

TROMBOCITA MEMBRÁN ÉS KONTRAKTILIS FEHÉRJERENDSZER PREPARATÍV ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREI

HARSÁNYI VERONIKA

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest

A trombocita normál alakja a keringésben: $2-3 \mu$ átmérőjű sima korong. Az 1. ábra sematikusan az ultrastruktúra komponenseit szemlélteti. A $70-90 \text{ \AA}$ átmérőjű plazma-membránt mintegy 200 \AA vastag glikoprotein köpeny veszi körül, ennek tulajdonítható a trombociták nagyfokú adhézis és aggregációs készsége. A mikrotubulusok az alakfenntartó mechanizmust biztosítják, térfogatváltozás nélküli alakváltozást tesznek lehetővé.

A trombocita anyagcseréje részben glikolízis útján biztosított, enzimrendszere a citoszolban van. Az energia termelő folyamatban mitokondriumok is részt vesznek.

A trombosztenin kontraktilis fehérje-rendszer a mikrofibrillumokban lokalizálódik.

A trombocitában van Golgi-rendszer, egyéb organellumai közül az elektrodenz granulumok főként szerotonint, ATP-t, ADP-t, és Ca^{2+} -t tartalmazznak, az α -granulumok lizozomális enzimeket. Az elektronrendez tubuláris rendszer a trombocita Ca^{2+} -tároló szerve, analóg a harántcsíkolt izom szarkoplazmatikus retikulumával (10). A trombocita nyitott csatorna rendszere összeköttetésben van a granulumokkal és a denz tubuláris rendszerrel, a release reakció során a kiválasztott anyagok ezen át jutnak a környezetbe. (13).

A 2. ábra ultravékony metszeti képen mutatja be a struktúrelemeket. Az elektronmikroszkópos preparatív eljárások közül a freeze-etching különösen alkalmas membrán struktúrák vizsgálatára.

Mint látható a táblázatból a négy összehasonlított homogenizálási eljárás közül az ultrahang kezelés és a glicerinnel terhelt sejtek lízise hatásos; az intracelluláris tejsavdehidrogenáz felszabadulás, a membrán marker-enzim p-NPPáz*.

A lizált sejtekből a membrán frakció szeparálása kontinuos vagy diszkontinuos sűrűség gradiens centrifugálással nyerhető (2). A szokásosan alkalmazott szukróz vagy ficoll gradienseken $1-5 \cdot 10^{10}$ trombocitából kiindulva $1-2 \text{ mg}$ membránfehérje nyerhető. A diszkontinuos gradiens tisztább készítményhez lehet jutni. A membrán frakció a plazma membrán mellett részben tartalmazza az organellumok membránjait is.

* P-nitro-fenil-foszfátáz és az épen maradó sejtek száma tekintetében.

Diszkontinuus: 18, 25, 30 és 35% szukróz gradienst alkalmazva, 94 000 xg 60 perces centrifugálásnál a membránfrakció a 30%-os rétegben jelentkezik. Diszkontinuus: 4,12 és 23% ficollon a 4–12%-os határretegben található a membránfrakció, az említett centrifugálási feltételek között (7).

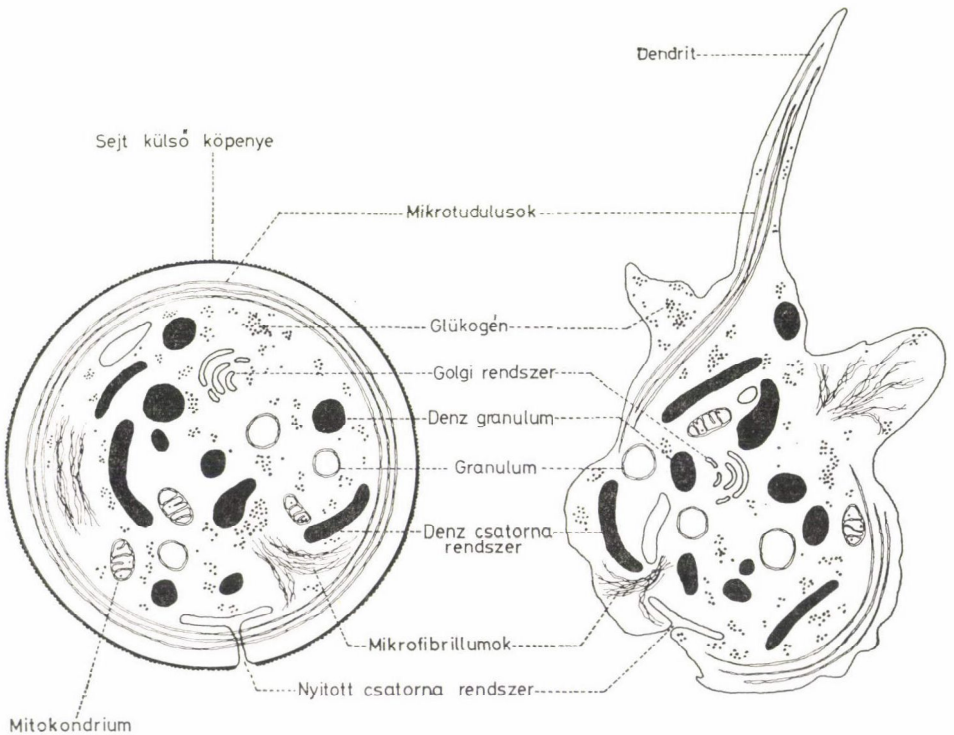
Az 5. ábra a trombocita homogenátum elektronmikroszkópos képe, glicerines lízis után.

