

TAPASZTALATOK A SIMAIZOM PLAZMAMEMBRÁN IZOLÁLÁSBAN

VÉR ÁGOTA és TURI ÁGNES

Semmelweis Orvostudományi Egyetem, I. Kémiai-Biokémiai Intézet, Budapest

A biomembránok vizsgálata során egyre inkább előtérbe került az egyes membránfunkciók közötti kölcsönhatások tanulmányozása. Elsősorban a membrán receptorok, a transzport folyamatok, illetve a membránban lokalizált egyes enzimszerek közötti lehetséges összefüggések képezik a membrán kutatások egyik legújabb irányzatát. Erre az adott lehetőséget, hogy az utóbbi évtizedekben elért módszertani fejlődés eredményeképpen ma már értékes tapasztalatokkal és ismeretekkel rendelkezünk a biomembránok — köztük a plazmamembránok — izolálásában és tisztításában. A membránok kémiai összetétele, enzimatis funkciói, egyes receptorainak tulajdonságai szintén ismertté váltak. Saját vizsgálatainkban a simaizom működését befolyásoló hormonok és gyógyszerek, valamint az egyéb plazmamembrán komponensek közötti kölcsönhatásokat kívánjuk tanulmányozni. Jelen közleményben a munka bevezető szakaszáról, a miometrium plazmamembrán izolálás során nyert tapasztalatainkról számolunk be.

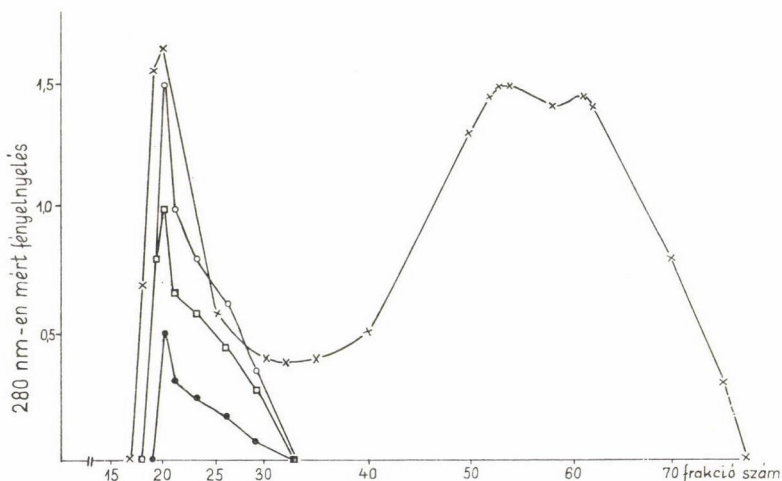
Vizsgálatainkat patkány és szarvasmarha miometriumon végeztük. 100—150 g-os patkányokat 3 napon át 1 mg/kg i.m. adott dietilösztroll származékkal (Syntestrin) előkezeltük azért, hogy az egyes állatok ovariális ciklusa azonos legyen. A szarvasmarha ovariális ciklusára az endometrium állapotából tudtunk következtetni. A miometrium bonyolult szerkezetű, látszólag hálózatos elrendezésű simaizom tömeg. Valójában sűrű érfonat izomfalaiból összefonódott lemez. A hosszanti és kereszt irányú izomkötegeket nehéz egymástól elkülöníteni. Módszereink kidolgozásánál figyelembe vettük az egyéb simaizom (bél, ér) OLIVEIRA (1974) plazmamembrán preparálási eljárásokat. Kezdetben nagy nehézséget jelentett a meglehetősen rigid szövet feltárása. Az uterus rétegeinek (endo-mio-perimetrium) elkülönítése után a miometrium szöveti szerkezetét fellazítottuk. A szarvasmarhaméh izomzatát darálással aprítottuk és késes blenderban homogenizáltuk. A patkány miometriumokat 1—2 mm-es darabokra vágtuk és 15 percig üvegpotterben homogenizáltuk. A homogenizálás során különböző nagyságú membrán fragmentek keletkeztek, amelyek majdnem egyenletesen oszlottak meg a differenciál centrifugálással elkülönített szubcelluláris komponensek között. Így többféle lehetőségünk volt viszonylag tiszta, enzimatisan aktív plazmamembrán elkülönítésére.

