

บทความทั่วไป

Structure and function of platelet membrane glycoproteins

ปริญานาด วงศ์จันทร์*

บทนำ

การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของไกลโคโปรตีนบนผิวเกล็ดเลือด นับเป็นหัวใจของการเรียนรู้บทบาทของเกล็ดเลือดในกระบวนการห้ามเลือด ไกลโคโปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดเป็นตัวกลางสำหรับสองขั้นตอนสำคัญในกระบวนการ primary hemostasis คือ adhesion และ aggregation โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับจำเพาะสำหรับ adhesion molecules ที่เกี่ยวข้อง ปัจจุบันมีการศึกษาจนรู้กลไกแล้วว่า adhesion เริ่มต้นจากการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับผนังหลอดเลือดผ่านโปรตีนตัวกลางคือ vWF ซึ่งสามารถจับกับไกลโคโปรตีนชนิด gpIb/IX ส่วนกลไกของ aggregation คือการจับกันระหว่าง adhesion molecule (fibrinogen) กับไกลโคโปรตีนชนิด gpIIb/IIIa ซึ่งนอกจากจับกับ fibrinogen แล้ว ยังสามารถจับกับ fibronectin และ vWF ได้อีกด้วย จึงทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจำนวนมากมาย การศึกษาคูณสมบัติทางชีวเคมี หน้าที่และกลไกการทำงานของไกลโคโปรตีน จึงต้องอาศัยเทคนิคและวิธีการต่างๆ ร่วมกันหลายวิธี เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน ในระยะแรกๆ

มีการศึกษาและแบ่งกลุ่มไกลโคโปรตีนเป็น 3 กลุ่มคือ gpI, gpII และ gpIII โดยวิธี gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแบ่งตามขนาดโมเลกุล จึงไม่รู้รายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างทางชีวเคมี หน้าที่และความสำคัญ นอกจากนี้ตัวรับจำเพาะของเกล็ดเลือด หลายชนิดมีปริมาณน้อยมากและไม่สามารถแยกได้ด้วยเทคนิคดังกล่าว ต่อมามีการพัฒนาใช้ monoclonal antibody ในการศึกษาตำแหน่งจำเพาะ หน้าที่ และแบ่งกลุ่มตามระบบ Cluster Differentiation of antigen (CD nomenclature) ในระยะหลังเทคนิคต่างๆ มีการพัฒนาขึ้นมาก จึงทำให้ทราบว่าไกลโคโปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดหลายชนิด จัดอยู่ในกลุ่มของ Receptor families ใหญ่ ซึ่งมี nomenclature ของกลุ่มเอง ได้แก่ Integrins, Leucine-rich glycoprotein, Immunoglobulin cell adhesion molecules, Selectins, Quadraspanin และ Seven transmembrane domain เป็นต้น (ตารางที่ 1) ไกลโคโปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดมีหลายชนิด (ตารางที่ 2) แต่บางชนิดเท่านั้นที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการห้ามเลือด

* แผนกวิชาวิทยาศาสตร์การธนาคารเลือด ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 1 Platelet membrane glycoproteins ของเกล็ดเลือดและยีนที่เกี่ยวข้อง

Gene family	Common name	gp	CD	Ligands	Function
Integrin	Fb R.	IIb/IIIa	41a	Fb, vWF	Adhesion, aggregation,
			IIb-41b	Fn, Vn, ?TSP	Protein trafficking
			IIIa-61		
	Cg R.	Ia/IIa	Ia-49b	Cg	Adhesion
			IIa-29		
	Fn R.	Ic/IIa	Ic-49e	Fn	Adhesion
			IIa-29		
	Lm R.	Ic/IIa	Ic-49f	Lm	Adhesion
			IIa-29		
	Vn R.	α_v /IIIa	α_v -51	Vn, Fb, vWF,	? Adhesion,
			IIIa-61	Fn, ?TSP	? Protein trafficking
Leucine-rich GP	vWF R.	Ib/IX	42	vWF,	Adhesion (high shear)
			Ib α -42b	Thrombin	?Thrombin act
			Ib β -42c		
			IX-42a		
		V			
Immunoglobulin cell adhesion molecules	PECAM-1		31	Heparin	Platelet and endothelial cells binding
	Fc γ RII		32	Immune complex	Immune complex binding
	ICAM-2		102	LFA-1	Platelet-leukocyte adhesion
	HLA-I				Histocompatibility complex
Selectins	P-Selectin (GMP-140, PADGEM)		62P	Sialyl-Le ^x	Platelet-leukocyte adhesion
7-transmembrane domain (G protein-linked)	Tb R.			Tb	Activation
	TXA ₂ R.			PGH ₂ /TXA ₂	Activation
	α 2-adrenergic R.			Epinephrine	Activation
	Vasopressin R.			Vasopressin	Activation
4-transmembran domain	p24		9	?	Activation
2-transmembrane domain		IV	36	Cg, TSP	Adhesion

