

## MEMBRÁNOVÉ GLYKOPROTEÍNY TROMBOCYTOV

JANA TOMÁŠKOVÁ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika, e-mail: tomaskova@ubgz.savba.sk

Došlo dne 16.IX.1999

---

 Kľúčové slová: membránové glykoproteíny, trombocyty
 

---

## Obsah

1. Úvod
2. Glykoproteínový Ib-V-IX komplex
3. GPIIb-IIIa
4. GPIa-IIa
5. CD36
6. P-Selektín
7. PECAM-1
8. CD9

## 1. Úvod

Trombocyty zastavujú krvácanie z poškodených krvných ciev a iniciujú opravné mechanizmy. Ďalšími predpokladanými úlohami trombocytov je ich účasť v iných patologických stavoch, akými je zápal, astma alebo obrana organizmu proti parazitom<sup>1,2</sup>. Pre tieto funkcie obsahujú veľa dôležitých komponentov, pričom povrchové glykoproteíny sú kritické pre dva procesy, adhéziu a agregáciu.

U trombocytov sa pod adhéziou rozumie príľnutie doštičiek k subendotelovému alebo iným bunkám, kým adhézia trombocytu k trombocytu je nazývaná agregáciou. Primárna adhézia predstavuje naviazanie doštičiek v kľudovom stave k subendotelovým bunkám a sekundárna adhézia naviazanie aktivovaných trombocytov k subendotelu. Primárna adhézia zahŕňa niekoľko rozličných štádií. Na začiatku sa glykoproteínový (GP) Ib-V-IX komplex (CD42) naviaže na von Willebrandov faktor, ktorý je asociovaný s kolagénom na subendotelovom povrchu. Viacnásobné naviazanie spôsobí zastavenie trombocytov, ich zachytenie na povrchu, čo vedie k aktivácii ďalších receptorov<sup>1</sup>.

Receptor pre kolagén, GP Ia-IIa, je dôležitým sekundárnym receptorom pre adhéziu a aktiváciu trombocytov. Je esenciálny pre indukciu procesu „rozprestierania sa“ trombocytov, ktorý je sprostredkovaný glykoproteínovým komplexom GPIIb-IIIa (cit.<sup>3,4</sup>). Ďalšie (sekundárne) receptory pomáhajú zosilniť väzbu k povrchu a pôsobia ako rezerva v patologických situáciách. Sem patria receptory pre fibronektín (GPIc-IIa), laminín (GPIc'-IIa) a vitronektín ( $\alpha_v\beta_3$ ) (cit.<sup>5-7</sup>). GPIIb-IIIa je obzvlášť dôležitý pri agregácii aj pri rozprestieraní trombocytov. Pri agregácii dochádza ku konformačnej zmene

GPIIb-IIIa, čím sa odkryje väzobné miesto pre fibrinogén<sup>8</sup>. Nasleduje aktivácia ďalších signálnych komponentov indukujúcich asociáciu GPIIb-IIIa s cytoskeletom, čo vedie k zoskupeniu receptorov, potrebného pre agregáciu trombocytov<sup>9,12</sup>. Ďalšie glykoproteínové receptory, napr. pre receptor trombospondín pravdepodobne zosilňujú a stabilizujú spojenie doštičiek<sup>7</sup>.

Trombocyty majú ďalšiu skupinu receptorov, podieľajúcich sa na väzbe s inými bunkami, ktoré môžu zohrávať úlohu v reparačných procesoch (neutrofilny a monocyt). Jeden z nich, PECAM, je exprimovaný na neaktivovaných trombocytoch<sup>13,14</sup>. Na druhej strane,  $\alpha$ -granulárny P-selektín je exprimovaný iba na aktivovaných doštičkách, ktoré uvoľnili obsah granúl<sup>15</sup>.

Jedným z hlavných glykoproteínov na povrchu trombocytov je CD9 antigén, ktorého funkcia nie je známa, ale predpokladá sa, že má podstatný fyziologický význam (viď nižšie). Okrem spomenutých proteínov je na povrchu ešte veľa ďalších minoritných molekúl, ktoré zahŕňajú rôzne typy receptorov a množstvo iných molekúl s neznámou funkciou (tab. I).

## 2. Glykoproteínový Ib-V-IX komplex

Glykoproteínový Ib-V-IX komplex (CD42a, b a c) pozostáva zo štyroch reťazcov. GPIb (CD42b) obsahuje GPIb $\alpha$  (150 kDa) a GPIb $\beta$  (27 kDa) spojené disulfidovou väzbou<sup>16</sup>, pričom GPIX (22 kDa; CD42a) je asociovaný silnou nekovalentnou väzbou v pomere<sup>17</sup> 1:1 a GPV (CD42c; 82 kDa) je naviazaný na komplex slabou nekovalentnou väzbou v pomere 1:2 (GPV:GPIb;) (cit.<sup>18</sup>). Na každom trombocyte sa nachádza okolo 25 000 kópií GPIb-IX (cit.<sup>19</sup>).

GPIb komplex je exprimovaný iba megakaryocytmi a trombocytmi. Na erytrocytoch, granulocytoch, T bunkách a tymocytoch sa nenachádza<sup>20</sup>. Zohráva kritickú úlohu v prvých štádiách naviazania trombocytov na exponované subendotelium. GPIb komplex bol identifikovaný ako receptor pre von Willebrandov faktor<sup>1</sup> a tiež pre trombin, ale to pravdepodobne len vtedy, keď CD42-GPV komplex je multimerický<sup>20</sup>.

Štúdiom porúch krvácania spôsobených mutáciami v GPIb $\alpha$  a vo vWf (Bernardov-Soulierov syndróm, typ 2B a trombocytový typ vWf deficiencie) bolo zistené, že zmeny v konformácii buď GPIb $\alpha$  (cit.<sup>21</sup>) alebo vWf (cit.<sup>22</sup>) môžu indukovať väzbu medzi týmito dvomi molekulami. Predpokladá sa, že za fyziologických podmienok väzba vWf na kolagén spôsobí jeho konformačnú zmenu, ktorá umožní naviazanie GPIb. Tak ako dochádza k spontánnej väzbe indukovanej bodovými mutáciami, tak sa interakcia objavuje aj medzi GPIb a ľudským vWf, ktorý bol opracovaný neuroamidázou kvôli odstráneniu kyseliny sialovej<sup>23</sup> alebo bovinným, prípadne prasačím vWf.

