

HUMÁN VÖRÖSVÉRSEJT MEMBRÁN FEHÉRJÉK SZOLUBILIZÁLÁSA

HASITZ MÁRIA, SZELÉNYI JUDIT és HOLLÁN ZSUZSA

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet Haemoglobin és Sejtmembránkutató
Osztály, Budapest

Az életfolyamatokban döntő szerepet játszó biomembránok szerkezetét a membránfehérjék determinálják. A membránfehérjék megismerésének és vizsgálatának első lépése a membránfehérjék oldása, amelyre nincs egy általánosan elfogadott módszer. Az irodalomban igen sokféle oldási módszert alkalmaznak és a feloldott membránfehérjéket különböző vizsgáló módszerekkel hasonlították össze pl: gélszűrés, ioncserés-, affinitási kromatográfia, elektroforézis és elektrofokuszálas stb.

A membrán preparálás normál humán vörösvérsejtből PARKER és HOFFMANN (1964) módszerével; 10^{-4} M Etiléndiamintetraecetsav (EDTA) jelenlétében készítettünk membránt.

Fehérjemeghatározás: mikrobiuret próba BAILEY (1962) szerint. Mivel a legtöbb fehérjeoldószer zavarja a meghatározást feleslegben alkalmazott 96%-os alkohollal kicsaptuk a feloldott membránfehérjéket és 2 nátriumhidroxidos újra oldás után mértük a fehérjetartalmat.

Az általunk összehasonlított oldási módszerek (l. 1. tábl.) eredményeit elektroforézissel vizsgáltuk urea- β merkaptóetanol (β ME) tartalmú keményítő gélben és nátriumlaurilszulfát (SDS) tartalmú poliakrilamid gélben.

Urea β ME-os keményítő gél AZEN mtsai (1965) szerint készítettük. A gél 8 M ureát, 0,14 M β ME-t tartalmazott pH 3 formiát pufferban. A fehérjefrakciókat mobilitásuknak megfelelően sorszámoztuk l. 1 ábrán. Mennyiségi kiértékelését Zeiss-féle mikrodenzitométerrel végeztük. A mennyiségi ábrákon a globin frakciók és a γ -globulin mobilitását bejelöltük, 1 0,78 0,5 mm/mm-nél levő jelek a globinnak, a 0,3 mm/mm jel pedig a γ globulinnak felel meg.

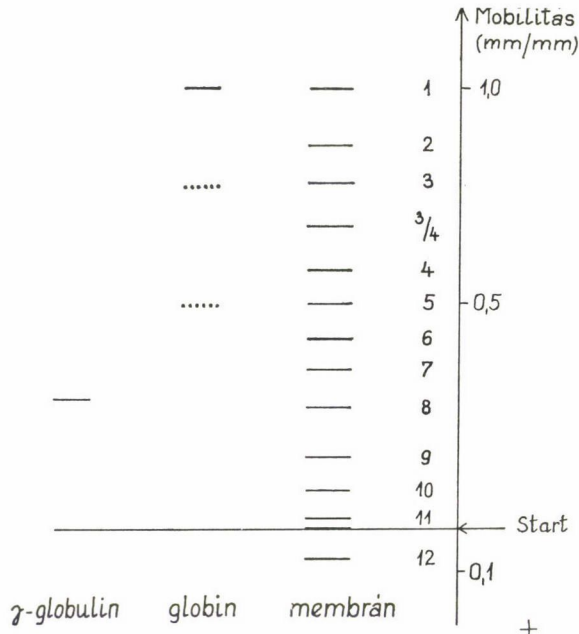
SDS poliakrilamid gél elektroforézis kivitelezése SHAPIRO és mtsai (1967) szerint. A molekulásúlyt WEBERN és OSBORNE (1969) szerint számoltuk ki glutáraldehiddel készült hemoglobin és albumin polimerek segítségével (PAYNE 1973).

