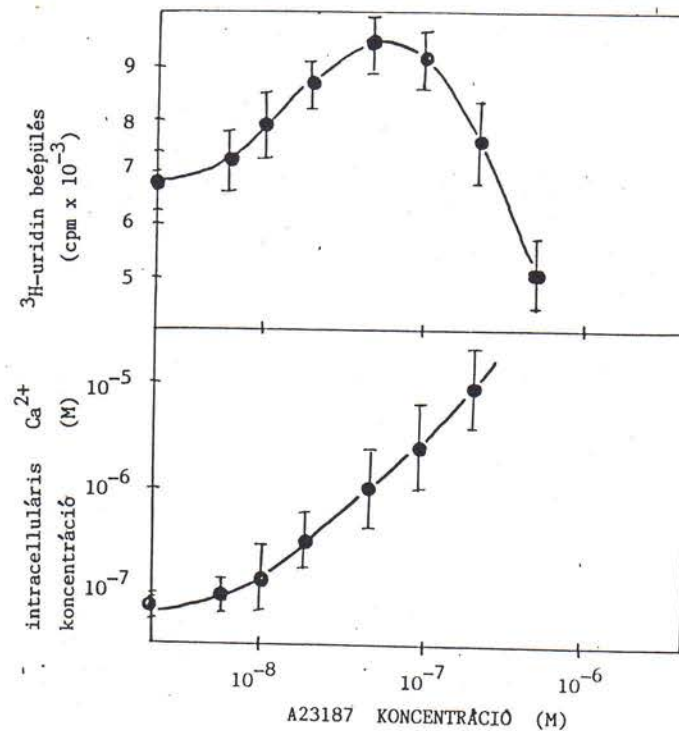


24. ábra Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változása a külső közeg Ca^{2+} koncentrációjának változásával

A Ca_i meghatározása (ld. 4.4.1. fejezet) előtt a sejteket kétszer mostuk Ca^{2+} -mentes módosított Hank-féle médiummal (sejtsűrűség: 5×10^6 sejt/ml). A fluoreszcenciáméréshez használt módosított Hank-féle médium Ca^{2+} koncentrációját 10^{-5} és 10^{-2} M között változtattuk 0.01 M, illetve 0.1 M CaCl_2 sorozatos adagolásával. A közeg szabad Ca^{2+} koncentrációját Ca^{2+} -érzékeny elektród (Orion) segítségével határoztuk meg. A fluoreszcencia jelet minden hozzáadás után legalább 5-10 percig követjük, a Ca_i értékét az egyensúlynak megfelelő állapotból számoltuk ki. A bevonalkázott részek Ca_i esetén a mitogén koncentrációjú Concanavalin A hozzáadása után mérhető értékeket (nem bemutatott adatok), Ca_o esetén pedig a Whitfield és mtsai (1973, 1979) által mitogénnek talált tartományt jelölik. Az adatok két különálló kísérlet reprezentánsai. Az ábra néhány pontjának nem sorozatos, hanem egyszeri Ca^{2+} hozzáadással történő újramérése azonos eredményeket szolgáltatott (Csermely és Somogyi, 1987/a-b).

azt a kérdést, hogy hogyan változik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a külső közeg Ca^{2+} koncentrációjának változtatása esetén. A 24. ábrán bemutatott eredményeink tanulsága szerint a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció a közeg Ca^{2+} koncentrációjának érzékeny függvénye. Az ábrából leolvasható az is, hogy a limfociták aktiválásához szükséges minimális külső Ca^{2+} koncentráció ($100 \mu\text{M}$, Whitney és Sutherland, 1972; Abboud és mtsai, 1985) 30 nM belső Ca^{2+} koncentrációnak felel meg. Abban az esetben, ha a külső Ca^{2+} koncentráció a Whitfield és mtsai (1973, 1979) által mitogénnek talált tartományba emelkedik, a belső Ca^{2+} koncentráció éppen eléri a Concanavalin A hozzáadása után tapasztalható 200 nM körüli értéket. A Ca_i -nek a közeg Ca^{2+} tartalmától való függése a sejtek általánosnak tűnő tulajdonsága, amelyet limfocitákon kívül (Tsien és mtsai, 1982/b; Hesketh és mtsai, 1983;

Abboud és mtsai, 1985; Bruschi és mtsai, 1984) mellékpajzsmirigy sejtekben (Shoback és mtsai, 1983) és hipofízis sejtekben (GH₄C₁ sejtek, Ramsdell és Tashjan, 1985) is kimutattak.



25. ábra Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció összefüggése a limfociták aktivációjával

Az egér timocitákat a 4.1. fejezetben leírtak alapján izoláltuk. A Cai fura-2-vel történő meghatározását a 4.4.1., a ³H-uridin beépülésének mérését a 4.8. fejezet szerint végeztük. Az ábrán látható eredmények három kísérlet átlageredményei (± SD).

A 25. ábrán bemutatott kísérleteink során a sejten belüli Ca²⁺ koncentrációt nem a közeg Ca²⁺ koncentrációjának növelésével, hanem az A23187 Ca-ionofór fokozatos adagolásával emeltük meg. A limfociták aktiválódását a ³H-uridin beépülésének mérésével követtük. A ³H-uridin beépülése már az első néhány órában érzékenyen jelzi a limfociták aktiválódását, hiszen (döntően a riboszómális RNS szintézise miatt) a limfociták aktivációja az uridin beépülésének korai növekedéséhez vezet (Pogo és mtsai, 1966). Az ábra A és B részének egybevetéséből kitűnik, hogy valóban: a sejten belüli Ca²⁺ koncentráció kismértékű emelése a limfociták aktiválódásához vezet. Abban az esetben viszont, ha a sejten belüli Ca²⁺ koncentráció meghaladja a 2-10 μM-t, előbb az aktiválás fokozatos megszűnése, majd a ³H-uridin beépülésének a kontroll érték alá esése figyelhető meg. A sejten belüli magasabb Ca²⁺ koncentrációnak az aktiválódást gátló hatása összefüggésben áll a megnövekedett Ca²⁺ szint citotoxikus hatásával. 0.1 mM körüli Ca²⁺ koncentráció esetén számos Ca²⁺-függő proteáz, lipáz DN-áz, RN-áz aktiválódik, amelyek végső soron a sejt szerkezetének megbomlásához, teljes széteséséhez vezetnek (Campbell, 1983).

5.3.2. Limfociták intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja az emberi életkor határán

Az eddigiekben olyan kísérleteket ismertettünk, amelyekben a sejten belüli Ca^{2+} szint emelkedése együtt járt a limfociták aktiválódásával. Ezen összefüggés analógiájára elképzelhető, hogy csökkent aktiválhatóságú limfociták sejten belüli Ca^{2+} szintje az átlagos értéknél alacsonyabb. E feltételezés vizsgálatára egyedi lehetőségünk nyílt akkor, amikor bekapcsolódtunk a 100. életévüket betöltött magyar állampolgároknak a SOTE Gerontológiai Központja vezetésével folyó vizsgálatába. Köztudomású, hogy idős korban a perifériális limfociták aktiválhatósága csökkent mértékű (Makinodan és Kay, 1980). Így a Ca_i meghatározása idős emberek limfocitáiban további adattal szolgálhat a sejten belüli Ca^{2+} szint és a limfociták aktiválhatósága összefüggéseinek megértéséhez.

A kísérletek során kapott eredményeinket a 7. táblázatban összegeztük. A vizsgálatok során összesen 12 férfi és 17 nő limfocitáinak Ca_i értékeit határoztuk meg (az összegzésből a V-46-os, illetve a V-74-es kiugró értékeket elhagytuk). Az átlagos Ca_i férfiak esetén 59 ± 16 nM-nak, nőknél 61 ± 13 nM-nak adódott. Így az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció nem mutat eltérést idős férfiak, illetve nők esetén. Annál nagyobb a különbség azonban, ha adatainkat egybevetjük a felnőtt korú vizsgálati alanyok perifériális limfocitáinak az irodalomban megadott Ca_i értékeivel (ld. 8. táblázat). Az összevetésből kitűnik, hogy a 100 évesek intracelluláris Ca^{2+} szintje közel feleakkora mint a felnőtt vizsgálati alanyok esetében meghatározott érték. Az általunk mért értékek a sejten belüli nehézfémionok által feltehetően nem torzítottak, hiszen a mérések döntő többsége a nehézfémionokra kevésbé érzékeny fura-2 indikátorral történt és TPEN hozzáadása sem befolyásolta a sejtekben mérhető fluoreszcenciát (nem bemutatott adatok). A fura-2-vel végzett méréseink során meghatározott Ca_i értékek semmiféle korrelációt nem mutatnak az adott mérésre jellemző intracelluláris fura-2 koncentrációval és a mérés során meghatározott 380 nm-es fluoreszcenciával. Ez arra utal, hogy a mérések során az irodalomban leírt, a méréseket eltorzító, részlegesen hidrolizált, Ca^{2+} -érzéketlen fura-2-észter (Scanlon és mtsai, 1987) nem volt jelen számottevő mennyiségben.

Az a tény, hogy idős korban a perifériális limfociták intracelluláris Ca^{2+} szintje a felnőttkori értéknek közel felére esik vissza, jó összhangban áll Peterson és mtsai (1986) megfigyeléseivel, akik humán fibroblasztokban mutattak ki hasonló tendenciákat. Idős egyének limfocitái aktivációjuk során sokkal érzékenyebbek a külső Ca^{2+} szint csökkenésére (Kennes és mtsai, 1981); a Ca-csatorna gátlása ezen esetekben nagyobb mértékben gátolja a mitogenezist, mint felnőttkori kontroll sejteknél (Wu és mtsai, 1985). Ezek a kísérleti adatok jól magyarázhatók azzal a feltételezéssel, hogy az idős kori limfociták sejten belüli Ca^{2+} szintjének nagyobb (kétszeres helyett minimálisan négyszeres) emelkedése kell ahhoz, hogy a mitogenezissel együttjáró 200-300 nM-os értéket elérje.

100 éves emberek perifériális limfocitáinak intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja

Jel	Életkor (év)	Cai (nM)	Indikátor
FÉRFIAK:			
V-46	103	565	quin2
V-62	101.5	47	fura-2
V-64	100	37	fura-2
V-78	100	65	fura-2
V-81	100	75	fura-2
V-83	99.5	78	fura-2
V-92	100	72	fura-2
V-98	104	55	fura-2
V-103	101	73	fura-2
V-109	100	67	fura-2
V-110	100	53	fura-2
V-112	102	63	fura-2
V-114	102	50	fura-2
NŐK:			
V-43	99.5	49	quin2
V-50	101	49	quin2
V-54	100	31	quin2
V-55	100	57	quin2
V-58	100.5	76	fura-2
V-59	100.5	80	fura-2
V-60	100.5	46	fura-2
V-61	100	89	fura-2
V-65	100	34	fura-2
V-74	101	534	fura-2
V-77	102	62	fura-2
V-80	101	62	fura-2
V-90	103	64	fura-2
V-93	100	73	fura-2
V-94	104	73	fura-2
V-95	100.5	46	fura-2
V-96	102	58	fura-2
V-107	100	47	fura-2

A sejtek izolálása a 4.1. fejezetben, intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjuk meghatározása a 4.4.1. fejezetben leírtak alapján történt. Az egyes Cai értékek két, néha három mérés átlagértékei.

A kísérleteinkből levonható --természetesen ilyen végletes formában eléggé vulgáris-- következtetés: magas Cai -- nagy aktivitás; alacsony Cai -- csökkent aktivitás. Jóllehet e következtetés második felére közvetlen bizonyítékunk nincsen, hiszen egy 100 éves ember szervezete nem éppen tekinthető a "leromlott immunrendszer" mintapéldájának. (Elméletileg még az is elképzelhető, hogy éppen ellenkezőleg: a limfociták csökkenő intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja a "hosszú élet egyik titka"...)

**Felnőtt korú vizsgálati alanyok perifériális limfocitáinak
intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja**

Ca_i (nM)	Indikátor	Irodalmi hivatkozás
118 $\pm$ 5	quin2	Gelfand és mtsai, 1986
181 $\pm$ 9	indo-1	"
98 $\pm$ 5	quin2	Waller és mtsai, 1984
107 $\pm$ 6	quin2	O'Flynn és mtsai, 1984

5.4. Forbol észter hatása a Ca-ionofórok működésére

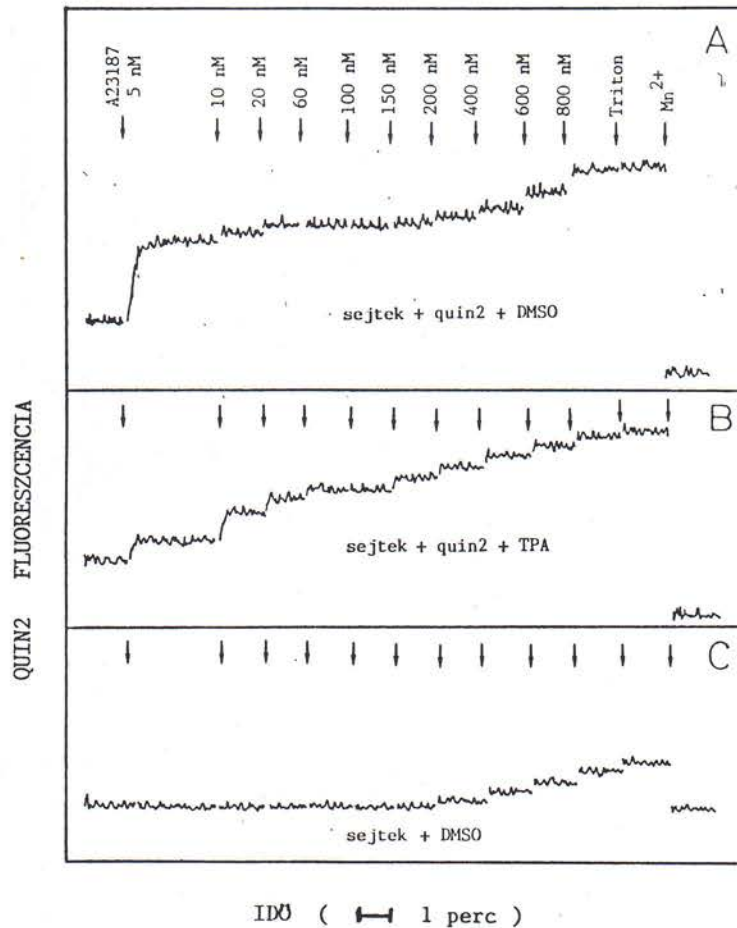
Annak bizonyítása után, hogy a fehérje kináz C-t aktiváló forbol észter kezelés a nehézfémetek sejten belüli átrendeződéséhez vezet (5.1. fejezet), valamint annak a bemutatása után, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásai sokrétűen összefüggnek a limfociták aktivációjával (5.3. fejezet) arra a kérdésre szeretnénk volna választ kapni, hogy játszanak-e a nehézfémetek valamilyen szerepet a fehérje kináz C-, illetve a Ca^{2+} -alapú jelátviteli rendszerek kölcsönhatásaiban. Ehhez olyan kísérleti feltételeket kerestünk, ahol a két rendszer viszonylag egyszerűen és szelektíven aktiválható. A fehérje kináz rendszer aktiválására kézenfekvő volt szelektív aktivátorainak, a forbol észtereknek, illetve a diacil-gliceroloknak az alkalmazása. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció szelektív növelésére a Ca-ionofórok látszottak a legalkalmasabbnak. Így kísérleteink során a forbol észtereknek (diacil-gliceroloknak) a Ca-ionofórok működésére gyakorolt hatását, hatásmódját vizsgáltuk.

5.4.1. Forbol észter gátolja a Ca-ionofórok által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedést és Ca^{2+} transzportot

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásai

A 26. ábrán sorozatos A23187 addíció hatását mutatjuk be két-féle sejt intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjára (quin2 fluoreszcenciájára). Az ábra A részén kontroll sejtek quin2 fluoreszcenciája látható, a B részen pedig TPA előinkubált sejtekkel (50 nM, 90 perc, 37 °C) ismételtük meg a kísérletet. A kontroll sejteket a TPA oldószerével, 0.1 térf. % dimetilszulfoxiddal inkubáltuk. Az ábra C részén a quin2-t nem tartalmazó sejtek autofluoreszcenciája látható. (Az A23187 fluoreszcenciája a kontroll, illetve a TPA kezelt sejtekben azonos volt; nem bemutatott adatok és 5.4.3. fejezet).

Az ábra A és C részét összehasonlítva megállapítható, hogy az ábra A részén bemutatott kísérlet 20 nM A23187 hozzáadása utáni részében a fluoreszcencia további emelkedése nem a quin2 fluoreszcenciájának növekedéséből, hanem az autofluoreszcenciából (ld. az ábra C része) fakad. A kísérlet végén Triton X-100 hozzáadására további (quin2 specifikus) fluoreszcencianövekedés nem tapasztalható. Ez azt igazolja, hogy kontroll sejtek esetén a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció 20 nM A23187 hozzáadása után

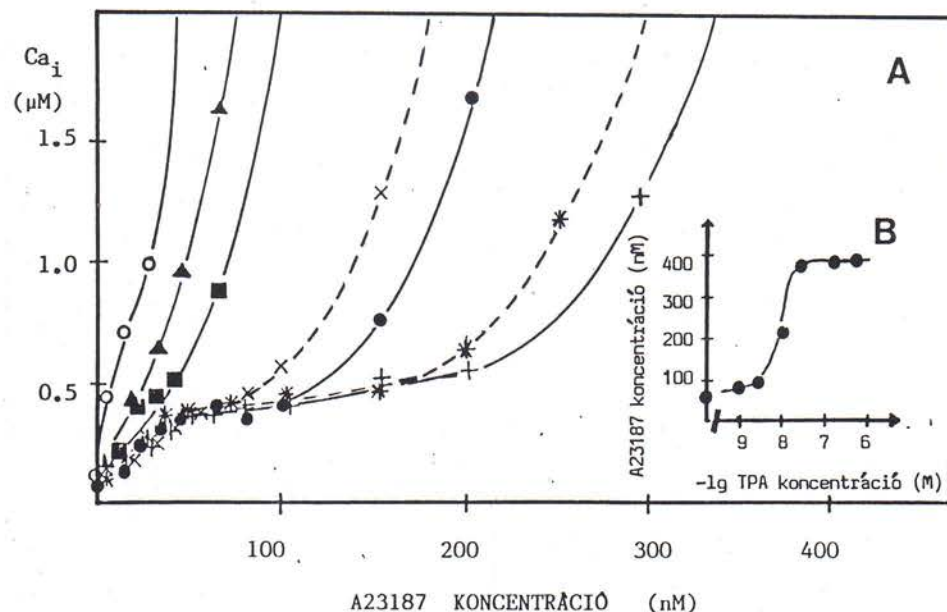


26. ábra Forbol észter hatása a Ca-ionofórok által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedésre

Az egér timocitákat dimetilszulfoxiddal (A és C rész), illetve TPA-val (50 nM, 90 perc, 37 °C; B rész) inkubáltuk. Az ábra A és B részén a sejtek quin2-vel való feltöltését és fluoreszcenciájuk meghatározását a 4.4.1. fejezet alapján végeztük. Az ábra C része a quin2-t nem tartalmazó sejtek autofluoreszcenciáját mutatja. A nyilaknál az adott végkoncentrációjú A23187-et, 0.05 súly % Triton X-100-at, illetve 10 μM MnCl_2 -ot adtunk a mintákhoz. Az A-C részek fluoreszcencia értékei azonos egységekben vannak feltüntetve. A bemutatott görbék 6 mérés reprezentánsai. A sejten belüli quin2 koncentráció 0.8 és 1.2 mM között volt a különböző mérések esetén. (Csermely és Somogyi, 1988)

közel teljes mértékben azonos az extracelluláris Ca^{2+} koncentrációval, azaz 1 mM-lal.

TPA kezelés hatására az A23187 hatékonysága számottevően lecsökken (26. ábra, B rész). A Ca_i -t a külső Ca^{2+} koncentrációval kiegyenlítő A23187 koncentráció kb. 200 nM-ra emelkedett, ami a kontroll értéknek kb. tízszerese.



27. ábra A TPA előinkubálás Ca -ionofórra gyakorolt hatásának idő- és koncentrációfüggése

Az egér timocitákat a 4.1. fejezet szerint izoláltuk. Intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjuk meghatározását a 4.4.2. fejezet alapján végeztük. A minták fluoreszcenciáját az egyes addíciók után 5-10 percen át követtük, a Ca_i -t a nyugalmi, egyensúlyi állapotból számoltuk. Az egyes adatok az A23187 sorozatos adagolásával kapott értékeket jelölik. Mindazonáltal az ábra néhány pontjának az A23187 nem sorozatos, hanem egyszeri hozzáadásával meghatározott értéke a bemutatottakhoz nagyon hasonló volt. Az egyes mintákat dimetilszulfoxiddal 150 percig (o—o), 20 nM TPA-val 15 percig (▲—▲), 30 percig (■—■), 45 percig (●—●), 90 percig (+—+), 120 percig (*—*—*), illetve 240 percig (x—x) inkubáltuk. 90 percnél rövidebb TPA inkubálás esetén a sejteket először quin2-vel töltöttük fel, majd TPA-val inkubáltuk. 45 percnél hosszabb TPA inkubálás esetén a quin2-vel való feltöltés a TPA inkubálás része volt. Azon pontok esetén (45, 60, 90 perc), ahol az inkubálás mind a két módja szerint elvégeztük a kísérleteket, nem volt kimutatható különbség a kapott eredmények között (nem bemutatott adatok). A B ábra az A23187 azon koncentrációjának a függését mutatja a TPA koncentrációjától (90 perces inkubálás mellett), amelyik éppen kiegyenlíti a Ca_i -t a külső Ca^{2+} koncentrációval. Az adatok 3 különálló kísérlet reprezentánsai, a quin2 sejten belüli koncentrációja 0.6 és 1.3 mM között változott. (Csermely és Somogyi, 1988)

A 27. ábrán a TPA A23187-re gyakorolt hatásának idő- és koncentrációfüggését láthatjuk. Mint ahogy az már az előző ábrából is kiderült, kontroll sejteken (o—o) az A23187 a Ca_i -t a külső Ca^{2+} koncentrációval kiegyenlítő, azaz "minimálisan hatékony" koncentrációja 20 nM-ra tehető. Ugyanez az érték 90 perces TPA előinkubálás után (20 nM végkoncentráció) 200-400 nM-ra nő. Ez a növekedés időfüggő és tranziens: 30 percnél kevesebb TPA előin-

kubálás esetén alig észrevehető, 120 perc elteltével pedig lassan csökkenésnek indul.

Az A23187 "minimálisan hatékony" koncentrációjának függését az előinkubálás során használt TPA koncentrációjától a 27. ábra B részén láthatjuk. Megállapítható, hogy a "minimálisan hatékony" A23187 koncentráció 20 nM TPA után tovább nem növekszik. Ez a TPA koncentrációtartomány megegyezik azzal, ahol a TPA a fehérje kináz C-t már teljes mértékben aktiválni képes (Castagna és mtsai, 1982).