Mechanizmus transdukcie signálov komplexom GPIb-V-IX je centrom záujmu kvôli jeho významnej úlohe vo funkcii krvných doštičiek. Zo štruktúry GPIb-V-IX komplexu je ťažké usudzovať akým spôsobom prechádza signál cez membránu, pretože väzobné miesta pre vWf sú relatívne ďaleko od povrchu trombocytu. Niekoľko pozorovaní však naznačuje možný mechanizmus prenosu signálu: i) je známe, že GPIb komplex

Tabuľka I  
Prehľad najznámejších trombocytových glykoproteínov

| CD Antigen                 | Antigen                                    | M <sub>r</sub> (kDa) |                | Expresia<br>(molekuly/trombocyt) |
|----------------------------|--|----------------------|----------------|----------------------------------|
|                            |  | R <sup>a</sup>       | N <sup>b</sup> |                                  |
| CD9 <sup>68,70</sup>       | p24  | 22–27                | 22–27          | 35 000–65 000                    |
| CD23 <sup>20</sup>         | FcεRII                                     | 45                   | 45             | ND <sup>c</sup>                  |
| CD31 <sup>13,14</sup>      | PECAM-1                                    | 130–140              | 130–140        | ND <sup>c</sup>                  |
| CD32 <sup>20</sup>         | FcγRII                                     | 40                   |                | ND <sup>c</sup>                  |
| CD36 <sup>51</sup>         | GPIV                                       | 88                   | 88             | 25000                            |
| CD41/CD61 <sup>20,32</sup> | GPIIb-IIIa                                 | 125+22/105           | 140/90         | 50000–80000                      |
| CD42a <sup>1,18,19</sup>   | GPIX                                       | 22                   | 22             | 25000                            |
| CD42b <sup>1,16,17</sup>   | GPIb                                       | 150+27               | 160–170        | 25000                            |
| CD42c <sup>1,18</sup>      | GPV  | 82                   | 82             | 25000                            |
| CD49b/CD29 <sup>3,20</sup> | VLA-2 integrín, GPIa-IIa                   | 165/130              | 160/115        | 2000                             |
| CD49e/CD29 <sup>5,20</sup> | VLA-5 integrín, GPIc-IIa                   | 135+25/130           | 155/115        | 1000                             |
| CD49f/CD29 <sup>6,20</sup> | VLA-6 integrín, GPIc'-IIa                  | 120+30/130           | 140/115        | 1000                             |
| CD51/CD61 <sup>7,20</sup>  | α <sub>v</sub> β <sub>3</sub>              | 125+24/105           | 150/90         | ND <sup>c</sup>                  |
| CD62p <sup>59-61</sup>     | P-selektín, PADGEM, GMP-140                | 140                  | 140            | 1000–10000 <sup>d</sup>          |
| CD63 <sup>20</sup>         | ME 491, MLA 1                              |                      | 53             | 650–12600 <sup>d</sup>           |
| CD107a <sup>20</sup>       | LAMP-1                                     | 120                  | 120            | <2000                            |
| CD107b <sup>20</sup>       | LAMP-2                                     | 120                  | 120            | <2000                            |
| CD109 <sup>20</sup>        | G <sub>ov</sub> <sup>a/b</sup> alloantigen | 175                  | 175            | ND                               |

<sup>a</sup> SDS-PAGE za redukujúcich podmienok, <sup>b</sup> SDS-PAGE za neredukujúcich podmienok, <sup>c</sup> nedefinované, <sup>d</sup> počet molekúl na membráne aktivovaného trombocytu

je spojený s cytoskeletom asociovaným s membránou cez proteín viažuci aktín (filamín)<sup>25</sup>; *ii*) zistilo sa, že GPIIbβ je fosforylovaný na cytoplazmatickej doméne na Ser-166 a táto fosforylácia zohráva úlohu v kontrole polymerizácie aktínu<sup>26</sup>; *iii*) zistilo sa, že aktivácia trombocytov je spojená s redistribúciou GPIIb-V-IX na otvorený kanálikový systém, na rozdiel od GPIIb-IIIa, ktorého množstvo sa zvyšuje na povrchu doštičiek<sup>27</sup>; *iv*) pri Bernardovom-Soulierovom syndróme (BSs), kde na povrchu trombocytov chýba GPIIb komplex, sú doštičky obrovské a ich membrány sú ľahšie deformovateľné<sup>29</sup>. Okrem toho bolo zistené, že u BSs trombocytov je znížená aktivita fosfolipázy C (PLC) (cit.<sup>29</sup>). Dôkazom, že GPIIb má spojitosť s aktiváciou GPIIb-IIIa, pochádza zo štúdií trombocytov s Glanzmannovou trombasténiou (absencia GPIIb-IIIa na povrchu trombocytov). Ak sú takéto trombocyty agregované s boviným vWf, na rozdiel od normálnych doštičiek, netvorí veľké stabilné agregáty, ale agregáty variabilnej veľkosti<sup>30</sup>. Vysvetlením tohto javu by mohlo byť, že naviazanie boviného vWf na GPIIb indukuje zatiaľ hypotetické signály, ktoré aktivujú GPIIb-IIIa k väzbe fibrinogénu (alebo vWf), čo vedie v dôsledku spätnej väzby k formovaniu stabilných agregátov. V neprítomnosti GPIIb-IIIa nemôže dôjsť k spätnej väzbe ani k stabilizácii. Hoci iné typy receptorov podliehajú rôznym typom adaptačných reakcií, pre GPIIb/vWf systém zatiaľ nebol ani jeden z nich identifikovaný. Po aktivácii môže GPIIb vytvárať zhluky, čo vedie k pevnejšiemu naviazaniu vWf (cit.<sup>1</sup>).