GP; glycoprotein, CD; cluster differentiation antigen, Fb; fibrinogen, Fn; fibronectin, Vn; vitronectin, Tb; thrombin, vWF; von Willebrand factor, TSP; thrombospondin, Cg; collagen, Lm; laminin, PGH; prostaglandin H, TXA; thromboxane A

ตารางที่ 2 ไกลโคโปรตีนบนผิวเกล็ดเลือด: ลักษณะทางชีวเคมีและการทำหน้าที่เป็นตัวรับจำเพาะ

GP	Mr		Characteristics	Analogous Proteins	Receptor function
	NR (kD)	R (kD)			
Ia	150	165	Complex with gpIIa	VLA-2 α subunit	Collagen receptor vWF receptor on unstimulated platelets, thrombin receptor
Ib	160	128-141 22	Complex with gpIX High sialic acid		Fibronectin receptor
Ic	148	145 25	Complex with gpIIa	VLA-5 α subunit	
IIa	130	150	Complex with gpIa, Ic	FnR, VLA β subunit	
IIb	145	130 23	Complex with gpIIa, Ca^{2+} -dependent heterodimer		Fibrinogen, Fibronectin, vWF receptor on stimulated platelets
IIIa	95	105	Cystein-rich, Complex with gpIIb	VnR, β subunit	
IV	85	85	High glycosylated, Protease-resistant		Thrombospondin receptor
V	82		Thrombin substrate		
IX	17		Complex with gpIb		
GMP-140 or PADGEM	138	148	α -granule membrane protein, found on stimulated platelet		

GP; glycoprotein, VLA; very late activation antigen, FnR; fibronectin receptor, VnR; vitronectin receptor

GMP; granule membrane protein; PADGEM; platelet activation-dependent granule external membrane, vWF; von Willebrand factor

คุณสมบัติและหน้าที่โดยทั่วไปของไกลโคโปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดที่จัดอยู่ในกลุ่มต่าง ๆ

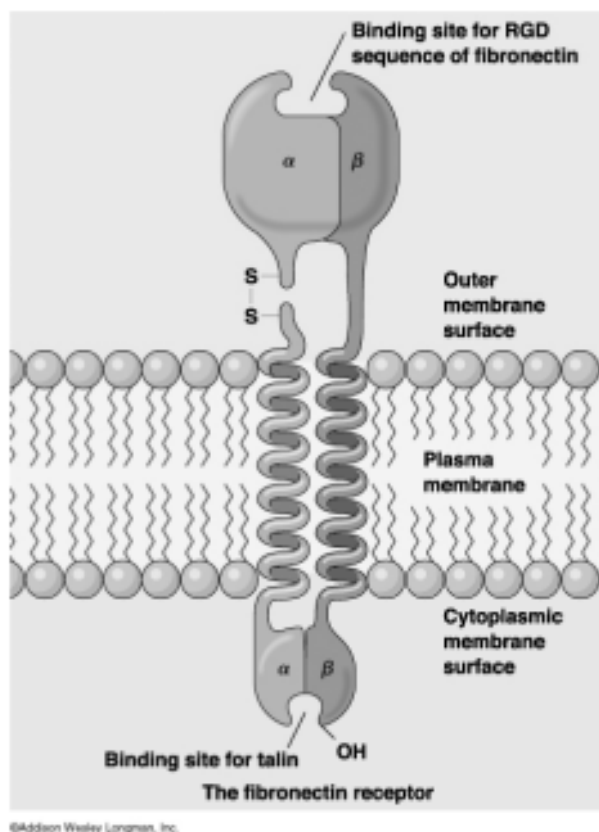
I. Integrins

โปรตีนในกลุ่มนี้เป็น transmembrane proteins โครงสร้างทางชีวเคมีเป็น heterodimer ประกอบด้วย 2 subunits ที่มีขนาดและโครงสร้างชีวเคมีต่างกัน ได้แก่ α -subunit และ β -subunit โปรตีนทั้งสองสายจับกันด้วยพันธะ non-covalent และ Ca^{2+} -dependent¹⁻⁵

α -subunit ประกอบด้วย divalent cation binding domain จำนวน 3-4 ตำแหน่ง ที่ศึกษาแล้วพบมี α -subunit จำนวน 13 ชนิด ที่กำหนดโดยยีนต่างกัน ส่วน