Módszerek:

1. Preparálási eljárások

SEREDA és CAROLL (1968) patkánymiometriumból izolált elektronmikroszkóposan igazolt plazmamembránt. A tisztított és fagyasztott miometriumot mikrotómmal pépessé szeletelte és pufferolt KCl oldatban szuszpendálta. Az így nyert viszonylag egységes homogenizátumot 3000 g-vel centrifugálta és többször mosta a szuszpendáló oldattal. Híg ATP oldattal extrahálta az aktiomiozint, majd az 1500 g centrifugálással nyert csapadékot elektronmikroszkópikusan vizsgálta. Üres membrányűrűket kapott, amelyeket kollagén szálak kapcsoltak össze nagyobb kolóniákká. Az eljárást mi is megismételtük. A kiülepített „plazmamembrán” konglomerátum nem alkalmas enzimatikus mérésekre, ezért üvegpotterrel tovább homogenizáltuk. Az így nyert viszonylag egységes preparátum azonban nem mutatott enzimaktivitást.

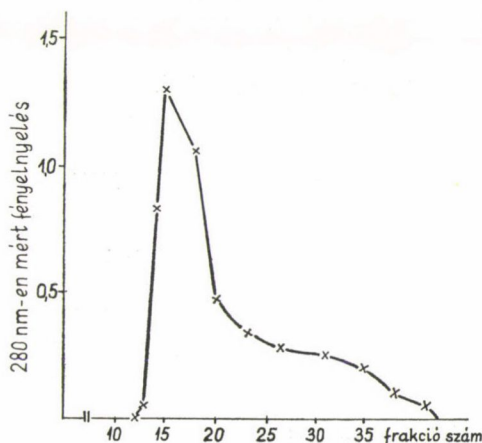
FRICKE és KLAUS (1974) gélszűrőssel (Sepharose 4B oszlopon) izolált szívizomból plazmamembrán fragmentekben dús mikroszóma frakciót. Az oszlopról két jól elkülönülő részben eluálta a posztmitokondriális frakciót. Az eljárást marhamiometrium plazmamembrán tisztítására akartuk alkalmazni. Az egyes frakciók fehérje tartalmát 280 nm-en mért abszorpcióval követtük (1. ábra), s megállapítottuk, hogy a plazmamembrán marker enzim — a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz — aktivitás csak az első fehérjecsúcsnak megfelelő



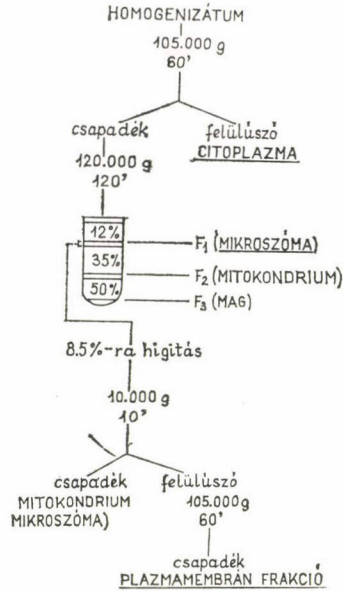
1. ábra. Marhaméh simaizom posztmitokondriális frakció gél filtrációja Sepharose 4B oszlopon. 10 000 g-vel 10 percig történő centrifugálással nyert posztmitokondriális felülszó gélfiltrációja előzetesen pufferolt KCl oldattal equilibrált Sepharose 4B géloszlopon ($20 \times 1,6$ cm). Eluálás az equilibráló oldattal történt. 2 ml-es frakciók 280 nm-on mért fényelnyelése $\times - \times$; Na^+ , K^+ , Mg^{++} ionok jelenlétében mért ATPáz aktivitás $\circ - \circ$; Mg^{++} -ATPáz aktivitás $\square - \square$; $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz aktivitás $\bullet - \bullet$.

