

PLAZMAMEMBRÁNOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE

MÁNYAI SÁNDOR és VÉGH ANTALNÉ

Országos Munka- és Üzemegészségügyi Intézet, Budapest

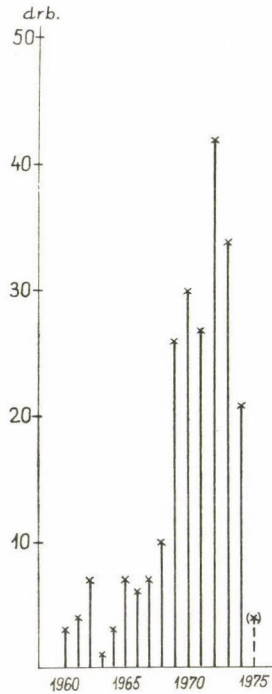
Az állati sejteket körülvevő plazmamembrán kémiai szerkezete, élettani és biokémiai szerepe és működése a biológiai tudományok egyik alapvető, napjainkban kiterjedten tanulmányozott kérdése. Mélyreható vizsgálatának előfeltétele olyan eljárások kidolgozása, amelyek segítségével nagytisztaságú, a sejt intracelluláris membránjaitól lehetőleg mentes plazmamembránokat lehet izolálni. Referátumunk e módszerekről kíván, a teljesség igénye nélkül, rövid irodalmi összefoglalást adni. Megírásánál részben korábbi összefoglaló művekre (DE PIERRE és KARNOVSZKY (1973), STECK (1972), STECK és WALLACH (1970), WALLACH (1973), WALLACH és LIN (1973), WARREN és GLICK (1971), részben az eredeti, ill. újabban megjelent közleményekre támaszkodtunk. A feldolgozott irodalmi adatokat válogatnunk kellett. Kizárólag a gerincesek (túlnyomórészt emlősök, ill. csirke) szerveiből, embrionális szövetből, valamint ép és tumor szövettényezetekből származó sejtek plazmamembránjával foglalkozunk. A vér alakos elemeit nem tárgyaljuk, ezekről e kötet más helyén olvashatunk (SZÁSZ (1978), HASITZ (1978), HARSÁNYI (1978)). Más szervek esetén figyelembe vettük BENEDECZKY (1978), NAGY (1978), JOÓ és KARNUSHINA (1978), valamint HRABÁK és SZAMEL (1978) csatlakozó munkáit.

A referátum összeállításához felhasznált közlemények megjelenésének a naptári évek szerinti eloszlásából (1. ábra) megállapíthatjuk, hogy azok a cikkek, amelyek a plazmamembránok izolálására új eljárást, vagy lényeges módosítást közölnek, zömben a 70-es években jelentek meg. Ez időben egybeesik a sűrűséggrádiens centrifugálási technika és az ehhez szükséges műszerezettség elterjedésével.

A plazmamembránok előállítására szolgáló teendőket négy csoportra oszthatjuk:

- (1) a preparálás alapját képező sejtek nyérése,
- (2) a sejtek roncsolása,
- (3) a plazmamembrán elválasztása és tisztítása,
- (4) a plazmamembrán analitikai azonosítása.

Az egyes műveletek elvét néhány mondatban össze lehet foglalni. A metodikai cikkek ennek ellenére nagy számát a kisebb-nagyobb módosítások adják. Ennek csak részben oka a különböző laboratóriumok eltérő technikai fel-



I. ábra. A referátum összeállításához felhasznált, a plazmamembránok izolálásával és azonosításával foglalkozó közlemények eloszlása a naptári évek szerint

szereltsége. Egy adott szervre kidolgozott izolálási módszert rendszerint csak megfelelő változtatásokkal lehet más szerv esetén alkalmazni. Különböző fajú állatok azonos szerveiből sem mindig sikerül ugyanazzal az eljárással megfelelő mennyiségű és tisztaságú plazmamembránt nyerni. A kutatók laboratóriumi tapasztalatát, találékonyságát és újítási kedvét szintén nem lehet figyelmen kívül hagyni. A közlemények nem eléggé szabatosan leírt metodikai részlete ugyancsak indítékai újabb módosításoknak.

A sokféle módosítás természetesen megnehezíti a közölt eredmények összehasonlítását, az adatok egyeztetését. Kevés olyan cikk jelent meg, amely több különböző módszerrel izolált plazmamembrán vizsgálatáról számolna be, ill. összehasonlító adatokkal támasztaná alá egyik, vagy másik preparatív eljárás előnyeit (LAUTER és mtsai (1972), ISRAEL és mtsai (1973), SHIN és CARRAWAY (1973), WALLACH és LIN (1973)).

1. A sejtek izolálása

A különböző szervek, szövetek anatómiai felépítésének ismeretében szükségtelen bizonygatni, hogy az elroncsolással nyert homogenátum többféle sejt alkotóelemeit tartalmazza. A máj nemcsak hepatocitákból áll, hanem

a RES-hez tartozó Kupffer-sejteket is tartalmaz. Azonban a májsejtek között is más az egymással érintkező, vagy a vér-sinusok, ill. az epekapillárisok felé eső sejtfelzárkók biokémiai szerkezete (WISHER és EVANS (1975)). A vese glomerulusok és tubulusok sejtjeinek eltérő élettani szerepe a plazmamembránjuk különbözőségében is megmutatkozik (KINNE és mtsai (1971), BUSSE és STEINMAIER (1974)). A felszívódásban fontos szerepet játszó vékonybél nyálkahártya hengerhámjának „polaritása” a lumen felé eső kefeszegély, ill. a basolateralis plazmamembrán minőségileg eltérő enzimaktivitásaiból is nyilvánvaló (FUJITA és mtsai (1972), MURER és mtsai. (1974), QUIGLEY és GOTTERER (1969)). Amikor tehát egy sejtet borító plazmamembrán jól meghatározott területei között biokémiai módszerekkel különbségeket állapíthatunk meg, jogos az a kívánság, hogy a preparálás előtt minél homogénabb sejtpopuláció álljon rendelkezésre.