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a fenti membrán preparálás után a membránhoz kötötten marad a globulinnak 2—5%-a és a γ globulin egy része. Az 1. ábrán sematikusan ábrázoltuk a tiszta globin és IgG mobilitását is. A globin komponensei közül főleg a főkomponens észlelhető a membrán készítményekben is, ennek mobilitását egységnek vettük és ehhez viszonyítottuk az

1. táblázat

Oldási módszer	Irodalom	Kioldott fehérje (mg/100 mg fehérje)	
		irodalmi	saját
10 ⁻ M EDTA és 5,10 ⁻³ M β ME pH 7,5 szembeni dialízis	TILLACK és mtsai 1970	20	15,25
1 M NaJ	MATSUI és SCHWARZ 1966		23,1
0,8 M NaCl	ROSENBERG és GUIDOTTI 1969		28,7
8 M urea 0,16 M ME pH 9,5	AZEN és mtsai 1965	teljes	54,25
Fenol: ecetsav: urea: víz 2 w: 1 v: 1,2 w: 1 v	LIMBER és mtsai 1970		95
n-butanolos extrakció 1 : 1 0 C°, 25', utána dialízis pH 4,5	ZWAAL és VANDEENEN 1968	teljes	44 *
50% piridinnel törtető oldás után dialízis pH 7	BLUMENFELD 1968		41,7 *
5% saponin	BAKERMANN és WASEMILLER 1967	91,8	28,7
3% SDS	FAIRBANKS és mtsai 1971	100 ~	100
1% SDS és 1% βME	BAKERMANN és WASEMILLER 1967	54,6	100
6 mg deoxykolát/mg fehérje			
5 mg TX 100/mg fehérje	MILLER 1970	~ 50	58

* = vízdíható fehérje

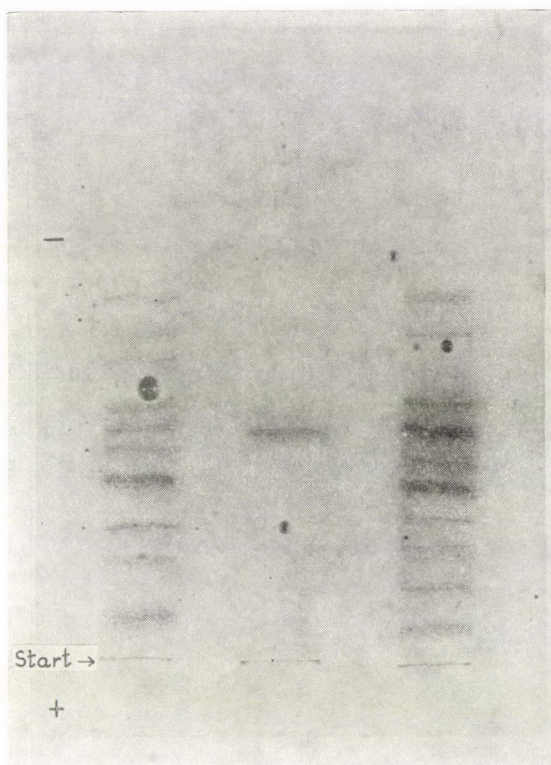


1. ábra. Urea- ME-os keményítő gélben használt számozási rendszer sematikus ábrázolása

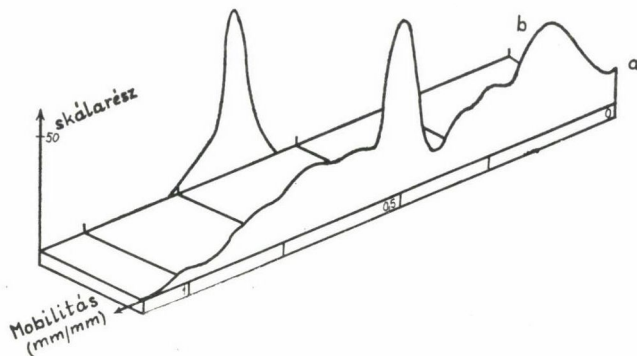
összes többi frakció mobilitását. A globin fő tömege tehát az I frakció az IgG pedig a 8.

A 2. ábrán az urea- β ME-os oldás mellett levő két minta MARCHESI és mtsai (1969) és TILLACK és mtsai (1970) által leírt oldási módszer eredménye, amely 10^{-3} M EDTA és $5 \cdot 10^{-3}$ M β ME szembeni 48 órás dialízissel készült pH 7,5 + 4 °C-on. Az oldás eredménye a „spectrin”. A dialízis után maradt csapadékot AZEN és mtsai (1965) urea- β ME-os hasítójában oldottuk összehasonlítás végett. A mennyiségi összehasonlítás képe 3. ábra. 15,25% fehérjét sikerült kioldani és ez az urea- β ME-os keményítő gélben egységesnek látszik.