frakcióban mérhető (2. ábra). A posztmitokondriális felülúszóból 105 000 g-vel kiülepített mikroszóma frakció azonban nem választható szét további frakciókra ezzel a gélszűrési módszerrel. Aránylag tiszta plazmamembrán frakció állítható elő KIDWAY (1970) módosított módszerével (3. ábra), bár a módszer nagy anyagvesztéssel jár. A preparálást marha- és patkány-miometriumból egyaránt elvégeztük. A homogenizálást mannit-EDTA-Trisz (pH 7,1) médiumban végeztük. 15–20%-os homogenizátumból 105 000 g-vel ülepítettük ki a partikuláris frakciókat. A csapadékot kevés homogenizáló médiumban szuszpendáltuk és rárétegeztük egy szakaszos nádcukor sűrűség-grádiensre. A gradiens réteggkoncentrációinak megválasztásánál felhasználtuk KIDWAY (1970) folyamatos sűrűség-gradiens centrifugálással nyert eredményeit, valamint saját korábbi tapasztalatainkat. A gradiens komponensei 12, 35, 50%-os 1 mM Trisz EDTA-t (pH 7,1) tartalmazó nádcukor rétegek voltak. 2 órán át 120 000 g-vel történő centrifugálás után a plazmamembrán frakció 12 és 35%-os cukoroldat interfázisában helyezkedett el. A rétegek szeparálása és izotóniásra történő hígítása után $10\,000 \times g$ centrifugálással kiülepítettük a mitokondriális szennyeződések, majd a felülúszóból 105 000 g-vel a plazmamembrán partikulumokat. A csapadékot a homogenizáló oldatban szuszpendáltuk és $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

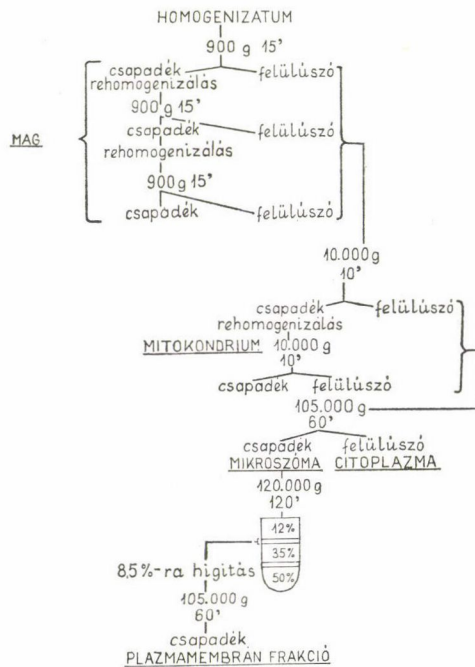
Nagyobb mennyiségű plazmamembránt nyertünk JANKOVA (1975) módosított módszerével (4. ábra). Első lépésben 900 g-vel kiülepítettük a magfrakciót. A csapadékot kétszer mostuk, majd az egyesített felülúszókból 10 000 g-vel elkülönítettük a mitokondrium frakciót, melyet egyszer mostunk. A posztmitokondriális felülúszóból 105 000 g-vel történő centrifugálással



2. ábra. Marhaméh simaizom mikroszomális frakció gélfiltrációja Sepharose 4B oszlopon. Posztmitokondriális felülúszóból 105 000 g-vel 60 percig történő centrifugálással előállított, 5 ml homogenizáló médiumban felszuszpendált mikroszomális frakció gélszűrése egy előzetesen pufferolt KCl oldattal equilibrált Sepharose 4B géloszlopon ($20 \times 1,6$ cm). Az eluálás az equilibráló oldattal történt. A 2 ml-es frakciók 280 nm-on mért fényelnyelése $\times - \times$.



3. ábra. Plazmamembrán frakció preparálása KIDWAY módosított módszerével



4. ábra. Plazmamembrán frakció előállítása JANKOVA módosított eljárásával

választottuk el a mikroszóma frakciót a szolubilis fehérjéket tartalmazó citoplazma frakciótól. A csapadékot (mikroszóma frakció) a homogenizáló médiumban szuszpendáltuk és az előzőekben ismertetett lépcsőzetes sűrűség-grádiensen tisztítottuk tovább.

2. Enzimaktivitások mérésére szolgáló eljárások

A preparálási eljárás hatékonyságát enzimatikus mérésekkel ellenőriztük. Plazmamembrán frakció enzim markerének a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz tekinthető legmegbízhatóbban, de markerként használható az 5'nukleotidáz is. Az utóbbi enzim összaktivitásának kb. 60%-a található a plazmamembrán frakcióban, a fennmaradó 40% egyenletesen oszlik el a többi szubcelluláris komponens között. A fentiekén kívül megvizsgáltuk még a leucin-amino-peptidáz (LAP) és a glukóz-6-foszfátáz aktivitás megoszlását is. A LAP kb. 50%-a a citoplazma frakcióban fordul elő, míg a glukóz-6-foszfátáz az endoplazmás retikulum enzime. A különböző enzimek aktivitásának meghatározását az alábbi módszerekkel végeztük.