A szerv *in situ* átáramoltatásával a vér alakos elemeinek nem elhanyagolható szennyeződésétől szabadíthatjuk meg készítményünket. Biokémiai laboratóriumokban meglepően ritkán élnek ezzel a lehetőséggel.

A különböző típusú sejtek izolálása céljából mindenek előtt a sejt-sejt kapcsolatot kell megszüntetni. Az ún. tömör szövetek esetén erre kíméletesen végzett pépesítést, szitákon való átpréselést, fehérje- ill. poliszaharidbontó enzimes emésztést alkalmaznak. Üreges szervek epithel sejtjeit mechanikus (LEVINE és WEINTRAUB (1970)), kémiai + mechanikus (MURER és mtsai (1974)), ill. kémiai (CHLAPOWSKI és mtsai (1972), HICKS és KETTERER (1970)) dezintegrálással lehet leválasztani.

A szöveti kötélkéből fellazított sejtek elkülönítésére a sejtek térfogata (mérete), sűrűsége, felszíni elektromos töltése, ill. specifikus felszíni receptorai, valamint specifikus festődési tulajdonságai nyújtanak lehetőséget. A sejtek elválasztására szolgáló technikai megoldások (lásd: WALLACH és LIN (1973)) közül a legáltalánosabban a különböző polimérek oldatában végzett centrifugálások terjedtek el. A sejtek szuszpendálására ill. centrifugálására izoozmotikus (tehát a sejteket lehetőleg nem károsító), nagy fajszámú természetes (szérum albumin, dextrans) ill. mesterséges (Ficoll = szaharóz polimér, polivinil-pirrolidon, kolloid kvasav) makromolekulákat tartalmazó oldatokat használnak. Az oldatok sűrűsége vagy homogén, vagy folyamatosan ill. szakaszosan változó (grádiens). Előbbi esetben differenciálcentrifugálással, utóbbiakban egyensúlyi centrifugálással választják el a különböző sejteket. Ezek sűrűségük szerint vagy leülepednek, vagy az oldat felszínére szállnak, vagy a megfelelő sűrűségű rétegben (folyamatos sűrűséggrádiens esetén), ill. két különböző sűrűségű oldat határán (szakaszos sűrűséggrádiens esetén) gyűlnek össze.

Két, egymással nem keveredő vizes poliméroltatban (polietilén-glikol + dextrans) végzett centrifugáláskor ugyancsak a fázishatárra rétegződnek a sejtek. Ily módon történő szétválasztásukban elsősorban felületi feszültségük játszik szerepet.

Az egymással nem elegyedő nem-vizes oldatokban történő sejtválasztásnak viszont a sejtek sűrűségén kívül azok felületi feszültsége és töltése is alapját képezi.

Amíg megfelelő centrifugálásokkal a legkülönbözőbb szervek és szövetek sejteit el lehet különíteni, addig az egyéb technikai megoldásokat rendszerint egy-egy sejtípus izolálására dolgozták ki és alkalmazzák. Az érthető nagy gyakorlati jelentősége miatt, különösen a limfociták izolálására és különböző típusaik elválasztására fejlesztettek ki elektroforézisen (ZEILLER és mtsai (1972), ZEILLER és DOLAN (1972), NORDLING és mtsai (1972), KOLIN (1965), KOLIN és LÜNER (1969), HANNIG (1969)), vizes polimérekben végrehajtott ellenáramú extrakción alapuló (ALBERTSON (1970), BRUNETTE és mtsai (1968), WALTER és mtsai (1969)), valamint specifikus adszorpciós oszlopon, vagy hálón megvalósított módszereket (WIGZELL és ANDERSON (1971), CAMPBELL és GREY (1972), EDELMAN és mtsai (1971)). Említésre méltók a kalibrált üvegoszlopokon történő szűrési technikák (SHORTMAN (1969)), valamint a nem-specifikus adszorpciót felhasználó eljárások (üveg: JOHNSON és GARVIN (1959), GARVIN (1961), pamut: CZERSKI és mtsai (1966), nylon: OPPENHEIM és mtsai (1968)). Alkalmazásuk főleg a vér alakos elemeinek szétválasztására terjed ki.

Az automatikus, elektronikus vezérlésű sejtválogató készülékek a jövő ígéretei. Jelenlegi teljesítményük még korlátozott. A sejtek megkülönböztetésére szolgáló jelet a sejtek térfogata (FULWYLER és mtsai (1969), VAN DILLA és mtsai (1967)), ultrabolya fényelnyelése (KAMENTSKY és MELAMED (1967)), vagy specifikus fluoreszcenciája (JULIUS és mtsai (1972), BONNER és mtsai (1972)) szolgáltatja.