Ďalšou úlohou GPIIb je jeho účasť v aktivácii doštičiek trombínom. Je známe, že trombocyty majú receptor pre trombín, ktorý patrí do rodiny proteínov sedemkrát prechádzajúcich membránou. Bolo dokázané, že pri fyziologických kon-

centráciach trombínu GPIIb amplifikuje odpoveď trombocytov na túto proteázu<sup>31</sup>.

### 3. GPIIb-IIIa

GPIIb-IIIa komplex (CD41/61, α<sub>2</sub>/β<sub>3</sub> integrín) patrí medzi hlavné glykoproteíny na povrchu trombocytov s 50 000 až 80 000 kópiami na trombocyt<sup>32</sup>. Je to heterodimér, ktorého tvorba je závislá na Ca<sup>2+</sup> (cit.<sup>33</sup>) a patrí do rodiny integrínov<sup>34</sup>. GPIIb má relatívnu molekulovú hmotnosť 140 kDa; je zložený z väčšej podjednotky (GPIIbα, 125 kDa) a menšej transmembránovej podjednotky (GPIIbβ, 22 kDa). GPIIIa je jednoduchý polypeptidový reťazec s molekulovou hmotnosťou 90 kDa za redukujúcich podmienok, resp. 105 kDa za neredukujúcich podmienok<sup>20</sup>.

GPIIb-IIIa slúži ako receptor pre viacero adhezívnych proteínov, fibrinogén<sup>35</sup>, fibronektín<sup>36</sup>, von Willebrandov faktor<sup>37</sup>, trombospondín<sup>38</sup> a vitronektín<sup>39</sup>. Tak ako iné integrínové receptory, na týchto proteínoch špecificky rozpoznáva tripeptid so sekvenciou R-G-D (arginín-glycín-kyselina asparagová)<sup>40</sup>. Na rozdiel od ostatných integrínových receptorov sa GPIIb-IIIa viaže aj na HHLGGAKQAGDV sekvenciu v γ-reťazci fibrinogénu<sup>20</sup>.

V nestimulovaných trombocytoch je receptor prítomný na povrchu a v α-granulách<sup>41</sup> v neaktívnej konformácii a má nízku afinitu k rozpustnému fibrinogénu, pritom však rozpoznáva povrchovo-viazaný fibrinogén<sup>42</sup>. Aktivácia trombocytov agonistami, napr. trombínom, ADP alebo tromboxánom A<sub>2</sub>, vedie k zmene konformácie a k rýchlemu zvýšeniu afinity receptora k fibrinogénu a iným adhezívnym proteínom<sup>8</sup>.

Po naviazaní fibrinogénu dochádza k ďalším konformačným zmenám receptora, výsledkom ktorých je expresia niekoľkých nových epitopov (LIBS, ligand-induced binding sites)<sup>9</sup>. Tie sú pravdepodobne dôležité z hľadiska funkcie, pretože protilátky rozpoznávajúce tieto miesta, spôsobujú agregáciu trombocytov alebo inhibujú nasledujúce procesy závislé na GPIIb-IIIa, napr. zmršťovaciu reakciu<sup>43</sup>.

Aktivácia GPIIb-IIIa a naviazanie fibrinogénu sú iba začiatkom procesu agregácie trombocytov. GPIIb-IIIa po naviazaní ligandu nie je pasívnym receptorom, ale prenáša signály, vedúce k tvorbe fokálnych adhezívnych bodov (miesta, kde sa lokalizujú a aktivujú proteín kinázy), novému usporiadaniu cytoskeletu a neskorej aktivácii fosfolipáz a fosfoinozitol fosfát kinázy<sup>10,44</sup>. Prenášanie signálov pravdepodobne vyžaduje zoskupenie GPIIb-IIIa receptorov, ktoré je sprostredkované polyvalentným ligandom, akým je fibrinogén<sup>11</sup>. Okrem expozície receptora a zoskupovania membránových komplexov, spôsobuje aktivácia trombocytov aj expresiu v cytoplazme lokalizovaného GPIIb-IIIa na povrchu buniek<sup>45</sup>.

Tak ako receptor, aj ligand podlieha konformačným zmenám, ktoré sa prejavujú expozíciou nových epitopov (RIBS, receptor-induced binding sites)<sup>46</sup>. Zmena v konformácii umožňuje fibrinogénu rozpoznávať neaktivované receptory, indukovať interakciu s cytoskeletom a fosforylačnú kaskádu, a tak získať ďalšie trombocyty do tvoriaceho sa agregátu<sup>12</sup>.

GPIIb-IIIa zohráva rozhodujúcu úlohu nielen v agregácii trombocytov, ale aj v ich adhézii a rozprestieraní sa. Trombocyty s Glanzmannovou trombasténiou, ktorým chýba GPIIb-IIIa, ukazujú zredukovanú adhéziu k subendotelu, aj keď nie tak dramaticky ako u BSs, kde chýba GPIb (cit.<sup>47</sup>). Taktiež majú oproti normálnym bunkám výrazne menšiu kontaktnú plochu<sup>48</sup>, čo naznačuje potrebu GPIIb-IIIa receptora pri rozprestieraní trombocytov adherovaných na subendotelum.