β -subunit ภายในประกอบด้วย disulfide bond หลายตำแหน่ง ปัจจุบันพบมี β -subunit แล้วจำนวน 7 ชนิด รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางชีวเคมีของไกลโคโปรตีนในกลุ่ม integrins

Integrins แต่ละชนิดทำหน้าที่ในการจับจำเพาะกับ ligand เฉพาะ ส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ หรือระหว่างเซลล์กับโปรตีนภายนอก มีบทบาทสำคัญในกระบวนการขนส่งโปรตีนภายในเซลล์ สำหรับเกล็ดเลือด ไกลโคโปรตีนสำคัญที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ gpl α , gpl α c, gpl α IIa, gpl α IIIa และ gpl α IIb โดยมีรายละเอียดดังนี้



รูปที่ 1 Biochemical structure of Integrins

1. Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa (gpl α IIb/IIIa)

Biochemical structure

เป็น complex ระหว่าง gpl α IIb และ gpl α IIIa ซึ่งเป็นสาย polypeptide 2 สายกำหนดการสร้าง โดยยีนที่อยู่ใกล้กันบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 17 (q21-23)⁶

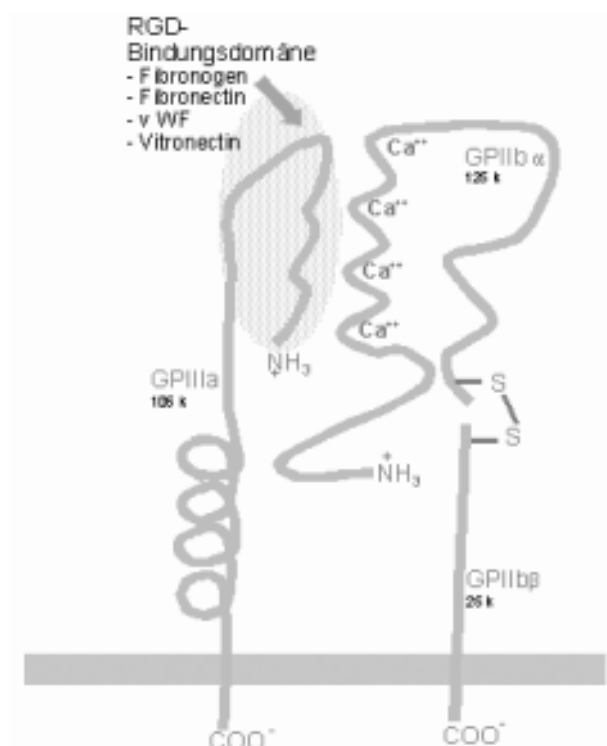
gpl α IIIa เป็น single polypeptide ขนาด 95 kD ภายในมี cysteine-rich domain จำนวน 5 ตำแหน่ง (รูปที่ 2) สำหรับ gpl α IIb เป็น dimeric polypeptide มีขนาดประมาณ 145 kD ใน non-reduced gel ประกอบด้วย 2 subunits ต่อกันด้วย s-s bond การสร้างเริ่มจากยีนกำหนดการสร้าง pro IIb molecule ก่อน จากนั้น pro IIb molecule จะเข้าจับ gpl α IIIa ใน endoplasmic reticulum

(ER) และเมื่อ complex นี้เคลื่อนเข้าสู่ golgi ซึ่งเป็นบริเวณที่ pro IIb ถูกตัดแปลง โดยแยกเป็น 2 subunits เรียกว่า heavy chain (gpIIb α) และ light chain (gpIIb β)⁷

Heavy chain หรือ gpIIb α มีขนาดใหญ่กว่าและเป็นส่วนที่ปรากฏภายนอกเซลล์ เชื่อมต่อกับ light chain หรือ gpIIb β ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าและเป็นส่วน membrane-

anchoring ด้วย s-s bond และเชื่อมต่อกับ gpIIIa ด้วย non-covalent bond

เมื่อถูกตัดแปลงภายใน golgi แล้ว mature gpIIb/IIIa จะถูกนำออกไปยังเมมเบรนของเกล็ดเลือด โดยพบได้ทั้งส่วน plasma membrane, OCS membrane และ α -granule membrane