Miközben figyelmünk, igyekezetünk arra irányul, hogy a plazmamembrán izolálást minél egységesebb sejtfrakcióból kezdjük el, a sejtek szöveti egységének számos olyan körülményét változtatjuk meg, amelyek szükségszerűen a plazmamembrán módosulásához vezetnek (WALLACH és LIN (1973)). A sejteket elválasztásuk alatt/után nagyobb O_2 - és kisebb CO_2 -tenzió veszi körül, mint a szöveti kötelékben. Az ionösszetétel, az ionerősség, a pH változása ugyanúgy nem közömbös a sejtet borító plazmamembránja szempontjából, mint a hirtelen lehűtés, vagy az a tény, hogy kikerül a különböző metabolitok, hormonok és egyéb szabályozó anyagok ellenőrzése alól. A sejtek izolálására alkalmazott fehérje- és poliszaharid-bontó enzimek a plazmamembrán szerkezetében is nyomot hagynak. Mindezek olyan hatások, amelyekre az izolált plazmamembránokkal végzett kísérletek eredményeinek értékelésénél és értelmezésénél nagyobb gondot kellene fordítani.

2. A sejtek roncsolása

A plazmamembrán felépítésének bármelyik modelljét fogadjuk is el, egyben mind megegyezik egymással: a membrán szerkezete nem homogén.

Izolálásához nélkülözhetetlen a roncsolása. A roncsolás mértéke azonban — éppen a szerkezete heterogenitása következtében — a preparálás végén nyert készítményben kvalitatív különbségeket okoz. Ezért a sejtek roncsolását a membránizolálási eljárások legkritikusabb (és egyben legkevésbé pontosan meghatározott) lépésének tekinthetjük.

Ha a sejtek szubcelluláris komponensei izolálására használt eljárások történeti fejlődésén végigtekintünk, magyarázatot találunk arra, hogy miért olyan későn, a magok, a mitokondriumok, a mikroszómák, a szekréciós granulomok, a lizoszómák izolálásának kidolgozása után került csak sor a plazmamembránok elválasztására. A felsorolt alkotórészek kinyerése általában gondosan izoozmotikus, vagy enyhén hiperozmotikus nem-elektrolit oldatokban feltárt sejtekből differenciálcentrifugálással történt. A szakaszos ill. a folyamatos sűrűséggradiens centrifugáláson, mint technikai újdonságon kívül arra a szemléleti változásra is szükség volt, hogy a kutatók *csak* a plazmamembránt akarják a sejtekből izolálni és lemondjanak az egyéb alkotórészek egyidejű kinyeréséről. Az első eredményes plazmamembrán-izolálást az tette lehetővé, hogy a sejteket ozmotikus shockkal roncsolták.

WALLACH és LIN (1973) referátumában még említi, de már nem ajánlja a sejtek hipotóniás feltárását. Ezt kizsorították az izoozmotikus oldatokban végrehajtott sejtroncsolások. Azonban ismét szerephez jutott, amikor az izoozmotikusan leülepített nyers szubcelluláris frakció (mag, mitokondrium, mikroszóma) ozmotikus shockja vezeti be a plazmamembrán leválasztását belőle.

Mind a hipoozmotikus, mind az izoozmotikus sejtfeltárás elengedhetetlen része a homogenizálás. Kulcsfontosságú szerepére utal, hogy akár a kézzel működtetett Dounce-féle, akár a motorral hajtott Potter—Elvehjem-féle homogenizátort használják is, több-kevesebb szabatossággal felhívják a figyelmet a homogenizátor lazaságára (esetleg pontos rés-méretét (clearance) is megadják), a fordulatszámra, a függőleges löketek számára és egy-egy homogenizálás időtartamára.

A klasszikus, nyírőerőn alapuló, mechanikus homogenizáláson kívül eredményes sejtfeltárást ér el az ún. intracelluláris nitrogén-kavitás módszer (STECK és WALLACH (1970), HUNTER és COMMERFORD (1961), WALLACH és KAMAT (1966)). Ennek az a lényege, hogy a feltárandó szövetet, sejtszuspenziót 60—80 at. nyomáson egyensúlyba hozzák nitrogénnel, majd óvatosan visszaállítják (minimális folyadék nyírőerőt engedélyezve) az eredeti nyomásvizonyokat. A sejt szubcelluláris alkotórészei (mitokondriumok, lizoszómák, durvafelszínű endoplazmás retikulum) általában sértetlenek maradnak, a plazmamembrán azonban — rendszerint túl apró vezikulumok képződése közben — széttöredezik.

Hasonló hatással van a plazmamembránra az ultrahanggal történő sejtroncsolás is (MACKENZIE és MILLAN (1972)). Hátránya, hogy ellentétben az

intracelluláris nitrogénkavitás módszerrel, nagy lokális hőfejlődéssel és nagymennyiségű szabad gyök felszabadulásával jár és valamennyi szubcelluláris membrán molekuláris károsodását is okozza.

A plazmamembrán szerkezetének megbontása labilis helyzetet teremt, amely az ismét stabilis plazmamembrán vezikulumok kialakulásához vezet. Minél nagyobb mértékű károsodás érte a sejt roncsolásakor a plazmamembránt, annál kisebb méretűek lesznek a vezikulumok, amelyek között normális (right side out) és kifordult (inside out) szerkezetűek egyaránt előfordulnak. Ez a magyarázata annak, hogy a plazmamembrán izolálása során olyan nagy jelentőséget tulajdonítanak a kéméletes homogenizálásnak. Mindezeknek az empirikus tanácsoknak azonban hiányzik az exakt kísérletes alapja. NOVIKOFF (1960) klasszikus vizsgálatán kívül senki sem ellenőrizte elektronmikroszkóppal a különféle homogenizálás sejtroncsoló hatásait.