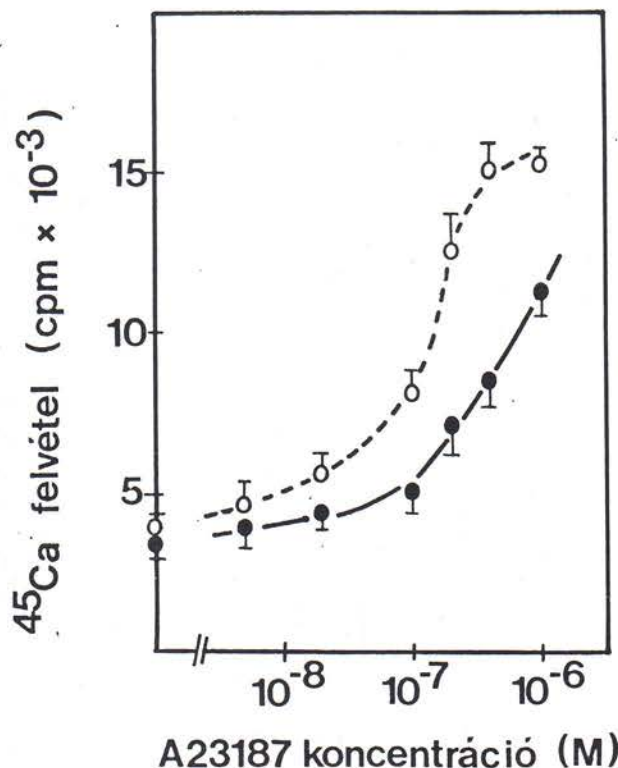
Eddigi vizsgálataink összegzéseként elmondható, hogy a TPA nemcsak a számtalan agonista által, hanem a Ca^{2+} -ionofór A23187 által kiváltott Ca_i emelkedés részleges meggátlására is képes. E hatás koncentráció és időfüggő, maximális mértékét 20 nM-nál több TPA esetén, illetve 90 perc előinkubálás körül éri el. Az irodalomban a TPA-nak számos ilyen, a Ca^{2+} szint emelkedését gátló hatása ismeretes (ld. 2.2. fejezet). Eredményeink mégis igen meglepőek, hiszen a TPA Ca -antagonizmusának eddigi példáit a fehérje kináz C által katalizált Ca^{2+} -csatorna, receptor, stb. foszforilációval magyarázták. Az A23187 egy 524 D molekulatömegű szerves vegyület. Fehérje kináz általi foszforilációja nehezen elképzelhető. Az viszont lehetséges, hogy a TPA hatása a Ca_i -re nem az A23187 által elősegített Ca^{2+} beáramlás gátlásán, hanem a Ca^{2+} kiáramlás gyorsításán alapul. Egy ilyen mechanizmus pl.: a plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz aktiválásával valósulhat meg. E mechanizmus annál is elképzelhetőbb, hiszen neutrofilek és vérlemezkék esetén a TPA általános Ca -antagonizmusát is e hatásra, a Ca^{2+} -ATPáz aktiválására vezetik vissza (Lagast és mtsai, 1984, Rickard és Sheterline, 1985; Smith és mtsai, 1985).

A quin2 fluoreszcenciájának változásait a nehézfémionok is befolyásolhatják (ld. 5.2. fejezet). Mint ahogy azt az 5.1. fejezetben igazoltuk, TPA hatására a nehézfémionok sejten belüli átrendeződése következik be. Így az sem kizárható, hogy a 26-27. ábrán bemutatott változások egy része nem az A23187 hatástalanításával, hanem a quin2 és a nehézfémek kölcsönhatásával magyarázható. E feltételezésekből egyértelműen következik, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásai mellett a Ca^{2+} transzport TPA hatására bekövetkező változásait is meg kellett vizsgálnunk.

A Ca^{2+} transzport változásai

A 28. ábrán egér timociták ^{45}Ca felvételének az A23187 koncentrációjától való függését mutatjuk be kontroll (o - - - o), illetve TPA előinkubált (20 nM, 90 perc; ●—●) sejtek esetén. Látható, hogy a ^{45}Ca felvétele erőteljesen lecsökken TPA kezelés hatására a kontroll sejtekhez képest. A ^{45}Ca felvétel azonos értékeinek eléréséhez TPA kezelt sejtek esetén kb. egy nagyságrenddel nagyobb A23187 koncentráció szükséges, mint a kontroll kísérletben. Ez a kísérleti adat egybevág az A23187 "minimálisan hatékony" koncentrációjának a Ca_i mérések esetén tapasztalt 10-szeres növekedésével.

Mindez azonban még mindig nem ad választ arra a kérdésre, hogy változik-e a Ca^{2+} kipumpálásának sebessége T limfocitákban TPA hatására. A 9. táblázatban a ^{45}Ca felvétel és leadás vizsgálata



28. ábra TPA előinkubálás hatása az A23187 által kiváltott ^{45}Ca felvételre

Egér timocitákat 20 nM TPA-val 90 percen át inkubáltunk (●—●). A kontroll sejteket (○—○) a TPA oldószerével, 0.1 térf. % DMSO-val kezeltük. A ^{45}Ca felvétel mérését a 4.4.2. fejezet alapján végeztük. Az adatok 3 különálló 3-3 paralelt tartalmazó mérés átlagértékei $\pm$ SD. (Csermely és Somogyi, 1988)

9. táblázat

^{45}Ca felvétel és leadás kontroll és TPA kezelt egér timocitákon^a

a ^{45}Ca felvétel/ leadás inkubá- lási ideje	^{45}Ca felvétel (cpm x 10 ⁻² /5 x 10 ⁶ sejt)		^{45}Ca leadás	
	kontroll	+TPA	kontroll	+TPA
5 perc	4.0 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.3	n.m. ^b	n.m.
10 perc	7.9 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3
+ 10 μM R24571	17.2 $\pm$ 1.4	13.0 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2
20 perc	13.1 $\pm$ 1.0	10.2 $\pm$ 0.8	3.5 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.4
60 perc	18.1 $\pm$ 2.0	15.3 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 0.8	7.0 $\pm$ 0.9
+ 10 μM R24571	n.m.	n.m.	2.5 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.4

^a A sejteket a 4.1. fejezet alapján izoláltuk. A ^{45}Ca felvétel és leadás értékeket a 4.4.2. fejezet alapján határoztuk meg. Az egyes értékek 3 különálló 3-3 paralelt tartalmazó mérés a "0 perces inkubálási idő"-re korrigált átlagértékei $\pm$ SD.

^b n.m. = nem meghatározott (Csermely és Somogyi, 1988)

során kapott eredményeinket mutatjuk be. A táblázat adatai szerint TPA kezelés sem a Ca^{2+} felvétel, sem pedig a Ca^{2+} leadás sebességét nem változtatja meg szignifikánsan. Az esetleges különbségek abban az esetben sem kimutathatóak, ha a plazmamembrán Ca^{2+} pumpáját a szelektív kalmódulin antagonistával, a kalmidazolimmal (R24571; Van Belle, 1981) gátoljuk. Így TPA hatására sem a kalmódulin-függő, sem az attól független Ca^{2+} kipumpáló rendszerek sebessége nem változik meg számottevően T limfocitákban.

Eredményeink látszólag elentmondanak a TPA neutrofilek és vételemezkék esetén tapasztalható, a Ca^{2+} kiáramlást fokozó hatásának (Lagast és mtsai, 1984; Rickardt és Sheterline, 1985, Smith és mtsai, 1985). Más irodalmi adatok azonban arra utalnak, hogy a Ca^{2+} pumpa rendszerek TPA hatására bekövetkező aktiválódása nem minden sejt általános jelensége. Grubbs és Maguire (1986) TPA kezelés hatására változatlan ^{45}Ca felvételtől és leadásról számolnak be S49 limfóma sejteken. Hasonló eredményeket kaptak Orillana és mtsai (1985) asztrocitóma sejteken, illetve DiVirgilio és mtsai (1986) PC12 és RINm5F szekréciós sejt vonalakon.

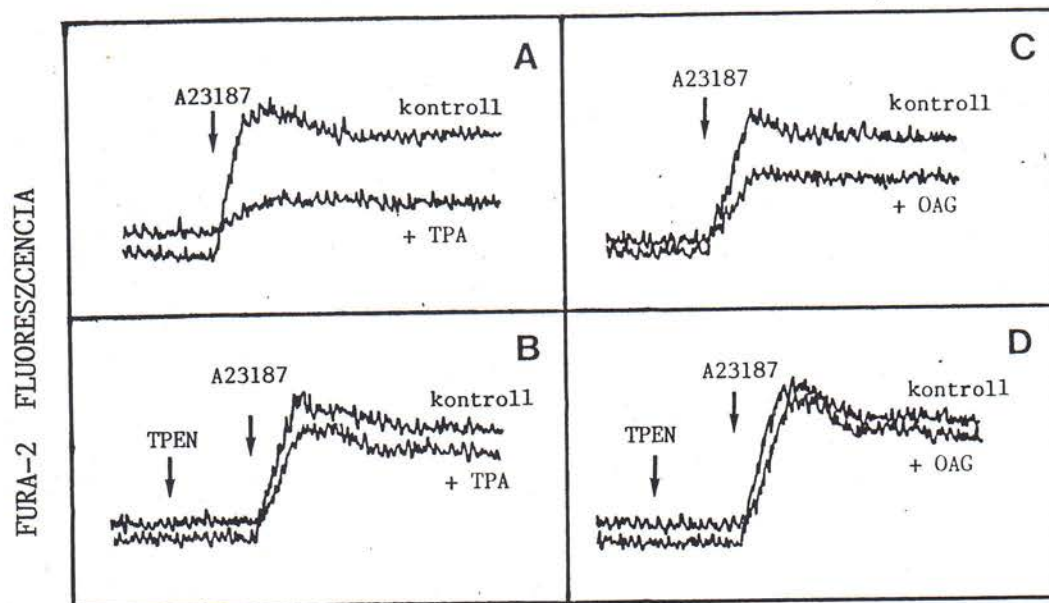
Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a fehérje kináz C rendszer aktiválódása hosszabb idő (kb. 90 perc) elteltével a Ca-ionofór, A23187 által elősegített Ca^{2+} felvételt hatékonyan lecsökkenti. Ez a csökkenés nem jár együtt a Ca^{2+} pumpa rendszerek aktiválásával.

5.4.2. Nehézfémionok szerepe a forbol észterek (diacil-glicerolok) és a Ca-ionofórok antagonizmusában

Annak a felismerése után, hogy a TPA képes meggátolni az A23187 Ca-ionofór hatását és ez a jelenség az ismeretes, illetve feltételezett mechanizmusokkal nem magyarázható, eddigi vizsgálataink fényében felmerül a kérdés: játszanak-e vajon a TPA által átrendezett nehézfémek valamilyen szerepet e Ca-antagonizmus kialakulásában. További kérdésként merülhet fel, hogy ezen Ca-antagonizmus vajon csak a TPA sajátja, vagy a fehérje kináz C "természetes" aktivátoraival, a diacil-glicerolokkal is kiváltható. E kérdésekre igyekeztünk választ találni az alábbiakban ismertetendő kísérleteink során.

A 29. ábra A részén 20 nM A23187 hatását mutatjuk be kontroll és TPA előinkubált (20 nM, 90 perc) egér timociták fura-2 fluoreszcenciájára. A quin2-vel végzett kísérleteknek (ld. 27. ábra, 5.4.1. fejezet) a fura-2-vel való reprodukálhatósága is csökkenti annak a valószínűségét, hogy a Ca_i csökkenés mértékében észlelt változás a quin2 mérés nehézfémek által való torzításának a következménye (ld. 5.2. fejezet).

Az ábra C részén oleoil-acetil-glicerollal (OAG) való előinkubálás hatása látható. Az OAG (hasonlóan a TPA-hoz) szintén képes az A23187 hatásának csökkentésére. Előkísérleteink tanulsága szerint az oleoil-acetil-glicerol 20 perces előinkubálás után fejtette ki maximális hatását. A sejteket tovább inkubálva az OAG minden bizonnyal foszfatidsavvá, monoacil-glicerollá és más termékekké metabolizálódhatott (ld. 2.1.3. fejezet). Ez lehet a magyarázata annak is, hogy az OAG a TPA-nál sokkal kisebb mértékben képes meggátolni az A23187 hatását. Elképzelhető, hogy a



29. ábra A sejten belüli nehézfém kelátor, TPEN a kontroll értékre állítja vissza az A23187 TPA, illetve OAG által lecsökkentett aktivitását

Egér timocitákat TPA-val (20 nM, 90 perc), oleoil-acetil-glicerollal (OAG-vel, 50 μ g/ml, 20 perc) illetve az oldószer dimetilszulfoxiddal (kontroll) inkubáltuk. A sejtek fura-2-vel való feltöltését és fluoreszcenciájuk meghatározását a 4.4.1. fejezet alapján végeztük. Az A23187 végkoncentrációja 20 nM, a TPEN-é 50 μ M volt. A bemutatott adatok három különálló kísérlet reprezentánsai. Az ábra A-D részének fluoreszcencia értékeit azonos egységekben tüntettük fel (Csermely és Somogyi, 1988).

hatás teljes kifejlődése OAG esetén is hosszabb időt venne igénybe, de ilyen hosszú idő elteltével az OAG már nincs jelen a rendszerben.

A 29. ábra B és D részében a sejtbiológiai gyakorlatba Arslan és mtsai (1985) által bevezetett sejten belüli nehézfém-kelátort, TPEN-t adtunk a kontroll, illetve TPA/OAG előinkubált sejtekhez. TPEN jelenlétében az A23187 hatékonysága a kontroll értékre nőtt. E kísérleteinket a 10-100-szor hatékonyabb Ca-ionofórral, az ionomicinnel is reprodukálni tudtuk. Azonos eredményeket kaptunk akkor is, ha egér timociták helyett nyúl timocitákkal dolgoztunk (nem bemutatott adatok). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a TPEN által komplexbe vitt nehézfémek minden bizonnyal szerepet játszanak az A23187 TPA, illetve OAG által kiváltott aktivitáscsökkenésében.

Az intracelluláris nehézfém kelátor, TPEN hatása a ^{45}Ca felvételére^a

A23187 koncentráció (nM)	^{45}Ca felvétel (cpm x 10^{-3})				
	kontroll	+ TPA	+TPA/TPEN	+ OAG	+OAG/TPEN
0	3.7±0.3	3.5±0.4	3.2±0.3	3.6±0.2	3.8±0.4
100	11.6±0.8	7.4±0.7	11.1±0.9	8.1±0.9	10.7±1.3
200	14.9±1.3	8.1±1.0	13.9±1.5	10.2±1.2	13.1±1.1

^aAz egér timociták izolálását a 4.1. fejezet, a ^{45}Ca felvétel méréseket a 4.4.2. fejezet alapján végeztük. A sejteket TPA-val (20 nM, 90 perc), OAG-val (50 µg/ml, 20 perc), TPEN-nel (100 µM, 90, illetve 20 perc), illetve az oldószerükként szolgáló DMSO-val inkubáltuk elő. Az adatok 3 különálló, egyenként 3-3 paraleles mérés átlagértékei ± SD. (Csermely és Somogyi, 1988)

A 10. táblázat adatai megerősítik eddigi eredményeinket. A táblázat adataiból kitűnik, hogy az oleoil-acetil-glicerol (OAG) nemcsak az A23187 által indukált Ca_i emelkedést, hanem a ^{45}Ca felvételt is csökkenteni képes. Az OAG-val indukált csökkenés mértéke itt is kisebb mint az A23187 TPA által előidézett hatás-csökkenése. TPEN mind a TPA, mind az OAG hatását képes felfüggeszteni. A 10. táblázatban közölt adataink (a 28. ábrán bemutatott adatokkal együtt) közvetlen bizonyítékát jelentik annak, hogy a fehérje kináz C aktiválása a Ca-ionofórok Ca^{2+} -transzportáló képességét valóban lecsökkenti és nem csupán az átrendező nehézfémek révén torzítja a Ca_i meghatározása során kapott eredményeket.

Eddigi eredményeink alapján felmerül a kérdés: vannak-e más olyan adatok, amelyek arra utalnak, hogy nehézfémionok képesek az A23187 által elősegített Ca^{2+} transzport gátlására. A nehézfémionoknak (Zn^{2+} , Mn^{2+} , stb) az A23187-hez mutatott affinitása a Ca^{2+} -énál 100-szor, 1000-szer nagyobb (Pfeiffer és Lardy, 1976). Mn^{2+} ionok megakadályozzák a limfociták A23187 által okozott ^{45}Ca felvételét (Resch és mtsai, 1978). Extracelluláris Mn^{2+} és Zn^{2+} ionok jelenlétében az A23187 csak a kontroll értéknél sokkalta nagyobb koncentrációban képes emelni az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt (nem bemutatott adatok). Ascites tumorsejtekben is a Ca-ionofórok csökkent hatékonyságát írták le. Ez együtt jár ezen sejtek kiugróan magas citoszolikus nehézfém tartalmával (Arslan és mtsai, 1985 és a benne lévő hivatkozások). Ezek az adatok több példán át is valószínűsítik, illetve igazolják, hogy a nehézfémionok képesek a Ca-ionofórok Ca^{2+} transzportjának meg-gátlására.

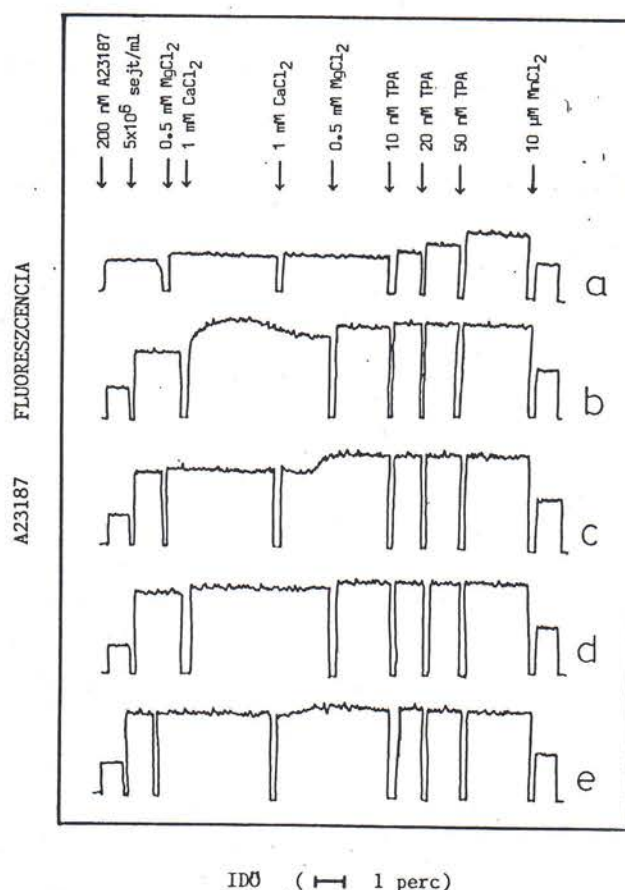
5.4.3. Forbol észter nem gátolja a Ca-ionofórok mozgékonyágát

Az előzőekben bizonyítottuk, hogy a nehézfémionok szerepet játszanak a Ca ionofórok TPA kezelés hatására bekövetkező aktivitáscsökkenésében. A továbbiakban arra a kérdésre igyekszünk választ találni: vannak-e más olyan mechanizmusok, amelyek elősegítik ezt a folyamatot. Számos ilyen mechanizmus feltételezhető:

- a TPA az ionofórokkal közvetlen kölcsönhatásba lépve gátolja transzport sajátosságait;
- a plazmamembrán fluiditása erőteljesen lecsökken TPA kezelés hatására: az ionofórok "befagynak" a membránba;
- az ionofórok valamely membránfehérjéhez való kötődéssel immobilizálódnak TPA kezelés hatására.

A23187 fluoreszcenciájának meghatározása kontroll és TPA inkubált sejtekben

Az A23187 fluoreszcenciájának meghatározását a 4.5.1. fejezet szerint, Pfeiffer és mtsai (1974) munkái alapján végeztük. A 30. ábrán az A23187 pufferben (a), kontroll (b,c) és TPA kezelt (50 nM, 90 perc, 37°C; d,e) sejtekben mutatott fluoreszcenciája látható. Az a görbe a Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes módosított Hank féle médiumba adott A23187 fluoreszcenciáját jelöli. Apoláros közegben



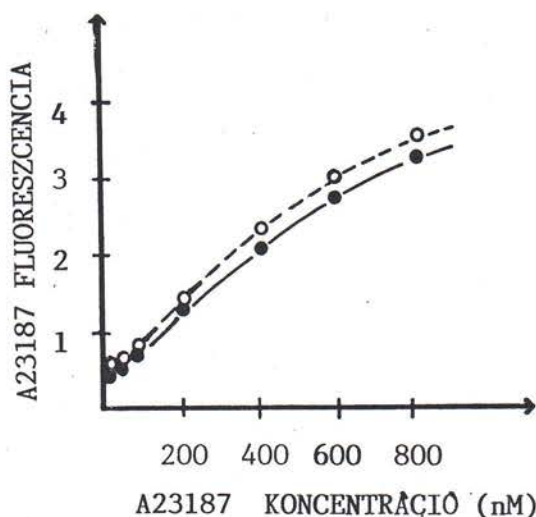
30. ábra TPA és TPA előinkubálás hatása az A23187 fluoreszcenciájára

Az A23187 fluoreszcenciájának meghatározását a 4.5.1. fejezetben leírtak szerint, Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes módosított Hank féle médiumban végeztük. Az egér timocitákat TPA-val (50 nM, 90 perc, d,e), illetve DMSO-val (b,c) inkubáltuk, majd 5×10^7 sejt/ml sejtsűrűségen újraszuszpendáltuk. A b-e. kísérletekben a sejteket a "törzsoldatból" adtuk a vizsgált mintához. Az ábrán bemutatott görbék fluoreszcencia értékeit azonos egységben tüntettük fel. A görbék 5 különálló kísérlet reprezentánsai. (Csermely és Somogyi, 1988)

az A23187 fluoreszcenciája a sokszorosára nő (Pfeiffer és mtsai, 1974). Ez lehet a magyarázata annak, hogy TPA hozzáadására az A23187 fluoreszcenciája megemelkedik. A TPA autofluoreszcenciája a vizsgált körülmények között elhanyagolható (nem bemutatott adat). A poláros oldószerben az egyaránt hidrofób A23187 és TPA egymással direkt kölcsönhatásba lépve közösen kizáródnak a víz szerkezetéből. Így az A23187 környezete hidrofóbbá válik, fluoreszcenciája megnő. Pfeiffer és munkatársai (1974) megfigyeléseivel összhangban a mangán kioltja az A23187 fluoreszcenciáját (a-e görbék).

A 30. ábra b. és c. görbéi az A23187 kontroll (csak DMSO-val inkubált) limfocitákban mutatott fluoreszcenciáját jelölik. Az A23187-nek a sejtek hozzáadására mutatott fluoreszcencia-növekedése az előzőek analógiájára a Ca^{2+} -ionofórnak a hidrofób sejtmembránba való beépülésével magyarázható. Ca^{2+} hozzáadására mind Mg^{2+} nélkül (b. görbe), mind jelenlétében (c. görbe) az A23187 fluoreszcenciájának átmeneti növekedése figyelhető meg. Sejtekben TPA hozzáadására az A23187 fluoreszcenciája nem változik meg.