รูปที่ 2 Structure of platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa

การสกัดไกลโคโปรตีนเพื่อการศึกษา มีวิธีการคล้ายกับที่ใช้แยกสกัดไกลโคโปรตีนจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสอื่น ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญคือ ไกลโคโปรตีนบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดมีปริมาณมากเพียงพอ (5% ของ platelet total proteins) นอกจากนี้โปรตีนบนเมมเบรนของเกล็ดเลือดยังคงสภาพได้ดีหลังการแตกสลาย มีข้อยกเว้นกรณีการแยกสกัด gpIb ที่พบว่าสามารถถูกทำลายได้จากเอนไซม์ประเภท calcium-dependent protease ซึ่งแก้ปัญหาได้โดยใช้ protease inhibitor ที่เหมาะสมเช่น leupeptin หรือใช้แบบ cocktail ที่มี benzamidin และ phenylmethylsulfonyl fluoride

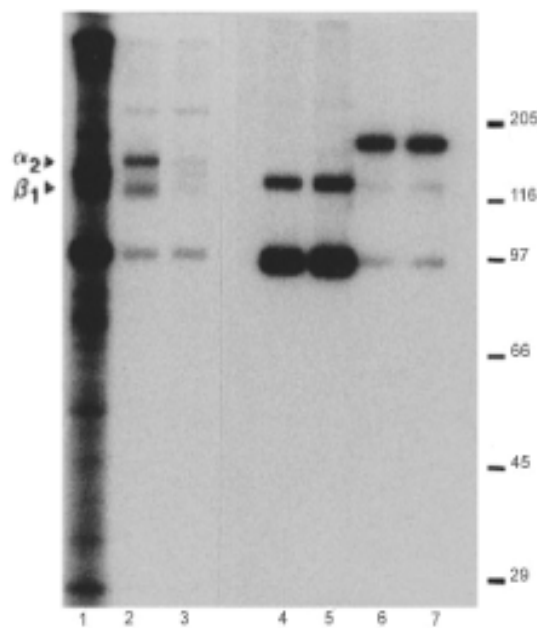
(PMSF) ร่วมด้วย หลังจากสลายเกล็ดเลือดแล้วปั่นแยกด้วยความเร็วสูงที่ 100,000g นานประมาณ 1-3 ชั่วโมงเพื่อกำจัด cytoskeletal components ออกไป (หากเป็นการแยกสกัดเกล็ดเลือดที่ไม่ถูกกระตุ้น ขั้นนี้ประกอบด้วย actin filaments เป็นส่วนใหญ่) จากนั้นนำส่วน platelet lysate ไปแยกชั้นด้วย Lectin affinity column, gel filtration หรือ ion-exchange resins เพื่อเก็บเฉพาะ glycoprotein-rich fraction⁸

การวิเคราะห์ไกลโคโปรตีนได้แก่ ศึกษาการแสดงออกบนเกล็ดเลือด หรือบนเซลล์ชนิดอื่น โดยติดฉลากโมเลกุลด้วยสารรังสีหรือสารเรืองแสง แล้ว

แยกผ่านกระแสไฟฟ้า ซึ่งอาจเป็น SDS-PAGE ทั้งแบบ reduced- หรือ non-reduced หรือ Two-dimensional reduced/non-reduced หรือ Cross-immunoelectrophoresis ซึ่งเหมาะสำหรับการศึกษาโมเลกุลที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อน หากมีโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไกลโคโปรตีนใดๆ จะทำให้การศึกษามีความจำเพาะมากขึ้น โดยการแยกผ่านกระแสไฟฟ้าและเคลื่อนย้ายโมเลกุลลงบนแผ่นเมมเบรน และทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี สังเกตสีของแถบโปรตีน (หากใช้หลักการ colorimetric) หรือการเรืองแสง (หากใช้หลักการ chemiluminescent) (รูปที่ 3)⁸⁻¹⁴ การใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีนอกจากมีประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างทางชีวเคมี และการแสดงออกของโมเลกุลแล้ว ยังช่วยให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่ของโมเลกุลดังกล่าวบนเกล็ดเลือด การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลหลังการกระตุ้น นอกจากนี้ยังใช้ศึกษา

การแสดงออกที่ผิดปกติของโมเลกุลดังกล่าวบนผิวของเกล็ดเลือดผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมอีกด้วย

ปัจจุบันนิยมศึกษาโมเลกุลต่างๆ ในระดับยีนและระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา เช่น การโคลนยีนที่น่าสนใจ เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลดังกล่าว เพราะบางครั้งปริมาณโปรตีนที่แยกสกัดมีไม่มากพอ โปรตีนไม่คงสภาพหลังการสกัด หรือได้โปรตีนที่ไม่สมบูรณ์ตามธรรมชาติ เซลล์เพาะเลี้ยงที่แสดงออกของไกลโคโปรตีนบนผิวเกล็ดเลือด ซึ่งใช้เป็นแหล่งของการโคลนยีนได้แก่ Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) สำหรับเป็นแหล่งของการโคลนยีนที่กำหนดการสร้าง gpIIb¹⁵ และ Human erythroleukemic cells (HEL) สำหรับเป็นแหล่งของการโคลนยีนที่กำหนดการสร้าง gpIIb¹⁴