Izolált sejtek membránját stabilizálni lehet a vezikulaképződéssel szemben. Ilyenkor a plazmamembránt egyetlen szerkezeti egységként, kisebb-nagyobb lemezek alakjában nyerik. Ez elérhető a sejtek $ZnCl_2$ -os (PERDUE és SNEIDER (1970), WARREN és mtsai (1966), BRUNETTE és TILL (1971)), fluoreszcein-Hg-acetátos (WARREN és mtsai (1966), HICKS és KETTERER (1971), SCHER és BARLAND (1972)), ill. glutáraldehides (NACHMAN és mtsai (1971)) előkezelésével. Hasonlóképpen plazmamembrán lemezek leválását eredményezi, ha pl. patkány húgyhólyagját tioglikolát oldattal töltik fel (CHLAPOWSKI és mtsai (1972)). A HeLa sejteket borító membrán ezzel szemben eléggé rugalmasnak bizonyul ahhoz, hogy előzetes stabilizálás nélkül is plazmamembrán lemezeket lehessen belőle nyerni (Bosmann és mtsai (1968)).

3. A plazmamembrán elválasztása és tisztítása

A plazmamembrán elválasztása és további tisztítása a sejtek elroncsolásával nyert homogenátumból lényegében hasonló elvek alapján történik, mint a sejtek előzetes izolálása. A sejt szerkezetének felbomlása azonban nemcsak az intracelluláris kapcsolatok megszűnését eredményezi, hanem számos új, nem-specifikus kölcsönhatás kialakulásához is vezet. Ezek részben gátolják, részben azonban — tudatosan idézve elő őket — elősegíthetik a plazmamembránok izolálását. Így pl. 1—2 mM Ca^{2+} alkalmazása a hipoozmotikus homogenizáló oldatban, ill. szaharóz hozzáadása (JOHNSEN és mtsai. (1974), BUSSE és STEINMAIER (1974)) a magok gélesedését hivatott meggátolni (BERMAN és mtsai (1969), EMMELOT és Bos (1969), RAY (1970)). A homogenátum 20—100-szoros meghígítása a homogenizáló médiummal (RAY (1970), NEVILLE (1960, 1968)), ismételt kezelése $MgCl_2$ -dal (BOOTH és KENNY (1974)) a könnyebb elválasztást célozza. A homogenátum néhány száz g-s felülűszojában is lehet a plazmamembránokat $ZnCl_2$ -os kezeléssel stabilizálni (ISRAEL és mtsai (1973)),

ill. adenilsav + $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ hozzáadásával gyors ülepedésre bírni (RYAN és SMITH (1971)).

A plazmamembránok izolálására legáltalánosabban a differenciálcentrifugálást, a sűrűséggrádiens centrifugálást, („rate zonal” centrifugálás: STECK (1972), különböző sűrűség egyensúlyi ultracentrifugálások: STECK és WALLACH (1970), STECK és mtsai (1970), STECK (1972)), ill. a két vizes fázisú polimérrendszerben történő centrifugálást (ALBERTSON (1970), BRUNETTE és TILL (1971)) alkalmazzák. Ezek során a szubcelluláris komponensek méretében, alakjában, sűrűségében, elektromos töltéssűrűségében, ill. egyéb tulajdonságaiban mutatkozó eltéréseket hasznosítják.

Elektroforézis segítségével (DAVENPORT (1964), SELLINGER és BORENS (1969)) nem sikerült megfelelően tiszta membránfrakciót előállítani.

A izolálendő vazkuláris szerkezetű szubcelluláris partikulák sűrűségének perturbációja, aminek révén pl. lizoszomákat, fagoszoma membránokat lehet izolálni (LEIGHTON és mtsai (1968)), a plazmamembránok esetén nem vezetett kielégítő eredményre.

A centrifugálási technikák fent említett három főtípusát rendszerint egymással kombinálva alkalmazzák. A homogenátum differenciálcentrifugálásával leüleptített nyers mag (néhány száz — 1000 g), mitokondrium (1000—2500 g), ill. mikroszóma (100 000 g) frakciója általában vagy közvetlenül, vagy ozmotikus shock után, kiindulását képezi a további frakcionálásnak. De izoozmotikus ill. hiperozmotikus teljes homogenátumokat eleve sűrűséggrádiens centrifugálással komponenseikre lehet bontani, amelyeket azután utólagos differenciálcentrifugálással nyernek ki és tisztítanak. A sűrűséggrádiens centrifugálásra kismolekulasúlyú vegyületek (szaharóz, glicerin) és polimérek (dextrán, Ficoll) oldata egyaránt felhasználható. Sűrűségük a centrifugacsőben ill. a zonális rotorban folyamatosan, vagy szakaszosan változhat. A grádiens alatt és fölött általában egy-egy eltérő sűrűségű záróréteg is elhelyezhető. Az elválasztáshoz szükséges centrifugális erő igen változatos: néhány 100-tól több 100 000 g-ig terjedhet. A centrifugálás időtartama percektől 16—20 óráig változhat. Centrifugálás helyett a szakaszos grádiens vibrálása is biztosíthatja a komponensek szétválasztását (LUTZ és FRIMMER (1970)).