#### 4. GPIa-IIa

Glykoproteín GPIa-IIa (CD49b/CD29, VLA-2 integrín) je heterodimér pozostávajúci z  $\alpha 2$ -integrínovej podjednotky (CD49b; 165 kDa za redukujúcich podmienok, resp. 160 kDa za neredukujúcich podmienok) a  $\beta 1$ -integrínovej podjednotky (CD29; 130 kDa, resp. 115 kDa), ktoré sú navzájom nekovalentne asociované<sup>20</sup>. Tento integrín je prítomný na povrchu trombocytov v oveľa menšej miere ako GPIIb-IIIa (2000 kópií), čo pravdepodobne súvisí s jeho úlohou v adhézii a aktivácii, ale nie v agregácii. GPIa-IIa je hlavným receptorom pre kolagén<sup>3</sup>. Je zahrnutý v adhézii trombocytov k rozličným typom (typ I až VIII) kolagénov<sup>4</sup>. Ak je GPIa-IIa nefunkčný, adhézia trombocytov sa znižuje; trombocyty sú veľmi slabo asociované so subendotelom, sú prichytené len na málo bodoch a nie sú aktivované alebo rozprestreté, čo poukazuje na adhéziu iba cez väzbu GPIb na vWf (cit.<sup>49</sup>). GPIa-IIa viaže kolagén konštitutívne<sup>50</sup>, ten aktivuje trombocyty (fosforylácia tyrozínu u P125<sup>FAK</sup>), čo je klasickým príkladom signalizácie zabezpečujúcej bunkovú interpretáciu vonkajšieho prostredia („outside-in“ signalizácia).

#### 5. CD36

CD36 je molekula s jedným refazcom (88 kDa), ktorá sa nachádza v membránach širokého spektra buniek, včítane

trombocytov, monocytov, epitelových a endotelových buniek<sup>51</sup>. CD36 je hydrofóbná molekula, ktorá je rezistentná k proteolytickej degradácii v membráne. V trombocytoch pôsobí ako receptor pre trombospondín a kolagén. Dôvodom, prečo trombocyty, ktorým chýba CD36, majú tú istú kapacitu viazať trombospondín ako normálne doštičky<sup>52</sup>, majú normálnu agregáciu indukovanú kolagénom<sup>53</sup> a normálnu signálnu transdukciu<sup>54</sup>, je kompenzácia chýbajúceho CD36 alternatívnymi signálnymi dráhami. Cytoplazmatická doména CD36 obsahuje sekvenciu pre väzbu so Src rodinou tyrozínových kináz a niekoľko z nich je nekovalentne asociovaných s CD36 (cit.<sup>55</sup>). Špecifita CD36 ako receptora môže byť modifikovaná fosforyláciou alebo defosforyláciou<sup>56</sup>. CD36 je okrem toho receptorom pre oxidované lipoproteíny<sup>57</sup> a pre erytrocyty infikované maláriou<sup>58</sup>.

#### 6. P-Selektín

P-Selektín (CD62p, GMP-140, PADGEM) je membránový glykoproteín granúl, ktorý má molekulovú hmotnosť<sup>59</sup> 140 kDa (preto GMP-140). P-Selektín patrí do selektínovej rodiny bunkových adhezívnych molekúl exprimovaných trombocytmi<sup>60</sup>. Ak sú trombocyty v kludovom stave, tak sa P-selektín nachádza v membráne  $\alpha$ -granúl a u endotelových buniek v ekvivalentných štruktúrach, vo Weibeleho-Paladeho telieskach<sup>61,62</sup>. Po stimulácii trombocytov agonistami typu trombínu dochádza k uvoľňovacej reakcii z granúl a P-selektín, spolu s ďalším obsahom granúl, je translokovaný na plazmatickú membránu. Kým trombocyty v kludovom stave exprimujú približne 1000 molekúl P-selektínu, po aktivácii sa ich množstvo zvyšuje na 10000. Exponovaný P-selektín sa potom viaže na karbohydrátové skupiny glykolipidov a glykoproteínov neutrofilov a myeloidných buniek<sup>15</sup> a môže sa zúčastniť v eliminácii aktivovaných trombocytov z cirkulácie na jednej strane, alebo v naviazaní neutrofilov na tromby na strane druhej. „Rolling“ leukocytov, pri ktorom sú leukocyty síce v blízkom kontakte s endotelovým povrchom, ale zároveň sa pohybujú v smere prúdenia krvi, je možným následkom väzby s P-selektínom na trombocytovej vrstve<sup>63</sup>. Je pravdepodobné, že P-selektín je v membráne trombocytov asociovaný s pp60<sup>c-src</sup>, ktorá môže byť kinázou zodpovednou za fosforyláciu P-selektínu na tyrozíne<sup>18</sup>. Funkcia tejto fosforylácie ešte stále nie je známa.

#### 7. PECAM-1

PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, CD31; 130–140 kDa) je trombocytový adhezívny receptor, ktorý sa nachádza tiež na endotelových bunkách, neutrofiloch a monocytoch<sup>13</sup>. Je to glykozylovaná molekula so 40 % obsahom sacharidov, ktorá patrí do veľkej rodiny imunoglobulínov. C-terminálna časť obsahuje transmembránovú doménu a 118 aminokyselín dlhú cytoplazmatickú doménu bohatú na serín a treonín. Zdá sa, že fosforylácia tejto domény je dôležitá na reguláciu aktivity proteínu. Po aktivácii dochádza k rýchlej fosforylácii PECAM-1 na seríne a tyrozíne a k jeho asociácii s cytoskeletom<sup>64</sup>. Sagava a kol.<sup>65</sup> zistili, že PECAM-1 bol fosforylovaný na tyrozíne po adhézii buniek alebo po aktivácii iných imunologických receptorov, napr. T-bunkového recep-

tora. PECAM-1 fosforylovaný na tyrozíne bol asociovaný s proteín tyrozín fosfatázou SHP-2. Nedávno bolo zistené, že okrem SHP-2 je fosforylovaný PECAM-1 asociovaný aj s druhou proteín tyrozín fosfatázou SHP-1, čo naznačuje, že v hematopoietických bunkách, napr. trombocytoch, je bunková signalizácia PECAM-1 regulovaná selektívnym skoncentrovaním a aktiváciou dvoch rozdielnych proteín-tyrozínových fosfatáz<sup>14</sup>.