A d. és e. görbéket TPA előinkubált (50 nM, 90 perc) sejtek jelenlétében vettük fel. Az A23187-nek a sejtek hozzáadására mutatott fluoreszcencia-növekedése függetlennek bizonyult a sejtek "előéletétől", kontroll sejtek ugyanolyan fluoreszcencia-növekedéshez vezettek, mint a TPA előinkubált timociták (vö. a b. és c. görbéket a d. és e. görbékkel). Ezzel szemben a TPA előinkubálás megakadályozta, illetve nagymértékben lecsökkentette az A23187 Ca^{2+} hatására létrejövő átmeneti fluoreszcencia-növekedését. Ezen átmeneti fluoreszcencia-növekedés gátlása kalmidazoliummal, a plazmamembrán Ca^{2+} -pumpa inhibitorával (Van Belle, 1981) is



31. ábra Az A23187 fluoreszcenciája kontroll és TPA kezelt timocitákban

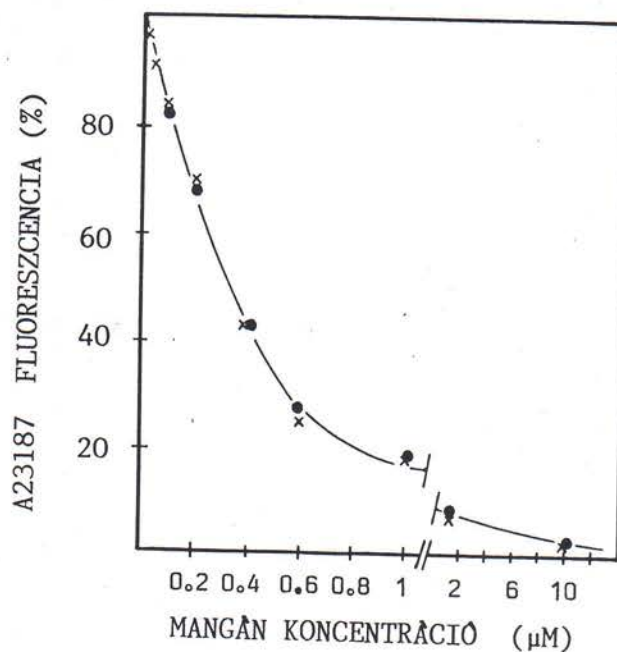
Az egér timocitákat a 4.1. fejezet alapján izoláltuk, az A23187 fluoreszcenciáját a 4.5.1. fejezet alapján határoztuk meg. A timocitákat TPA-val (20 nM, 90 perc; ●-●-●), illetve DMSO-val (o-o-o) inkubáltuk. A sejtsűrűség 5×10^6 sejt/ml volt. A bemutatott értékek 3 különálló mérés reprezentánsai.

elérhető" (nem bemutatott adatok). E kísérleti tény arra utal, hogy az A23187 fluoreszcenciájának átmeneti növekedése összefüggésben állhat a Ca^{2+} pumpa aktiválódásával, az ionofór egyfajta "aktív állapotát" jelezve. Ez az "aktív állapot" TPA előinkubálás után nem elérhető, ami újabb bizonyítékaul szolgálhat a TPA és a Ca-ionofórok antagonizmusának.

A 30. ábrán bemutatott kísérleteinket két irányban bővítettük tovább. A 31. ábrán az A23187 fluoreszcenciáját 20 nm-től 800 nm-ig követtük kontroll és TPA előinkubált (20 nM, 90 perc) sejtekben. Számottevő különbséget ezen esetekben sem találtunk.

Abból a tényből, hogy az A23187 fluoreszcenciája kontroll és TPA kezelt sejtekben megegyezik, egy érdekes következtetés vonható le. Az 5.4.2. fejezetben ismertetett eredményeink alapján feltételezhető, hogy forbol észterrel kezelt sejtekben az A23187 jelentős része nehézfémekkel képzett komplexe formájában van jelen. Az ionofór fluoreszcenciája mégsem változik. Pfeiffer és munkatársai (1974), valamint saját, nem bemutatott adataink szerint a nehézfémek közül a cink az egyetlen, amely nem oltja ki az A23187 fluoreszcenciáját. Emiatt fenti feltételezésünket úgy pontosíthatjuk, hogy forbol észterrel kezelt sejtekben az A23187 jelentős része cinkkel képzett komplexe formájában van jelen. Ez a feltételezés szép összhangban áll az 5.1. fejezetben bemutatott eredményeinkkel, amelyek szerint forbolészter kezelés hatására a cink koncentrációja nő meg a citoszolban a legjelentősebb mértékben.

A mangánnak az A23187 fluoreszcenciáját kioltó hatását vizsgálva (32. ábra) nem találtunk semmilyen különbséget a



32. ábra Mangánnak az A23187 fluoreszcenciáját kioltó hatása kontroll és TPA kezelt timocitákban

A kísérletet az előző ábrán leírtak alapján végeztük el. x—x, kontroll sejtek; •—• TPA inkubált sejtek.

kioltás mértékében kontroll, illetve TPA kezelt sejtek esetén. Az 50 %-os kioltás mindkét esetben $0.3 \mu\text{M Mn}^{2+}$ koncentráció esetén jelentkezik a közeg 1 mM Ca^{2+} és 0.5 mM Mg^{2+} koncentrációja mellett. Ez azt jelenti, hogy a timocitákba épült A23187 Mn^{2+} -ra, illetve $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ra mutatott relatív affinitása nem változik meg TPA kezelés hatására.

Eddigi eredményeink eléggé valószínűtlenné teszik, hogy a TPA-nak és az A23187-nek membránbeli közvetlen kölcsönhatása szerepet játszon a két anyag antagonizmusában. Az antagonista hatás időfüggő, 20 nM TPA koncentráció felett állandó, (így 20 nM TPA-nak kellene közel tízszeres mennyiségű A23187-et blokkolnia) és az A23187 fluoreszcenciájának TPA kezelésre mutatott állandósága sem támasztja alá a közvetlen kölcsönhatás tényét. A Mn^{2+} és a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -affinitásának változatlansága arra utal, hogy pusztán a nehézfémionok koncentrációjában bekövetkező mennyiségi és nem affinitásbeli változások azok, amelyek a Ca-ionofórok aktivitásának meggátlásához vezetnek.

Az A23187 emissziós anizotrópiája kontroll és TPA kezelt sejtekben

Az emissziós anizotrópia mérések az adott fluorofór mozgékony-ságának érzékeny jelzői (ld. 4.5.2. fejezet). Ezen sajátosságánál fogva az A23187 emissziós anizotrópiájának a megmérése az egyik legalkalmasabb módszer arra, hogy eldöntsük: csökkent-e az ionfór mozgékony-sága TPA kezelés hatására.

A TPA által okozott membránfluiditás változásokat vizsgáló eddigi kísérletek eredménye elég ellentmondásos. Stocker és mtsai (1987) leukocitákban a TPA membránfluiditás-csökkentő hatásáról számolnak be. Ezzel ellentétben Fischer és mtsai (1974) patkány embrió sejtekben, valamint Deelers és mtsai (1981) mesterséges membránokban a TPA fluiditásnövelő hatását tapasztalták. Goppelt-Strübe és Resch (1987) nemrég megjelent közleményükben rámutat-tak, hogy a fluoreszcencia polarizáció (és így az ebből származ-tatható fluiditás) mértéke erősen különbözik akkor, ha a fluo-reszcens próbát egész sejthez, vagy izolált plazmamembrán prepa-

11. Táblázat

Az A23187 fluoreszcenciájának emissziós anizotrópiája pufferben, kontroll és TPA-kezelt egér timocitákban

A23187 koncentráció (nM)	puffer	emissziós anizotrópia	
		kontroll sejt	TPA kezelt sejt
50	0.141 ± 0.021	0.215 ± 0.018	0.204 ± 0.023
100	0.129 ± 0.020	0.208 ± 0.029	0.191 ± 0.020
200	0.118 ± 0.025	0.176 ± 0.016	0.164 ± 0.014
400	0.126 ± 0.017	0.169 ± 0.010	0.151 ± 0.009

A sejteket TPA-val (20 nM, 90 perc), illetve DMSO-val (kontroll sejtek) inkubáltuk. Az emissziós anizotrópiát a 4.5.2. fejezetben leírtak alapján mértük. A sejtsűrűség 5×10^6 sejt/ml volt. Az adatok öt különálló kísérlet átlagértékei $\pm$ SD.

rátumhoz adjuk. Így a fluoreszcens próbák különböző kísérleti feltételek közötti különböző megoszlása is hozzájárulhat az irodalmi adatok ellentmondásosságához. Kísérleteinkben e probléma alárendeltebb szerepet játszik, hiszen adatainkból nem a membrán általános fluiditásváltozására kívánunk következtetni, hanem egy fluoreszcens anyag, az A23187 Ca ionofór mozgékonyosságát kívánjuk megvizsgálni saját emissziós anizotrópiája nyomonkövetésével.

Az A23187 emissziós anizotrópiája számottevően megemelkedik akkor, ha az ionofór beépül az egér timociták plazmamembránjába (11. táblázat). Ez az ionofór immobilizálódására utal. Mindazonáltal TPA kezelt sejtekben az emissziós anizotrópia további növekedése nem következik be, sőt kismértékű csökkenést ($p < 0.2$ szignifikanciaszintű különbség 50-200 nM A23187 esetén, illetve $p < 0.025$ szignifikanciaszint 400 nM A23187 esetén) tapasztalhatunk. Ez a plazmamembrán TPA hatására bekövetkező fluiditásnövekedésére utalhat.

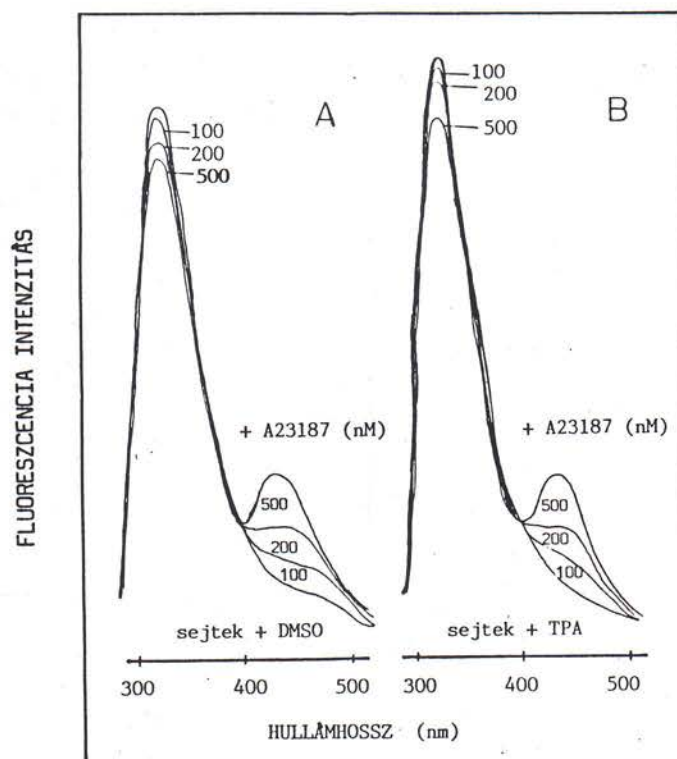
Energiatranszfer a membránfehérjék Tyr, Try csoportjai és az A23187 Ca-ionofór között

Annak a magyarázataként, hogy az A23187 kevésbé tudja transzportálni a Ca^{2+} -ot TPA kezelt sejtekben az is elképzelhető, hogy ilyen esetben az ionofór a plazmamembrán valamely fehérjéjéhez kötődve immobilizálódik. Ez a jelenség a membránfehérjék Tyr, Try csoportjai és az A23187 között létrehozható energiatranszfer nagyságának ugrásszerű megemelkedésével kellene, hogy járjon (ld. Hyono és mtsai, 1985; valamint 4.5.3. fejezet).

A 33. ábrán a 270 nm-en (a Tyr és Try gerjesztési maximumán) gerjesztett sejtszuszpenzió fluoreszcencia emissziós spektrumai láthatók. Az A23187 saját fluoreszcenciájára korrigált spektrumokon a 430 nm-nél megjelenő csúcs az A23187 másodlagos emissziója. E csúcs nagysága jelzi az energiatranszfer mértékét. Arra, hogy a rendszerben valódi energiatranszfer mehet végbe, az is utal, hogy a Tyr, Try emissziójának csökkenése nagyjából egybevág az A23187-re jellemző hullámhosszon megjelenő másodlagos emisszió mértékével. A 33. ábra A és B részének összevetésével látható, hogy TPA kezelés nem okoz számottevő változást a Tyr, Try csoportok és az A23187 közötti energiatranszfer mértékében.

Eddigi méréseinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az A23187 TPA kezelés hatására bekövetkező --feltételezett-- immobilizációját sem az emissziós anizotrópia vizsgálatok, sem pedig az energiatranszfer mérések nem mutatták ki. Így a TPA-nak az A23187 Ca^{2+} transzportáló képességét csökkentő hatása a vizsgált okok közül egyedül a megnövekedett nehézfém-koncentráció gátló hatására vezethető vissza.

Feltételezésünk szerint tehát az A23187 jelentős része nehézfémekkel (leginkább: cinkkel) képzett komplexek formájában van jelen a forbol észterrel kezelt sejtekben. A forbol észter kezelés hatására a citoszolban megjelenő nehézfémek mennyiségére az 5.1.2. fejezetben leírt számszerű eredményeink egy érdekes számítás elvégzésére nyújtanak lehetőséget. Elég-e a felszabaduló nehézfémek mennyisége a jelenlévő A23187 komplexbe vitelére --gátlására?



33. ábra Egér timociták membránfehérjéinek Tyr, Try csoportjai és az A23187 közötti energiatranszfer

Egér timocitákat DMSO-val (A rész), illetve TPA-val (20 nM, 90 perc, B rész) inkubáltunk. Az energiatranszfer méréseket a 4.5.3. fejezet alapján végeztük. Az A23187 Ca-ionofórt a megjelölt koncentrációkban, 100, 200 és 500 nM-ban adtuk a sejtekhez. Az emissziós spektrumokat az A23187 fluoreszcenciájára korrigáltuk a 4.5.3. fejezet szerint. Az egyes spektrumok 5 különálló kísérlet reprezentánsai, az ábra A és B részének fluoreszcencia egységei azonosak (Csermely és Somogyi, 1988).

Az 5.4.1. fejezetben ismertetett eredményeinkből kitűnik, hogy forbol észter kezelés hatására az A23187 minimálisan hatékony koncentrációja 20 nM-ról kb. 200 nM-ra emelkedett. Ez milliliterenként kb. 100-200 pmol A23187 "hatástalanítását" igényli. Mivel egy milliliterben a kísérletek során 5×10^6 timocita volt, az 5.1.2. fejezetben vizsgált 5×10^9 db. timocita esetén 100-200 nmol A23187 "hatástalanítására" elegendő nehézfémnek kellett termelődnie forbol észter kezelés hatására. A 3. táblázatban bemutatott adataink alapján TPA hatására a citoszolban 16 nmol Cu és 242 nmol Zn jelent meg. Ez mindenképpen elegendőnek látszik az A23187-tel közös komplex képzésére, különösen akkor, ha figyelembe vesszük, hogy az A23187 a fémekkel leginkább 2:1 arányú komplexet képez (Pfeiffer és mtsai, 1974). E számításunk számszerűen is igazolja az A23187 fluoreszcenciájának változatlanlanságából fakadó azon feltételezésünket, hogy az A23187 döntő mértékben a cinkkel képezhet komplexet TPA kezelt sejtekben.

5.5. Cink ionok hatása a Ca^{2+} - és foszfolipid-függő fehérje kináz aktivitására és lokalizációjára

Eddigi kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a Ca^{2+} - és foszfolipid-függő fehérje kináz (fehérje kináz C) rendszer aktiválása a nehézfémek sejten belüli átrendeződéséhez vezet (5.1. fejezet). Fény derült arra is, hogy a citoszol megnövekedett nehézfém tartalma szerepet játszik a Ca-ionofóroknak a fehérje kináz C aktiválására bekövetkező hatáscsökkenésében (5.4. fejezet). Mivel nem csak a fehérje kináz C hat a Ca^{2+} -függő folyamatokra, hanem a Ca^{2+} is hat a fehérje kináz C-re, mint az enzim egyik aktivátora, kézenfekvő a kérdés: befolyásolják-e a nehézfémionok (különösen közülük a leggyakoribb: a cink) valamilyen módon a fehérje kináz C aktivációját. E kérdésre próbálunk meg választ keresni a továbbiakban.

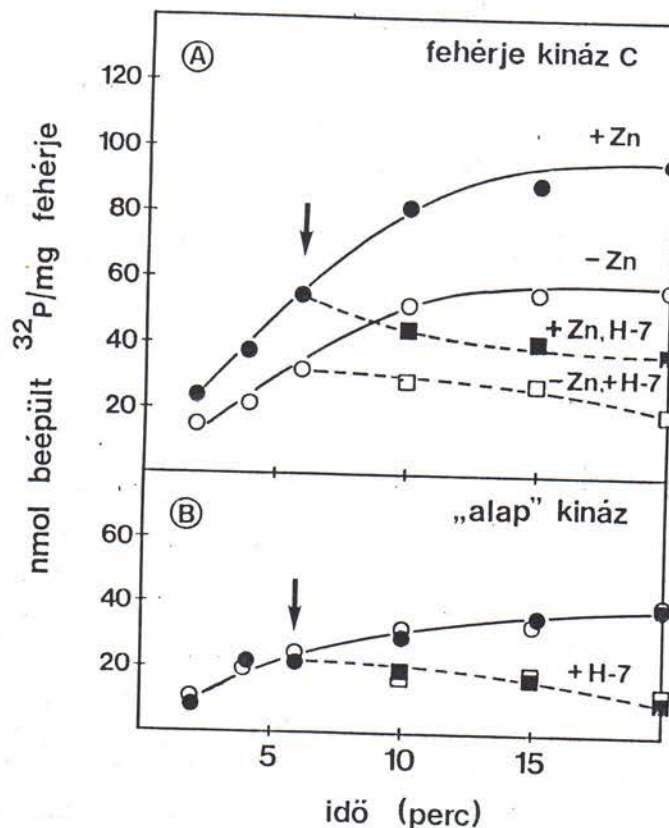
5.5.1. Cink ionok hatása a fehérje kináz C aktivitására

Kísérleteink során először a fehérje kináz C aktivitásának Zn^{2+} hatására bekövetkező változásait vizsgáltuk. A 34. ábrán bemutatott eredményeink szerint 0.75 mM ZnCl_2 jelentősen növeli a citoszobeli fehérje kináz C aktivitását, miközben az "alap-kináz" aktivitás (amelyet Ca^{2+} és foszfolipidek nélkül mértünk) változatlan marad. A membránkötött fehérje kináz C aktivitását hasonló koncentrációjú ZnCl_2 nem befolyásolja (nem bemutatott adatok). A fehérje kináz C cink hatására bekövetkező aktivációja 30 és 90 % között változott a különböző preparátumokban. A maximális aktiváshoz szükséges összes ZnCl_2 koncentráció 0.7 és 1.0 mM közötti tartományba esett.

A preparátumról preparátumra való különbségnek több oka is lehet:

- különbözhet az egyes preparátumok oxidáltsági foka. Mivel a szulfhidril csoportok cink-kötő képessége oxidációjukkal nagymértékben csökken, előrehaladottabb oxidáció esetén mind a sejten belüli SH-csoportok, mind a DTT SH-csoportjai Zn^{2+} megkötésére egyre inkább alkalmatlanokká válnak, az aktiváláshoz szükséges összes ZnCl_2 koncentráció csökken.
- A citoszobeli fehérje kináz C cinkkel való telítettsége a különböző preparátumokban különböző lehet. Így a citoszolban lévő összes enzim mennyiség különböző hányadát lehet (természetesen a szükséges ZnCl_2 változó mennyiségével) aktiválni.
- A különböző preparátumok különbözőségéhez az a nemrégiben felfedezett tény is hozzájárulhat, hogy a fehérje kináz C-nek legalább három izoenzime különböztethető meg. Ezen izoenzimek egymástól való különbségei részben genetikailag meghatározottak, de különbözőségük más, eddig még fel nem tárt okokra is visszavezethető lehet (Jaken és Kinley, 1987; Sekiguchi és mtsai, 1987; Woodgett és Hunter, 1987).

E feltételezések bizonyítása, vagy cáfolata további kísérleteket igényel.



34. ábra Cink aktiválja a fehérje kináz C-t

A nyúl timocitákból származó citoszolt a 4.2. fejezet alapján izoláltuk. A fehérje kináz C aktivitásának meghatározása a 4.6. fejezet alapján történt. Az ábra A részén a fehérje kináz C aktivitása, B részén pedig az „alap-kináz” aktivitás látható. Az egyes méréseket cink nélkül (○, □), illetve 0.75 mM összes koncentrációjú ZnCl_2 jelenlétében (●, ■) végeztük. A nyíllal jelölt helyen 100 μM végkoncentrációjú fehérje kináz C inhibitor, H-7-et adtunk a reakcióelegy egy részéhez. Az adatok négy különálló kísérlet reprezentánsai (Csermely és mtsai, 1988).

0.75 mM összes ZnCl_2 koncentráció esetén a szabad Zn^{2+} koncentráció 10^{-8} M körüli értékre tehető. 2 mM-nál több ZnCl_2 hozzáadása esetén mind a citoszobeli, mind a membránkött fehérje kináz C aktivitása erőteljesen csökken (nem bemutatott adatok). Ezen, gátló hatású ZnCl_2 koncentráció esetén a Zn^{2+} szabad koncentrációja 10^{-6} M körüli értékre tehető. A szabad Zn^{2+} koncentrációkat Bartfai (1979) alapján becsültük az EGTA, EDTA és DTT pH értékekre korrigált stabilitási konstansait Bjerrum és mtsai (1957) adatai alapján számoltuk. A szabad Zn^{2+} koncentrációk fenti értékeit azonban csupán becsléseknek lehet tekinteni. Pontos számításokat azért nem tudtunk végezni, mivel az előállt rendszer kelátorok (EGTA, EDTA, DTT + citoszolikus fehérjék, vegyületek) és kationok sokaságát (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} + a citoszol kationjai) tartalmasta.

Nishizuka és csoportja egyik korai közleményében arról számolt be, hogy Zn^{2+} nem képes aktiválni a fehérje kináz C enzimet (Inoue és mtsai, 1977). Az általuk leírt eredmények és saját eredményeink közötti ellentmondás azonban csak látszólagos. Nishizuka és csoportja ugyanis e korai közleményeiben nem a fehérje kináz C-t, hanem csak annak a regulációs domén lehasítása után keletkező katalitikus doménjét (fehérje kináz M) vizsgálta.

Parker és mtsai (1986) szerint a fehérje kináz C feltételezett cink kötőhelye(i) a regulációs domén részét képezi(k). Így a Nishizuka és csoportja által közölt eredmények és saját eredményeink közötti látszólagos ellentmondás valójában azt az elképzelésünket erősíti meg, hogy a fehérje kináz C feltételezett cink-kötőhelye szerepet játszik az enzim cink ionok által okozott aktivációjában.

A ZnCl_2 hatására észlelt enzimaktivitás növekedés számos olyan ok miatt következhet be, amelyek esetén az enzimnek csupán látszólagos aktivitásnövekedéséről beszélhetnénk. Az alábbiakban ezen lehetséges okokat soroljuk fel -- cáfoljuk meg.

- a. a ZnCl_2 -ből nem a Zn^{2+} , hanem a Cl^- aktivál.

ZnSO_4 , illetve cink-acetát ugyanolyan hatékonysággal alkalmazható (nem bemutatott adatok).