A különböző sűrűséggrádiensek molekulasúlyuk, ill. eltérő penetráló képességük alapján egyben ozmotikus grádiensek is lehetnek, amelynek következtében a zárt vezikulumok duzzadhatnak ill. zsugorodhatnak. Ez akörülmény befolyásolhatja, meghatározhatja elmozdulásuk irányát és mértékét a centrifugálás alatt. A két, vízben különbözőképpen oldódó polimérrendszer (polietilén glikol + dextrán) elsősorban felületi tulajdonságaik alapján teszi lehetővé a plazmamembránok izolálását.

4. A plazmamembrán analitikai azonosítása

A sejtek izolálása és roncsolása, valamint a plazmamembránok elválasztása és tisztítása során felmerült problémák igazán a készítmény analitikai azonosításakor tűnnek elő. Ekkor nemcsak az izolált plazmamembrán frakció tisztaságáról, hanem lehetőleg a membránok natív állapotáról is számot kell adni. Nem lehet figyelmen kívül hagyni a mennyiségi kitermelés kérdését sem. Meggondolandó ugyanis, hogy 10—15%-os kitermelés esetén egy még oly tiszta plazmamembrán preparátum mennyire jellemző része a felhasznált szövet teljes plazmamembrán tartalmának. Vitatott kérdés, hogy melyek azok az ismérvek, amelyek alapján a plazmamembrán azonosítható. Nincs egyetlen, jellemző indikátora. Az elektronmikroszkópos ellenőrzés nélkülözhetetlen, de önmagában szintén nem elégséges. A preparálás során a különböző eredetű membránokból képződött vezikulumok között olykor nem könnyű a plazmamembránból származókat azonosítani. Kvantitatív vizsgálatok különösen nehézkesek elektronmikroszkóp segítségével. Elfogadott gyakorlattá vált, hogy komplex morfológiai (elektronmikroszkópos) és biokémiai (analitikai + enzimaktivitás mérés) vizsgálatok nélkül alig jelenik meg ma már membránokkal foglalkozó közlemény.

A plazmamembrán felismerésére, azonosítására elvileg kétféle biokémiai lehetőség kínálkozik:

(a) az izolált készítményben jellemző alkotórészek, enzimaktivitások kimutatása, meghatározása,

(b) a plazmamembrán megjelölése jellemző reagáló csoportjain keresztül az ép sejten, majd ennek a jelöltségnek a követése, vizsgálata az izolálás során/után. Mindkét elv gyakorlati megvalósítása számos bizonytalanságot rejt magában.

A sejtek intracelluláris morfológiai szerkezete a kémiai összetétel heterogenitásában is tükröződik: alkotórészeik a sejt egyes organellumai között nem egyenletesen oszlanak el. Bizonyára a metodikai lehetőségek is közrejátszanak abban, hogy az enzimaktivitással bíró fehérjék intracelluláris lokalizációjáról tudunk legtöbbet (de DUVE és mtsai. (1955), BROWN és CHATTOPADHYAY (1971). Az ún. „marker”, jelző enzimek aktivitásának meghatározása ma a legérzékenyebb módszer az egyes szubcelluláris komponensek azonosítására, tisztaságának ellenőrzésére. Egyre nélkülözhetlenebbé válik azonban az egyes frakciók lipid-összetételének vizsgálata (COLBEAU és mtsai (1971)) és egyelőre kevés támpontunk van a jellemzőnek tekinthető szénhidrát alkotórészek előfordulásáról (KRAMER 1971).

Az egyes enzimek *in situ* elhelyezkedéséről az ép ill. metszett sejtben a fény- ill. elektronmikroszkópos hisztokémia nyújt felvilágosítást. E módszerek kritikai értékelésére nem kívánunk kitérni, e helyett kézikönyvekre utalunk (CHAYEN és mtsai (1973), GEYER (1973), HAYAT (1974)).

Az izolált sejtalkotórészek jellemzőnek tartott enzimaktivitásainak meghatározásánál, értékelésénél ugyancsak indokolt a körütekintő kritika. Az enzimek általában abban a szubcelluláris komponensben fordulnak elő, ahol működésüket is kifejtik. Azonban nem lehetünk biztosak abban, hogy az enzim ugyanúgy működik a celluláris mikro környezetében, mint az abból izolált partikulában. A sejt roncsolásakor, a frakcionálás során egyes enzimek eredeti lokalizációjukból kioldódhatnak, mások nem-specifikusan más komponensekhez kötődhetnek. Az enzimek egy része veszít az aktivitásából a homogenizálásakor, mások aktiválódhatnak. Az intracelluláris proteázok hatása egyes szövetek homogenátumában végletes változásokat eredményez.

Az ún. jelző enzimek sem mindig egyenletesen oszlanak el a rájuk jellemző plazmamembránban. Vonatkozik ez mind a membránban történő haránt irányú mind a lapszerinti elrendeződésre. A plazmamembrán jelző enzimek közül egyesek az extracelluláris tér, ill. a szomszédos sejt felé tekintenek, ezek az ektoenzimek (Mg^{2+} -ATPáz: MUSTAFA és mtsai (1969), WALLACH és ULLREY (1962), TRAMS és LAUTER (1974), 5-nukleotidáz, foszfodiészteráz I, p-nitrofenilfoszfátáz, leucil- β -naftilamidáz (TRAMS és LAUTER (1974))). Az endo-enzimek a plazmamembrán belső felszíne felé fordulnak (adenilcikláz: TRAMS és LAUTER (1974)). A transzport feladatokat ellátó enzimek viszont valószínűleg sugárirányban helyezkednek el a membránban. Egyes enzimek elhelyezkedése a plazmamembrán külső/belső felszínén állatfaj és szerv szerint is változik (TRAMS és LAUTER (1974)).