A 6. ábra a szukróz gradiensen nyert membránfrakció, a 7. ábra a ficoll gradiensen tisztított membránfrakciót mutatja. A membránfrakció vezikulumai között méretkülönbség van, egyéb sajátásai megegyeznek. A 2. táblázat szemlélteti a teljes trombocita és a kétféle gradiensen tisztított membránfrakció néhány enzimaktivitását (7).

A 3. ábra jól szemlélteti az organelumok membránjait, a 4. ábrán a plazma membrán külső és belső felületének eltérő szemcsézettsége figyelhető meg (5).

1. A trombocita membrán preparálása és vizsgálata

A trombocita kinyerése friss alvadásgátolt vérből, differenciál centrifugálással lehetséges. A plazmafehérjék eltávolítására több módszer alkalmas:



1. ábra. Trombocita ultrastruktúra

- a) sóoldattal való mosás — Ca^{2+} -kötő anyag jelenlétében
- b) albumin gradiens centrifugálás
- c) inert olaj gradiens centrifugálás
- d) géliszűrés, magas kizárási térfogatú oszlopon.

A mosást követő homogenizálást célszerű — endogén proteázok fel szabadulása miatt — proteolitikus inhibitorok jelenlétében végezni. A homogenizálási lehetőségek a következők:

- a) ismételt fagyasztás és felolvasztás
- b) ultrahang kezelés
- c) potter-homogenizálás
- d) glicerinnel terhelt sejtek hipotóniás lízise
- e) detergens kezelés (triton X-100, nonidet P-40, Na-dezoxikolat, digitonin . . .)

Néhány homogenizálási eljárás effektivitását szemlélteti az 1. táblázat (7)

1. táblázat
Homogenizálási módszerek összehasonlítása

Tromboc szám/mm ³	Fagyasztás-felolvasztás 5×	Ultrahang kezelés 4—5 sec	Kettős potterezés 20 min 4C°	Glicerín + hipotóniás lízis
2,6.10 ⁶	1,3.10 ⁶ (49,5%)	4,3.10 ⁵ (16,4%)	2,0.10 ⁶ (76,5%)	3,9.10 ⁵ (15%)
tejsav-dehidrogenáz	53%	94%	60%	85%
p-NPPáz	39%	91%	36%	80%

2. táblázat
Teljes sejt és a membrán-frakciók néhány enzimaktivitása

	Trombocita	membrán (ficoll)	Membrán) (szukróz)
	μmol/óra/mg protein		
p-nitro-fenil foszfatáz	12,2	52,5	40
Na ⁺ , K ⁺ -ATPáz	0,120	0,225	0,195
foszfo-dieszteráz	0,085	0,725	0,680
tejsav-dehidrogenáz	61,8	1,5	3,8
glutaminsav-dehidrogenáz	0,161	0,032	0,041
béta-glükurinidáz	0,209	0,108	0,132
glükóz-6-foszfatáz	0,564	0,114	0,169

A táblázatban szereplő p-NPPáz, Mg^{2+} -függő K^+ - Na^+ -ATPáz és foszfo-dieszterázon kívül a következő enzimek fordulnak elő a trombocita membránban: Ca^{2+} - vagy Mg^{2+} -függő ATPáz, kolineszteráz, savanyú-foszfatáz, 5'-nukle-

otidáz. A membrán külső felületén a kollagén receptor a glükozil-transzferáz, belső felületén a galaktozil-transzferáz. A tisztított membránban mérhető adenil-cikláz aktivitást prosztoglandin E_1 stimulálja, ez a hatás GTP jelenlétében fokozott.