A nagy koncentrációjú sóoldattal való oldást 1 M NaJ-ban (MATSUI és SCHWARZ 1966) és 0,8 M NaCl-ban (ROSENBERG és GUIDOTTI 1969) végeztük l. 4. ábrán. NaJ-os oldással 23,1% fehérjét, NaCl-dal 28,7% fehérjét sikerült kioldani. Az 5. ábrán látható a mennyiségi kiértékelés. Viszonylag kevés membránfehérje frakciót eredményeztek ezek az oldások. Egymáshoz viszonyítva a NaCl-os oldás elektroforetogramjából hiányzik a 9. frakció és a mennyiségi eloszlás is különböző.

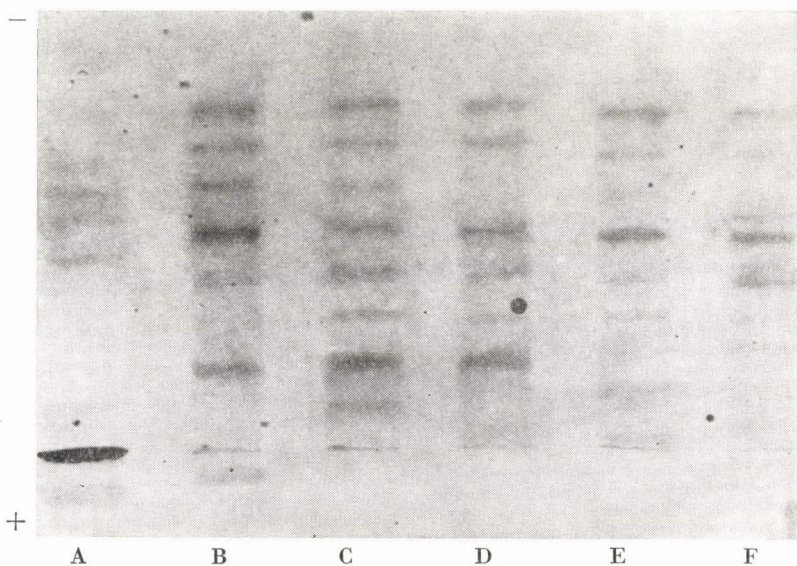


2. ábra. Urea- β ME-os keményítő gél elektroforézis. Minták: középső: Spectrin, melyet membrán szuszpenzióból 10^{-3} M EDTA, $5 \cdot 10^{-3}$ M ME-t tartalmazó oldattal szembeni dialízissel oldottunk ki. Baloldali: dialízis után maradt csapadék urea- β ME-os hasítóval oldva. Jobboldali: membránfehérje urea- β ME-t tartalmazó hasítóval oldva

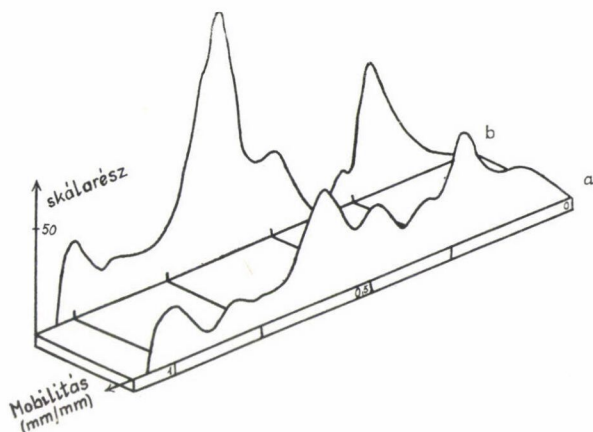


3. ábra. Mennyiségi kiértékelése az EDTA- β ME szembeni dialízissel nyert membrán fehérje elektroforetogramjának. Görbék a: 10^{-3} M EDTA és $5 \cdot 10^{-3}$ M β ME szembeni dialízis csapadéka oldva urea- β ME-os hasítóban. b: spectrin

A detergenses oldások közül az 5% Saponin és a 3% SDS (BAKERMANN és WESEMILLER 1967) eredménye látható a 4. ábrán. A Saponinos módszer 28,7%-os az SDS 91,8%-os gyakorlatilag teljes kioldást eredményezett. A detergenses oldásoknál észleltünk az urea- β ME-os keményítő gélben egy jellegzetesen lassú anódos mobilitású frakciót, amelyet a membránfehérjéhez kötötten maradt anionos detergens okoz. A 6. ábrán a Saponinos oldás mennyi-