รูปที่ 3 SDS-PAGE and autoradiography of platelet membrane glycoproteins

(Lane 5; gpIIb/IIIa, Lane 7; gpIIb)

(รูปภาพดัดแปลงจาก platelet Immunobiology: Molecular and clinical aspects, Kunicki TJ, 1989)

จากการศึกษา platelet gpIIb/IIIa พบว่ามีโครงสร้างทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่ม adhesion receptor อื่นๆ ทั้งในส่วนของ α subunit และ

β subunit ทั้งด้านคุณสมบัติ ดังแสดงในตารางที่ 3 และลำดับกรดอะมิโนดังแสดงในตารางที่ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของ gpIIb/IIIa กับ adhesion receptors อื่น ๆ

α Subunits	gpIIb	VnR	FnR
Number of amino acids, total	1008	1018	1008
Large chain	871	860	858
Small chain	137	158	150
Number of cysteine, total	17	18	20
Large chain	14	15	16
Small chain	3	3	4
Potential N-linked glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr)	5	13	14
Large chain	4	10	14
Small chain	1	3	0
Putative Ca ²⁺ -binding repeats	4	4	4
Length of cytoplasmic domain	20	32	28
Number of amino acid			
β Subunits	gpIIIa	Band 3	Leukocyte β
Number of amino acids	762	779	747
(mature protein)			
Potential N-linked glycosylation sites at extracellular domain	6	12	5
Number of cysteine	56	56	56
Length of cytoplasmic domain	41-46	41-46	40-45
Number of amino acid			
Number of cysteine repeats	4	4	4

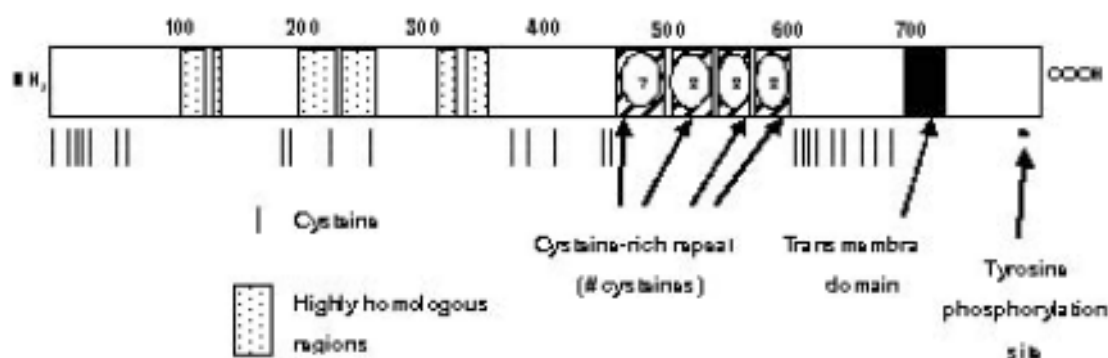
ตารางที่ 4 Protein sequence identities in the adhesion receptor subunits

α Subunits	Large chain		Small chain		Overall	
	No.	%	No.	%	No.	%
Common	261	28.9	27	17.0	288	27.1
gpIIb vs FnR	359	39.8	43	27.1	402	37.9
gpIIb vs VnR	340	37.7	43	27.0	383	36.1
FnR vs VnR	424	47.0	49	30.8	473	44.5
β Subunits						
Common					248	31.4
gpIIa vs Band 3					358	45.3
gpIIIa vs Leukocyte β					304	38.5
Band 3 vs Leukocyte β					359	45.4

Fn: fibronectin, Vn; Vitronectin

การวิเคราะห์ cDNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีน 3 ชนิดคือ platelet gpIIb, Leukocyte β -subunit และ Band 3 พบว่าบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วงกรดอะมิโนลำดับที่ 110-350 และมีความคล้ายกันมากกว่า 45%¹⁶ (รูปที่ 4) ส่วน gpIIb เมื่อเปรียบเทียบกับ

Vitronectin receptor และ Fibrinogen receptor พบว่าทั้งสามโมเลกุลมีความเหมือนกัน คือมีส่วน cytoplasmic tail สั้นๆ ขนาดประมาณ 20-32 residues large chain ประกอบด้วย 4 calcium binding repeat และตำแหน่ง cysteine จำนวนมาก¹⁴ ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 4 Model of the overall cDNA-derived structure of β subunits of gpIIb, leukocyte β subunit and Band 3