A membránon levő egyik ADP kötőhelyre prosztoglandin E_1 léphet, aggregáció gátló hatást fejtve ki. Ez terápiás készítménynél is eredményesen felhasználható a tárolás folyamán fellépő esetleges aggregáció kiküszöbölésére. A PG- E_1 a c-AMP szintet emeli. A c-AMP aggregáció gátló hatású, magas c-AMP szint a membrán struktúrát stabilizálja, esetleg valamelyik membrán fehérjét foszforilálva stabil konformációt biztosít (6).

A 3. táblázat a trombocita és a membránfrakciók foszfolipid összetételét mutatja (7).

3. táblázat

Teljes sejt és a membrán-frakciók foszfolipid összetétele

	Trombocita	Membrán (ficoll)	Membrán (szukróz)
szfingomielin	17,7 ± 0,03	3,3 ± 0,02	3,6 ± 0,03
foszfatidil-kolin	32,2 ± 2,5	31,4 ± 1,5	32,7 ± 1,7
foszfatidil-inozitol	8,3 ± 2,6	3,3 ± 1,2	6,4 ± 1,9
foszfatidil-szerin	12,6 ± 3,5	3,6 ± 1,5	3,9 ± 1,5
foszfatidil-etanolamin	22,1 ± 3,4	26,2 ± 2,1	25,4 ± 2,4

A teljes trombocita és a membrán frakciók SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel nyert képét a 8. ábra mutatja (7). Mind a teljes homogenátumban, mind pedig a membrán frakciókban igen sok a komponens és polipeptid láncok tekintetében nagy heterogenitást mutat. PAS-festéssel 3 fő glükoprotein komponens mutatható ki a membránfrakciókban, a 150 000 és 80 000 daltonos tartományban (6).

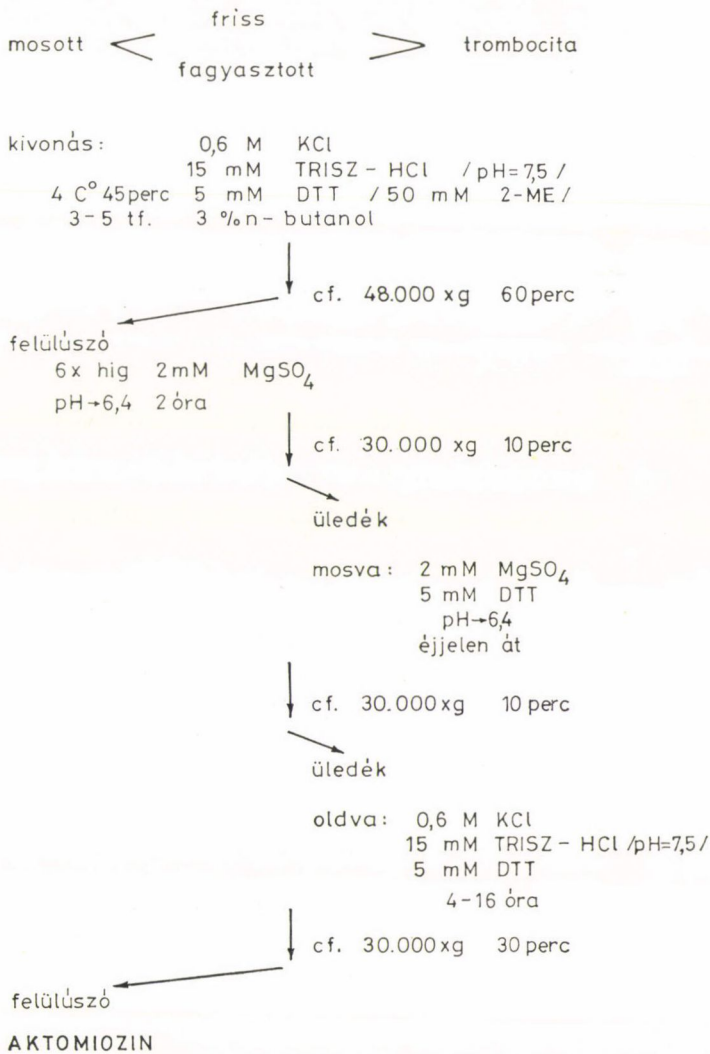
A trombocita Ca-tartalma más sejtekhez, szövetekhez viszonyítva (vázizom, simaizom, kötőszövet, vesesejtek) magas, 4–5-szörös. A teljes trombocita 58nM Ca^{2+} -t tartalmaz mg fehérjére számítva. A Ca^{2+} 98%-a fehérjéhez kötött. A membránfrakcióban a Ca^{2+} 21%-a kapcsolódik lipidhez, szfingomielinhez és foszfatidil-kolinhoz (11).