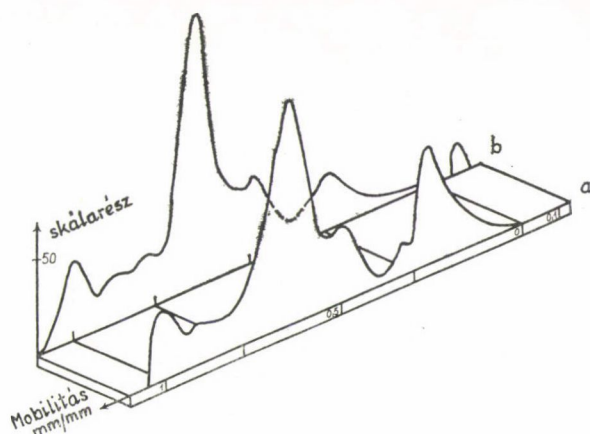
4. ábra. Urea- β ME-os keményítő gél elektroforézis. Minták: A: 3% SDS, B: 5% Saponin, C: 1 M NaJ, D: 0,8M NaCl, E: fenol: ecetsav: urea: víz = 2w: 1,2w: 1v, F: 8 M urea és 0,16 M β ME tartalmú oldószerekkel oldva a membránfehérjék



5. ábra. Mennyiségi kiértékelése a nagy só koncentrációval oldott membrán fehérjék elektroforetogramjának. Görbék: a: 1M NaJ 0,8 M NaCl

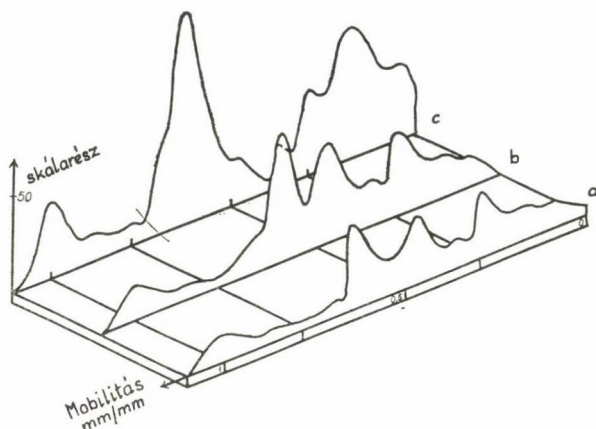
ségi értékelése látható. Az elektroforetogram viszonylag kevés membránfehérje frakciót tartalmaz. Nagy mennyiségi és minőségi hasonlóság mutatkozik a saponin és a NaCl-os oldással nyert membránfehérje komponensek között, eltekintve a detergens oldás jellegzetes frakciójától.

AZEN és mtsai (1965) 8 M ureában és 0,16 M β ME-lel oldották a membránfehérjéket pH 9,5-ön. LIMBER és mtsai (1970) is ureával oldottak savas közegben fenol, ecetsav, urea, víz (2w : 1v : 1,2W : 1 v), (PAU)-keverékkel. Urea- β ME-os hasítóval 54,25%, PAU-val 95% fehérjét oldottunk ki l. 4. ábrát.