(รูปภาพดัดแปลงจาก platelet Immunobiology: Molecular and clinical aspects, Kunicki TJ, 1989)



รูปที่ 5 Model of overall cDNA-derived structure of two-chain α subunits of gpIIb, VnR α and FnR α (*cysteine missing in gpIIb and VnR α)

(รูปภาพดัดแปลงจาก platelet Immunobiology: Molecular and clinical aspects, Kunicki TJ, 1989)

Expression and function

gpIIb/IIIa เป็นไกลโคโปรตีนชนิดที่พบมากที่สุด ในเกล็ดเลือด พบได้ตั้งแต่ระยะ megakaryocyte และในเกล็ดเลือด ทั้งภาวะปกติและภาวะที่ถูกกระตุ้น โดยมีประมาณ 40×10^3 - 80×10^3 โมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด

และอีกประมาณ 40×10^3 โมเลกุลอยู่ภายในที่บริเวณผนังของ open canalicular system (OCS) และ α -granule¹⁷ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้บนผิวเซลล์ชนิดอื่นด้วย

gpIIb/IIIa เป็น receptor จำเพาะสำหรับ

adhesive ligands ได้แก่ fibrinogen, vWF, fibronectin และ vitronectin นอกจากนี้เชื่อว่ายังสามารถจับกับ thrombospondin ได้ด้วย แต่ ligand หลักคือ fibrinogen อย่างไรก็ตาม เกล็ดเลือดต้องถูกกระตุ้นเสียก่อนจึงสามารถทำหน้าที่ได้¹⁸ การจับกันระหว่าง gpIIb/IIIa และ ligands ต่างๆ เกิดขึ้นผ่านบริเวณเฉพาะที่อยู่ใน ligands และมีลำดับกรดอะมิโนคือ Agr-Gly-Asp (RGD) sequence¹⁹ เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 2 สำหรับ fibrinogen ซึ่งเป็น ligand หลัก มีบริเวณพิเศษนอกเหนือจาก ligands อื่นๆ คือ γ -chain มีบริเวณเฉพาะซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 10 ตำแหน่งเรียงกัน เรียกว่า Dodecapeptide sequence (HHLGAKQAGDV) ซึ่งสามารถจับกับ gpIIb/IIIa ได้²⁰ agonist ที่สำคัญในการกระตุ้น gpIIb/IIIa คือ ADP และ thrombin ภายหลังการกระตุ้นแล้วจึงจะเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนแรกของการกระบวนการ hemostasis ยังต้องการ gpIIb/IIIa ด้วย เพราะการเกาะติดผนังหลอดเลือดอาศัย vWF ซึ่งจับได้กับไกลโคโปรตีนทั้งสองชนิดคือ gpIb/IX และ gpIIb/IIIa

การส่งสัญญาณเข้าสู่เกล็ดเลือดหลังปฏิสัมพันธ์ระหว่าง ligand และ gpIIb/IIIa เป็นดังนี้ cytoplasmic domain ของ gpIIb/IIIa เกิด interaction กับ submembranous actin cytoskeleton ผ่านโปรตีน Talin^{21,22} ปฏิสัมพันธ์ระหว่างไกลโคโปรตีนกับ cytoskeletal network ทำให้เกิดแรงดึง โครงสร้าง ผิวเกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการยึดเกาะกันระหว่างเกล็ดเลือดได้ นอกจากนี้การเกิดแรงดึงยังช่วยควบคุม clot retraction และหากการกระตุ้นเหมาะสม จะส่งผลให้ gpIIb/IIIa สามารถจับกับ Fibrin ช่วยเสริมความแข็งแรงของกลุ่มเกล็ดเลือดอีกด้วย

ดังนั้น นอกจากบทบาทสำคัญในกระบวนการเกาะติดผนังหลอดเลือดและการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยกันเองแล้ว gpIIb/IIIa ยังช่วยทำให้เกิด spreading ของเกล็ดเลือดหลังการเกาะติด²³ ช่วยทำให้เกิด clot retraction และยังเป็นแหล่งสะสม fibrinogen ใน α -granule²⁴ อีกด้วย บทบาทอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดและการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดคือ ช่วยในการจับกันระหว่าง plasminogen และ FXIIIa

กับเกล็ดเลือด²⁵ การเคลื่อนย้ายแคลเซียมผ่านเมมเบรนของเกล็ดเลือด²⁶ และการจับกันระหว่าง IgE กับเกล็ดเลือดซึ่งมีผลทำให้เกิด cytotoxicity ต่อ parasite อีกด้วย²⁷