Mg^{++} -ATPáz és $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz

A Mg^{++} -ATPáz aktivitásának meghatározása 2 ml reakció-eleegyben történt, melynek összetétele: 50 mM Trisz-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 és 5 mM ATP. 10 percig 37 °C-on történő inkubálás után az enzimatikus ATP-hidrolízist 1 ml 20%-os TCA-val állítottuk elő, és a fehérjementes szűrletben a felszabadult anorganikus foszfátot LOHMAN és JENDRASSIK (1926) szerint mértük. A $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz aktivitás meghatározása esetén a fenti reakcióelegy még 100 mM NaCl-t és 20 mM KCl-t is tartalmazott.

$\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz aktivitás = $\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+$ jelenlétében mért ATP bontás — Mg^{++} jelenlétében mért ATP-bontás.

5'nukleotidáz

Az 5'nukleotidáz aktivitást 1 ml reakcióelegyben határoztuk meg, mely 100 mM KCl-t 10 mM MgCl_2 -t és 10 mM AMP-t tartalmazott 37 °C-on 20 perces inkubálás után 0,5 ml 20%-os TCA-t adtunk a reakcióelegyhez, és a fehérjementes szűrletben LOHMANN és JENDRASSIK (1926) szerint határoztuk meg a felszabadult anorganikus foszfátot.

Leucinamino-peptidáz

A leucinamino-peptidáz aktivitást GOLDBERG és RUTENBURG (1958) szerint határoztuk meg, szubsztrátként L-leucin- β naftilamint használtunk, s a felszabadult naftilamint BRATON és MARSHALL (1939) módszerével mértük.

Glukóz-6-foszfataz

Az aktivitás mérésénél HUBSCHER és WEST (1965) módszerét alkalmaztuk. Az egyes frakciók fehérje tartalmát LOWRY és mtsai (1951) szerint állapítottuk meg.

Eredmények

A fehérjetartalom megoszlása a miometrium szubcelluláris frakcióiban

A fehérjetartalom %-os megoszlását a miometrium egyes szubcelluláris frakciói között az 1. táblázat mutatja a szarvasmarha és patkány vonatkozásában. A két species miometrium szubcelluláris frakcióiban a fehérjemegoszlás hasonló. A preparálás eredményeként nyert plazmamembrán frakció a homogenizátum fehérje tartalmának kb. 0,1–1,0%-át képezi. A mikroszóma frakció ennek kb. 10-szerese.

„Marker”enzimek megoszlása a patkány miometrium szubcelluláris frakcióiban

A 2. táblázatban tüntettük fel az egyes marker enzimek aktivitásának megoszlását a patkány miometrium szubcelluláris frakciói között.

1. táblázat

Fehérjemegoszlás a homogenizátum %-ában

| Frakció | Marhaméh | | Patkányméh | |
|-----------------------|----------|----------------|------------|----------------|
| | X | S _X | X | S _X |
| Homogenizátum | 100 | 1,0 | 100 | |
| Mag | 37,5 | 4,1 | 38,5 | 8,0 |
| Mitokondrium | 11,7 | 1,0 | 19,4 | 4,2 |
| Citoplazma | 29,5 | 0,5 | 33,1 | 8,0 |
| Mikroszóma | 6,5 | 0,1 | 6,6 | 1,2 |
| Plazmamembrán frakció | 0,6 | 0,1 | 1,0 | 0,1 |