Több sejt plazmamembránja funkcionális polaritást mutat, ami a jelző enzimek lapszerinti eltérő elhelyezkedésében nyilvánul meg. Bár az 5-nukleotidázt a máj (és egyéb) plazmamembrán legalkalmasabb jelző enzimének tekintik (lásd pl. DORLING és LE PAGE (1973)), pontos lokalizációját mégis vitatják (SONG és BODANSKY (1967), SONG és mtsai (1969)). A májsejtek egymással érintkező felszínén a legalacsonyabb általában a jelző enzimek aktivitása (WISHER és EVANS (1975)). A legnagyobb viszont az 5-nukleotidáz aktivitása a májsejteknek az epe-caliculusok és a vér-sinusok felé eső felszínén (WACHSTEIN és MEISEL (1957), ESSNER és mtsai (1958), GOLDFISCHER és mtsai (1964), WISHER és EVANS (1975)). Ugyanakkor kizárólag az epe-caliculusok falában fordul elő az ugyancsak plazmamembrán jelző enzimként számontartott alkalikus foszfátáz (WACHSTEIN és ZAK (1946, 1949)), de nincs glukagonnal aktiválható adenilcikláz aktivitása. Utóbbinak a vér-sinusok felé tekintő májsejtfelszínén a legnagyobb az aktivitása (WISHER és EVANS (1975)). Az elmondattokból metodikai szempontból tehát az következik, hogy a májból izolált plazmamembrán készítményt akkor tekinthetjük valamennyi sejtfelszín képviselőjének, ha abban mind az 5-nukleotidáz, mind az alkalikus foszfátáz specifikus aktivitása közel azonos arányban növekszik a homogenátumban mért értékekhez képest (DORLING és LE PAGE (1973)).

A funkcionális polarizáció további szép példáját szolgáltatja a felszívást végző vékonybél nyálkahártya, ill. vesetubulus hengerhámjának plazmamembránja. Míg a Na,K-ATPáz csaknem kizárólag és az 5-nukleotidáz főleg a basolateralis plazmamembránban található, addig a sejtnek a lumen felé tekintő kefeszegélyére az alkalikus foszfatáz, a szaharáz, a trehaláz, a különböző peptidáz aktivitások lokalizációja jellemző. (lásd pl., vese: BUSSE és STEINMAIER (1974), CHESNEY és mtsai (1973), GLOSSMANN és GIPS (1974), KINNE és mtsai (1971), QUIRK és ROBINSON (1972), bél: DOUGLAS és mtsai (1972), FORSTNER és mtsai (1968), FUJITA és mtsai (1971, 1972), MURER és mtsai (1974), QUIGLEY és GOTTERER (1969), SCHMITZ és mtsai (1973)).

A plazmamembrán (és hasonlóan egyéb szubcelluláris komponens) azonosítása során nem elégedhetünk meg azzal, hogy a jellemzőnek tartott jelző enzim specifikus aktivitása sokszorosa a sejtthomogenátumban mértnek. (A helyes vonatkoztatási alapnak az ép sejt enzimaktivitásának kellene lennie!) Ugyanakkor az izolálni nem szándékozott, de szennyeződésként előfordulható organellumok jelző enzimeit csökkent specifikus aktivitását is ki kell preparátumunkban mutatni. Nem mindig megvalósított, de jogos követelmény, hogy a plazmamembrán izolálásához (ugyanúgy más szubcelluláris komponensekéhez is) analitikai anyag (= enzimaktivitás)-mérleg tartozik. Ha ennek az igénynek eleget is teszünk, ne feledjük, hogy még mindig nem ismerjük, hogy készítményünk mennyire szennyezett enzimaktivitással nem rendelkező fehérjékkel.

A plazmamembránok azonosításának elvileg más módja az, hogy csoportspecifikus reagensekkel az ép sejten megjelölik, majd ezt a jelölést vizsgálják a sejt szubfrakcionálása során (WALLACH és LIN (1973)). E sokat ígérő, de ugyancsak nem problémamentes vizsgáló eljárás elméleti alapjaival, technikai megvalósításával és lehetőségeinek kritikai értékelésével előkészületben levő referátum (Ormos, Mányai (előkészületben)) foglalkozik majd.