2. Platelet membrane glycoprotein Ia/IIa complex

gpIa/IIa จัดอยู่ใน β_1 -integrin family มีบทบาทไม่มากนักต่อกระบวนการเกาะกลุ่มของเซลล์ เนื่องจาก gpIa/IIa จับกับ collagen²⁸ ต้องการ divalent cation สองชนิดคือ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} และถูกยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} ดังนั้นในร่างกายคนปกติ จึงแทบไม่เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไกลโคโปรตีนชนิดนี้กับ collagen เลย เพราะในร่างกายมีปริมาณ Ca^{2+} สูงและมี Mg^{2+} น้อยมาก ในคนที่มีความผิดปกติของยีนที่กำหนดการสร้าง gpIa/IIa จะพบมีเลือดออกง่าย แต่ไม่รุนแรง

3. Platelet membrane glycoprotein Ic/IIa complex

จัดอยู่ในกลุ่มของ β_1 -integrin family พบได้บนเซลล์ชนิดอื่นๆ มีบทบาทสำคัญต่อการจับกันระหว่างเกล็ดเลือดในขณะปกติ (resting) กับ fibronectin บนเซลล์ชนิดอื่น²⁹ และยังมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการพัฒนาของเซลล์และการกระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่น

4. Platelet membrane α_v /gpIIIa complex

มี ligand จำเพาะคือ vitronectin³⁰ ทำงานได้ในสภาวะที่มี Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} อยู่ด้วย ทำให้เกิด platelet adhesion จัดอยู่ในกลุ่ม β_3 -integrin family โมเลกุลอื่นที่ทำหน้าที่เป็น ligand ได้อีกคือ fibrinogen, vWF และ thrombospondin³¹ แต่ยังไม่มียข้อมูลชัดเจนในส่วนที่เกี่ยวข้องกับเกล็ดเลือด พบ α_v /gpIIIa ได้ บนผนังหลอดเลือด และ osteoclast³² จากการศึกษา พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการของร่างกายหลายอย่าง ได้แก่ bone resorption,³³ endothelial-matrix interaction,³⁴ lymphoid cell apoptosis,³⁵ neovascularization,³⁶ smooth muscle cell migration และ intimal hyperplasia³⁷

II. Leucine-rich glycoprotein (LRG) receptor

โมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดที่มีโครงสร้างทางชีวเคมีจัดอยู่ในกลุ่มนี้มีเพียงชนิดเดียว คือ gpIb/IX แต่นับว่า

มีความสำคัญต่อบทบาทหน้าที่ของเกล็ดเลือด และการ
เกิดพยาธิสภาพของร่างกายที่ชัดเจนทั้ง autoimmune
และ drug-induced thrombocytopenia

Platelet membrane glycoprotein Ib/IX

Biochemical structure

โครงสร้างชีวเคมีเป็น heterodimer ประกอบด้วย
gpIX และ gpIb โดยมีรายละเอียดดังนี้

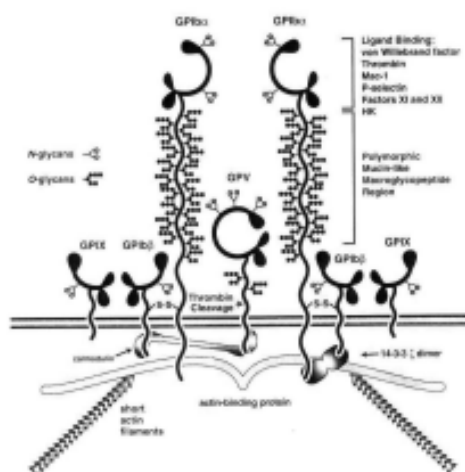
gpIX เป็นสาย polypeptide ขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 kD³⁸ ควบคุมและกำหนดการสร้างโดยยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 3 ปลาย N-terminal อยู่ด้าน extracellular region และมีส่วน cytoplasmic domain สายสั้น gpIX จับกับ gpIb ด้วย noncovalent bond จากการศึกษาไม่พบว่า gpIX เกี่ยวข้องโดยตรงกับหน้าที่ของเกล็ดเลือด แม้ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด แต่พบว่าเป็นความจำเป็นเพราะหากไม่มี gpIX จะทำให้ gpIb เสียเสถียรภาพในการแสดงออก และเสียประสิทธิภาพในการทำหน้าที่ นอกจากนี้ยังมีความสำคัญและจำเป็นต่อการแสดงออกของ gpV อีกด้วย³⁹

gplb เป็น heterodimer ประกอบด้วย gplb α น้ำหนัก 143 kD จับกับ gplb β ซึ่งมีขนาด 22 kD และเป็นส่วน transmembrane part ด้วย s-s bond⁴⁰ gplb β ประกอบด้วย LRG ซ้ำๆ 7 บริเวณ ในขณะที่ gplX มีเพียงหนึ่งตำแหน่ง การศึกษาด้านคลินิกพบว่า gplb