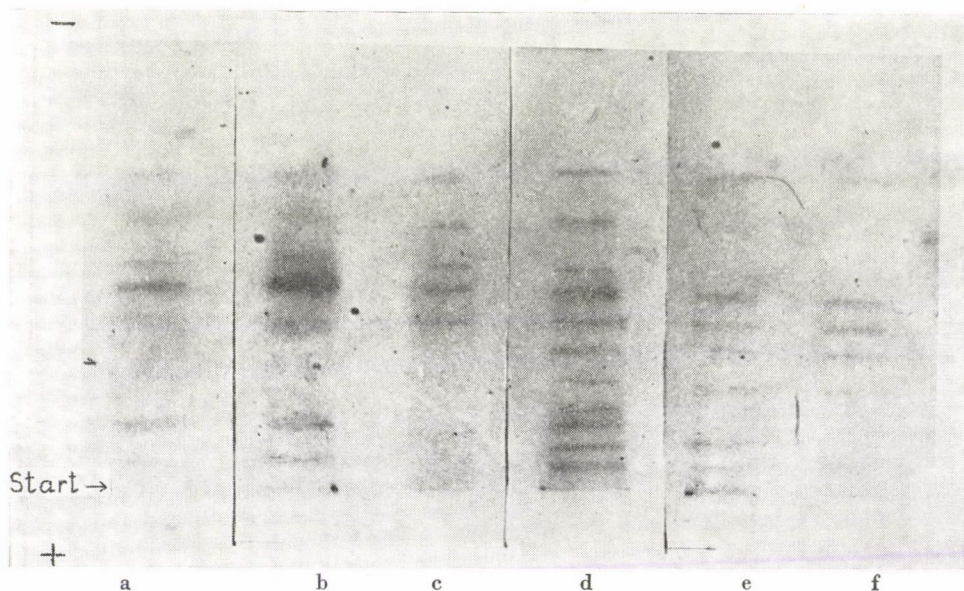


6. ábra. Mennyiségi kiértékelése a 5% saponinnal oldott membrán fehérjék elektroforetogramjának, b görbe: összehasonlítva, a 0,8 M NaCl oldási eredményével

A 7. ábrán látható a két módszerrel nyert fehérjék mennyiségi eloszlása. Igen nagy az eltérés egymáshoz viszonyítva. A PAU oldás egyetlen jellegzetes frakciója a 11, közvetlenül a start előtt. A szerzők az eredeti leírásban urea- β



7. ábra. Mennyiségi kiértékelése a különböző módszerekben használt urea által kioldott membrán fehérjék elektroforetogramjának. Görbék: a: éteres extrakció után oldva 8 M urea, 0,16 M β ME tartalmú hasító oldattal b: éteres extrakció nélkül oldva urea- β ME-os hasítóban c: fenol: ecetsav: urea: víz 2w: 1v: 1,2w: 1v

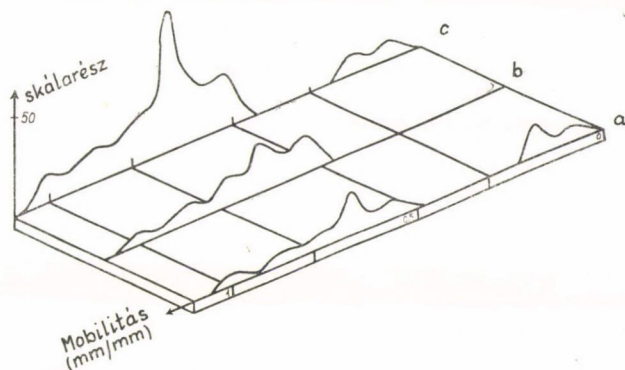


8. ábra. Urea- β ME-os keményítő gél elektroforézis. Vízdíható membrán fehérjék összehasonlítása. a: n-butanolos extrakció vizes fázisa, ezt dializáltuk pH 4,5 desztillált víz ellen b: a felülúszó-vízdíható fehérjék, c: csapadék urea- β ME-os hasítóval oldva. d: piridinnel oldott membrán fehérjék képe ezt dializáltuk desztillált víz ellen e: felülúszó-vízdíható fehérjék f: csapadék urea- β ME-os hasítóval oldva

ME-os oldás előtt éterrel extrahálták a membránt, azonban ROSENBERG és GUIDOTTI (1969) úgy találták, hogy a membránfehérjék 10%-át oldja az éter. Ezért hasonlítottuk össze az éterrel extrahált és az intakt membránproteinek ill. a lipoproteinek elektroforetikus viselkedését. Mint látható a 7. ábrán a frakciók száma, mobilitása és mennyiségi viszonyai nem mutatnak eltérést.