A trombocita metabolikus nukleotid pool-ját *in vitro* jelölni lehet radioaktív foszfáttal, adenzinnal, vagy adeninnel. A release reakcióban a jelzett komponensek nem távoznak. A nem-metabolikus nukleotid pool, amely a szubcelluláris granulumokban tárolódik, és a release reakció során szekretálódik, izotóppal nem jelölhető. A h. trombocitában az adenin nukleotidok 60%-a a szekréciós poolban van.

A gyorsan kicserélődő Ca^{2+} -pool az elektrodenz tubuláris rendszerben van. A citoszolban a Ca-kötő fehérje a kontraktilis rendszerhez tartozó troponin.

2. A trombocita kontraktilis fehérjerendszere

A trombocita összfehérje mintegy 15%-át a trombosztenin kontraktilis rendszer teszi ki. A 9. ábra a trombocita aktomiozin filamentáris rendszerét mutatja, negatív festéssel preparált, elektronmikroszkópos felvételen. A sima, vastagabb filamentumok a miozin filamentumok, az aktin filamentumok pedig nyúlizomból nyert nehéz-meromiozinnal (HMM) dekoráltak. Ezzel a módszerrel lehet kimutatni az aktintípusú filamentumokat valamennyi kontraktilis rendszerben, ezek ui. harántcsíkolt izomból nyert HMM-al a jellegzetes arrow-head struktúrát adják. Amint a 9. ábrán látszik a mikrotubulusok kontraktilis fehérjéje HMM-nal nem reagál, vagyis nem aktinszerű anyag. (3).

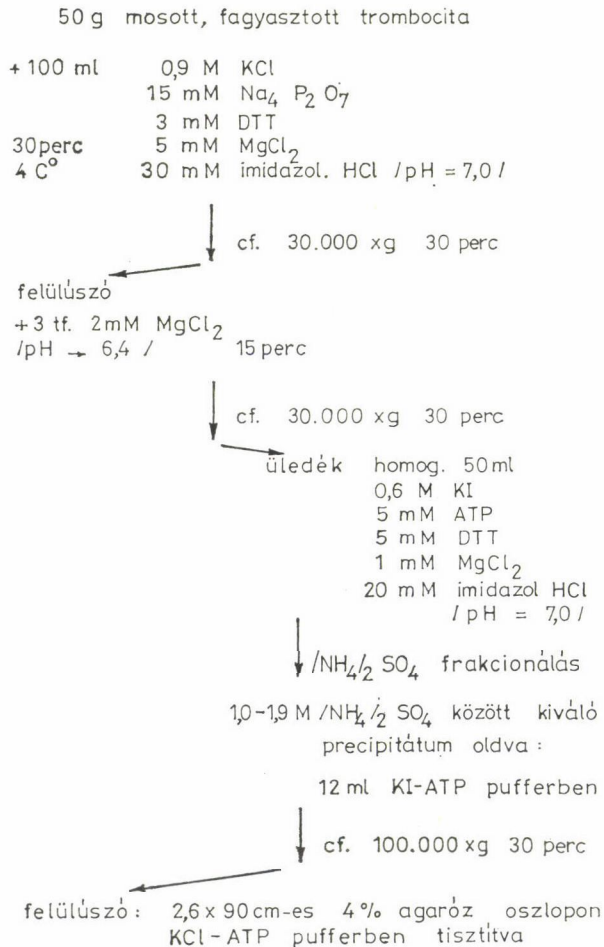


A trombocita kontraktilis fehérje rendszere, a trombosztenin a következő trombocita funkciókban vesz részt:

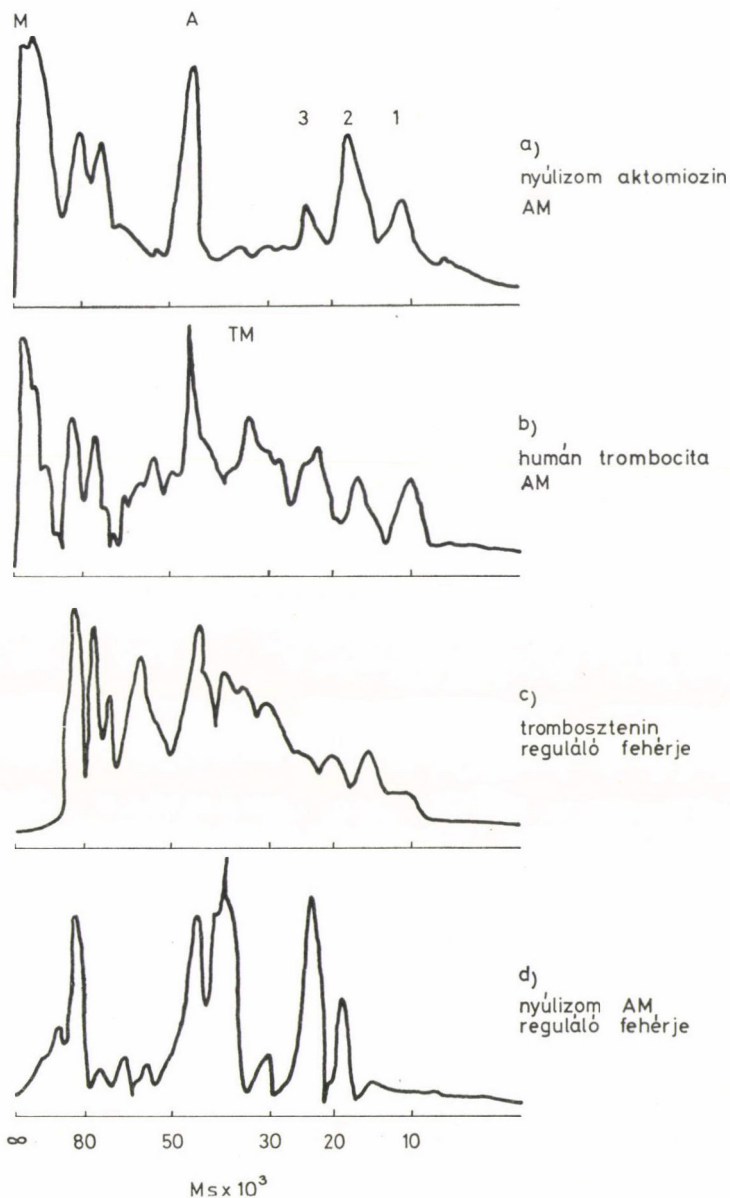
- a) biztosítja a trombociták gyors alakváltoztatását
- b) lehetővé teszi az organellumok centrális elmozdulását a release reakciót megelőzően
- c) részt vesz az aggregáció folyamatában
- d) biztosítja az alvadék összehúzódását.

Ezek a felsorolt folyamatok Ca^{2+} -igényesek és SH-csoportok intaktságát feltételezik. Így pl. a membrán bizonyos -SH csoportjai részt vesznek az aggregációban, a retrakcióhoz pedig intracelluláris -SH csoportok épsége szükséges (4). A trombosztenin előállítása a következő séma szerint történhet: (1).

A nyert aktomiozin Mg^{2+} és ATP jelenlétében 100 000 xg-s centrifugálással részben miozinná (felülúszó) és F-aktinná szétválasztható, de nem ad aktinmentes terméket.



További tisztítása $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fracionálással lehetséges. A következő preparálási eljárással a trombocita miozin aktin-mentesen nyerhető (9).



10. ábra. a) nyúl vázizom aktomiozin b) humán trombocita aktomiozin (100 μg) 0,1% SDS, 10% poliakrilamid-gél denzitogramja M = miozin nehéz lánc, A = aktin, 1, 2, 3, = miozin könnyű láncok, TM = tropomiozin c) trombosztenin reguláló fehérjerendszere d) nyúlizom aktomiozin reguláló fehérjei

A 10. ábra a nyúlizom aktomiozin és az emberi trombocita aktomiozin SDS-poliakrilamid gél denzitogramja. A miozin- és aktin-komponens azonos molekulásúlyértéknél jelentkezik. A számmal jelzett miozin könnyű láncok eltérőek. A trombocita aktomiozin a nyúlizoméznál több tropomiozint tartalmaz.