Úloha PECAM-1 vo funkcii trombocytov ešte stále nie je jasná. Nie je zahrnutý v agregácii trombocytov. Nedávne výskumy ukázali, že plní adhezívnu funkciu. Má homofilné aj heterofilné adhezívne vlastnosti, ktoré môžu hrať významnú úlohu v množstve dôležitých procesov, akými je nazhromaždenie leukocytov v miestach zápalu, regulácia uvoľňovania leukocytov z kostnej drene a v kardiovaskulárnom vývoji<sup>66</sup>. Výsledky poukazujú na možnosť, že ligandami pre PECAM-1 v heterotypickej adhézii sú povrchové glykozamínoglykany buniek<sup>67</sup> a integrín  $\alpha_v\beta_3$  (cit.<sup>20</sup>).

## 8. CD9

CD9 (p24; 24 kDa) je integrálny membránový glykoproteín patriaci do nedávno popísanej rodiny proteínov, ktoré štyri krát prechádzajú membránou, tzv. tetraspanovej rodiny<sup>68</sup> (TM4SF). Je exprimovaný v hematopoietických aj v nehematopoietických tkanivách, vrátane endotelových buniek, fibroblastov a buniek nervového systému<sup>69,71,72</sup>. V hematopoetickom systéme sa nachádza na povrchu bazofilov, eozinofilov, aktivovaných T lymfocytov a pre-B bunkách. Nenachádza sa na erytrocytoch, zrelých T a B bunkách, ale je veľmi silno exprimovaný na megakaryocytoch a trombocytoch<sup>69,70</sup>. Na trombocytoch patrí medzi hlavné povrchové proteíny s 35 000–60 000 molekulami na jednu bunku, čo je úroveň exprese porovnateľná s expresiou GPIIb-IIIa (cit.<sup>73</sup>).

Funkcia CD9 je stále nejasná. Z doteraz publikovaných prác sa dá usudzovať, že ide o multifunkčnú molekulu, ktorá ovplyvňuje adhéziu buniek, proliferáciu a migráciu v imunitnom systéme. Monoklonové protilátky rozpoznávajúce CD9 antigén sú potentnými aktivátormi trombocytových funkcií, porovnateľnými s trombínom. Indukujú celú škálu funkcií, vrátane agregácie, sekrecie granúl, fosforylácie proteínov, hydrolýzy fosfatidylinozitolu, mobilizácie  $Ca^{2+}$  a metabolizmu kyseliny arachidónovej<sup>74</sup>. Tieto zistenia naznačovali, že CD9 by mohol byť signálnym transduktorom. Worthington a kol.<sup>75</sup> demonštrovali, že  $(Fab')_2$  fragmenty anti-CD9 protilátok strácajú schopnosť aktivovať trombocyty a zablokovanie Fc $\gamma$ RII receptora s korešpondujúcou protilátkou inhibuje agregáciu a  $Ca^{2+}$  mobilizáciu indukovanú anti-CD9 protilátkami. Na základe tohto faktu vznikli pochybnosti o úlohe CD9 v prenose signálu u trombocytov. Ozaki a kol.<sup>76</sup> potvrdili, že naviazanie monoklonovej protilátky na CD9 bez stimulácie Fc $\gamma$ RII receptora neindukuje fosforyláciu proteínov na tyrozíne alebo agregáciu trombocytov. Zároveň však zistili, že  $(Fab')_2$  fragment anti-CD9 protilátky *per se* indukuje a zvyšuje aktivitu nereceptorovej tyrozínovej kinázy p72<sup>syk</sup> a vedie k asociácii p60<sup>c-src</sup> s p72<sup>syk</sup>. Hato a kol.<sup>73</sup> ako prví ukázali, že anti-CD9 protilátky podporujú naviazanie fibrinogénu na trombocyty. Naviac ďalšie práce ukazujú, že agregácia trombocytov indukovaná monoklonovými anti-CD9 protilátkami je primárne sprostredkovaná aktiváciou fosfolipázy C (cit.<sup>74,75,77,78</sup>). Aktivácia tiež

iniciuje reorganizáciu cytoskeletálnej štruktúry agregovaných trombocytov<sup>77</sup>. Aktivácia fosfolipázy C anti-CD9 protilátkou bola potvrdená Krollom a kol.<sup>79</sup>, ktorí zároveň ukázali, že je podmienená signálnou cestou závislou na GPIIb-IIIa komplexe a extracelulárnom vápniku. Predpokladalo sa, že by CD9 a GPIIb-IIIa komplex mohli asociovať na povrchu trombocytov. Schopnosť anti-CD9 monoklonových protilátok spôsobovať agregáciu trombocytov a väzbu fibrinogénu (typické charakteristiky GPIIb-IIIa) naznačovala zahrnutie CD9 vo funkcii integrínov<sup>73</sup>. Asociácia CD9 s GPIIb-IIIa bola identifikovaná pomocou chemického cross-linkera po opracovaní trombocytov s anti-CD9 protilátkou a ich následnej aktivácii<sup>78</sup>. Dôkaz, že táto asociácia existuje aj v trombocytoch v kľudovom stave priniesli najprv Laroche-Traineau a kol.<sup>80</sup>, ktorí pomocou MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelet antigens) techniky dokázali, že GPIIb-IIIa komplexy boli takmer permanentne asociované s CD9 antigénom v lyzátoch trombocytov. Následne Indig a kol.<sup>81</sup> vyprecipitovali komplex oboch proteínov za natívných podmienok. Účast CD9 molekuly v prenose bunkových signálov podporuje zistenie, že CD9 je asociovaný s malými GTP-viažúcimi proteínmi<sup>82</sup>.

Nedávne štúdie poukazujú na účasť CD9 v adhézii a migrácii buniek prostredníctvom väzby s integrínmi  $\beta 1$  rodiny<sup>83-88</sup>.  $\beta 1$ -Integríny sú schopné napriek rozdielnym cytoplazmatickým doménam  $\alpha$  reťazca, naštartovať podobné aktivačné procesy. Predpokladá sa, že nielen expresia, ale aj regulácia aktivity integrínov môže byť dôležitým faktorom ovplyvňujúcim túto aktivitu<sup>87</sup>. Významnú úlohu v tomto procese by mohol zohrávať práve CD9. Bolo napríklad ukázané, že monoklonové protilátky proti CD9 zvyšujú adhéziu pre-B buniek na fibroblasty v kostnej dreni mechanizmom, ktorý zahŕňa väzbu VLA-4 a VLA-5 k fibronektínu<sup>88</sup>.