A vízben oldódó membránfehérjéket két módszerrel oldottuk: n-butanolos extrakció (ZWAAL és VAN DEENEL 1968) és piridinnel való oldás (BLUMENFELD 1968) utáni desztilláltvízes dialízissel. MADDY (1964) n-butanolos extrakciót használt ökörvörösvérsejt membrán oldására, később POULIK és LAUF (1965) az emberi vörösvérsejt membránfehérjéket oldották ki n-butanolos extrakcióval. Mi ZWAAL és VAN DEENEN (1968) leírása szerint valósítottuk meg az extrakciót 1 : 1 arányú n-butanollal 0 °C-on 25 percig történő kirázás után pH 4,5-ön dializáltuk a mintákat. Úgy találtuk, hogy 44%-a a n-butanolos extrakció vizes fázisának víz oldható. Az elektroforetogram képe a 8. ábra. A n-butanolos extrakció vizes fázisát és a dialízis után visszamaradt csapadékot urea- β ME-os hasító oldattal oldottuk. Ezekben az esetekben ez a hasító teljesen oldott. A 9. ábra a mennyiségi értékelést mutatja. Az 1., 2., 3., 4., 5. frakciók mindkét fázisban megtalálhatók, míg a 9.10. teljes egészében csak a vizes fázisban vannak. A membránfehérjék teljes oldása lehetséges több, mint 30%-os végkoncentrációjú piridinnel (BLUMENFELD 1968). Az 50% piridinnel történt oldás után nyert frakciók a 8. ábrán láthatók. Desztillált vízzel szembeni dialízis után vízoldhatónak bizonyult az eredeti fehérje 41,7%. A 10. ábrán a mennyiségi értékelés látható. A 1., 4., 5., 6., 7. frakciók egy része vízoldható, míg a 10. és 11. frakciók teljes mennyisége a vizes fázisban látható.

Az 1. összefoglaló táblázatban megtalálható az eddig részletezett oldásokon kívül az anionos dezoxikolat és a nem ionos Triton X 100 (TX 100) detergensnek membránfehérje oldó képessége is. Ezt a kettőt igen elterjedten használják membránfehérje és enzim vizsgálatokhoz, mivel nem szüntetik



9. ábra. Mennyiségi kiértékelése a n-butanolos extrakció után kapott membránfehérjék elektroforetogramjának. Görbék: a: n-butanolos extrakció vizes fázisa oldva urea- β ME-ban b: dialízis utáni csapadék oldva urea- β ME-ban c: vízoldható fehérjék

meg a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat és a legtöbb fehérje megőrzi negyedleges szerkezetét, de jól ismertek az ellenpéldák is. Bár a TX 100-nak kisebb a kölcsönhatása a fehérjékkel, mint az anionos dezoxikolátnak, mégis károsan befolyásolja a Na^+ K^+ Ca^+ ATPáz, citokróm-oxidáz, glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz, adenilát-cikláz bioaktivitását. (HELÉNIUS és SIMON 1972).

A fehérjevizsgálatokban forradalmi fejlődést jelentett az SDS poliakrilamid gél elektroforézis módszerének bevezetése. Ugyanis az anionos detergens SDS és β ME jelenlétében oldott fehérje mintákból lehetőségessé vált, hogy szeparáljuk és molsúly szerint identifikáljuk a fehérjék polipeptid láncait.

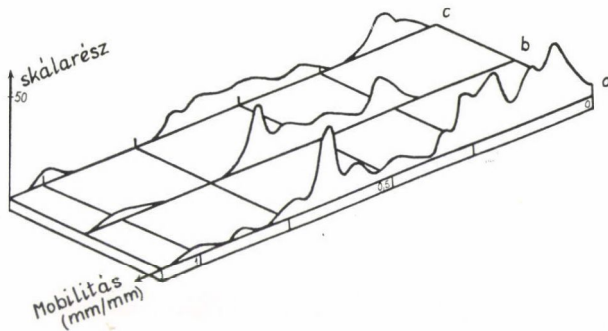
A 11. ábrán látható normál vörösvérsejt membrán SDS poliakrilamid gél elektroforetogramja, ahol a FAIRBANKS és mtsai (1971) számozási rendszerével neveztük el a polipeptid láncokat.

Az SDS poliakrilamid gél igen alkalmas módszer, ha a polipeptid lánc összetétel érdekel, de a hátrány az a mi vizsgálatainknál, hogy a vörösvérsejt membrán összetett fehérjéből álló komplex. Ennek oldása után az elektroforézissel kapott, molsúly szerint eloszlott polipeptid láncok valószínűleg mindegyike heterogén, a polipeptidlánc aminosav szekvenciája szempontjából és lehetnek jelen kismennyiségű polipeptid láncok is (GUIDOTTI 1972). Hogy ez milyen problémát jelent munkánk során, két példát szeretnék itt részletezni.