- b. ZnCl_2 hatására Ca^{2+} szabadul fel a Ca-EGTA, Ca-EDTA komplexekből, hiszen a Zn^{2+} sokkal nagyobb affinitással bír ezen kelátorokhoz, mint a Ca^{2+} (Bjerrum és mtsai, 1957). Az enzim aktiválódását tulajdonképpen a felszabaduló Ca^{2+} ionok okozzák.

Amennyiben ZnCl_2 helyett vele ekvimoláris mennyiségű CaCl_2 -ot adtunk a reakcióelegyhez, az aktiválás nem következik be (nem bemutatott adatok).

- c. Nem a fehérje kináz C, hanem valamely más Ca^{2+} függő fehérje kináz (pl.: a Ca^{2+} -kalmodulin függő fehérje kináz) aktiválódik.

Amennyiben a ZnCl_2 -ot és az aktiváláshoz használt CaCl_2 -ot együtt adjuk az alap-kináz reakcióelegyhez semmilyen aktivációt nem tapasztalunk (nem bemutatott adatok).

- d. A fehérje kináz C katalitikus doménjéről Ca^{2+} -függő neutrális proteázokkal a regulációs domén leválasztható. Így az enzim Ca^{2+} - és foszfolipid aktiválhatósága megszűnik (Kishimoto és mtsai, 1983; Murray és mtsai, 1987; Buday és mtsai, 1987). Amennyiben a Zn^{2+} a fehérje kináz C degradációjában szerepet játszó proteázokat gátolná, e folyamatot is mint a fehérje kináz C --látszólagos-- aktivációját észlelnénk.

A katalitikus domén (M kináz) felszaporodását, illetve mennyiségének cink hatására bekövetkező csökkenését az "alap-kináz" aktivitásának változásai kellene hogy kísérjék. Ilyen változásokat nem tapasztaltunk (34. ábra B rész). A Ca^{2+} -függő neutrális proteázt gátló leupeptin hatására a fehérje kináz C aktivitása nem változik az általunk nyert preparátumokban (12. táblázat). A limfocitáknak a fehérje kináz C-t hasító proteázaktivitása jóval kisebb, mint az agy-, illetve májsejtekben, vérlemezékben vagy neutrofilekben található proteázaktivitás (v.ö.: Guy és mtsai, 1986 és Murray és mtsai, 1987).

A Ca^{2+} -függő neutrális proteázok mellett a fehérje kináz C cink-aktivációját a citoszol más proteázai is befolyásolhatják. Young és mtsai (1987) adatai szerint azonban a fehérje kináz C enzim féléletideje a magas proteázaktivitású, 37°C -on tartott glióma sejtekben is eléri a 6-7 órát. Mivel a fehérje kináz C aktivitásának mértékét közvetlenül az egyes szubcelluláris frakciók izolálása után végeztük, nem valószínű, hogy az enzim proteolitikus bontása előrehaladott fokot ért volna el. Erre utal az is, hogy a fehérje kináz C aktivítását az izoláló pufferhez adott proteáz-gátlók közül egy sem befolyásolta (2 mM PMSF, 1 mM benzamidin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripszin inhibitor, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepsztatin, illetve apronitin; nem bemutatott adatok).

- e. Cink ionok a foszfo-fehérje foszfatázok ismert inhibitorai (Sparks és Brautigan, 1986). A fehérje kináz C-vel párhuzamosan működő, a fehérje kináz C által foszforilált szubsztrátot defoszforiláló foszfatázok gátlása kísérleti körülményeink között a fehérje kináz C --látszólagos-- aktiválásaként jelentkezne.

A 34. ábrán a fehérje kináz C-nek a fehérje kináz inhibitorral, H-7-tel (Hidaka és mtsai, 1984) való gátlása után a szubsztrát foszforiláltságának szintje azonos mértékben csökken cink jelenlétében, mint anélkül. Ez arra utal, hogy a cink nem befolyásolja a fehérje kináz C-vel párhuzamosan működő foszfatázok aktivitását.

- f. A cink ionok a tirozin támadáspontú foszfo-fehérje-foszfatázokat még a foszfoszerin/foszfothreonin-fehérje foszfatázoknál is jobban gátolják (Sparks és Brautigan, 1986). Ez felveti a lehetőségét annak, hogy cink jelenlétében a fehérje kináz C-nek egy --ezidáig a gyors defoszforiláció miatt rejtett-- tirozin kinázok által foszforilált formája stabilizálódik, amely az alap-enzimnél magasabb aktivitással bír.

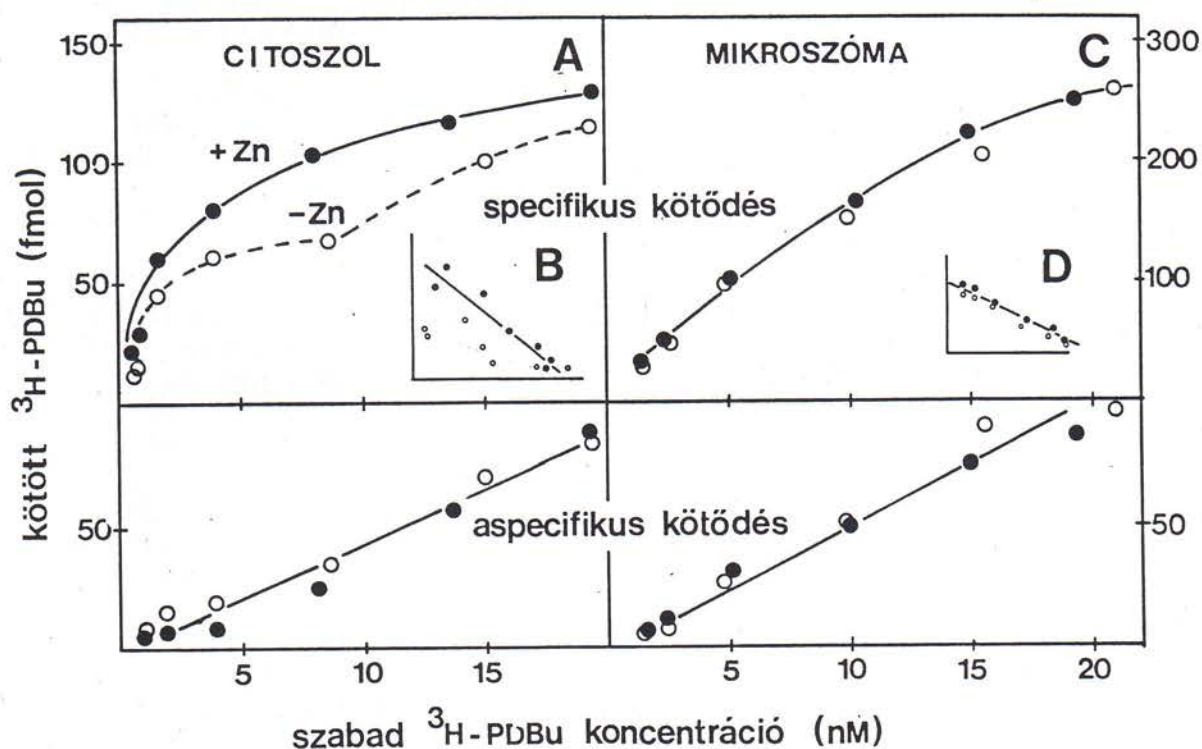
A citoszol-enzim 60 μM ATP, illetve 100 μM Na_3VO_4 jelenlétében való előinkubálása nem vezetett az enzim aktiválódásához (nem bemutatott adatok). Mivel a Na_3VO_4 a foszfortirozin-fehérje-foszfatázok másik ismert gátlószere (Swarup és mtsai, 1982), ezen adatok a tirozin-foszforilációnak a fehérje kináz C aktiválhatóságában játszott szerepe ellen szólnak.

Az előzőekben ismertetett megfontolások miatt valószínű, hogy Zn^{2+} nanomólos szabad koncentrációban képes a fehérje kináz C enzim aktiválására. Az enzim cinkkel való aktiválhatósága lehet hogy összefüggésben áll a regulációs doménben Parker és mtsai (1986) által feltételezett cink-kötőhely telítettségével.

Az értekezés megírásának ideje alatt Murakami és mtsai (1987) eredményeinkhez igen hasonló adatokat közöltek. Megfigyeléseik szerint Zn^{2+} kis koncentrációban az agy citoszol fehérje kináz C-t 10-75 %-os mértékben aktiválja. Amennyiben a Zn^{2+} szabad koncentrációja a μM -os értéket meghaladja, a fehérje kináz C gátlása következik be. Ezen adatuk is egybevág az általunk találtakkal.

5.5.2. Cink ionok hatása a fehérje kináz C forbol észter kötő képességére

Egy enzim adott kísérleti körülmények közötti aktiválódása alapvetően két mechanizmus szerint mehet végbe: vagy az enzim által katalizált reakció maximális sebessége nő meg, vagy az enzim affinitása válik nagyobbá szubsztátjai, illetve aktivátorai iránt. Noha a fehérje kináz C-nek az előző fejezetben ismerttetett aktiválása nem vezethető vissza az enzim affinitásváltozására, hiszen mind a szubsztátokat, mind az aktivátorokat nagy feleslegben, "telítési értéken" alkalmaztuk, ez a tény nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a Zn^{2+} a reakció maximális sebességén kívül az enzim affinitását is befolyásolja. Az ATP-re, hisztonra, Ca^{2+} -ra, foszfatidilszerinre és forbol észterre/diacilglicerolra mutatott affinitások vizsgálata közül elsőként a Zn^{2+} hatását a forbol észter kötődése esetén vizsgáltuk meg. Az alábbiakban e kísérleteink eredményeit mutatjuk be.



35. ábra Cink hatása a 3H -forbol-dibutirát kötődésére

A nyúl timocitákat a 4.1., szubcelluláris frakcióikat a 4.2. fejezet alapján izoláltuk. A 3H -forbol-dibutirát kötődésének mértékét a 4.7. fejezet szerint határoztuk meg. A vizsgált fehérjemennyiség citoszol esetén 100 μg , mikroszómák esetén 200 μg volt. Az üres körök a Zn^{2+} nélkül, a töltött körök 0.75 mM $ZnCl_2$ jelenlétében végzett mérések eredményét jelölik. Az ábra B és D részén a kötési adatok Scatchard-analízise látható.

A 34. ábrán látható, hogy cink ionok megnövelik a citoszol forbol észter receptorainak affinitását a ^3H -forbol-dibutirát iránt. Hasonló növekedés membránkött receptorok esetén nem tapasztalható. Zn^{2+} nem okozott semmiféle változást az 1 μM jelzetlen forbol-dibutirát jelenlétében mért aspecifikus kötődésben sem. A kötődési adatok nagymértékű hasonlóságot mutatnak a fehérje kináz C aktiválódás során kapott eredményeinkkel. A Zn^{2+} hasonló módon csak a citoszolikus enzimre van hatással. A Zn^{2+} nélkül mért citoszol kötődési görbe több, különböző affinitású kötőhelyre utal. E különbségek cink hozzáadására nagymértékben csökkennek, eltűnnek. Ez összhangban állna a citoszol fehérje kináz C aktiválásának változó mértékével, illetve azzal a feltételezésünkkel, hogy a citoszol enzim cinkkel különböző mértékben telített enzimek keveréke. E feltételezést további kísérletek hivatottak megnyugtató módon bizonyítani.

5.5.3. Cink ionok hatása a fehérje kináz C reverzibilis membránköttetésére

Ca^{2+} elősegíti a fehérje kináz C reverzibilis kötődését a membránokhoz (12. táblázat; Niedel és mtsai, 1983; Wolf és mtsai, 1985/a-b; Pontremoli és mtsai, 1986; Gopalakrishna és mtsai, 1986). A 12. táblázat szerint cink ionok is képesek a fehérje kináz C membránköttetésének elősegítésére.

A cink ionok által kiváltott kötődéshez a citoszol és a mikroszóma frakció endogén Ca^{2+} tartalma is hozzájárulhat. E hatás azonban nem lehet döntő mértékű, hiszen a cink ionok abban az esetben is képesek a membránköttetés előidézésére, ha a citoszol és a mikroszóma frakció endogén Ca^{2+} tartalmát előzetesen chelex 100 kezeléssel eltávolítjuk (nem bemutatott adatok). A fehérje kináz C a cink ionok által előidézett membránköttetésére is reverzibilis abban az értelemben, hogy a Ca^{2+} -köttetéshez hasonlóan EGTA kezeléssel az enzim ezen esetben is a membránról eltávolítható (12. táblázat).

A 12. táblázat figyelemreméltó adata, hogy 0.1 mM Ca^{2+} olyan körülmények között, amikor a mellette egyébként jelenlévő 1-2 μM nehézfém-szennyezést (ld. 4. táblázat és nem közölt adatok) EGTA, EDTA komplexek segítségével eltávolítottuk csak csökkent mértékben képes a fehérje kináz C membránköttetésének előidézésére. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a nehézfém (cink) ionok a Ca^{2+} által elősegített membránköttetésben is szerepet játszhatnak.

A 12. táblázatban a fehérje kináz C aktivitásértékek specifikus aktivitásként vannak feltüntetve. Mivel a citoszol fehérje-tartalma a mikroszómafrakciónak kb. 3-4-szerese, emiatt a Ca^{2+} , illetve Zn^{2+} okozta membránköttetés egyben az összes enzimaktivitás mintegy 40-50 %-os csökkenésével jár. Az enzim összes aktivitásának ilyen csökkenése az irodalomban általános jelenség, amelynek pontos oka még nem tisztázott (Niedel és mtsai, 1983; Pontremoli és mtsai, 1986; Gopalakrishna és mtsai, 1986). Az mindenestre megállapítható, hogy az enzimaktivitás csökkenésének tényétől függetlenül a cink a Ca^{2+} -hoz hasonló változásokat okoz a fehérje kináz C aktivitásának megoszlásában.

12. táblázat

Ca²⁺ és Zn²⁺ elősegíti a fehérje kináz C membránköttődését^a

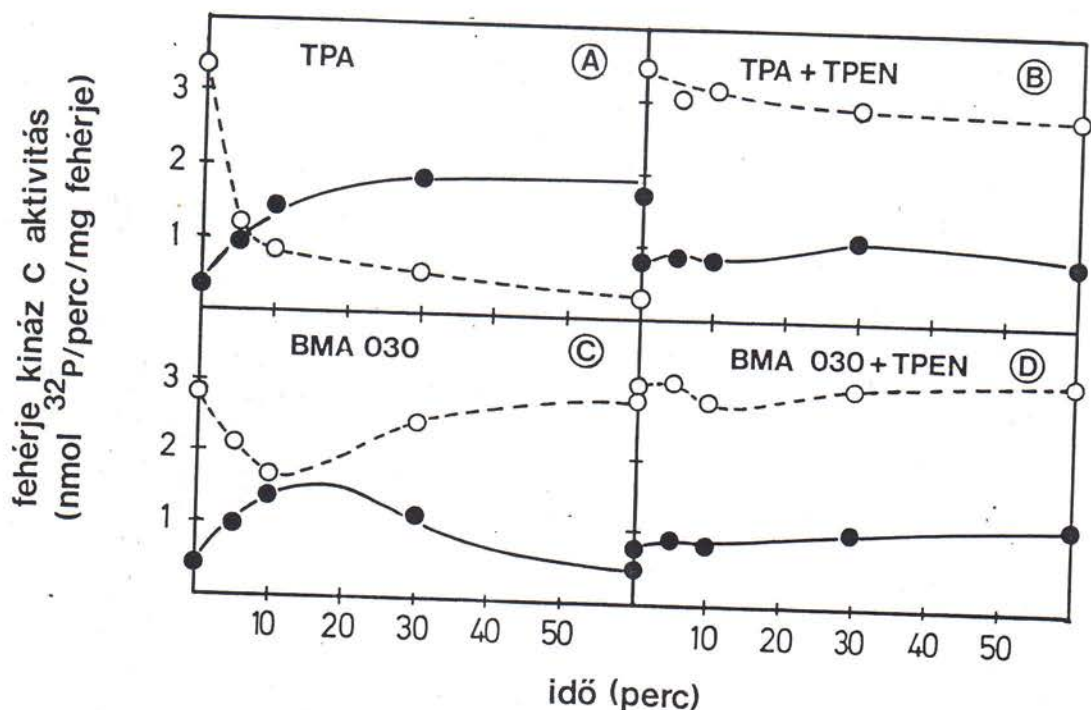
Az izolálás módja, (az izoláló puffer további alkotórészei)	Fehérje kináz C aktivitás (nmol ³² P/perc/mg fehérje)	
	Citoszol	Mikroszóma
EDTA (2 mM), EGTA (1 mM)	6.0 ± 0.5	1.5 ± 0.3
EDTA (2 mM), EGTA (1 mM), 50 µg/ml leupeptin	6.1 ± 0.4	1.4 ± 0.4
CaCl ₂ (3.1 mM), EGTA (1 mM), EDTA (2 mM)	5.1 ± 0.7	2.0 ± 0.3
CaCl ₂ (0.1 mM), 50 µg/ml leupeptin	2.0 ± 0.2	4.8 ± 0.8
"Ca-mikroszóma" + + EGTA extrakció ^b	4.6 ± 0.5	2.1 ± 0.4
ZnCl ₂ (50 µM), 50 µg/ml leupeptin	2.5 ± 0.3	4.5 ± 0.7
"Zn-mikroszóma" + + EGTA extrakció	4.8 ± 0.4	2.2 ± 0.3

^aNyúl timociták citoszolját és mikroszóma frakcióját a 4.2. fejezet alapján izoláltuk. Az izoláló puffer 20 mM Hepes-t (pH 7.4), 10 mM 2-merkaptóetanolt és a táblázatban megjelölt alkotóelemeket tartalmazta. A fehérje kináz C aktivitásának meghatározását a 4.6. fejezet alapján végeztük. Az adatok 3 különálló kísérlet átlagértékei ± SD.

^b0.1 mM CaCl₂, illetve 50 µM ZnCl₂ jelenlétében izolált mikroszóma frakciót 1 mM EGTA-t, 2 mM EDTA-t, 20 mM Hepes-t (pH 7.4) és 10 mM 2-merkaptóetanolt tartalmazó pufferben állni hagytuk 60 percen át 4 °C-on. Inkubálás után a membrán vezikulákat centrifugálással (100 000 g, 30 perc, 4 °C) különítettük el. Ezen esetekben a "Citoszol" a felülúszót, a "Mikroszóma" az üledéket jelöli (Csermely és mtsai, 1988).

5.5.4. Cink ionok szerepe a fehérje kináz C forbol észter és antigén által elősegített membránköttődésében

A fehérje kináz C aktivációjának egyik igen érdekes, és az utóbbi időben rendkívül sokat tanulmányozott lépése az enzim forbol észterek, diacil-glicerolok, illetve más ágensek (pl. antigének) hatására bekövetkező citoszol → plazmamembrán átrendeződése (Nishizuka, 1986; Farrar és Ruscetti, 1986; Nel és mtsai, 1987). Az alábbi kísérleteinkben arra a kérdésre kerestünk választ, hogy elképzelhető-e a nehézfémionok (cink) részvétele e folyamatokban.



36. ábra Az intracelluláris nehézfém kelátor, TPEN hatása a fehérje kináz C átrendeződésére

A humán perifériális limfocitákat a 4.1. fejezet alapján izoláltuk. A sejteket 50 μ M TPEN-nel (B és D rész), illetve DMSO-val (0.5 térf. %, A és C rész) 37 °C-on 20 percen át előinkubáltuk, majd az inkubálást 20 nM TPA-val, illetve 20 ng/ml BMA 030 anti-CD3 antitesttel folytattuk. (A BMA 030 ebben a koncentrációban mutat optimális mitogén hatást; nem bemutatott adatok.) Az inkubálást az ábrán megjelölt időpontokban gyors 0 °C-ra való hűtéssel és a sejtek lecentrifugálásával állítottuk le. A citoszol és a mikroszóma frakció izolálását a 4.2., a fehérje kináz C aktivitásának meghatározását a 4.6. fejezet alapján végeztük. Az üres körök a citoszol, a töltött körök a mikroszómák fehérje kináz C aktivitását jelölik. Az adatok három különálló kísérlet reprezentánsai (Csermely és mtsai, 1988).

A 36. ábra A részén a fehérje kináz C-nek TPA hatására bekövetkező tartós átrendeződése látható. Az ábra C részén az enzim BMA 030 anti-CD3 antitest (Kurrle és mtsai, 1985, ld. 4.9. fejezet) által kiváltott átmeneti membránkötődését mutatjuk be. Mindkét kísérletbeli eredmény jó összhangban áll az irodalomban közölt adatokkal (Nishizuka, 1986; Farrar és Ruscetti, 1986, Nel és mtsai, 1987 és az ott idézett hivatkozások). A 36. ábra B és D részén az előző kísérleteket ismételtük meg úgy, hogy a humán perifériális limfocitákat előzetesen az intracelluláris nehézfémkelátor TPEN-nel (Arslan és mtsai, 1985) kezeltük. TPEN kezelés után sem a forbol észter, sem az anti-CD3 antitest nem képes a fehérje kináz C membránkötődésének előidézésére. A TPEN nem az intracelluláris Ca^{2+} ionok komplexbe vitelével fejti ki hatását, hiszen TPEN hatására nem változik meg az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció (ld. 23. és 29. ábrák, valamint Arslan és mtsai, 1985) és a Ca^{2+} antagonistá TMB-8 nem képes a fehérje kináz C átrendeződésének a meggátlására (ld. 13. táblázat).

13. táblázat

Különböző fémionok, valamint TPEN és TMB-8 hatása a fehérje kináz C TPA és antigén által kiváltott átrendeződésére^a

Kezelés	Fehérje kináz C aktivitás (nmol ³² P/perc/mg fehérje)		³ H-forbol-dibutirát kötődés (fmol/mg fehérje)	
	Citoszol	Mikroszóma	Citoszol	Mikroszóma
Kontroll	3.4 ± 0.6	0.7 ± 0.3	1200 ± 120	150 ± 30
+ TPA	0.4 ± 0.2	1.8 ± 0.4	80 ± 10	560 ± 60
+ BMA 030	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	700 ± 110	510 ± 90
+ TPEN	3.5 ± 0.4	0.6 ± 0.2	1010 ± 30	180 ± 40
+ TPEN, TPA	2.9 ± 0.5	0.6 ± 0.1	950 ± 50	230 ± 20
+ Zn-TPEN, TPA	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	n.k. ^b	470 ± 50
+ TPEN, BMA 030	3.1 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1130 ± 70	n.k.
+ Zn-TPEN, BMA 030	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.3	760 ± 80	360 ± 60
+ Fe-TPEN, TPA	1.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	750 ± 20	150 ± 40
+ Mn-TPEN, TPA	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.3	580 ± 20	250 ± 20
+ TMB-8	3.6 ± 0.3	0.8 ± 0.3	1350 ± 140	200 ± 20
+ TMB-8, TPA	0.3 ± 0.05	1.6 ± 0.3	40 ± 20	570 ± 40
+ TMB-8, BMA 030	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.2	800 ± 50	540 ± 20

^a A humán perifériális limfocitákat a 4.1., szubcelluláris frakcióikat a 4.2 fejezet alapján izoláltuk. A fehérje kináz C aktivitás meghatározását a 4.6., a ³H-forbol-dibutirát kötődés mérését a 4.7. fejezet szerint végeztük. A sejtek különböző anyagokkal való kezelése a 36. ábránál megadottak szerint történt. A TPA-val, illetve a BMA 030 anti-CD3 antitesttel való inkubálás ideje 10 perc volt. A Zn-TPEN, Fe-TPEN és Mn-TPEN komplexeket azonos módon: mennyiségű TPEN, illetve ZnCl₂, FeSO₄ és MnCl₂ összekeverésével állítottuk elő. A komplexekkel való inkubálás során a TPEN végkoncentrációja 50 μM volt, ugyanannyi, mint a csak TPEN-t alkalmazó kísérletekben. A TMB-8-cal végzett kísérleteinkben a Ca-antagonista végkoncentrációja 100 μM, az inkubálás ideje 20 perc volt. Az adatok 3 kísérlet átlageredményei ± SD (Csermely és mtsai, 1988).