Opičí CD9 antigén tvorí komplex s transmembránovým prekursorom heparín viažúcim epidermálnym rastovým faktorom (HB-EGF), ktorý je identický s receptorom pre difterický toxín (diphtheria toxin, DTR). Asociácia s CD9 zvyšuje dramaticky aktivitu rastového faktora proHB-EGF a taktiež zvyšuje množstvo väzbových miest pre DTR, bez zmeny afinity a množstva receptora. To viedlo k úvahám, že CD9 indukuje konformačnú zmenu proHB-EGF (cit.<sup>89,90</sup>). Lagaudriere-Gesbert a kol.<sup>91</sup> potvrdili, že aj ľudský CD9 zvyšuje DTR-senzitivitu LM buniek (fibroblastová bunková línia) transfekovaných s génom proHB-EGF.

Expresia CD9 antigénu bola popísaná aj na bunkách nervového systému. Pokusy s anti-CD9 protilátkami naznačili úlohu CD9 molekuly v intracelulárnej signalizácii, v adhézii, v pohyblivosti a v regulácii rastu nervových buniek<sup>72,92,93</sup>.

CD9 slúži aj ako ko-stimulačná molekula. Na T bunkách aktivovaných TCR je CD9 členom signálnej dráhy nezávislej na CD28. Na rozdiel od CD28 stimulácie, ktorej výsledkom je plná aktivácia a proliferácia T bunky, CD9 kostimulácia vedie k indukcii apoptózy<sup>94</sup>. Li a Tait<sup>95</sup> naznačili možnú účasť CD9 v zmenách topológie fosfatidylycerínu v plazmatickej membráne, ktoré sú typickým diagnostickým znakom apoptickej bunky.

Súčasná expresia CD9 a pro HB-EGF na makrofágoch má podstatný vplyv na vývoj aterosklerózy<sup>96</sup>. CD9 v spojení s VLA integrínmi môže hrať významnú úlohu prostredníctvom ovplyvnenia reorganizácie kolagénového matrixu, čo je proces zahrnutý v zužovaní krvných ciev<sup>86</sup>.

Z množstva molekúl, ktoré tvoria komplex s CD9 antigé-

nom sú pravdepodobne najdôležitejšie molekuly z TM4SF rodiny. CD9 bezprostredne interaguje s CD63 a CD81<sup>20</sup>. Hoci ich funkcie nie sú známe, predpokladá sa ich úloha v bunkovej adhézii a migrácii, prenose signálu a ko-stimulácii. Pretože doteraz nebol identifikovaný žiadny extracelulárny ligand pre TM4SF proteíny je možné, že ich hlavnou funkciou je vytvorenie siete zloženej z TM4SF proteínov. Hlavnou úlohou tejto siete môže byť organizovanie bunkového povrchu prostredníctvom naviazania rozdielnych povrchových molekúl regulujúcich v konečnom dôsledku rôzne bunkové funkcie<sup>97</sup>.