IRODALOM

1. ALBERTSON, P. A.: *Adv. Protein Chem.* **24**, 309–341 (1970).
2. BENEDECZKY, I.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 261 (1978).
3. BERMAN, H. M., GRAM, W., SPIRITES, M. A.: *Biochim. Biophys. Acta* **183**, 10–18 (1969).
4. BONNER, W. A., HULETT, H. R., SWEET, R. G., HERZENBERG, L. A.: *Rev. Sci. Instr.* **43**, 404–409 (1972).
5. BOOTH, A. G., KENNY, A. J.: *Biochem. J.* **142**, 575–581 (1974).
6. BOSMANN, H. B., HAGOPIAN, A., EYLAR, E. H.: *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 51–59 (1968).
7. BROWN, H. D., CHATTOPADHYAY, S. K.: In: Brown, H. D. (Ed.): *Chemistry of the Cell Interface. Part A*, Academic Press, New York pp. 73–203 (1971).
8. BRUNETTE, D. M., McCULLOCH, E. A., TILL, J. E.: *Cell Tissue Kinet.* **1**, 319–327 (1968).
9. BRUNETTE, D. M., TILL, J. E.: *J. Membrane Biol.* **5**, 215–224 (1971).
10. BUSSE, D., STEINMAIER, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 359–372 (1974).
11. CAMPBELL, P. A. C., GREY, H. M. G.: *Cell. Immunol.* **5**, 171–179 (1972).
12. CHAYEN, J., BITENSKY, L., BUTCHER, R.: *Practical Histochemistry*. Wiley and Sons, London (1973).
13. CHESNEY, R. W., SACKTOR, R.: *J. Biol. Chem.* **248**, 2183–2191 (1973).

14. CHLAPOWSKI, F. J., BONNEVILLE, M. A., STAEHELIN, L. A.: *J. Cell Biol.* **53**, 92—104 (1972).
15. COLBEAU, A., NACHBAUR, J., VIGNAIS, P. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 462—492 (1971).
16. CZERSKI, P., SZMIEGIELSKI, L., LITWIN, J.: *Acta Haematol.* **35**, 294—303 (1966).
17. DAVENPORT, J. B.: *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 177—190 (1964).
18. VAN DILLA, M. A., FULWYLER, M. J., BOONE, I. U.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **125**, 367—370 (1967).
19. DORLING, P. R., LEPAGE, R. N.: *Biochim. Biophys. Acta* **318**, 33—44 (1973).
20. DOUGLAS, A. P., KERLEY, R., ISSELBACHER, K. J.: *Biochem. J.* **128**, 1329—1338 (1972).
21. DE DUVE, C., PRESSMAN, B. C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R., APPELMANS, F.: *Biochem. J.* **60**, 604—617 (1955).
21. EDELMAN, G. M., RUTISHAUSER, U., MILLETTE, C. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 2153—2157 (1971).
23. EMMELOT, P., BOS, C. J.: *Int. J. Cancer* **4**, 705—722 (1969).
24. ESSNER, E., NOVIKOFF, A. B., MASEK, B.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 711—716 (1958).
25. FORSTNER, G. C., SABESIN, S. M., ISSELBACHER, K. J.: *Biochem. J.* **106**, 381—390 (1968).
26. FUJITA, M., MATSUI, H., NAGANO, K., NAKAO, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **233**, 404—408 (1971).
27. FUJITA, M., OHTA, H., KAWAI, K., MATSUI, H., NAKAO, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **274**, 336—347 (1972).
28. FULWYLER, M. J., GLASCOCK, R. B., HIEBERT, R. D., JOHNSON, N. M.: *Rev. Sci. Instr.* **40**, 42—48 (1969).
29. GARVIN, J. E.: *J. Exp. Med.* **114**, 51—73 (1961).
30. GEYER, G.: *Ultrahistochemie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1973).
31. GLOSSMANN, H., GIPS, H.: *Arch. Pharmakol.* **282**, 439—444 (1974).
32. GOLDFISCHER, E., ESSNER, E., NOVIKOFF, A. B.: *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 72—95 (1964).
33. HANNIG, K.: In: Gerritsen, T. (Ed.): *Modern Separation Methods of Macromolecules and Particles*, Vol. 2, Wiley, New York, pp. 45—69 (1969).
34. HARSÁNYI, V.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 341 (1978).
35. HASITZ, M.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 321 (1978).
36. HAYAT, M. A.: *Electron Microscopy of Enzymes. Principles and Methods*. van Nostrand Reinhold Co., New York (1974).
37. HICKS, R. M., KETTERER, B.: *J. Cell Biol.* **45**, 542—553 (1970).
38. HRABÁK, A., SZAMEL, M.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 327 (1978).
39. HUNTER, M. J., COMMERFORD, L.: *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 580—586 (1961).
40. ISRAEL, A., VERJUS, M. A., SEMMEL, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **318**, 155—166 (1973).
41. JOHNSON, S., STOKKE, T., PRYDZ, H.: *J. Cell Biol.* **63**, 357—363 (1974).
41. JOHNSON T. M., GARVIN, J. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **102** 333—3335
44. JOÓ, F., KARNUSHINA, I.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 299 (1978).
44. JULIUS, J. H. J., MASUDA, T., HERZENBERG, L. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 1934—1938 (1972).
45. KAMENTSKY, L. A., MELAMED, M. R.: *Science* **156**, 1364—1365 (1967).
46. KINNE, R., SCHMITZ, J. E., KINNE-SAFFRAN, E.: *Pflügers Arch.* **329**, 191—206 (1971).
47. KOLIN, A.: *J. Chromatogr.* **17**, 532—537 (1965).
48. KOLIN, A., LUNER, S. J.: *Anal. Biochem.* **30**, 111—131 (1969).
49. KRAEMER, P. M.: In: (Ed.): *Biomembranes*, Plenum Press, New York Vol. 1, 67—190.
50. LAUTER, G. J., SOLYOM, A., TRAMS, E. G.: *Biochim. Biophys. Acta* **266**, 511—523 (1972).
51. LEIGHTON, F., POOLE, B., BEAUFAY, H., BAUDHUIN, P., COFFEY, J. W., FOWLER, S., DE DUNE, C.: *J. Cell Biol.* **37**, 482—513 (1968).
52. LEVINE, P. H., WEINTRAUB, L. R.: *J. Lab. Clin. Med.* **75**, 1026—1029 (1970).
53. LUTZ, F., FRIMMER, M.: *Z. physiol. Chem.* **351**, 1429—1434 (1970).
54. MACKENZIE, M., MILLAN, D. B.: *Anal. Biochem.* **48**, 225—232 (1972).
55. MURER, H., HOFFER, U., KINNE-SAFFRAN, E., KINNE, R.: *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 170—179 (1974).
56. MUSTAFA, M. G., IBRAHIM, A. B., LE, C. T., CORES, C. E.: *Life Sci.* **8**, 1343—1349 (1969).
57. NACHMAN, R. L., FERRIS, B., HIRSH, J. G.: *J. Exp. Med.* **133**, 785—806 (1971).
58. NAGY, Á.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 291 (1978).
59. NEVILLE, D. M. jr.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 413—422 (1960).
60. NEVILLE, D. M. jr.: *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 540—552 (1968).
61. NORDLING, S., ANDERSSON, L. C., HÄYRY, P.: *Eur. J. Immunol.* 405—410 (1972).
62. NOVIKOFF, A.: *Cell Physiology of Neoplasia*. University of Texas Press, Austin, pp. 219—268 (1960).
63. OPPENHEIM, J. J., LEVENTHAL, B. G., HERSH, E. M.: *J. Immunol.* **101**, 262—270 (1968).