^b n.k. = nem kimutatható

A 13. táblázat adatai szerint az intracelluláris nehézfémkelátor, TPEN nem képes a forbol észter, illetve anti-CD3 antitest által kiváltott fehérje kináz C átrendeződés meggátlására abban az esetben, ha Zn^{2+} -komplexe formájában adjuk a sejtekhez. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a TPEN ezen hatását valóban a nehézfémek sejten belüli szabad koncentrációjának csökkentésével éri el. Ez a kísérlet lehetőséget teremt arra, hogy információt nyerjünk a különböző nehézfémek hatékonyságáról a TPEN hatásának visszafordításában. Kísérleteinkben a sejten belül leggyakrabban előforduló nehézfémeket (Zn , Cu $\approx$ Fe és Mn ; ld. 3. táblázat; nem bemutatott adatok és Arslan és mtsai, 1985) vizsgáltuk. A Cu vizsgálatára azért nem került sor, mivel a réz ionok 5 nagyságrenddel erősebben kötődnek a TPEN-hez, mint a Zn^{2+} (Adreneg és mtsai, 1977). Emiatt a réz kizorítaná a cinket a TPEN-nel képzett komplexéből, lehetetlenné téve ezáltal a réz és a cink hatása közötti különbségtételt. Fe és Mn csak részben képes a TPEN hatásának megfordítására (13. táblázat). Amennyiben kizárólag csak a Fe -TPEN-t, illetve az Mn -TPEN-t adtuk a sejtekhez, a fehérje kináz C megoszlása a citoszol és a mikroszóma frakció között a kontroll sejtekéhez igen hasonló volt (nem bemutatott adatok).

A Ca^{2+} - és foszfolipid-függő hiszton kináz aktivitás átrendeződései nem mindig jelzik egyértelműen a fehérje kináz C enzim átrendeződését az egyes sejtfrakciók között. Számos esetben ugyanis az átrendeződést kiváltó kísérleti körülmények (pl. forbol észter kezelés) jelentősen megváltoztatják a fehérje kináz C szubsztrátspecifitását (Cochet és mtsai, 1986). Emiatt fehérje kináz C aktivitásméréseinkkel párhuzamosan a 3H -forbol-dibutirát kötő receptorok átrendeződését is vizsgáltuk. A 13. táblázatban bemutatott kötődési adataink szerint a 3H -forbol-dibutirát receptor megoszlása a fehérje kináz C aktivitás megoszlásával párhuzamosan változik. Ezek az eredmények megerősítik a fehérje kináz C aktivitás átrendeződésével kapcsolatban levont következtetéseinket és arra utalnak, hogy az alkalmazott kezelések nem okozzák a fehérje kináz C a szubsztrátként használt bázikus H1 hiszton irányában mutatott specifitásának megváltozását.

Fehérje kináz C-vel kapcsolatos eredményeink összefoglalásaként megállapíthatjuk, hogy

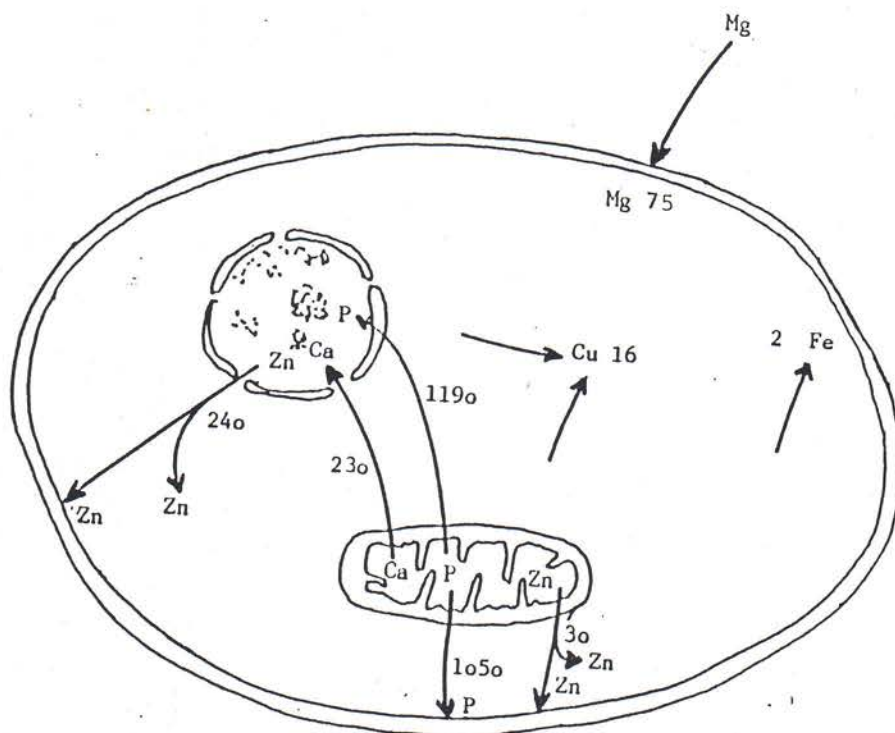
- Zn^{2+} nanomoláris koncentrációban képes a citoszolban lokalizált fehérje kináz C aktiválására;
- a citoszol fehérje kináz C forbol észterrel szembeni affinitása Zn^{2+} hatására nő;
- Zn^{2+} képes az enzim reverzibilis membránkötődésének az előidézésére;
- a Zn^{2+} szerepet játszik a fehérje kináz C Ca^{2+} , TPA és antigén által kiváltott membránkötődésében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS, AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

6.1. A cink szerepe a Ca^{2+} ionokon alapuló másodlagos hírvivő rendszer és a fehérje kináz C enzimen keresztül megvalósuló aktivációs út kölcsönhatásaiban -- az eredmények összefoglalása

- a. Kísérleteink során először azt vizsgáltuk meg, hogy van-e lehetőség a nehézfémek (cink) részvételére a T limfociták Ca^{2+} - és fehérje kináz C alapú jeltovábbító rendszerei kölcsönhatásaiban. Nehezen képzelhető el ugyanis a nehézfém ionok részvétele e folyamatokban akkor, ha a fenti két jeltovábbító rendszer egyikének aktiválása esetén koncentrációjuk változatlan marad. A sejten belül a szabad és kötött állapotú nehézfémionok egyensúlyban vannak egymással. Emiatt a nehézfémionok szabad koncentrációjának megváltozása feltételezhetően együtt kell, hogy járjon összes mennyiségük megváltozásával is. Így az 5.1. fejezetben ismertetett kísérleteinkkel arra a kérdésre kerestünk választ, hogy változik-e a nehézfémek koncentrációja az egyes szubcelluláris frakciókban a fehérje kináz C enzim forbol észterrel történő aktivációja esetén.

Mind röntgenfluoreszcenciás méréseink (5.1.1. fejezet, illetve Csermely és mtsai, 1987/a), mind plazma emissziós spektrofotometriával kapott adataink (5.1.2. fejezet, illetve Csermely és mtsai, 1987/b) azt igazolják, hogy forbol észter kezelés hatására a nehézfémek jelentős átrendeződése következik be a sejten belül. A kísérleteinkben kapott eredmények összefoglalását a 37. ábrán mutatjuk be. Eredményeink szerint a fehérje kináz C tartós aktiválódása esetén a nehézfémek (különösen a cink) egy jelentős része a timociták mag- és mitokondriális frakciójából a mikroszómákba (azaz döntő részben a plazmamembránba, hiszen T limfociták esetén a mikroszóma frakció igen kis mennyiségű endoplazmás retikulumot tartalmaz, ld. 4.2. fejezet) és a citoszolba rendeződik át. Ez az átrendeződés alapját képezheti a két jelátviteli rendszer nehézfémek (cink) segítségével megvalósuló kölcsönhatásának. Az átrendeződéssel kapcsolatos fontos, de eddig megválaszolatlan kérdés, hogy milyen mechanizmus állítja vissza a cink eredeti homeosztázisát (ld. 6.2 és 7. fejezetek).



37. ábra Különböző elemek TPA inkubálás hatására bekövetkező átrendeződése nyúl timocitákban

Az ábrán szereplő adatok az átrendeződött elemek mennyiségét mutatják nmol/5 x 10⁹ sejt egységekben. Az egyes értékeket a 3. táblázat adatai alapján számoltam. Az áttekinthetőség kedvéért az endoplazmás retikulumot és a lizoszómákat nem tüntettem fel.

- b. Vizsgálataink következő részében a Ca²⁺-függő jelátviteli rendszer aktiválásával foglalkoztunk. Kidolgoztuk azokat a kísérleti körülményeket, amelyek betartásával a sejtben belüli szabad Ca²⁺ koncentráció (Cai) meghatározása nehézfémek jelenlétében is biztonsággal elvégezhető (5.2. fejezet, illetve Csermely és Somogyi, 1987/a-b). Néhány példán (a Cai változása a sejtben kívüli Ca²⁺ koncentráció hatására, a Cai és a sejtek aktiválódásának összefüggése) bemutattuk annak a kissé egyszerűsített szabálynak az érvényesülését, amely szerint csökkent sejtben belüli Ca²⁺ szint a limfociták csökkent aktivitásával, egy bizonyos határon belül megemelt sejtben belüli Ca²⁺ szint pedig megemelkedett általános sejtaktivitással jár. E vizsgálatainkkal kapcsolatos az az új és érdekes megfigyelésünk, hogy a limfociták sejtben belüli szabad Ca²⁺ szintje az emberi életkor határán lévő idős emberek esetén a felnőttkori értéknek közel felére esik vissza (5.3. fejezet).

- c. A fehérje kináz C rendszer aktiválódása számos ismert esetben a Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszer gátlásához vezet (2.2. fejezet). Kísérleteink során a Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszer aktiválásának egy olyan példáját vizsgáltuk, amelyben a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció növekedése szelektíven és egyszerű mechanizmus segítségével létrehozható. Ilyen körülmények között ugyanis nagyobb esélyünk nyílik a nehézfémek hatásának kimutatására, mint más, bonyolultabb rendszerek esetén. A Cai ezen szelektív és egyszerű mechanizmusú befolyásolását Ca-ionofórok segítségével valósítottuk meg.

Az 5.4. fejezetben ismertetett eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy

- a fehérje kináz C diacil-glicerolokkal, illetve forbol észterekkel történő aktivációja a Ca-ionofórok Ca^{2+} -transzportáló aktivitásának jelentős csökkenését eredményezi;
- a Ca-ionofórok inaktiválódásában az ionofórok immobilizációja nem játszik szerepet;
- a Ca-ionofórok inaktiválódását nehézfémekkel, leginkább cinkkel képzett stabil komplexük okozhatja. E feltételezésünket a nehézfém-kelátor, TPEN-nel végzett kísérleteink támasztják alá. Forbol észter kezelés hatására a citoszolban megjelenő cink mennyisége elegendőnek látszik a Ca-ionofórok "hatástalanítására". Az a tény, hogy a citoszolban megjelenő nehézfémek túlnyomó többsége cink, jó összhangban áll azzal a megfigyelésünkkel, hogy ugyancsak a cink az egyetlen nehézfém, amely az A23187 fluoreszcenciáját nem oltja ki. E követelménynek feltételezésünk értelmében teljesülnie kell, hiszen az A23187 fluoreszcenciája forbol észter kezelés hatására nem változik.

Eredményeinket összefoglalva kimondhatjuk, hogy a nehézfémek (leginkább cink) részvétele a fehérje kináz C-nek a Ca-ionofórok által kiváltott Cai-változásra gyakorolt hatásában a kimutatható (Csermely és Somogyi, 1988). Ezen eredményeink megnyithatják az utat a nehézfémek a fehérje kináz C és a Ca^{2+} -függő jelátviteli rendszer kölcsönhatásaiban játszott szerepének általános tisztázása előtt (ld. 7. fejezet).

- d. Annak a kimutatása után, hogy a cink részt vesz a fehérje kináz C rendszernek a Ca^{2+} -függő rendszerre gyakorolt hatásában értelemszerűen merül fel a kérdés fordítottja: részt vesz-e a cink a Ca^{2+} és a fehérje kináz C kölcsönhatásában. E kérdés-feltevés annál is indokoltabb, mivel a fehérje kináz C enzim elsődleges szerkezetének meghatározása során Parker és mtsai (1986) cink-kötőhely(ek) jelenlétét feltételezték az enzim regulációs doménjében.

Az 5.5. fejezetben leírt eredményeink alapján a következőket állapíthatjuk meg:

- Zn^{2+} nanomoláris szabad koncentrációban képes a citoszolikus fehérje kináz C aktiválására, a membránkötött enzim ellenben cinkkel nem aktiválható;

- Zn^{2+} megnöveli a fehérje kináz C forbol észterrel szemben mutatott affinitását, a membránkötött enzim affinitása nem változik cink hatására;
- a citoszolbeli fehérje kináz C aktiválódásának és affinitásnövekedésének jellege arra utal, hogy a citoszolban több, cinkre különbözőképpen reagáló fehérje kináz C izoenzim van jelen;
- Zn^{2+} elősegíti a fehérje kináz C reverzibilis membránkötődését;
- nehézfémek (feltételezhetően cink) részt vesznek a fehérje kináz C Ca^{2+} , forbol észter és antigén által kiváltott membránkötődésében.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy cink ionok sokrétűen befolyásolják a fehérje kináz C aktivációjának különböző lépéseit (Csermely és mtsai, 1988). Eredményeink ismeretében elképzelhető, hogy a fehérje kináz C a nehézfémek segítségével egyfajta pozitív visszacsatolást valósít meg: hosszabb idő elteltével, amikor az aktiváció kezdeti szakaszában felszabadult diacil-glicerol mennyiség jelentős része már metabolizálódott, a citoszolban megjelenő nehézfémek biztosíthatják az enzim aktivált állapotát. E feltételezés igazolása további hosszas kísérletező munkát igényel (ld. 7. fejezet).

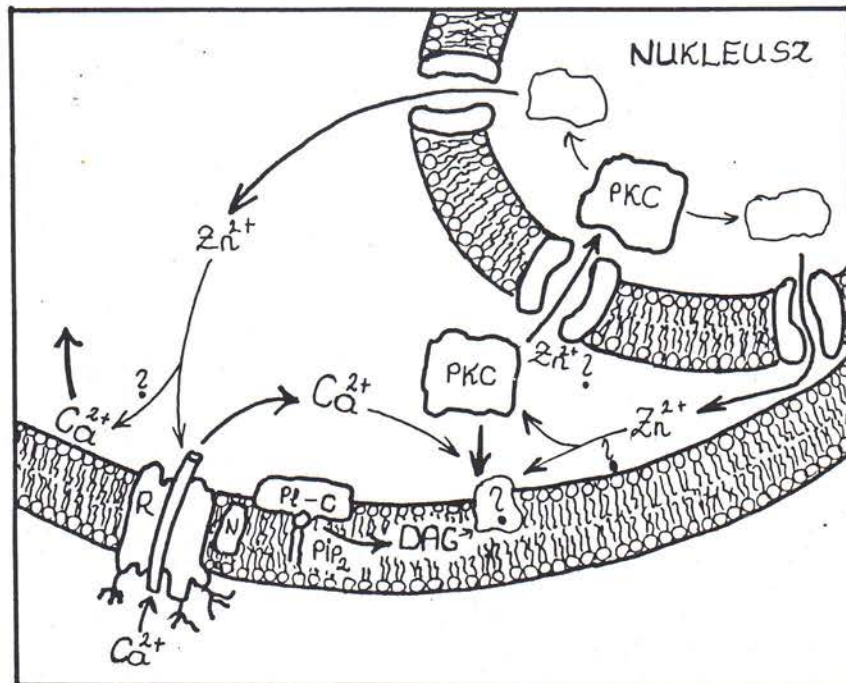
6.2. Elképzeléseim a nehézfémionok részvételéről a T limfociták aktivációjának korai szakaszában

A 38. ábrán azt a --részben bizonyított, részben pedig hipotetikus-- képet igyekeztem felvázolni, amely a nehézfémionoknak a limfociták aktivációja korai szakaszában való részvételéről bennem kialakult.

Analitikai kísérleteink (5.1. fejezet) eredményei azt bizonyítják, hogy a hosszabb idejű forbol észter kezelés hatására a nehézfémek (főként cink) egy része a mag- és a mitokondriális frakcióból a citoszolba és a mikroszómákba rendeződik át. Egy ilyen irányú átrendeződés alapvetően két okból következhet be. Forbol észter kezelés hatására vagy a citoszolban és a mikroszómákban lévő cink-kötő fehérjék affinitása nő meg, vagy a mag- és a mitokondriális frakcióban lévőké csökken. Az a tény, hogy a változatlan affinitású (ld. 32. ábra) A23187 Ca -ionofórt a citoszolban megjelenő cink gátolni képes (5.4.2. fejezet) arra utal, hogy a citoszolban lévő cink-kötő fehérjék általános affinitása semmiképpen sem növekedhet meg a kontroll állapothoz képest. Emiatt a fenti két lehetőségből csak a második valószínűsíthető, azaz: forbol észter kezelés hatására a mag- és a mitokondriális frakcióban lévő cink-kötő fehérjék cinkkel szemben mutatott affinitásának csökkennie kell.

A kérdés az, hogy hogyan? A forbol észterek ugyanis a fehérje kináz C szelektív aktivátoraként ismeretesek (Castagna és mtsai, 1982), az enzim pedig döntően a citoszolban lokalizálható.

Az ellentmondás feloldásának egyik elképzelhető módja az, ha feltételezzük, hogy a forbol észtereknek a sejtmagban is van egy



37. ábra Nehézfém (cink) ionok részvétele a T limfociták aktivációjának korai szakaszában

Az ábrán alkalmazott rövidítések: DAG, diacil-glicerol; N, GTP-kötő fehérje; PIP₂, foszfatidilinozitol-biszfoszfát; PKC, fehérje kináz C; Pl-C, foszfatidilinozitol specifikus foszfolipáz C (foszfodiészteráz); R, T sejt receptor.

receptora, amely nem feltétlenül esik egybe a fehérje kináz C enzimmel. Bár a forbol észter receptor és a fehérje kináz C azonoságát rendkívül sok módon (együttizolálás, kölcsönös kötőhelyezés, diacil-glicerolokkal, enzimaktiválás, stb.) igen sok munkacsoport igazolta, mégis számos közleményben több forbol észter kötőhelyet feltételeznek (Ashendel, 1985). Más közleményekben különbségeket mutattak ki a forbol észter és "endogén megfelelői", a diacil-glicerolok hatásmódjában (Shinohara és mtsai, 1985; Ashby és mtsai, 1985; Muir és mtsai, 1986; Kamber, 1986). Kraft és munkatársai (1986) arról számoltak be, hogy a fehérje kináz C-t aktiváló bryostatin gátolja a HL-60 promieloid leukémia sejtek forbol észter okozta differenciálódását. A kísérletek alapján tehát e pillanatban nem zárható ki, hogy a forbol észtereknek létezik egy (vagy több), a fehérje kináz C aktiválásától független támadáspontja.

A fehérje kináz C-től független forbol észter receptor feltételezése kísérleti eredményeink megmagyarázásához nem feltétlenül indokolt. A nehézfémek (főként a cink) citoszolban való felszaporodását a forbol észterek mellett a fehérje kináz C "endogén aktivátoraival", a diacil-glicerolokkal is ki tudtuk váltani. Másrészt az utóbbi hónapokban egyre-másra jelentek meg olyan közlemények, amelyek a fehérje kináz C-nek a sejtmaghoz való kötődésé-

ról, illetve aktiválódás hatására a sejtmagba való átrendeződéséről számolnak be (Girard és mtsai, 1987; Kraft és mtsai, 1987; Cambier és mtsai, 1987; Misra és Sahyoun, 1987). Így a fehérje kináz C korábban szinte kizárólagosnak tartott citoszol- és plazmamembránbeli lokalizációja, valamint a kísérleti eredményeink magyarázatához illeszkedő sejtmagbéli elhelyezkedése közötti ellentét ezáltal feloldódott.

Így a fehérje kináz C-nek hosszabb forbol észter kezelés hatására a sejtmagba való átrendeződése esetén elképzelhető, hogy a sejtmagban található cink-kötő fehérjéket foszforilálva csökkentse azok cinkkel szembeni affinitását. És valóban: a fehérje kináz C in vivo számos magban található fehérje foszforilálására képes: így a H1, H2B és a H4 hisztonokéra, az 1.-es, 2.-es és 17-es HMG ("high-mobility-group", magas mozgékonyágú) fehérjékére, valamint számos más polipeptidére (pp23, pp33 és pp80) (Ramachandran és mtsai, 1984; Misra és Sahyoun, 1987 és benne szereplő hivatkozások). Sahyoun és mtsai (1985) a topoizomeráz II fehérje kináz C általi in vitro foszforilációját figyelték meg. A fehérje kináz C magbéli szubsztátjai listájának további bővülésével előbb-utóbb bizonyára fény derül a cink eleresztésének pontos mechanizmusára is. A sejtmagnak a tumor promotor forbol észter kezelés hatására létrejött ilyen, "cink-hiányos" állapota nagyon hasonlít a malignus limfociták vizsgálata során kapott eredményekre, amelyek a malignus limfociták sejtmagjainak csökkent cinktartalmára mutattak (Yarom és mtsai, 1976; van Rig és Pories, 1980). Assaf és munkatársai (1984), valamint Howell és munkatársai (1984) kimutatták, hogy stimuláció hatására az idegsejtek cinket eresztenek el. Ebben az esetben is a sejt fehérjei cinkkel szembeni affinitása stimuláció hatására bekövetkező csökkenése játszódhatott le.

Wedner és munkatársai a plazmamembránban lévő szabad SH-csoportok számának a limfociták stimulációja során bekövetkező növekedéséről számoltak be. A növekedés átmeneti, kinetikája nagy hasonlóságot mutat az általunk észlelt "nehézfém-hatás" időbeli lefutásával (ld. 27. ábra). Az SH-csoportok számában bekövetkező növekedés gátlásával a limfociták stimulációja is gátolható (Wedner, 1984). Mivel a felszabaduló SH-csoportok a nehézfémek (különösen a cink) kötőhelyéül szolgálhatnak, a limfociták stimulációjának SH-érzékenysége összefüggésben állhat az általunk észlelt nehézfém hatásokkal. E feltételezés nem áll ellentmondásban azzal a követelménnyel, hogy a citoszol és a plazmamembrán cinkkel szembeni affinitása nem nőhet meg a stimuláció folyamán, hiszen egyrészt a felszabaduló SH-csoportok "alacsony affinitású" Zn^{2+} kötőhelyeket is képezhetnek, másrészt pedig a citoszol és a plazmamembrán szabad SH tartalmának a megnövekedése a cink-homeosztázis helyreállításában is szerepet játszhat. A fentiek analógiájára az is elképzelhető, hogy a magbéli SH-csoportok kereszt-kötése, oxidációja is hozzájárul a mag cinktartalma egy részének eleresztéséhez.