*Práca bola spracovaná vďaka grantu Vega No. 2/4015/98.*

#### LITERATÚRA

- Clemetson K. J.: *Thromb. Haemostasis* 74, 111 (1995).
- Mannaioni P. F., Di Bello M. G., Masini E.: *Inflamm. Res.* 46, 4 (1997).
- Santoro S. A., Walsh J. J., Staatz W. D., Baranski K. J.: *Cell Regul.* 2, 905 (1991).
- Saelman E. U. M., Nieuwenhuis H. K., Hese K. M., de Groot P. G., Heijnen H. F. G., Sage E. H., Williams S., McKeown L., Gralnick H. R., Sixma, J. J.: *Blood* 83, 1244 (1994).
- Giancotti F. G., Languino L. R., Zanetti A., Peri G., Tarone G., Dejana E.: *Blood* 69, 1535 (1987).
- Sonnenberg A., Modderman P. W., Hogervorst F.: *Nature* 336, 487 (1988).
- Klemke R. L., Yebra M., Bayna E. M., Cheresch D. A.: *J. Cell Biol.* 127, 859 (1994).
- Calvette J. J.: *Thromb. Haemostasis* 72, 1 (1994).
- Kouns W. C., Wall C. D., White M. M., Fox C. F., Jennings L. K.: *J. Biol. Chem.* 265, 20594 (1990).
- Savage B., Shattil S. J., Ruggeri Z. M.: *J. Biol. Chem.* 267, 11300 (1992).
- Miyamoto S., Akiyama S. K., Yamada K. M.: *Science* 267, 883 (1995).
- Quinn M., Fitzgerald D. J.: *Am. Heart J.* 135, 113 (1998).
- Newman P. J., Berndt M. C., Gorski J., White G. C. H., Lyman S., Paddock C., Müller W. A.: *Science* 247, 1219 (1990).
- Hua Ch. T., Gamble J. R., Vadas M. A., Jacson D. E.: *J. Biol. Chem.* 273, 28332 (1998).
- Erbe D. V., Watson R., Presta L. G., Wolitzky B. A., Foxall C., Brandley B. K., Lasky L. A.: *J. Cell Biol.* 120, 1227 (1993).
- Phillips D. R., Poh Agin P.: *J. Biol. Chem.* 252, 2121 (1977).
- Du X., Beutler L., Ruan C. H., Castaldi P. A., Berndt M. C.: *Blood* 69, 1524 (1987).
- Modderman P. W., von dem Borne E. G., Sonnenberg A.: *Biochem. J.* 299, 613 (1994).
- Berndt M. C., Gregory C., Kabral A., Zola H., Fournier D., Castaldi P. A.: *Eur. J. Biochem.* 151, 637 (1985).
- Barclay A. N., Brown M. H., Law S. K. A., McKnight A. J., Tomlinson M. G., van der Merwe P. A.: *The Leucocyte Antigen Facts Book*, 2. vyd. Academic Press, Harcourt Brace Co., London 1997.
- Miller J. L., Cunningham D., Lyle V. A., Finch C. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4761 (1991).
- Randi A. M., Rabinowitz I., Mancuso D. J., Mannucci P. M., Sadler J. E.: *J. Clin. Invest.* 87, 1220 (1991).
- Gralnick H. R., Williams S. B., Collier B. S.: *J. Clin. Invest.* 75, 19 (1985).
- Cooper H. A., Clemetson K. J., Lüscher E. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1069 (1979).
- Andrews R. K., Fox J. E. B.: *J. Biol. Chem.* 266, 7144 (1991).
- Fox J. E. B., Berndt M. C.: *J. Biol. Chem.* 264, 9520 (1989).
- Michelson A. D., Ellis P. A., Barnard M. R., Matic G. B., Viles A. F., Kestin A. S.: *Blood* 77, 770 (1991).
- White J. G., Burris S. M., Hasegawa D., Johnson M.: *Blood* 63, 1249 (1984).
- McNicol A., Drouin J., Clemetson K. J., Gerrard J. M.: *Arterioscler. Thromb.* 13, 1567 (1993).
- Joyce R. P., Ho F. C. S., Hui P. K., Wong H. W., Lai M. P.: *Pathology* 17, 71 (1985).
- De Marco L., Mazzucato M., Masotti A., Ruggeri Z. M.: *J. Biol. Chem.* 269, 6478 (1994).
- Wagner C. L., Mascelli M. M., Neblock D. S., Weisman H. F., Collier B. S., Jordan R. E.: *Blood* 88, 907 (1996).
- Perutelli P., Mori P. G.: *Haematologica* 77, 162 (1992).
- Ginsberg M. H., Xiaoping D., O'Toole T. E., Loftus J. C., Plow E. F.: *Thromb. Haemostasis* 70, 87 (1993).
- Marguerie G. A., Plow E. F., Edgington T. S.: *J. Biol. Chem.* 245, 5357 (1979).
- Parise L. V., Phillips D. R.: *J. Biol. Chem.* 261, 14011 (1986).
- Plow E. F., Pierschbacher M. D., Rouslahti E., Marguerie G. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 8057 (1985).
- Karczewski J., Knudsen K. A., Smith L., Murphy A., Rothman V. L., Tuszynski G. P.: *J. Biol. Chem.* 264, 21322 (1989).
- Mohri H., Ohkubo T. (1991): *Am. J. Clin. Pathol.* 96, 605 (1994).
- Yamada K. M.: *J. Biol. Chem.* 266, 12809 (1991).
- Humbert M., Kunicky T. J., Bihour C., Winckler J., Nurden A. T., Nurden P.: *Semin. Thromb. Hemostasis* 22, 279 (1996).
- Gartner T. K., Amrani D. L., Derrick J. M., Kirschbaum N. E., Matsueda G. R., Taylor D. B.: *Ann. New York Acad. Sci.* 714, 303 (1994).
- Gulino D., Ryckewaert J. J., Andrieux A., Ribiet M. J., Marguerie G.: *J. Biol. Chem.* 265, 9575 (1990).
- Fox J. E. B., Lipfert L., Clark E. A., Reynolds C. C., Austin C. D., Brugge J. S.: *J. Biol. Chem.* 268, 25973 (1993).
- Sims P. J., Ginsberg M. H., Plow E. F., Shattil S. J.: *J. Biol. Chem.* 266, 7345 (1991).
- Ugarova T. P., Budzynski A. Z., Shattil S. J., Ruggeri Z. M., Ginsberg M. H., Plow E. F.: *J. Biol. Chem.* 268, 21080 (1993).
- Ruggeri Z. M., De Marco L., Gatti L., Bader R., Montgomery R. R.: *J. Clin. Invest. Med.* 100, 963 (1983).
- Lawrence J. B., Gralnick H. R.: *J. Lab. Clin. Med.* 109, 495 (1987).
- Nieuwenhuis H. K., Sakariassen K. S., Houdijk W. P. M., Nievelstein P. F. E. M., Sixma J. J.: *Blood* 68, 692 (1986).
- Collier B. S., Beer J. H., Scudder L. E., Steinberg M. H.: *Blood* 74, 182 (1989).
- Oquendo P., Hundt E., Lawler J., Seed B.: *Cell* 58, 95 (1989).