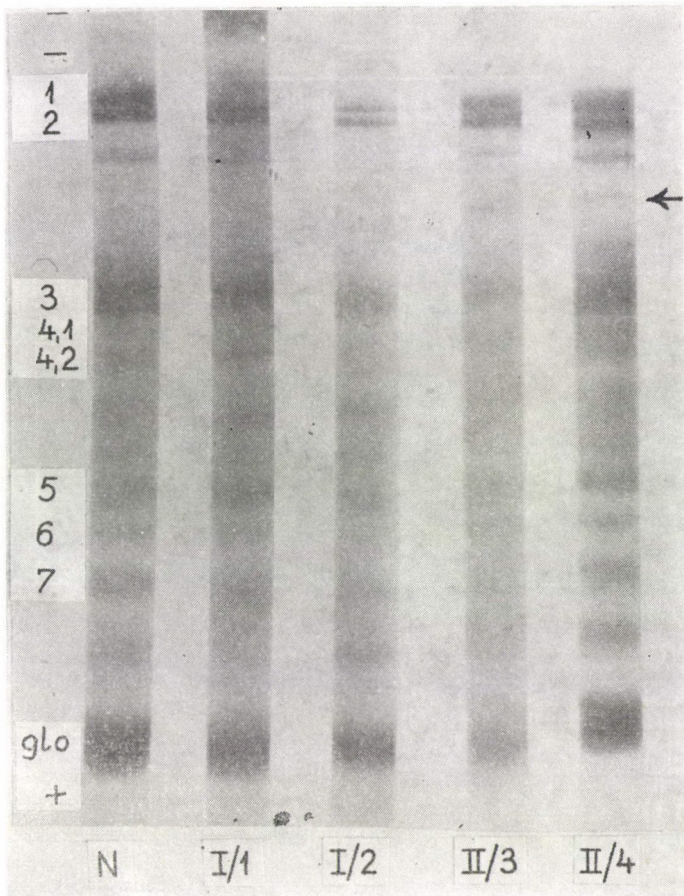
A vörösvérsejt fagyasztásakor glicerint használunk krioprotektív agensként, ennek eltávolítása igen fontos feladat. A 11. ábrán a I a különböző mosással a II agglomerációval glicerint mentesített normál humán vörösvérsejt membránfehérjék elektroforetogramja. Látható, hogy az agglomerációs mentesítési módszerek alkalmazása után $128\ 000 \pm 13\ 000$ dalton molekulasúllyal új polipeptidlánc jelentkezett, mint erről beszámoltunk (HARSÁNYI és mtsai 1975). Azonban az elektroforetogram alapján nem lehet megítélni, vajon egy nagy molsúlyú polipeptidlánc részleges degradációja, vagy kis molekulasúlyú frakciók aggregálódása okozza-e ezt a változást.

A 12. ábrán látható egy zárványtest anaemiás beteg membránfehérje elektroforetogramja, urea- β ME-os keményítő gélben, urea β ME-os hasítóval történt oldás után. Mint erről korábban beszámoltunk (SZELÉNYI és mtsai 1972) új katódos mobilitású frakciók jelentkeztek. Azonban ezekről a mintákról készült SDS poliakrilamid gélen semmiféle változást nem tudunk kimutatni. Tehát az új frakciók alegységeinek molekulasúlya nem különbözik a normál molekulasúly eloszlásától.

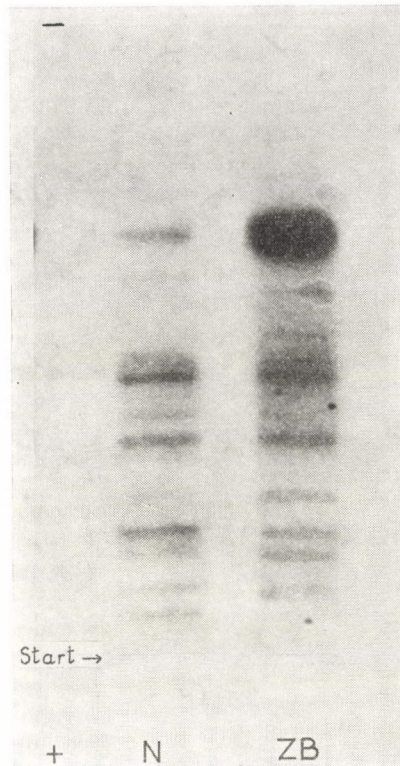
Összefoglalva eredményeinket, gyakorlatban csatlakozunk KAPLAN és CRIDDLE (1971) megállapításához, hogy az urea és SDS tartalmú oldószerek és a gél rendszerek általában kielégítő eredményeket nyújtanak a membránfehérjék karakterizálásához, ez azonban csak a fehérje változások detektálására igaz. Rendkívül gondosan kell azt az oldási módszert kiválasztani, amely a vizsgálandó membránfehérje és további kísérleteink célkitűzéseinek leginkább megfelel.