2. táblázat

A Mg⁺⁺-ATPáz, 5'nukleotidáz és a LAP aktivitás %-os megoszlása a patkányméh egyes szubcelluláris frakciói között

| Frakció | Mg ⁺⁺ -ATPáz | | 5'nukleotidáz | | LAP | |
|-----------------------|-------------------------|----------------|---------------|----------------|------|----------------|
| | X | S _X | X | S _X | X | S _X |
| Homogenizátum | 100 | | 100 | | 100 | |
| Mag | 12,4 | 6,0 | 23,0 | 4,0 | 14,5 | 2,0 |
| Mitokondrium | 18,4 | 5,0 | 8,2 | 5,0 | 8,4 | 2,0 |
| Citoplazma | 0 | | 18,7 | 2,0 | 55,0 | 5,0 |
| Mikroszóma | 60,6 | 6,0 | 44,0 | 4,5 | 8,0 | 2,0 |
| Visszanyerés | 94,4 | | 93,9 | | 85,9 | |
| Plazmamembrán frakció | 30,0 | 6,0 | 38,0 | 4,5 | 8,0 | 2,0 |

A homogenizátum 5' nukleotidáz összaktivitásának 44%-a a mikroszóma frakcióban található. A további tisztítás során előállított plazmamembrán frakció a homogenát összaktivitásának 38%-át tartalmazza.

A Mg^{++} -ATPáz 60%-a a mikroszóma frakcióban lokalizálódik, míg a plazmamembrán frakcióban az összaktivitás 30%-át tudtuk kimutatni. A leucinamino-peptidáz aktivitás (LAP) 55%-át — az irodalmi adatokhoz hasonlóan — a citoplazma frakcióban mértük.

A 3. és 4. táblázat adatai a szarvasmarha, ill. a patkány miometrium szubcelluláris frakcióiban mért marker enzimek specifikus aktivitásaira vonatkoznak.

$Na^+ + K^+$ -ATPáz kizárólag a szarvasmarha miometrium mikroszóma és plazmamembrán frakciójában tudtuk kimutatni, a patkány miometriumból előállított szubcelluláris frakciókban nem. A szarvasmarha miometriális plazmamembrán frakcióban az enzim specifikus aktivitása kb. háromszorosára emelkedik a mikroszóma frakcióban mért aktivitáshoz képest.

3. táblázat

A $Na^+ + K^+$ -ATPáz, Mg^{++} -ATPáz, 5' nukleotidáz és a LAP specifikus aktivitása marhaméh szubcelluláris frakcióiban

| Frakció | $Na^+ + K^+$ -ATPáz | | Mg^{++} ATPáz | | 5' nukleotidáz | | LAP | |
|-----------------------|---------------------|-------|-----------------|-------|----------------|-------|-----|-------|
| | X | S_X | X | S_X | X | S_X | X | S_X |
| Homogenizátum | 0 | 0 | 1,7 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 0,8 | 0,4 |
| Mag | 0 | 0 | 0,2 | 0,1 | 0,9 | 0,3 | 0,3 | 0,2 |
| Mitokondrium | 0 | 0 | 2,4 | 1,0 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,2 |
| Citoplazma | 0 | 0 | 0,4 | 0,2 | 2,4 | 1,0 | 1,9 | 0,8 |
| Mikroszóma | 5,0 | 1,0 | 4,1 | 8,0 | 4,6 | 1,0 | 4,0 | 1,1 |
| Plazmamembrán frakció | 14,7 | 3,0 | 38,3 | 10,0 | 7,0 | 1,1 | 8,3 | 1,0 |

$Na^+ + K^+$ -ATPáz

Mg^{++} -ATPáz

5' nukleotidáz

LAP

specifikus aktivitás:

μ mol P/mg fehérje/óra

specifikus aktivitás:

μ g naftilamid/mg fehérje/óra

4. táblázat

Mg^{++} -ATPáz, 5' nukleotidáz és a LAP specifikus aktivitása a patkányméh szubcelluláris frakcióiban

| Frakció | Mg^{++} -ATPáz | | 5' nukleotidáz | | LAP | |
|---------------|------------------|-------|----------------|-------|-----|-------|
| | X | S_X | X | S_X | X | S_X |
| Homogenizátum | 17,0 | 2,0 | 3,0 | 0,4 | 0,8 | 0,2 |
| Mag | 5,4 | 2,6 | 0,9 | 0,4 | 0,2 | |
| Mitokondrium | 20,4 | 6,0 | 8,4 | 0,1 | 1,5 | 1,0 |
| Citoplazma | 0 | | 2,2 | | 2,6 | 0,4 |
| Mikroszóma | 79,9 | 15,0 | 18,1 | 1,0 | 2,4 | 0,2 |
| Membrán | 400,0 | 40,0 | 67,0 | 15,0 | 9,7 | 5,2 |