A sejtmagban számos olyan cinktartalmú enzim található, amelyek az RNS és DNS szintézis nélkülözhetetlen elemei. Ilyenek például: az RNS- és a DNS-polimeráz, a timidin kináz, stb. (Slater és mtsai, 1976; Yarom és mtsai, 1976). Így a cink ionok eltávozása a magból számos magi folyamatot meggátolhat. Ezen a módon a TPA közismert antiproliferatív hatása (Gescher, 1985) --amelyet a G1

-> S fázisátmenet gátlásával hoznak összefüggésbe (Dröge, 1986)-- és a cink ionok eltávozása a magból egymással kapcsolatba hozható. A 37. ábráról leolvasható, hogy a távozott cink ionok "helyét" a magban kb. azonos mennyiségű kalcium foglalja el. Ez a Zn--Ca "csere" aktiválhatja a magi Ca-függő endonukleázokat, amelyek cink jelenlétében gátolva vannak (Duke és mtsai, 1983). Ezen endonukleázok is hozzájárulhatnak a TPA antiproliferatív hatásához.

A citoszolban is számos cink tartalmú fehérjét irtak le az utóbbi időben (Günther és mtsai, 1979; Phillips, 1981). Számos receptor-fehérje elsődleges szerkezetének felderítésekor feltételezték egy vagy több cinkkötőhely jelenlétét (kortizol-, ösztadiol-, tiroid hormon receptorok --Weinberger és mtsai, 1986--; fehérje kináz C --Parker és mtsai, 1986--, stb.). Sabbah és munkatársai (1987) bizonyították a cink szerepét az ösztadiol receptor DNS-hez való kötődésében. A citoszolban megjelenő cinkfelesleg hatására mind-ezen fehérjék bizonyos tulajdonságai megváltozhatnak.

Nehézfém (cink) ionok affinitása jónéhány fehérje Ca-kötőhelye iránt a Ca^{2+} -énál nagyobb (Brewer, 1981; Habermann és Richardt, 1987). Így a citoszolban, illetve a mikroszómális frakcióban megjelenő cink ionok a Ca-kötőhelyek elfoglalására és így a jelátviteli folyamatokban fontos szerepet játszó Ca-fluxusok meggátlására képesek. Ilyen módon a TPA kezelés hatására létrejövő cink-átrendeződés szerepet játszhat a sejtközötti kommunikáció TPA-kiváltotta gátlásában (Davidson és mtsai, 1985), a TPA kezelt sejtek növekedésének az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásaira való érzéketlenedésében (Fischer és Weinstein, 1981), valamint a citotoxikus hatások TPA által való gátlásában (Jondal és mtsai, 1986).

A forbol észter ezen gátló hatásainak magyarázataként természetes módon kínálkozhat a forbol észter receptorok down-regulációja és a sejtfelszín különböző fehérjeinek (amelyek lehetnek ioncsatornák, vagy akár a gap junction bizonyos alkotói maguk is) a forbol észter receptorokkal való együttes endocitózisa, internalizációja. Ezen együttes internalizáción alapuló folyamatok számos receptorra (pl. T sejt receptor, EGF receptor, transzferrin receptor, stb.) jellemzőek (Nishizuka, 1986; Dröge, 1986). Ugyanakkor az internalizációs folyamatok kiteljesedését általában időben későbbre, a TPA-inkubáció 6.-24. órájára teszik. A fehérje kináz C okozta közvetlen foszforiláció és down reguláció közötti időszakban a nehézfémionok általunk leírt "felszabadulása" fontos szerephez juthat bizonyos ionális folyamatok gátlásában.

A citoszolban és a mikroszómákban megjelenő cink a fehérje kináz C másodlagos aktivációjához vezethet (5.5. fejezet). Így a fehérje kináz C aktivációjával kiváltott cink-átrendeződés egyfajta pozitív visszacsatolásként a sejtaktiváció egy olyan szakaszában (90 perc elteltével) lehet képes a fehérje kináz C aktivált állapotának fenntartására, amikor a kezdeti aktivációt kiváltó körülmények (az intracelluláris Ca-raktárak kiürülésével erőteljesen megnövekedett Ca^{2+} szint, a plazmamembrán magas diacil-glicerol koncentrációja) már javarészt megszűntek.

Összefoglalás

A fehérje kináz C tartós aktiválódásának hatására létrejövő hipotetikus folyamatsorozat lépései tehát az alábbiak lehetnek:

a fehérje kináz C aktiválódik, egy része a sejtmagba kerül. Ott különböző cink-kötő fehérjéket is foszforilál. A foszforiláció hatására e fehérjéknek cinkkel szemben mutatott affinitása csökken: cinktartalmának egy részét a sejtmag elereszti. A citoszolban és a plazmamembránban megjelenő cink a Ca^{2+} kötőhelyek egy részének elfoglalásával a Ca^{2+} függő jelátviteli rendszer számos elemét kikapcsolja, az aktiváció útjára lépett sejtet a környezeti hatások egy részétől (átmenetileg) függetleníti. A citoszolban és a plazmamembránban megjelenő cink a fehérje kináz C másodlagos aktivációjához vezet. Ezután a folyamat kettéágazhat: vagy sor kerül viszonylag gyorsan az eredeti nehézfém homeosztázis helyreállítására, vagy az RNS és DNS szintézishez szükséges magbéli enzimek cinkhiánya miatt a $G_1 \rightarrow S$ fázisátmenet, és így a sejtosztódás gátlása következik be.

A fenti hipotetikus folyamatsorozat szinte minden elemének bizonyításához további hosszas kísérletezőmunka szükséges. Annyi azonban már most is megállapítható, hogy a fehérje kináz C Ca^{2+} -függő szabályozásában a cink szerepe bizonyítható és fordítva: elképzelhető, hogy a fehérje kináz C függő jelátviteli rendszer nemcsak a kísérleteinkben bizonyított in vitro módon, hanem in vivo is képes a Ca^{2+} -függő rendszer cink segítségével történő szabályozására. Annak az eldöntése, hogy ezen jelátviteli rendszerek mellett beszélhetünk-e a nehézfémelek átrendeződéseiről alapuló jelátviteli rendszerről a jövő feladata (ld. 7. fejezet).

7. A KÍSÉRLETES MUNKA TOVÁBBI IRÁNYAI

A bemutatott kísérleti eredmények továbbfejlesztésére számtalan út kínálkozik. Az alábbiakban az általam legfontosabbnak tartottak felsorolására tesztek kísérletet.

1. Értekezésem egyik fontos eredménye, hogy forbol észterek a nehézfémek sejten belüli átrendeződését okozzák (ld. 5.1. fejezet. Diacil-glicerolok hasonló szerepe valószínűsíthető (ld. 5.3. fejezet), de nehézfémeket átrendező hatásuk közvetlenül még nem kimutatott. Emiatt a röntgenfluoreszcenciás, illetve a plazma emissziós mérések diacil-glicerolokkal való megismétlése indokoltnak látszik.
2. A kísérleti adatok mind arra utalnak, hogy diacil-glicerolok, illetve forbol észterek hatására a citoszol szabad nehézfémion koncentrációja megnő. E feltételezett koncentrációnövekedés kimutatása igen jelentős bizonyítéka lenne a felsorolt összefüggéseknek. Nehézfémionok szabad koncentrációjának meghatározására szolgáló kísérleti módszer mindezidáig nem ismeretes. Mindazonáltal Smith és munkatársai (1983) egy olyan, a Ca^{2+} ionok szabad koncentrációjának meghatározására szolgáló kísérleti módszert fejlesztettek ki, amely elvileg alkalmas a nehézfémionok szabad koncentrációjának meghatározására is. A fluorral szubsztituált komplexképző fluor atomjai különböző kémiai eltolódást mutatnak a ^{19}F -NMR spektrumban a kelátor más-más fémekkel alkotott komplexe esetén. Így az egyes fémionok koncentrációja egyidejűleg meghatározható.
3. A nehézfémionoknak az aktiválódás során történő átrendeződése után valamikor sor kell, hogy kerüljön az eredeti nehézfém-homeosztázis visszaállítására. Ennek a nyomkövetése, a nyugalmi nehézfém koncentrációk, illetve eloszlás visszaállításában szerepet játszó mechanizmusok (pl. esetleg a citoszol és a plazmamembrán SH-csoportjai számának növekedése; ld. 6.2. fejezet) vizsgálata ugyancsak elvégzendő feladat.
4. Az eddigi eredmények alapján célszerűnek látszik a nehézfémionok szerepének vizsgálata olyan rendszereken is, ahol a fehérje kináz C aktivátorai (diacil-glicerolok, forbol észterek) nem Ca-ionofórokkal, hanem más, a Ca^{2+} növekedését eredményező anyagokkal (antigének, mitogének, stb.) állnak antagonizmusban. Amennyiben a nehézfémionok szerepét e rendszerekben is sikerül kimutatni, felmerül a kérdés: vajon a rendszer mely pontján (pontjain) hatnak? A Ca-csatornák, a GTP-kötő fehérjék, a foszfolipáz C enzim, az inozitolfoszfát receptorok és kinázok mind a nehézfémionok egy-egy lehetséges támadáspontját jelentik, tág teret engedve a kísérletező fantáziájának és munkabírásiának.

amelyekben a Ca^{2+} szerepe bizonyított. Ilyen például a citotoxikus T limfociták "sejtölő" mechanizmusa, a sejtek egymás közötti információcseréjében résztvevő gap-junction-ok, stb. Az eddigi eredmények fényében elképzelhető, hogy a nehézfémionok e folyamatokban is szerepet játszanak.

6. Forbol észterek a T limfociták sejtmagjainak cinktartalmát jelentős mértékben csökkentik. Jónéhány sejttípusban forbol észter kezelés a sejtprolifерáció leállításához, a $G_1 \rightarrow S$ fázisátmenet gátlásához vezet. Mivel az S fázis beindításában, a DNS replikációjában igen sok cinktartalmú enzim vesz részt, elképzelhető, hogy e két folyamat ok-okozati összefüggésben is áll egymással.
7. Mindeddig tulajdonképpen a fehérje kináz C enzim aktiválódása által okozott nehézfém-átrendeződés lehetséges következményeiből soroltam fel néhányat. E nehézfém-átrendeződés mechanizmusának vizsgálata is sok érdekes eredménnyel járhat (ld. 6.2. fejezet), nevezetesen: annak a kérdésnek a vizsgálata, hogy a magba áthelyeződött fehérje kináz C mely ottani cinktartalmú fehérjék foszforilálásával csökkenti azok cink iránti affinitását, cink-kötő képességét.
8. A nehézfémeknek (cinknek) a fehérje kináz C-re gyakorolt hatása is számos további kérdést vet fel: miért tűnik a cink nélkülözhetetlennek a fehérje kináz C enzim receptorához való kötődésében: közvetlen kötő, vagy konformációstabilizáló szerepe van; hány cink kötőhelye van az enzimnek: egy vagy kettő; hogyan vesz részt a cink az enzim aktiválásában; igaz-e az a feltételezés (ld. 6.2. fejezet), hogy a membránkötött enzim minden esetben cinket tartalmaz, míg a citoszolbeli enzim tulajdonképpen a "cinkes" és "nem cinkes" forma keverékének tekinthető; játszik-e szerepet a cink az enzimnek a magba való áthelyeződésében, stb., stb.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni

- Dr. **Antoni Ferenc** akadémikusnak, a SOTE I. sz. Kémiai-Bio-kémiai Intézete igazgatójának, hogy munkámat lehetővé tette, mindvégig figyelemmel kísérte, bátorította;
- Dr. **Fodor Péternek** (Kertészeti Egyetem, Kémiai Tanszék) a plazma emissziós spektrofotometriás mérések elvégzéséért;
- Dr. **Gueth Sándornak** (ELTE TTK, Atomfizikai Tanszék) a röntgen-fluoreszcenciás mérések elvégzéséért;
- Dr. **Körös Endre** professzornak (ELTE TTK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) hasznos tanácsaiért és útmutatásaiért;
- **Kövecses Máriának** (SOTE I. sz. Kémiai-Bio-kémiai Intézete) a ^3H -uridin beépülésének méréseiben nyújtott segítségéért;
- **Kristóf Zoltánnak** (ELTE TTK Növény-szervezettani Tanszéke) a fluoreszcens mikroszkóppal végzett kísérletekben nyújtott segítségéért;
- Dr. **James O. Learynek** (Strong Memorial Hospital, Rochester NY USA) az áramlási citometrikus mérésekben nyújtott segítségéért;
- Dr. **Anthony N. Martonosi** professzornak (State University of New York, Health Sciences Center, Syracuse NY USA) azért, hogy tanácsaival, értékes segítségével megalapozta munkámat a területen;
- Munkatársaimnak,
 - == Dr. **Annus Sándornénak**
 - == **Bajkó Évának**
 - == **Iván Lászlónénak**
 - == **Mihály Katalinnak**
 - == Dr. **Müllner Nándornak**
 - == Dr. **Turi Agnesnek**
 - == **Végh Miklósnénak**
 - == Dr. **Vér Agotának**sokoldalú segítségükért;
- Dr. **Klaus Resch** professzornak (Medizinische Hochschule Hannover, Abt. Molekularpharmakologie, Hannover, NSzK) értékes segítségéért, hasznos tanácsaiért;
- Dr. **Rontó Györgyi** professzor asszonynak (SOTE Biofizikai Intézete) a Jobin Yvon fluoriméter használatáért;

- Dr. **Siklós László**nak (MTA SzBK, Biofizikai Intézet) az EDAX mérésekben nyújtott segítségéért;
- Dr. **Szamel Mártán**nak (SOTE I.sz. Kémiai-Biokémiai Intézet -- Medizinische Hochschule Hannover, Abt. Molekularpharmakologie, Hannover, NSzK) hasznos tanácsaiért;
- Dr. **Tóth Sándor**nak (SOTE Gerontológiai Központ) gyümölcsöző együttműködésünkért;
- Dr. **Varga Vincének** (SOTE I.sz. Kémiai-Biokémiai Intézete) azért, hogy tudományos diákkörösként bevezetett a biokémiai kutatómunka alapjaiba.

Köszönetemet szeretném kifejezni **szüleim**nek, hogy nem kis anyagi áldozattal tudományos kutatómunkám végzésére lehetőséget biztosítottak -- biztosítanak és végül, de távolról sem utolsósorban köszönöm Dr. **Somogyi János** professzornak, tudományos vezetőmnek hogy pályafutásomat mindvégig figyelemmel kísérte, nagy hatékonysággal menedzselte és tanácsaival a helyes irányba terelgette.

Budapest, 1987. december.

(dr. Csermely Péter)

Az értekezés témaköréből készült közlemények:

1. Csermely P. és Somogyi J. (1986): Az intracelluláris Ca koncentráció quin2-vel történő meghatározásának stratégiája. **Biokémia** 10, 115-121.
2. Csermely P. és Somogyi J. (1987): Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérése quin2 fluoreszcens indikátorral. **Kórház és Technika** 25, 33-38.
3. Csermely, P. and Somogyi, J. (1987): The possible pitfalls of the measurement of intracellular Ca concentration in T lymphocytes with the fluorescent dye, quin2. **Immunobiology** 174, 380-394.
4. Csermely, P., Gueth, S. and Somogyi, J. (1987): The tumor promoter tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of zinc in subcellular fractions of rabbit thymocytes measured by X-ray fluorescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 144, 863-868.
5. Csermely, P., Fodor, P. and Somogyi, J. (1987): The tumor promoter tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of heavy metals in subcellular fractions of rabbit thymocytes as measured by plasma emission spectroscopy. **Carcinogenesis** 8, 1663-1666.
6. Csermely, P. and Somogyi, J. (1988): Tumor promoter 12-O-tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) can reduce the Ca-transporting ability of Ca-ionophores in T lymphocytes. An involvement of intracellular heavy metal ions. **J. Cell.. Physiol.** Nyomtatás alatt.
7. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. and Somogyi, J. (1988): Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. **J. Biol. Chem.** Nyomtatás alatt.

Az értekezés módszertani részét megalapozó közlemények:

1. Varga, S., Csermely, P. and Martonosi, A. (1985): The binding of vanadium(V)oligoanions to sarcoplasmic reticulum. **Eur. J. Biochem.** 148, 119-126.
2. Csermely, P., Varga, S. and Martonosi, A. (1985): Competition between decavanadate and fluorescein isothiocyanate on the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. **Eur. J. Biochem.** 155, 455-460.
3. Csermely, P., Martonosi, A., Levy, G.C. and Ejlert, A.J. (1985): ^{51}V -NMR analysis of the binding of vanadium(V)oligoanions to sarcoplasmic reticulum. **Biochem. J.** 230, 807-815.

4. Csermely, P. (1986): Oligovanadát anionok és a szarkoplazmás retikulum Ca-ATPázának kölcsönhatásai. **Biokémia** 10, 71-74.
5. Csermely, P., Katopis, Ch., Wallace, B.A. and Martonosi, A. (1987): The E₁ → E₂ transition of Ca-transporting ATPase in sarcoplasmic reticulum occurs without major changes in secondary structure. A circular dichroism study. **Biochem. J.** 241, 663-669.
6. Varga, S., Csermely, P., Müllner, N., Dux, L. and Martonosi, A. (1987): Effect of chemical modification on the crystallization of Ca-ATPase in sarcoplasmic reticulum. **Biochim. Biophys. Acta** 896, 187-195.
7. Martonosi, A., Dux, L., Taylor, K.A., Ting-Beall, H.P., Varga, S., Csermely, P., Müllner, N., Papp, S. and Jóna, I. (1987): The structure of Ca-ATPase in sarcoplasmic reticulum. In: **Proteins and Excitable Membranes** (D.M. Fambourgh, B. Hille editors), Wiley, New York, pp. 257-286.
8. Martonosi, A., Dux, L., Taylor, K.A., Csermely, P., Müllner, N., Pikula, S., Papp, S., Varga, S., Jóna, I. and Keresztes, T. (1987): The Ca²⁺ pump of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Acta Physiol. Hung.** 22, 263-276.
9. Szamel, M., Kövecses, M., Csermely, P., Szollár, L., Goppelt, M., Resch, K. and Somogyi, J. (1988): The decisive role of Na⁺, K⁺-ATPase in stimulation process of T lymphocytes. In: **Proc. of the 5th Int. Conf. of Na⁺, K⁺-ATPase** (J.C. Skou, J. Norby, A.B. Maunsbach, eds.), Alan R. Liss, New York. Nyomtatás alatt.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Abboud, C.N., Scully, S.P., Lichtman, A.H., Brennan, J.K. and Segel, G.B. (1985): The requirements for ionized calcium and magnesium in lymphocyte proliferation. *J. Cell. Physiol.* 122: 64-72.
2. Adrenegg, G. and Wenk, F. (1974): Pyridinderivative als Komplexbildner VIII. Die Herstellung je eines neuen Vier- und Sechszähligen Liganden. *Helv. Chim. Acta* 50: 2330-2333.
3. Adrenegg, G., Hubmann, E., Podder, N.G. and Wenk, F. (1977): Pyridinderivative als Komplexbildner XI. Die Thermodynamik der Metallkomplexbildnung mit bis-, tris- und tetrakis((2-Pyridyl)methyl)aminen. *Helv. Chim. Acta* 60: 123-140.
4. Alford, R.H. (1970): Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 104: 698-703.
5. Anderson, W.L. and Tomasi, T.B. (1984): Suppression of lymphocyte proliferation by copper-albumin chelates. *J. Biol. Chem.* 259: 7602-7606.
6. Anderson, W.B., Estival, A., Tapiovaara, H. and Gopalakrishna, R. (1985): Altered subcellular distribution of protein kinase C (a phorbol ester receptor) possible role in tumor promotion and the regulation of cell growth: relationship to changes in adenylate cyclase activity. *Adv. Cycl. Nucl. and Protein Phosph. Res.* 19: 287-306.
7. Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987): Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognised by a TPA-modulated trans-acting factor *Cell* 49: 729-739.
8. Arslan, P.F., DiVirgilio, F., Beltrame, M., Tsien, R.Y. and Pozzan, T. (1985): Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. *J. Biol. Chem.* 260: 2719-2727.
9. Ashby, B., Kowalska, M.A., Wernick, E., Rigmaiden, M., Daniel, J. L. and Smith, B. (1985): Differences in the mode of action of 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol and phorbol ester in platelet activation. *J. Cycl. Nucl. and Protein Phosph. Res.* 10: 473-483.
10. Ashendel, C.L. (1985): The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 822: 219-242.
11. Ashley, Ch.C. and Campbell, A.K. (1979): Detection and measurement of free Ca in living cells. Elsevier.

12. Assaf, S.Y. and Cheung, S-H. (1984): Release of endogenous Zn^{2+} from brain tissue during activity. **Nature** 308: 734-736.
13. Aussel, C., Mary, D. and Fehlmann, M. (1987): Prostaglandin synthesis in human T cells: its partial inhibition by lectins and anti-CD3 antibodies as a possible step in T cell activation. **J. Immunol.** 138: 3094-3099.
14. Averdunk, R. and Günther, Th. (1980): Effect of Concanavalin A on Ca^{2+} binding, Ca^{2+} uptake and the Ca^{2+} -ATPase of lymphocyte plasma membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 97: 1146-1153.
15. Balazovich, K.J., Smolen, J.E. and Boxer, L.A. (1986): Endogenous inhibitor of protein kinase C: association with human peripheral blood neutrophils but not with specific granule-deficient neutrophils or cytoplasts. **J. Immunol.** 137: 1665-1673.
16. Bartfai, T. (1979): Preparation of metal chelate complexes and the design of steady-state kinetic experiments involving metal nucleotide complexes. **Adv. Cycl. Nucl. Res.** 10: 219-242.
17. Bauer, S. and Jakobs, K.H. (1986): Phorbol ester treatment impairs hormone-but not stable GTP analog-induced inhibition of adenylate cyclase. **FEBS Letters** 198: 43-46.
18. Bazzi, M.D. and Nelstuen, G.L. (1987/a): Role of substrate in imparting calcium and phospholipid requirements to protein kinase C activation. **Biochemistry** 26: 1974-1982.
19. Bazzi, M.D. and Nelstuen, G.L. (1987/b): Role of substrate in determining the phospholipid specificity of protein kinase C activation. **Biochemistry** 26: 5002-5008.
20. Behl, B., Goppelt-Strübe, M., Schwintzer, B., Wiebe, K. and Resch, K. (1987): Phospholipid-metabolism of a stimulated murine T cell clone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 144: 1303-1312.
21. Berg, J.M. (1986/a): Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. **Science** 232: 485-486.
22. Berg, J.M. (1986/b): Nucleic acid-binding proteins: more metal binding fingers. **Nature** 319: 264-265.
23. Berridge, M.J. (1984): Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. **Biochem. J.** 220: 345-360.
24. Besterman, J.M., Pollen, R.S., Bocker, E.L. Jr. and Cuatrecasas, P. (1986): Diacyl-glycerol-induced translocation of diacylglycerol kinase: use of affinity-purified enzyme in a reconstitution system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 9378-9382.