52. McKeown L., Vail M., Williams S., Kramer W., Hansmann K., Gralnick H.: *Blood* 83, 2866 (1994).
53. Yamamoto N., Akamatsu N., Yamazaki H., Tanoue K.: *Br. J. Haematol.* 81, 86 (1992).
54. Daniel J. L., Dangelmaier C., Strouse R., Smith J. B.: *Thromb. Haemostasis* 71, 353 (1994).
55. Huang M. M., Bolen J. B., Barnwell J. W., Shatill S. J., Brugge J. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7844 (1991).
56. Goldberger J., Pernambuco M.: *Science* 262, 1436 (1993).
57. Nicholson A. C., Frieda S., Pearce A., Silverstein R. L.: *Arterioscler. Thromb.* 15, 269 (1995).
58. Ockenhouse C. F., Tandon N. N., Magowan C., Jamieson G. A., Chulay J. D.: *Science* 243, 1469 (1989).
59. Hsu-Lin S. C., Berman C. L., Furie B. C., August D., Furie B.: *J. Biol. Chem.* 259, 9121 (1984).
60. Johnston G. I., Cook R. G., McEver R. P.: *Cell* 56, 1033 (1989).
61. McEver R. P., Beckstead J. H., Moore K. L., Marshall-Carlson L., Bainton D. F.: *J. Clin. Invest.* 84, 92 (1989).
62. Bonfanti R., Furie B. C., Wagner D. D.: *Blood* 73, 1109 (1989).
63. Buttrum S.M., Hatton R., Nash G. B.: *Blood* 82, 1165 (1993).
64. Zehnder J. L., Hirai K., Shatsky M., McGregor J. L., Levitt L. J., Leung L. L. K.: *J. Biol. Chem.* 267, 5243 (1992).
65. Sagawa K., Kimura T., Swieter M., Siraganian R. P.: *J. Biol. Chem.* 272, 31086 (1997).
66. Wu X. W., Lian E. C. Y.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 3154 (1997).
67. De Lisser H. M., Yan H. C., Newman P. J., Müller W. A., Buck C. A., Albeda S. M.: *J. Biol. Chem.* 268: 16037 (1993).
68. Maecker H. T., Todd S. C., Levy S.: *FASEB J.* 11, 428 (1997).
69. Boucheix C., Benoit P., Frachet P., Billard M., Worthington R. E., Gagnon J., Uzan G.: *J. Biol. Chem.* 266, 117 (1991).
70. Kersey J. H., Lebien T. W., Abramson C. S., Newman R. Sutherland R., Greaves M.: *J. Exp. Med.* 153, 726 (1981).
71. Wright M. D., Tomlinson M. G.: *Immunol. Today* 15, 588 (1994).
72. Kagawa T., Mekada E., Shishido Y., Ikenaka K.: *J. Neurosci. Res.* 50, 312 (1997).
73. Hato T., Ikeda K., Yasukawa M., Watanabe A., Kobayashi Y.: *Blood* 72, 224 (1988).
74. Boucheix C., Soria C., Mirshahi M., Soria J., Perrot J-Y., Fournier N., Billard M., Rosenfeld C.: *FEBS Lett.* 161, 289 (1983).
75. Worthington R. E., Carroll R. C., Boucheix C.: *Brit. J. Haematol.* 74, 216 (1990).
76. Ozaki Y., Satoh K., Kuroda K., Qi R., Yatomi Y., Yanagi S., Sada K., Yamamura H., Yanabu M., Nomura S., Kume S.: *J. Biol. Chem.* 270, 15119 (1995).
77. Hato T., Sumida M., Yasukawa M., Watanabe A., Okuda H., Kobayashi Y.: *Blood* 75, 1087 (1990).
78. Slupsky J. R., Seehafer J. G., Tang S-G., Masellis-Smith A., Shaw A. R. E.: *J. Biol. Chem.* 264, 12289 (1989).
79. Kroll M. H., Mendelsohn M. E., Miller J. L., Ballen K. K., Hrbolich J. K., Schafer A. I.: *Biochem. Biophys. Acta* 1137, 248 (1992).
80. Laroche-Traineau J., Macchi L., Marit G., Nurden P., Nurden A. T., Clofent-Sanchez G.: *Platelets* 7, 303 (1996).
81. Indig F. E., Diaz-Gonzales F., Ginsberg M. H.: *Biochem. J.* 327, 291 (1997).
82. Seehafer J. G., Shaw A. R. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 401 (1991).
83. Rubinstein E., Poindessous-Jazat V., Le Naour F., Billard M., Boucheix C.: *Eur. J. Immunol.* 27, 1919 (1997).
84. Rubinstein E., Le Naour F., Billard M., Prenant M., Boucheix C.: *Eur. J. Immunol.* 24, 3005 (1994).
85. Le Naour F., Francastel C., Prenant M., Lantz O., Boucheix C., Rubinstein E.: *Leukemia* 11, 1290 (1997).
86. Scherberich A., Moog S., Haan-Archipoff G., Azorsa D., Lanza F., Beretz A.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1691 (1998).
87. Ryan D., Nuccie B., Abboud Camille N. and Winslow J.: *J. Clin. Invest.* 88, 995 (1991).
88. Masellis-Smith A., Shaw R. E.: *J. Immunol.* 152, 2768 (1994).
89. Iwamoto R., Senoh H., Okada Y., Uchida T., Mekada E.: *J. Biol. Chem.* 266, 20463 (1991).
90. Higashiyama S., Iwamoto R., Goishi K., Raab G., Taniguchi N., Klagsbrun M., Mekada E.: *J. Cell Biol.* 128, 929 (1995).
91. Lagaudrière-Gesbert C., Le Naour F., Lebel-Binay S., Billard M., Lemichez E., Boquet P., Boucheix C., Conjeaud H., Rubinstein E.: *Cell. Immunol.* 182, 105 (1997).
92. Kaprielian Z., Cho K. O., Hadjiargyrou M., Patterson P. H.: *J. Neurosci.* 15, 562 (1995).
93. Anton E. S., Hadjiargyrou M., Patterson P. H., Matthew W. D.: *J. Neurosci.* 15, 584 (1995).
94. Tai X-G., Toyooka K., Yashiro Y., Abe R., Park Ch.-S., Hamaoka T., Kobayashi M., Neben S., Fujiwara H.: *J. Immunol.* 159, 3799 (1997).
95. Li W., Tait J.F.: *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 89 (1998).
96. Ouchi N., Kihara S., Yamashita S., Higashiyama S., Nakagawa T., Shimomura I., Funahashi T., Kameda-Takemura K., Kawata S., Taniguchi N., Matsuzawa Y.: *Biochem. J.* 328, 923 (1997).
97. Horváth G., Serru V., Clay D., Billard M., Boucheix C., Rubinstein E.: *J. Biol. Chem.* 273, 30537 (1998).

**J. Tomášková** (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Platelet Membrane Glycoproteins**

Platelets stop bleeding from damaged blood vessels and initiate repair processes. They are also involved in thrombosis, a pathological variant of haemostasis, and they have other physiological functions in inflammatory and immunity-related diseases. The function of platelets is largely dependent on the presence of a number of glycoproteins. Work over the past decade has shown that over 40 glycoproteins are present on the platelet surface. Some of these glycoproteins are described in the review and their structure-function relationships discussed.