10. ábra. Mennyiségi kiértékelése a piridinnel oldott membrán fehérjék elektroforetogramjának. Görbék: a: 50% piridinnel oldott, b: dialízis utáni csapadék oldva urea- β ME-ban c: vízóldható fehérjék



11. ábra. SDS poliakrilamid gél elektroforézis. Normális és fagyasztott humán vvs membrán fehérjék elektroforetogramja N normál I/1 és I/2 különböző mosási eljárásokkal II/3 és II/4 különböző agglomerációs eljárásokkal glicerinnel mentesített vvs membrán fehérjék elfoképe (HARSÁNYI és mtsai 1975) \rightarrow új polipeptid lánc. $128\ 000 \pm 13\ 000$ dalton molekulasúlyal



12. ábra. Urea- β ME-os keményítő gél elektroforézis. N normál és ZB zárványtestes anaemiás beteg vvs membrán fehérje elektroforetogramja

IRODALOM

1. AZEN, E. A., ORR S., SMITHIES O.: *J. Lab. Clin. Med.* **65**, 440 (1965).
2. BAILEY, J. L.: *Techniques in protein chemistry* Elsevier Publishing Comp. Amsterdam (1962).
3. BAKERMAN, S., WASEMILLER G.: *Biochemistry* **6**, 1100 (1967).
4. BLUMENFELD O. O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**, 200 (1968).
5. FAIRBANKS G., STECK T. L., WALLACH D. F. H.: *Biochemistry* **10**, 2606 (1971).
6. GUIDOTTI G.: *Ach. Intern. Med.* **129**, 194 (1972).
7. HARSÁNYI V., HASITZ M., BREUER J. H., GÁRDÓS G., HOLLÁN S. R. *Transfúzió* **9**, 87 (1975).
8. HELENIUS A., SIMON, K.: *J. Biol. Chem.* **247**, 3656 (1972)
9. KAPLAN D. M., CRIDDLE, R. S.: *Physiol. Rev.* **51**, 249 (1971).
10. LIMBER G. K., DAVIS R. F., BAKERMANN S.: *Blood* **36**, 111 (1970).
11. MADDY, A. H.: *Biochim. biophys. Acta (Amst)* **38**, 448 (1964).
12. MARCHESI V. T., STEERS E. Jr., TILLACK T. W. MARCHESI S. L.: p. 117. in *The red cell membrane structure and function* Eds Jamiesen G. A. Greenwalt T. J. Lippencott Co. Philadelphia-Toronto (1969)
13. MATSUI H.: SCHWARZ A.: *Biochim. biophys. Acta (Amst)* **123**, 380
14. MILLER, De M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 716 (1970).
15. PARKER, J. HOFFMANN J. F.: *Nature (Lond)* **201**, 823 (1964)
16. PAYNE J. W.: *Biochem J.*, **135**, 867 (1973).

17. POULIK, M. D., LAUF P. K.: *Nature (Lond)* **208**, 864 (1965).
18. ROSENBERG S. A., GUIDOTTI G.: *J. Biol. Chr.* **244**, 5118
19. SHAPIRO A. L., VINUEL E., MAIZEL J. V.): *Biochem. Biophys. Res. Commun* **28**, 815 (1967).
20. Szelényi J. G. BREUE[, J. H. GYÖRFFY GY., HASITZ M., HORÁNYI, M., HOLLÁN, S. R.:
(1972) *Haematológia* **6** 327
21. TILLACK T. W., MARCHESI S. L., MARCHESI V. T., STEERS E., *Biochim. biophys. Acta (Amst)*
200, 125 (1970).
22. WEBERN, K., OSBORNE M., J.: *Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).
23. ZWAAL, R. F. A., VANDEENEN L. L. M L. L. M.: *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **163**,
44 (1968).