Mg^{++} -ATPáz

5' nukleotidáz

LAP

specifikus aktivitás:

μ mol P/mg fehérje/óra

specifikus aktivitás:

μ g naftilamid/mg fehérje/óra

Összehasonlítva a Mg^{++} -ATPáz és 5'nukleotidáz specifikus aktivitását a két faj miometriumának szubcelluláris frakcióiban, azt tapasztaljuk, hogy a patkányban mindkét enzim specifikus aktivitása egy nagyságrenddel magasabb a szarvasmarha miometrium megfelelő értékeinél. A feldúsulás mértéke a plazmamembrán frakcióban azonban nem tér el jelentősen egymástól. Az 5'nukleotidáz specifikus aktivitása patkány miometrium plazmamembránban a homogenizátum specifikus aktivitásának 22,3-szeresére, szarvasmarha esetén 14-szeresére növekszik. A Mg^{++} -ATPáz specifikus aktivitása patkány miometrium plazmamembránban 23,5-ször, a szarvasmarhában 22,4-szer magasabb a homogenát megfelelő értékeinél. A LAP specifikus aktivitása mindkét fajban a plazmamembrán frakcióban a legmagasabb. Szarvasmarha miometriumból izolált plazmamembránban a LAP specifikus aktivitása a homogenizátumban mért értéknek 10-szeresére növekszik, a patkány miometrium esetén az emelkedés 26-szoros.

Vizsgálatainkban patkányból és szarvasmarhából izoláltunk miometriális plazmamembránban dúsított frakciót, amelyet enzimológiailag jellemeztünk. Kísérleti eredményeinket összevetve más irodalmi adatokkal JANKOVA (1975), KIDWAY (1974) megállapíthatjuk, hogy az általunk kidolgozott módszerrel reprodukálható módon aránylag nagy mennyiségű, plazmamembránban más frakciót nyerhetünk különböző speciestek miometriumból, amely alkalmasnak látszik a plazmamembrán funkcionális komponensei közötti kölcsönhatások tanulmányozására.

IRODALOM

1. BARR, L., CONNOR, J. A., DEWEY, M. M., APRILLE, J. and JOHNSTON, P. V.: *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 336–347 (1974).
2. BRATTON, A. C., MARSHALL, E. K.: *J. Biol. Chem.* **128**, 537–550 (1939).
3. CARROL, P. M., SEREDA, D. D.: *Nature* **217**, 666–667 (1968).
4. DORNAND, J., MOVESSERON-CANET, J. M., MANI, J. C., PATT, B.: *Biochimie* **56**, 1425–1432 (1974).
5. FRICKE, U., KLAUS, W.: *Preparative Biochemistry* **4**, 13–29 (1974).
6. GOLDBERG, J. A., PINEDA, F. P., RUTENBURG, A. M.: *Amer. J. Clin. Path.* **32**, 571–582 (1959).
7. JANKOVA, T., PAEGELOW, I., REISSMANN, S. AROLD, H.: *Acta Biol. med. germ.* **34**, 9–13 (1975).
8. KIDWAY, A. M.: *Methods in Enzymology* **31**, 134–145 (1974).
9. KIDWAY, A. M., RADCLIFFE, M. A., DANIEL, E. E.: *Biochim. Biophys. Acta* **233**, 538–549 (1970).
10. KONO, T., KAKUMA, F., HOMMA, M., FUKUDA, S.: *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 155–175 (1964).
11. LOHMANN, K., JENDRASSIK, L.: *Biochem.* **178**, 416–422 (1926).
12. LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: *J. Biochem.* **193**, 265–275 (1951).
13. MCCOLLESTER, D. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 427–437 (1962).
14. MELVYN, S., SWARTZ, T. L.: *J. Biol. Chem.* **248**, 6471–6478 (1973).
15. OLIVEIRA, M. M., HOLZHACKER, S.: *Biochim. Biophys. Acta* **332**, 221–232 (1974).
16. RAY, T. K.: *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 1–9 (1970).
17. ROSENTHAL, S. L., EDELMAN, P. M., SCHWARTZ, I. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 512–517 (1965).