A c. és d. denzitogram a trombocita aktomiozin és a nyúlizom aktomiozin Ca-reguláló fehérjéit mutatja. A trombocitában a troponin-tropomiozin rendszer komponensei mennyiségi és minőségi eltérést mutatnak, a nyúlizoméval összehasonlítva (12). A vázizom aktomiozin, nem-izom és trombocita aktomiozin ATP-áz néhány jellemzőjét a 4. táblázat tartalmazza (8).

4. táblázat

Vázizom, sima- és nem-izom, valamint trombocita aktomiozin ATPáz aktivitásának jellemzői

Módosító	Vázizom AM	Sima és nem izom AM	Trombocita AM
ionerősség (I) kétértékű ion (alacsony I)	magas < alacsony I $\text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$	magas > alacsony I $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$	magas > alacsony I $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+}$
urea (0,5–1,5 M)	részleges gátlás	aktiválás	aktiválás
parc. tripszin emésztés	—	aktiválás	aktiválás
szubsztrát analogok	$\text{ITP} > \text{UTP} > \text{GTP} >$ $> \text{ATP} > \text{CTP}$	$\text{ATP} > \text{ITP} >$ $> \text{GTP}$	$\text{ATP} > \text{UTP} >$ $> \text{ITP} = \text{GTP} =$ $= \text{CTP}$
EDTA (magas I)	aktiválás	gátlás	gátlás

Ma már valószínűnek látszik, hogy valamennyi sejt plazmamembránja aktomiozinszerű kontraktilis fehérjét tartalmaz. Így érdemes egyidejűleg foglalkozni valamely sejt membránja és kontraktilis fehérjerendszere vizsgálatával.

Az utóbbi években a nem-izom kontraktilis rendszernek vizsgálata előtérbe került, mivel számos alapkérdést — főként a vázizom működése vonatkozásában — molekuláris szinten sikerült tisztázni.

Magunk is vizsgáltuk a trombocita membránrendszerét és a kontraktilis fehérje-rendszer egyik alapkomponeit, a trombocita miozin molekuláris szerkezetét.

Vizsgálatainkról a budapesti FEBS-en számoltunk be.

IRODALOM

1. ADELSTEIN, E. S., CONTI, M. A., ANDERSON, W. Jr.: Phosphorylation of human platelet myosin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 3115 (1973).
2. BARBER, A. J., JAMIESON, G. A.: Isolation and characterization of plasma membranes of human blood platelets. *J. Biol. Chem.* **245**, 6357 (1970).
3. BEHNKE, O., KRISTENSEN, B. I., NIELSEN, L. E.: Electron microscope observations on actionid and myosinoid filaments in blood platelets. *J. Ultrastructure Res.* **37**, 351 (1971).
4. HARBURY, C. B., SCHRIER, S. L.: Modification of platelet SH-groups. *Thrombos. Diathes. Haemorr.* **31**, 469 (1974).
5. HOAK, J.: Freeze-etching studies of human platelets. *Blood* **40**, 514 (1972).
6. JAMIESON, G. A., BARBER, A. J.: Biochemistry of platelet membranes. *Thrombos. Diathes. Haemorr.* **54**, 239 (1973).
7. KAULEN, H. D., GROSS, R.: Metabolic properties of human platelet membrane. *Thrombos. Diathes. Haemorr.* **30**, 199 (1973).
8. MALIK, N. M., ABRAMOWITZ, J., DETWILER, Th. C., STRACHER, A.: Enzymatic properties of platelet actomyosin. *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 268 (1974).
9. POLLARD, Th. D., THOMAS, S. M., NIEDERMAN, R.: Human platelet myosin I. *Anal. Biochem.* **60**, 258 (1974).
10. SKAER, R. J., PETERS, P. D., EMMINES, J. P.: The localization of Calcium and Phosphorus in human platelets. *J. Cell. Sci.* **15**, 679 (1974).
11. STEINER, M., TATEISHI, T.: Distribution and transport of Calcium in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **367**, 232 (1974).
12. THORENS, S., SCHAUB, M. C., LÜSCHER, E. F.: A Ca-sensitizing system from human platelets. *Experientia* **29**, 349 (1973).
13. ZUCKER, M. B.: Blood platelets in hemostasis. *Trans. N. Y. Acad. Sci. II.* **36**, 561 (1974).