64. PERDUE, J. F., SNEIDER, J.: *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 125–140 (1970).
65. DE PIERRE, J. W., KARNOVSKY, M. L.: *J. Cell Biol.* **56**, 275–303 (1973).
66. QUIGLEY, J. P., GOTTERER, G. S.: *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 456–468 (1969).
67. QUIRK, S. J., ROBINSON, G. B.: *Biochem. J* **128**, 1319–1328 (1972).
68. RAY, T. K.: *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 1–9 (1970).
69. RYAN, J. W., SMITH, U.: *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 177–180 (1971).
70. SCHER, I., BARLAND, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 580–588 (1972).
71. SCHMITZ, J., PREISER, H., MAESTRACCI, D., GHOSH, B. K., CERDA, J. J., CRANE, R. K.: *Biochim. Biophys. Acta* **323**, 98–112 (1973).
72. SELLINGER, O. Z., BORENS, R. N.: *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 176–184 (1969).
73. SHIN, B. C., CARRAWAY, K. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **330**, 254–268 (1973).
74. SHORTMAN, K.: In: Gerritsen, T. (Ed.): *Modern Separation Methods of Macromolecules and Particles. Vol. 2*, Wiley, New York, pp. 167–181 (1969).
75. SONG, C. S., BODANSKY, O.: *J. Biol. Chem.* **242**, 694–699 (1967).
76. SONG, C. S., KAPPAS, A., BODANSKY, O.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **166**, 565–573 (1969).
77. STECK, T. L.: In: Fox, C. F., Keith, A. (Eds.): *Membrane Molecular Biology*, Sinauer Associates, Stanford, pp. 76–114 (1972).
78. STECK, T. L., STRAUS, J. H., WALLACH, D. F. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **203**, 385–393 (1970).
79. STECK, T. L., WALLACH, D. F. H.: In: Busch, H. (Ed.): *Methods in Cancer Research*, Academic Press, New York pp. 93–155 (1970).
80. SZÁSZ, I.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **21**, 311 (1978).
81. TRAMS, E. G., LAUTER, C. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 180–197 (1974).
82. WACHSTEIN, M., MEISEL, E.: *Amer. J. Clin. Path.* **27**, 13–23 (1957).
83. WACHSTEIN, M., ZAK, F. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **62**, 73–76 (1946).
84. WACHSTEIN, M., ZAK, F. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **72**, 234–236 (1949).
85. WALLACH, D. F. H.: *The Plasma Membranes*, Springer, New York (1973).
86. WALLACH, D. F. H., KAMAT, V. B.: In: Neufeld, E. F., Ginsburg, V. (Eds.): *Methods in Enzymology*, **8**, Academic Press, New York pp. 164–172 (1966).
87. WALLACH, D. F. H., LIN, P. S.: *Biochim. Biophys. Acta* **300**, 211–254 (1973).
88. WALLACH, D. F. H., ULLREY, D.: *Cancer Res.* **22**, 228–234 (1962).
89. WALTER, H., KROB, E. J., ASCHER, G. S.: *Exp. Cell. Res.* **55**, 279–283 (1969).
90. WARREN, L., GLICK, M. C.: In: Habel, K., Salzman, N. P. (Eds.): *Fundamental Techniques in Virology*, Academic Press, New York pp. 66–71 (1969).
91. WARREN, L., GLICK, M. C., NASS, M. K.: *J. Cell. Physiol.* **68**, 269–288 (1966).
92. WIGZELL, H., ANDERSON, B.: *Annu. Rev. Microbiol.* **25**, 291–307 (1971).
93. WISHER, M. H., EVANS, W. H.: *Biochem. J.* **146**, 375–388 (1975).
94. ZEILLER, K., DOLAN, L.: *Eur. J. Immunol.* **2**, 439–44 (1972).
95. ZEILLER, K., PASCER, G., HANNIG, K.: *Prep. Biochem.* **2**, 21–31 (1972).