25. Bjerrum, J., Schwarzenbach, G. and Sillén, L.G. (1957): **Stability Constants of Metal Ion Complexes**, Part I., The Chemical Society, London.
26. Blinks, J.R., Mattingly, P.H., Jewell, E.R., Van Leuven, M., Hassler, G.C. and Allen, D.G. (1978): Practical aspects of the use of aequorin as a calcium indicator: assay, preparation, microinjection and interpretation of signals. **Meth. in Enzymology** 57: 292-328.
27. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
28. Breitmeyer, J.B. (1987): How T cells communicate. **Nature** 329: 760-761.
29. Brewer, J. (1981): Molecular mechanisms of zinc action on cells. **Agents and Actions** 8 (suppl.): 37-49.
30. Bruschi, G., Bruschi, M.E., Caroppo, M., Orlandini, G., Pavarani, C. and Cavatorta, A. (1984): Intracellular free Ca in circulating lymphocytes of spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.** 35: 535-542.
31. Bryan, Ch.F. and Leech, S.H. (1983): The immunoregulatory nature of iron I. Lymphocyte proliferation. **Cell. Immunol.** 75: 71-79.
32. Buday, L., Seprödi, J., Farkas, Gy., Mészáros, Gy., Romhányi, T., Bánhegyi, T., Mandl, J., Antoni, F. and Faragó, A. (1987): Proteolytic activation of protein kinase C in the extracts of cells treated for a short time with phorbol ester. **FEBS lett.** 223: 15-19.
33. Cambier, J.C., Newell, M.K., Justement, L.B., McGuire, J.C., Leach, K.L., Chen, Z.Z. (1987): Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes, **Nature** 327: 629-632.
34. Campbell, A. (1983): **Intracellular Calcium**. J. Wiley and Sons, New York.
35. Carpentieri, U., Myers, J., Thorpe, L., Daeschner, C.W. III. and Haggard, M.E. (1986): Copper, zinc and iron in normal and leukemic lymphocytes from children. **Cancer Res.** 46: 981-984.
36. Carpenter, D., Jackson, T. and Hanley, M.R. (1987): Protein kinase Cs, coping with a growing family. **Nature** 325: 107-108.
37. Carter, H., Bird, J.M. and Smith, A.D. (1986): Two species of phospholipase C isolated from lymphocytes produce specific ratios of inositol phosphate products. **FEBS Letters** 204: 23-27.

38. Carter, H.R. and Smith, A.D. (1987): Resolution of phosphoinositide-specific phospholipase C isolated from porcine lymphocytes into multiple species. Partial purification of two isoenzymes. *Biochem. J.* 244: 639-645.
39. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982): Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851.
40. Caswell, A.H. and Hutchinson, J.D. (1971): Visualisation of membrane bound cations by a fluorescent technique. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 42: 43-49.
41. Chabbott, H. and Cabot, M.C. (1986): Phorbol diesters inhibit enzymatic hydrolysis of diacylglycerols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3126-3130.
42. Chen, R.F. and Bowman, R.L. (1965): Fluorescence polarisation: measurement with ultraviolet-polarizing filters in a spectrofluorimeter. *Science* 147: 729-732.
43. Chilson, O.P., Boylston, A.W. and Crumpton, M.J. (1984): Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *EMBO J.* 3, 3239-3245.
44. Chueh, S.-H., Mullaney, J.M., Ghosh, T.K., Zachary, A.L. and Gill, D.L. (1987): GTP- and inositol-1,4,5-trisphosphate-activated intracellular calcium movements in neuronal and smooth muscle cell lines. *J. Biol. Chem.* 262: 13857-13864.
45. Cobbold, P.H. and Rink, T.J. (1987): Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.* 248: 313-318.
46. Cochet, C., Souvignet, C., Keramidas, M. and Chambaz, E.M. (1986): Altered catalytic properties of protein kinase C in phorbol ester treated cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 1031-1037.
47. Cockcroft, S. (1987): Phosphoinositide phosphodiesterase: regulation by a novel guanine nucleotide binding protein, Gp. *Trends in Biochemistry* 12: 75-78.
48. Coffey, R.G., Hadden, E.M. and Hadden, J.W. (1981): Phytohemagglutinin stimulation of guanylate cyclase in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 256: 4418-4424.
49. Cohen, P. (1985): The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* 151: 439-448.
50. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R. and Gallo, R.C. (1979): Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. Exp. Med.* 149: 969-974.

51. Cox, A.Ch. and Carroll, R.C. (1986): The effect of tetradecanoyl phorbol acetate on calcium-ion mobilization, protein phosphorylation and cytoskeletal assembly induced by thrombin or arachidonate. **Biochim. Biophys. Acta** 886: 390-398.
52. Csermely, P. and Somogyi, J. (1987/a): Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérése quin2 fluoreszcens indikátorral. **Kórház és Orvostechnika** 25: 33-38.
53. Csermely, P. and Somogyi, J. (1987/b): The possible pitfalls of the measurement of intracellular calcium concentration of T lymphocytes with the fluorescent indicator quin2. **Immunobiology** 174: 380-394.
54. Csermely, P. and Somogyi, J. (1988): Tumor promoter 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) can reduce the Ca-transporting ability of Ca-ionophores in T lymphocytes. **J. Cell. Physiol.** In press.
55. Csermely, P., Gueth, S. and Somogyi, J. (1987/a): The tumor promoter tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of zinc in subcellular fractions of rabbit thymocytes measured by X-ray fluorescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 144: 863-868.
56. Csermely, P., Fodor, P. and Somogyi, J. (1987/b): The tumor promoter tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of heavy metals in subcellular fractions of rabbit thymocytes as measured by plasma emission spectroscopy. **Carcinogenesis** 8: 1663-1666.
57. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. and Somogyi, J. (1988) Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. **J. Biol. Chem.** In press.
58. Curtiss, L.K. and Edgington, T.S. (1978): Identification of a lymphocyte surface receptor for low density lipoprotein inhibitor, an immunoregulatory species of normal human serum low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.** 61: 1298-1308.
59. Davidson, J.S., Baumgarten, I.M. and Harley, E.H. (1985) Studies on the mechanism of phorbol ester induced inhibition of intercellular junctional communication. **Carcinogenesis** 6: 1353-1358.
60. Deelers, M., Defrise-Quertain, F., Ruysschaert, J.M. and Malaisse, W.J. (1981): Interaction of phorbol esters with lipid bilayers: thermotropic changes in fluorescence polarisation, phase transition and calcium ionophoresis. **Res. Comm. in Chem. Pathol. and Pharmacol.** 34: 423-439.
61. Dennes, E., Tupper, R. and Wormale, A. (1961): The zinc content of erythrocytes and leucocytes of blood from normal and leukemic subjects. **Biochem. J.** 78: 578-587.

62. Diakun, G.P., Fairall, L. and Klug, A. (1986): EXAFS study of the zinc-binding sites in the protein transcription factor IIIA. *Nature* 324: 698-699.
63. Di Polo, R., Requena, J., Brinley, F.J., Mullins, L.S., Scarpa, A. and Tiffert, T. (1975): Ionized calcium concentrations in squid axons. *J. Gen. Physiol.* 67: 433-438.
64. Di Virgilio, F., Pozzan, T., Wollheim, C.B., Vincentini, L.M. and Meldolesi, J. (1986): Tumor promoter phorbol myristate acetate inhibits Ca^{2+} influx through voltage gated Ca^{2+} channels in two secretory cell lines PC12 and RINm5F. *J. Biol. Chem.* 261: 32-35.
65. Dower, S.K. and Urdal, D.L. (1987): The interleukin-1 receptor. *Immunol. Today* 8: 46-51.
66. Dröge, W. (1986): Protein kinase C in T-cell regulation. *Immunol. Today* 7: 340-343.
67. Duke, R.C., Chervenak, R. and Cohen, J.J. (1983): Endogeneous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6361-6365.
68. Epstein, P.M. and Hachisu, R. (1984): Cyclic nucleotide phosphodiesterase in normal and leukemic human lymphocytes and lymphoblasts. *Adv. Cycl. Nucl. and Protein Phosph. Res.* 16: 303-324.
69. Erne, P., Schachter, M., Fabbro, D., Miles, C.M.M. and Sever, P.S. (1987): Calcium transients in human platelets monitored by aequorin, fura-2 and quin2: effects of protein kinase C activation and inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 66-72.
70. Eurenius, K., Dalton, T.V. and Lokey, H.J. (1969): The mechanism of glucocorticoid action on the phytohemagglutinin stimulated lymphocyte I. In vitro binding of corticosteroids to lymphoid tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 177: 572-578.
71. Exton, J.H. (1986): Mechanisms involved in calcium-mobilizing agonist responses. *Adv. Cycl. Nucl. and Protein Phosph. Res.* 20: 211-262.
72. Fanger, B.D. (1987): Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Anal. Biochem.* 162, 11-17.
73. Farrar, W.L. and Ruscetti, F.W. (1986): Association of protein kinase C with IL-2 receptor expression. *J. Immunology* 136: 1266-1273.
74. Feinstein, M.B. and Sha'afi, R.J. (1983): Role of calcium in arachidonic acid metabolism and in the actions of arachidonic acid-derived metabolites. In: *Calcium and Cell Function* (Ed: W.Y. Cheung) Academic Press NY vol.4.pp.: 337-376.

75. Ferber, E., Resch, K., Wallach, D.F.H. and Imm, W. (1972): Isolation and characterisation of lymphocyte plasma membranes. **Biochim. Biophys. Acta** 266: 494-504.
76. Fischer, P.B., Flamm, M., Schuchter, D. and Weinstein, I.B. (1974): Tumor promoters induce membrane changes detected by fluorescence polarisation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 86: 1063-1068.
77. Fischer, P.B. and Weinstein, I.B. (1981): Enhancement of cell proliferation in low calcium medium by tumor promoters. **Carcinogenesis** 2: 89-95.
78. Fischer, S., Fagard, R., Gacon, G., Genetet, N. Piau, J.P. and Blaineau, C. (1984): Stimulation of tyrosine phosphorylation in lectin treated human lymphocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 124: 682-689.
79. Fitzer, C.J., O'Brian, C.A., Guillem, J.G. and Weinstein, J.B. (1987): The regulation of protein kinase C by chenodeoxycholate, deoxycholate and several structurally related bile acids. **Carcinogenesis** 8: 217-220.
80. Fleischer, B. (1987): A novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen. **J. Immunol.** 138: 1346-1350.
81. Flynn, A. (1985): In vitro levels of copper, magnesium and zinc required for mitogen stimulated T lymphocyte proliferation. **Nutr. Res.** 5: 487-495.
82. Fraker, P.J., Gershwin, M.E. Good, R.A. and Prasad, A. (1986): Interrelationships between zinc and immune function. **Fed. Proc.** 45: 1474-1479.
83. Fredericks, R.E., Tanaka, K.R., Valentine, W.N. and Mattson, M. (1960): Zinc in human blood cells: normal values and abnormalities associated with liver disease. **J. Clin. Invest** 39: 1651-1656.
84. Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Mills, G.B. and Grinstein, S. (1985): Mitogens trigger a calcium-independent signal for proliferation in phorbol-ester-treated lymphocytes. **Nature** 315: 419-420.
85. Gelfand, E.W., Cheung, R.K. and Grinstein, S. (1986): Mitogen-induced changes in Ca^{2+} permeability are not mediated by voltage-gated K^{+} channels. **J. Biol. Chem.** 261: 11520-11523.
86. Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Mills, G.B. and Grinstein, S. (1987): Role of membrane potential in the response of human T lymphocytes to phytohemagglutinin. **J. Immunol.** 138: 527-531.
87. Gescher, A. (1985): Antiproliferative properties of phorbol ester tumour promoters. **Biochem. Pharmacol.** 34, 2587-2592.

88. Gerzer, R., Böhme, E., Hofmann, F. and Schultz, G. (1981): Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. **FEBS Letters** 132: 71-74.
89. Girard, P., Stevens, V.L., Blackshear, P.J., Merrill, Jr. A.H., Wood, J.G. and Kuo, J.F. (1987): Immunocytochemical evidence for phorbol ester-induced directional translocations of protein kinase C in HL60, K562, CHO and E7SKS cells: possible role in differentiation. **Cancer Res.** 47: 2892-2898.
90. Glynn, I.M., and Chappell, J.B. (1964): A simple method for the preparation of ^{32}P -labelled adenosine triphosphate of high specific activity. **Biochem. J.** 90: 147-149.
91. Goligorsky, M.S., Hruska, K.A., Loftus, D.J. and Elson, E.L. (1986): Alpha $_{1}$ -adrenergic stimulation and cytoplasmic free calcium concentration in cultured renal proximal tubular cells: evidence for compartmentalization of quin2 and fura-2. **J. Cell. Physiol.** 128: 466-474.
92. Gopalakrishna, R., Barsky, S.H., Thomas, T.P. and Anderson, W.B. (1986): Factors influencing chelator-stable, detergent extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. Differences between Ca^{2+} -induced and phorbol ester stabilized membrane bindings of protein kinase C. **J. Biol. Chem.** 261, 16438-16445.
93. Goppelt-Strübe, M., Kyas, U. and Resch, K. (1986): Phospholipase-A $_2$ activity in T lymphocytes. **FEBS Letters** 202: 45-48.
94. Goppelt-Strübe, M. and Resch, K. (1987): Pitfalls in measuring fluorescence polarization in mitogen-stimulated T lymphocytes. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler** 368: 409-412.
95. Gray, J.D. and Golub, S.H. (1984): Conservation of lymphoid cells. **Meth. Enzymology** 108: 363-367.
96. Greene, W.C. and Leonard, W.J. (1986): The human interleukin-2 receptor. **Ann. Rev. Immunol.** 4: 69-95.
97. Grinstein, S., Smith, J.D., Rowcett, Ch. and Dixon, S.J. (1987): Mechanism of activation of lymphocyte $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchange by Concanavalin A. **J. Biol. Chem.** 262: 15277-15284.
98. Grubbs, R.D. and Maguire, M.E. (1986): Regulation of magnesium but not calcium transport by phorbol ester. **J. Biol. Chem.** 261: 12550-12554.
99. Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. **J. Biol. Chem.** 260: 3440-3450.
100. Guy, G.R., Gordon, J., Walker, L., Michell, R.H. and Brown, J. (1986): Redistribution of protein kinase C during mitogenesis of human B lymphocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 139: 146-153.

101. Günther, T., Averdunk, R. and Rühl, H. (1979): Zinc metabolism in normal, lectin-stimulated and leukemic lymphocytes. **J. Immunol.** 104: 698-703.
102. Habermann, E. and Richardt, . (1987): Intracellular calcium binding proteins as targets for heavy metals. **Trends Pharmacol. Sci.** 7: 298-300.
103. Hadden, J.W., Hadden, E.M., Wilson, E.E., Good, R.A. and Coffey, R.G. (1972): Direct action of insulin on plasma membrane ATPase activity in human lymphocytes. **Nature New Biology** 235: 174-177.
104. Hannun, Y.A. and Bell, R.M. (1986): Phorbol ester binding and activation of protein kinase C on Triton X-100 mixed micelles containing phosphatidylserine. **J. Biol. Chem.** 261: 9341-9347.
105. Hannun, Y.A., Coomis, C.R., Merrill, A.H. Jr. and Bell, R.M. (1986): Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. **J. Biol. Chem.** 261: 12604-12609.
106. Helderman, J.H. (1984): Acute regulation of human lymphocyte insulin receptors. **J. Clin. Invest.** 74: 1428-1435.
107. Hesketh, T.R., Smith, G.A., Moore, J.P., Taylor, M.V. and Metcalfe, J.C. (1983): Free cytoplasmic calcium concentration and the mitogenic stimulation of lymphocytes. **J. Biol. Chem.** 258: 4876-4882.
108. Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. and Sasaki, Y. (1984): Isoquinoline sulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. **Biochemistry** 23, 5036-5041.
109. Highsmith, S., Bloebaum, P. and Snowdrome, K. (1986): Sarcoplasmic reticulum interacts with the Ca^{2+} indicator precursor fura-2-AM. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 138: 1153-1162.
110. Hinks, L.J., Colmsel, M. and Delves, H.T. (1982): Determination of zinc and copper concentrations in leukocytes. **Analyst** 107: 815-823.
111. Hirasawa, K. and Nemoto, A. (1986): Active form of Ca^{2+} -dependent phosphatidylinositol phospholipase C from rat thymocytes at physiological Ca^{2+} concentrations. **Biochem. Soc. Transact.** 14: 1242-1243.
112. Hirata, F and Axelrod, J. (1980): Phospholipid methylation and signal transduction. **Science** 209: 1082-1090.
113. Hjelmeland, L.M. (1980): A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77: 6368-6370.

114. Houslay, M.D. (1985): The insulin receptor and signal generation at the plasma membrane. In: **Molecular mechanisms of transmembrane signalling** (Eds.: Cohen and Houslay) Elsevier pp.: 279-334.
115. Howell, G.A., Welch, M.G. and Frederickson, Ch.J. (1984): Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices **Nature** 308: 736-738.
116. Huang, K.-P., Jesse Chan, K.-F., Singh, T.J., Nakabayashi, H. and Huang, F.L. (1986): Autophosphorylation of rat brain Ca^{2+} - and phospholipid-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.** 261: 12134-12140.
117. Hucho, F., Krüger, H., Pribilla, J. and Oberdieck, K. (1987): A 40 kDa inhibitor of protein kinase C purified from bovine brain. **FEBS Letters** 211: 207-210.
118. Hyono, A., Kuriyama, S. and Masui, M. (1985): Fluorescence energy transfer between ionophore, A23187 and membrane proteins isolated from outer and cytoplasmic membranes of Gram-negative bacterium. **Biochim. Biophys. Acta** 813: 111-116.
119. Imboden, J.B., Weiss, A. and Stobo, J.D. (1985): Transmembrane signalling by the T3-antigen receptor complex. **Immunol. Today** 6: 328-331.
120. Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. and Nishizuka, Y. (1977): Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. **J. Biol. Chem.** 252: 7610-7616.
121. Isakov, N., Scholz, W. and Altman, A. (1986): Signal transduction and intracellular events in T lymphocyte activation. **Immunol. Today** 7: 271-277.
122. Ishigame, K. and Nishi, Y. (1985): Superoxide dismutase activity and zinc, copper and manganese concentrations in leukocytes. **Clin. Chem.** 31: 1094-1095.
123. Ishitoya, Y., Yamakawa, A. and Takenawa, T. (1987): Translocation of diacylglycerol kinase in response to chemotactic peptide and phorbol ester in neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 144: 1025-1030.
124. Jaken, S. and Kiley, S.C. (1987): Purification and characterisation of three types of protein kinase C from rabbit brain cytosol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 4418-4422.
125. Johnson, P.C., Ware, J.A., Cliveden, P.B., Smith, M., Dvorak, A.M. and Salzman, E.W. (1985): Measurement of ionized calcium in blood platelets with the photoprotein aequorin. Comparison with quin2. **J. Biol. Chem.** 260: 2069-2076.

126. Jondal, M. J. N. G., Patarroyo, M. and Broliden, P.-A. (1986): Phorbol ester regulation of Ca^{2+} flux during natural, lectin- and antibody-dependent killing. *Immunology* 59: 347-352.
127. Jones, D. P., Thor, H., Andersson, B. and Orrenius, S. (1978): Detoxification reactions in isolated hepatocytes. Role of glutathione peroxidase, catalase and formaldehyde dehydrogenase in reactions relating to N-demethylation by the cytochrome P-450 system. *J. Biol. Chem.* 253: 6031-6037.
128. Kaever, V., Szamel, M., Goppelt, M. and Resch, K. (1984): Characterization and subcellular localisation of nucleotide cyclases in calf thymus lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 776: 133-143.
129. Kamber, M. (1986): Phorbol myristate acetate-induced proliferation of an IL-2-dependent T-cell line: action of PMA is independent of IL-2 and cannot be mimicked by diacylglycerols. *Cell. Immunol.* 102: 177-186.
130. Kamisaka, Y., Toyoshima, S. and Osawa, T. (1986): Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of murine lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 569-578.
131. Kanter, R. J., Rai, K. R., Muniz, F. Michael, B., Balkon, J. and Sawitsky, A. (1982): Intracellular zinc in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 24: 26-32.
132. Kennes, B., Hubert, C., Brohee, D. and Neve, P. (1981): Early biochemical events associated with lymphocyte activation in ageing I. Evidence that Ca^{2+} dependent processes induced by PHA are impaired. *Immunology* 42: 119-126.
133. Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. and Nishizuka, Y. (1983): Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.* 258: 1156-1164.
134. Kleiman, N. J., Friedman, D. L. and DiSabato, G. (1984): Preparation of single-cell suspensions from lymphoid organs. *Meth. Enzymology* 108: 43-49.
135. Klip, A., Rothstein, A. and Mock, E. (1984): Stimulation of hexose uptake in rat thymic lymphocytes by phorbol ester. A role for Ca^{2+} and Na^+/H^+ exchange? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 14-22.
136. Kohno, H., Taketani, S. and Tokunaga, R. (1986): Phorbol ester-induced regulation of transferrin receptors in human leukaemia K562 cells. *Cell. Struct. Funct.* 11: 181-190.
137. Kolesnick, R. N. (1987): 1,2-diacyl-glycerols but not phorbol esters stimulate sphingomyelin hydrolysis in GH₃ pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 262, 16759-16762.
138. Kovacs, W. J. and Olsen, N. J. (1987): Androgen receptors in human lymphocytes. *J. Immunol.* 139: 490-493.

139. Kraft, A.S., Smith, J.B. and Berkow, R.L. (1986): Bryostatin, an activator of the calcium phospholipid-dependent protein kinase, blocks phorbol ester-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells HL-60. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1334-1338.
140. Kraft, A.S., Appling, C. and Berkow, R.L. (1987) Specific binding of phorbol esters to nuclei of human promyelocytic leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 393-401.
141. Kreuter, D., Kim, I.Y.H., Goldenring, J.R., Rasmussen, H., Ukomadu, C. DeLorenzo, R.J. and Yu, R.K. (1987): Regulation of protein kinase C activity by gangliosides. *J. Biol. Chem.* 262: 1633-1637.
142. Ku, J., Kishimoto, A., Takai, Y., Ogawa, Y., Kimura, S. and Nishizuka, Y. (1981): A new possible regulatory system for protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes II. Possible relation to phosphatidylinositol turnover induced by mitogens. *J. Immunol.* 127: 1375-1379.
143. Kurrle, R., Seifert, W., Trautwein, A. and Seiler, F.R. (1985): Cellular mechanisms of T cell activation by modulation of the T3 antigen complex. *Transplantation Proc.* 17, 880-885.
144. Lagast, H., Pozzan, T. Waldvogel, F.A. and Lew, H.D. (1984): Phorbol myristate acetate stimulates ATP dependent calcium transport by the plasma membrane of neutrophils. *J. Clin. Invest.* 73, 878-883.
145. Larrick, J.W. and Cresswell, P. (1979): Transferrin receptors on human B and T lymphoblastoid cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 583: 483-490.
146. Leach, K.L., James, M.L. and Blumberg, P.M. (1983): Characterisation of a specific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4208-4212.
147. Ledbetter, J.A., Parsons, M., Martin, P.J., Hansen, J.A., Rabinovitch, P.S. and June, C.H. (1986): Antibody binding to CD5 (Tp67) and Tp44 T cell surface molecules: effects on cyclic nucleotides, cytoplasmic free calcium, and cAMP mediated suppression. *J. Immunol.* 137: 3299-3305.
148. Lederman, H.M., Cohen, A., Lee, J.W.W., Freedman, M.H. and Gelfand, E.W. (1984): Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. *Blood* 64: 748-753.
149. Levitan, I.B. (1985): Phosphorylation of ion channels. *J. Membr. Biol.* 87: 177-190.
150. Loken, and Herzenberg, (1975): Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter. *Ann. NY. Acad. Sci.* 254: 163-171.

151. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
152. Macara, I.G. (1985): Oncogenes, ions and phospholipids. *Am. J. Physiol.* 248: C3-C11.
153. Makinodan, T. and Kay, M.M.B. (1980): Age influence on the immune system. *Adv. Immunol.* 29: 287-291.
154. Marban, E., Rink, T.J., Tsien, R.W. and Tsien, R.Y. (1980): Free calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with Ca-sensitive microelectrodes. *Nature* 286: 845-850.
155. Mascardo, R.N., Benton, R.W. and Sheterline, P. (1984): Somatostatin has an antiproliferative effect on Concanavalin A-activated rat thymocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 33: 131-138.
156. Meggio, F., Brunati, A.M. and Pinna, L.A. (1987): Polycation-dependent, Ca^{2+} -antagonized phosphorylation of calmodulin by casein kinase-2 and a spleen tyrosine protein kinase. *FEBS Letters* 215: 241-246.
157. Mentlein, R. (1986): The tumor promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate and regulatory diacylglycerols are substrates for the same carboxylesterase. *J. Biol. Chem.* 261: 7816-7818.
158. Milanese, C., Richardson, N.E., Reinherz, E.L. (1986): Identification of a T helper cell-derived lymphokine that activates resting T lymphocytes. *Science* 231: 1118-1122.
159. Misra, K.K. and Sahyoun, N. (1987): Protein kinase C binding to isolated nuclei and its activation by a Ca^{2+} /phospholipid independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 760-768.
160. Mitsuse, S. and Oishi, M. (1985): Induction of a novel nuclear protein (p54) by phorbol esters in mouse erythroleukemia (Friend) cells. *Cancer Res.* 45: 3836-3842.
162. Mochly-Rosen, D. and Koshland, D.E.Jr. (1987): Domain structure and phosphorylation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262: 2291-2297.
163. Moruzzi, M., Barbiroli, B., Monti, M.G., tadolini, B., Hakim, G. and Mezzetti, G. (1987): Inhibitory action of polyamine on protein kinase C association to membranes. *Biochem. J.* 247: 175-180.
164. Muir, J.G. and Murray, A.E. (1987): Bombesin and phorbol ester stimulate phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase C: evidence for a role of protein kinase C. *J. Cell. Physiol.* 130: 382-391.

165. Murakami, K., Whiteley, M.K. and Routtenberg, A. (1986): Regulation of protein kinase C activity by cooperative interactions of Zn^{2+} and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 262: 13902-13906.
166. Murray, A.W., Fournier, A., Hardy, S.J. (1987): Proteolytic activation of protein kinase C: a physiological reaction? *Trends in Pharmacol. Sci.* 12: 53-54.
167. Mustelin, Th. (1987): GTP dependence of the transduction of mitogenic signals through the T3 complex in T lymphocytes indicates the involvement of a G-protein. *FEBS Letters* 213, 199-203.
168. Nel, A.E., Bouic, P., Lattanze, G.R., Stevenson, H.C., Miller, P., Dirienzo, W., Stefanini, G.F. and Galbraith, R.M. (1987): Reaction of T lymphocytes with anti-T3 induces translocation of C-kinase activity to the membrane and specific substrate phosphorylation. *J. Immunol.* 138: 3519-3524.
169. Nidel, J.E., Kuhn, L.J. and Vandenbark, G.R. (1983): Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 36-40.
170. Nishikawa, T., Goto, M. and Shimizu, S. (1985): Inhibitory action of phosphatidylinositol on synaptosomal $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 893-900.
171. Nishizuka, Y. (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698.
172. Nishizuka, Y. (1986): Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312.
173. O'Brien, R.M., Houslay, M.D., Milligan, G. and Siddle, K. (1987): The insulin receptor tyrosyl kinase phosphorylates holomeric forms of the guanine nucleotide regulatory proteins G_i and G_s *FEBS Letters* 212: 281-288.
174. O'Flynn, K., Lynch, D.C. and Tatham, P.E.R. (1984): The effect of mitogenic lectins and monoclonal antibodies on intracellular free calcium concentration in human T lymphocytes. *Biochem. J.* 219: 661-666.
175. Ogawa, Y., Takai, Y., Kawahara, Y., Kimura, S. and Nishizuka, Y. (1981): A new possible regulatory system for protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes I. Characterisation of a calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J. Immunol.* 127: 1369-1374.
176. Orellana, S.A., Solski, P.A. and Brown, J.H. (1985): Phorbol ester inhibits phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilisation in cultured astrocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 260: 5236-5239.

177. Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, . (1986): The complete primary structure of protein kinase C -- the major phorbol ester receptor. *Science* 233: 853-859.
178. Parker, P.J., Goris, J. and Merlevede, W. (1987): Specificity of protein phosphatases in the dephosphorylation of protein kinase C. *Biochem J.* 240: 63-67.
179. Farnes, J.R. (1987): T-cell differentiation antigens: proteins, genes and function. *BioEssays* 4: 255-259.
180. Partignani, P., Valitutti, S., Aiello, F., and Musiani, P. (1987): Platelet activating factor receptor antagonists inhibit mitogen induced human peripheral blood T cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 802-810.
181. Payan, D.G., Brewster, D.R. and Goetzl, E.J. (1983): Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J. Immunol.* 131: 1613-1615.
182. Peterson, C., Ratan, R.R., Shelanski, M.L. and Goldman, J.E. (1986): Cytosolic free calcium and cell spreading decrease in fibroblasts from aged and Alzheimer donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7999-8001.
183. Pfeiffer, D.R. and Lardy, H.A. (1976): Ionophore A23187. The effect of H^+ concentration on complex formation with divalent and monovalent cations and the demonstration of K^+ transport in mitochondria mediated by A23187. *Biochemistry* 15: 935-943.
184. Pfeiffer, D.R., Reed, P.W. and Lardy, H.A. (1974): Ultraviolet and fluorescent spectral properties of the divalent cation ionophore A23187 and its metal ion complexes. *Biochemistry* 13: 4007-4014.
185. Phillips, J.L. (1981): Molecular distribution of cytoplasmic zinc in phytohemagglutinin-stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* 3, 225-235.
186. Piga, A., Taheri, M.R., Yaxley, J.C., Wickremasinghe, R.G. and Hoffbrand, A.V. (1984): Higher tyrosine protein kinase activity in resting lymphocytes than in proliferating normal or leukaemic blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 766-773.
187. Pogo, B.G.T., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E. (1966): RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55: 805-812.
188. Pollock, W.K. and Rink, T.J. (1986): Thrombin and ionomycin can raise platelet cytosolic Ca^{2+} to micromolar levels by discharge of internal Ca^{2+} stores: studies using fura-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 308-314.

189. Pollock, K., Rink, T.J. and Irvine, R.F. (1986): Liberation of (³H)arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in fura-2 loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen. **Biochem. J.** 235: 869-877.
190. Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B., Sacco, O. and Horecker, B.L. (1986): Differential mechanisms of translocation of protein kinase C to plasma membranes in activated human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 136: 228-234.
191. Puppo, F., Corsini, G., Mangini, P., Bottaro, L. and Barreca, Th. (1985): Influence of β -endorphin on phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation and on the expression of mononuclear cell surface antigens in vitro. **Immunopharmacol.** 10: 119-125.
192. Putney, J.W. Jr. (1987): Formation and actions of calcium mobilizing messenger, inositol-1,4,5-trisphosphate. **Am. J. Physiol.** 252: 6149-6157.
193. Ralph, R.K. (1983): Cyclic AMP, calcium and control of cell growth. **FEBS Letters** 161: 1-8.
194. Ramachandran, Ch., Yau, P., Bradbury, E.M., Shyamala, G., Yashuda, H. and Walsh, D.A. (1984): Phosphorylation of high mobility group proteins by the calcium-phospholipid-dependent protein kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.** 259: 13495-13503.
195. Ramsdell, J.S. and Tashjan, A.H. Jr. (1985): Thyrotropin releasing hormone and epidermal growth factor stimulate prolactin synthesis by a pathway(s) that differs from that used by phorbol esters: dissociation of actions by calcium dependency and additivity. **Endocrinology** 117: 2050-2060.
196. Ransom, J.T., DiGiusto, D.L., and Cambier, J.C. (1986): Single cell analysis of calcium mobilization in anti-immunoglobulin-stimulated B lymphocytes. **J. Immunology** 136: 54-57.
197. Rasmussen, H. (1981): **Calcium and cAMP as synarchic messengers.** Wiley & Sons NY.
198. Resch, K., Bouillon, D. and Gerns, D. (1978): The activation of lymphocytes by the ionophore A23187. **J. Immunol.** 120: 1514-1520.
199. Resch, K., Schneider, A. and Szamel, M. (1981): Preparation of right-side-out oriented subfraction from purified thymocyte plasma membranes by affinity chromatography on Concanavalin-A-Sepharose. **Anal. Biochem.** 117: 282-292.
200. Rickard, J.E. and Sheterline, P. (1985): Evidence that phorbol ester interferes with stimulated Ca^{2+} redistribution by activating Ca^{2+} efflux in neutrophil leukocytes. **Biochem. J.** 231: 623-628.

201. Rink, T.J. and Pozzan, T. (1985): Using quin2 in cell suspensions. **Cell Calcium** 6: 133-144.
202. Roda, A., Hofman, A.F. and Mysels, K.J. (1983): The influence of bile salt structure on self association in aqueous solutions. **J. Biol. Chem.** 258: 6362-6370.
203. Rozengurt, E. (1985): The mitogenic response of cultured 3T3 cells: integration of early signals and synergistic effects in a unified framework. In: **Molecular mechanisms of plasma-membrane signalling** (Eds: Cohen and Houslay) Elsevier pp.: 429-452.
204. Sabbah, M., Redeuilh, G., Secco, . and Baulieu, E.-E. (1987): The binding activity of estrogen receptor to DNA and heat shock protein (Mr 90,000) is dependent on receptor-bound metal. **J. Biol. Chem.** 262: 8631-8635.
205. Sahyoun, N., Wolf, M., Besterman, J., Hsieh, T-C., Sander, M., LeVine, H.III., Chang, K-J. and Cuatrecasas, P. (1986): Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II: topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 1603-1607.
206. Samelson, L.E., Davidson, W.F., Morse, H.C.III. and Klausner, R.D. (1987): Abnormal tyrosine phosphorylation on T-cell receptor in lymphoproliferative disorders **Nature** 324: 674-676.
207. Sato, A., Bacon, P.E. and Cory, J.G. (1984): Studies on the differential mechanisms of inhibition of ribonucleotide reductase by specific inhibitors of the non-heme iron subunit. **Adv. Enzyme Regul.** 22: 231- .
208. Scanlon, A.R., Fox, J.A., Sherline, P. and Cuatrecasas, P. (1986): Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase. **Science** 233: 967-972.
209. Scanlon, M., Williams, D.A. and Fay, F.S. (1987): A Ca^{2+} insensitive form of fura-2 associated with polymorphonuclear leukocytes, assesment and accurate measurement. **J. Biol. Chem.** 262: 6308-6312.
210. Schonhardt, T. and Ferber, E. (1987): Translocation of phospholipase A_2 from cytosol to membranes induced by 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol in serum free cultured macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 149: 769-775.
211. Schwartz, R.H. (1987): Fugue in T-lymphocyte recognition. **Nature** 326: 738-739.
212. Segal, J. and Ingbar, S.H. (1986): The effect of trypsinization on the plasma membrane binding and action of 3,5,3'-triiodothyrosine in rat thymocytes. **Endocrinology** 118: 1863-1868.

213. Segel, G.B., Simon, W., Lichtman, A.H. and Lichtman, M.A. (1981): The activation of lymphocyte plasma membrane (Na,K)-ATPase by EGTA is explained better by zinc than calcium chelation. *J. Biol. Chem.* 256: 6629-6632.
214. Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1987): Three distinct forms of rat brain protein kinase C: differential response to unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 797-802.
215. Shapiro, D.N., Adams, B.S. and Niederhuber, J.E. (1985): Antigen-specific T cell activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *J. Immunol.* 135: 2256-2261.
216. Shoback, D., Thatcher, J., Leombruno, R. and Brown, E. (1983): Cytosolic Ca and PTH release in dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 113: 424-426.
217. Shiohara, O., Knecht, M. and Catt, K.J. (1985): Differential actions of phorbol ester and diacylglycerol on inhibition of granulosa cell maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 468-474.
218. Siklós, L. (1983): Assembly and reliability of an X-ray microanalyser system with a possibility of independent mass measurement. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 18: 211-222.
219. Sitkovsky, M.V., Pasternack, M.S., Lugo, J.P., Klein, J.R. and Eisen, H.N. (1984): Isolation and partial characterisation of Concanavalin A receptors on cloned cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1519-1523.
220. Slater, J.P., Mildvan, A.S. and Loeb, L.A. (1971): Zinc in DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 37-43.
221. Smith, B.M., Warner, W. and Carchman, R.A. (1985): Alterations in calcium metabolism in phorbol ester-treated mouse peritoneal macrophages. *Cell Calcium* 6: 371-383.
222. Smith, G.A., Hesketh, R.T., Metcalfe, J.C., Feeney, J. and Morris, P.G. (1983): Intracellular calcium measurements by ^{19}F -NMR of fluorine-labelled chelators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7178-7182.
223. Smith, K.A., Crabtree, G.R., Kennedy, S.J. and Munk, A.K. (1977): Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivity of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Nature* 267: 523-526.
224. Sparks, J.W. and Brautigan, D.L. (1986): Molecular basis for substrate specificity of protein kinases and phosphatases. *Int. J. Biochem.* 18: 479-504.
225. Stocker, R., Winterhalter, K.H. and Richter, Ch. (1982): Increased fluorescence polarisation of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in the phorbol myristate acetate-stimulated plasma membrane of human neutrophils. *FEBS Lett.* 144: 199-203.

226. Stöhr, M. and Vogt-Schaden, M. (1980): A new dual staining technique for simultaneous flow cytometric DNA analysis of living and dead cells. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A. Suppl. No. 274*: 96-102.
227. Stubbs, Ch.D. and Smith, A.D. (1984): The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta* 779: 89-137.
228. Swarup, G., Cohen, S. and Garbers, D.L. (1982): Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1104-1109.
229. Swarup, G., Dasgupta, J.D. and Garbers, D.L. (1983): Tyrosine protein kinase activity of rat spleen and other tissues. *J. Biol. Chem.* 258: 10341-10347.
230. Sweatt, J.D., Connolly, Th.M., Cragoe, E.J. and Limbird, L.E. (1986): Evidence that Na^+/H^+ exchange regulates receptor-mediated phospholipase- A_2 activation in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261: 8667-8673.
231. Szalay, L. and Damjanovich, S. (1983): *Lumineszcencia a biológiában és az orvostudományban*, Akadémiai Kiadó, Budapest.
232. Szamel, M., Somogyi, J., Csukás, I. and Solymosy, F. (1980): Effect of ouabain on macromolecular synthesis during the cell cycle in mitogen stimulated human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 633: 347-360.
233. Szamel, M., Schneider, S. and Resch, K. (1981): Functional interrelationship between $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogen stimulated rabbit thymocytes. *J. Biol. Chem.* 256: 9128-9204.
234. Szamel, M., Goppelt, M. and Resch, K. (1985). Characterization of plasma membrane domains of mouse $\text{EL}4$ lymphoma cells obtained by affinity chromatography on Concanavalin-A-Sepharose. *Biochim. Biophys. Acta* 821: 479-487.
235. Szamel, M., Goppelt-Strübe, M., Bessler, W., Wiesmüller, K.H. and Resch, K. (1987): Separation of plasma membrane domains of calf thymocytes by affinity chromatography on ouabain Sepharose. *Biochim. Biophys. Acta* 899: 247-257.
236. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka Y. (1979): Calcium-dependent activation of multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254: 3692-3695.

237. Takuwa, N., Takuwa, Y. and Rasmussen, H. 8(1987): A tumour promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate increases cellular 1,2-diacylglycerol content through a mechanism other than phosphoinositide hydrolysis in Swiss-mouse 3T3 fibroblasts. **Biochem. J.** 243: 647-653.
238. Tandon, N.N, Davidson, L.A. and Titus, E.D. (1983): Changes in (Na⁺+K⁺)-ATPase activity associated with stimulation of thymocytes by Concanavalin A. **J. Biol. Chem.** 258: 9850-9855.
239. Trotter, J., Flesch, I., Schmidt, B. and Ferber, E. (1982): Acyltransferase-catalysed cleavage of arachidonic acid from phospholipids and transfer to lysophosphatides in lymphocytes and macrophages. **J. Biol. Chem.** 257: 1816-1823.
240. Tsien, R.Y. (1980): New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis and properties of prototype structures. **Biochemistry** 19: 2396-2404.
241. Tsien, R.Y. (1981): A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. **Nature** 290: 527-528.
242. Tsien, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J. (1982/a): T cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca and membrane potential in T lymphocytes. **Nature** 295: 68-71.
243. Tsien, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J. (1982/b): Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. **J. Cell Biol.** 94: 325-334.
244. Tung, H.Y.L. (1987): Phosphorylation of the calmodulin-dependent phosphatase by protein kinase C. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 138: 783-788.
245. Utsunomiya, N., Tsuboi, M. and Nakanishi, M. (1986): Early transmembrane events in alloimmune cytotoxic T-lymphocyte activation as revealed by stopped-flow fluorometry. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 1877-1880.
246. Vaccarino, F., Guidotti, A. and Costa, E. (1987): Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 8707-8711.
247. Vallee, B.L. and Gibson, J.G. II (1948): The zinc content of normal human whole blood, plasma, leucocytes and erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 176: 445-457.
248. van Belle, H. (1981): R24571: a potent inhibitor of calmodulin-activated enzymes. **Cell Calcium** 2: 483-494.
249. van Patten, S.M., Heisermann, G.J., Cheng, H.-C. and Walsh, D. A. (1987): Tyrosine kinase catalysed phosphorylation and inactivation of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.** 262: 3398-3403.

250. van Rigg, A.M. and Pories, W.J. (1980): Zinc and tumor growth. In: Siegel, H. (ed.) **Metal ions in Biological Systems**, Marcel Dekker, New York, Vol. 10: 207-251.
251. Waller, R.L., Brattin, W.J. and Dearborn, D.G. (1984): Cytosolic free calcium concentration and intracellular calcium distribution in lymphocytes from cystic fibrosis patients. **Life Sci.** 35: 775-781.
252. Wang, P., Toyoshima, A. and Isawa, T. (1986): Partial purification and characterisation of membrane-bound and cytosolic phosphatidylinositol specific phospholipases C from murine thymocytes. **J. Biochem.** 100: 1015-1022.
253. Ward, D.M. and Kaplan, J. (1986): Mitogenic agents induce redistribution of transferrin receptors from internal pools to the cell surface. **Biochem J.** 238: 721-728.
254. Ware, J.A., Johnson, P.C., Smith, M. and Salzman, E.W. (1985): Aequorin detects increased cytoplasmic calcium in platelets stimulated with phorbol ester or diacyl-glycerol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 133: 98-104.
255. Wedner, H.J. (1984): Biochemical events associated with lymphocyte activation. **Surv. Immunol. Res.** 3: 295-303.
256. Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J. and Evans, R.M. (1986): The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. **Nature** 324: 640-646.
257. Weinberger, J. and Bass, G. (1986): Tyrosine phosphorylation of a 66,000 Mr soluble protein in lectin-activated human peripheral blood T lymphocytes. **J. Immunol.** 136: 4226-4231.
258. Weiel, J.E., Adams, D.O. and Hamilton, T.A. (1985): Biochemical models of gamma-interferon action altered expression of transferrin receptors of murine peritoneal macrophages after treatment in vitro with PMA or A23187. **J. Immunol.** 134: 293-298.
259. Weiss, A., Imboden, J., Shoback, D. and Stobo, J. (1984/a): Role of T3 surface molecules in human T cell activation. T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81: 4169-4173.
260. Weiss, M.J., Daley, J.F., Hogdon, J.C. and Reinherz, E.L. (1984/b): Calcium dependency of antigen-specific (T3-Ti) and alternative (T11) pathways of human T cell activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81: 6836-6840.
261. Weiss, A., Imboden, J., Hardy, K., Manger, B., Terhorst, C. and Stobo, J. (1986): The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. **Ann. Rev. Immunol.** 4: 593-619.

262. Wertz, Ph.W. (1985): Effects of phorbol esters on phospholipid metabolism in vitro. In: **Arachidonic acid metabolism and tumor promotion** (Eds.: S.M. Fischer, T.J. Slaga). Martenius Nijhoff Publ. Boston pp.: 73-99.
263. Whitehouse, R.C., Prasad, A.S., Rabbani, P.J. and Cossack, Z.T. (1982): Zinc in plasma neutrophils, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic spectrophotometry. **Clin. Chem.** 28: 475-480.
264. Whitfield, J.F., MacManus, J.P. and Gillan, D.J. (1973): Calcium dependent stimulation by a phorbol ester (PMA) of thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation. **J. Cell. Physiol.** 82: 151-156.
265. Whitfield, J.F., Boynton, A.L., MacManus, J.P., Sikorska, M. and Tsang, B.K. (1979): The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. **Mol. Cell. Biochem.** 27: 155-162.
266. Whitney, R.B. and Sutherland, R.M. (1972): Requirement for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin. **J. Cell. Physiol.** 80: 329-338.
267. Wickremasinghe, R.G., Piga, A., Campana, D., Yaxley, J.C. and Hoffbrand, A.V. (1985): Rapid down-regulation of protein kinase C and membrane association in phorbol-ester treated cells. **FEBS Lett.** 190: 50-54.
268. Wolf, M., LeVine, III, H., May, W.S. Jr., Cuatrecasas, P. and Sahyoun, N. (1985/a): A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca^{2+} and phorbol ester. **Nature** 317: 546-551.
269. Wolf, M., Cuatrecasas, P. and Sahyoun, N. (1985/b): Interaction of protein kinase C with membrane is regulated by Ca^{2+} phorbol esters and ATP. **J. Biol. Chem.** 260: 15718-15722.
270. Wolff, H.P. (1956): Untersuchungen zur Patophysiologie d Zinkstoffwechsels. **Klin. Wochenschr.** 34: 409-418.
271. Wolfson, M., McPhail, L.C., Nasrallah, V.N. and Snyderman, (1985): Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in activation of the respiratory burst enzyme. **J. Immunol.** 135: 2057-2062.
272. Woodgett, J.R. and Hunter, T. (1987): Isolation and characterisation of two distinct forms of protein kinase C. **J. Biol. Chem.** 262: 4836-4843.
273. Wu, W., Pahlavani, M., Richardson, A. and Cheung, H.T. (1988): Effect of maturation and age on lymphocyte proliferation induced by A23187 through an interleukin independent pathway. **J. Leukocyte Biol.** 38: 531-540.
274. Yarom, R., Hall, Th.A. and Polliack, A. (1976): Electron microscopic X-ray microanalysis of normal and leukemic human lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 73: 3690-3694.

275. Yeh, E.T.H., Reiser, H., Daley, J. and Ock, K.L. (1987): Stimulation of T cells via the TAP molecule, a member in a family of activating proteins encoded in the Ly-6 locus. *J. Immunol.* 138: 91-97.
276. Young, S., Parker, P.J., Ullrich, A. and Stabel, S. (1987): Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 244: 775-779.