มีส่วนเกี่ยวข้องเป็น target antigen ใน autoimmune thrombocytopenia และ quinine/quinidine-induced thrombocytopenia⁴¹ gpIb α กำหนดการสร้าง โดยยีนบนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 17 (17p12ter)⁴² แต่ยังไม่ทราบยีนที่กำหนดการสร้าง gpIb β

gplb α มีบทบาทสำคัญต่อการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือดโดยตรง เนื่องจากมี binding site สำหรับ vWF ที่เป็น ligand หลัก บริเวณดังกล่าวนี้อยู่ที่ s-s loop ระหว่างกรดอะมิโนลำดับที่ 220-310²⁹ ตำแหน่งบน vWF ที่จับกับ binding site นี้คือกรดอะมิโนลำดับที่ 694-708 ตำแหน่งที่จับกับ gplb α เป็นคนละตำแหน่งกับ RGD sequence ที่ vWF ใช้จับกับ gpIIb/IIIa ในภาวะปกติ vWF ที่อยู่ในกระแสเลือดไม่จับกับเกล็ดเลือด แต่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและทำงานได้ในสองกรณีคือ กรณีแรกผนังหลอดเลือดฉีกขาด และทำให้ vWF เกาะติดกับผนังหลอดเลือดเสียก่อน หรือในกรณีที่สอง คือเกิด shear force โดยสารบางชนิดได้แก่ Ristocetin หรือ Botrocetin⁴³

gplb α ยังมี high-affinity binding site ที่จับกับ thrombin ได้และบริเวณที่ใช้จับกับ thrombin คือกรดอะมิโนลำดับที่ 271-284⁴⁴ (รูปที่ 6) และมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเกล็ดเลือด ผู้มีความผิดปกติในการแสดงออกของ gplb/IX เกล็ดเลือดทำงานผิดปกติทำให้เกิดภาวะเลือดออกได้ง่าย เช่น ผู้ป่วยโรค Bernard-Soulier syndrome (BSS)⁴⁵

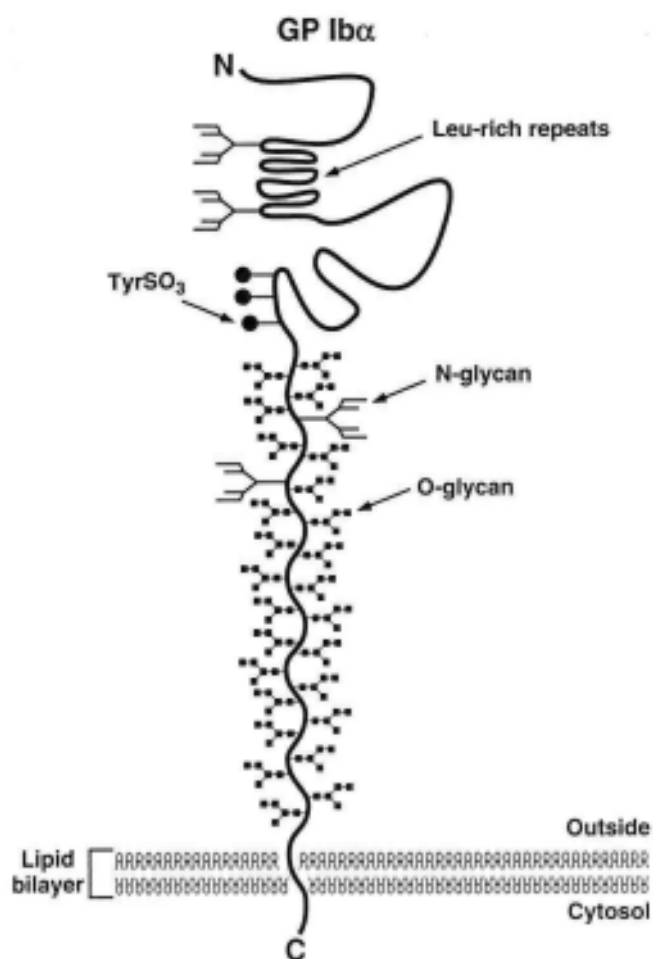


รูปที่ 6 Structure of platelet membrane gplb/IX

(ดัดแปลงจาก Alan D. Michelson. Platelets. New York, AP Academic Press, 2002)

gpIb/IX complex เป็นส่วนประกอบหลักของโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดที่ชื่อ glycocalyx เนื่องจาก gpIb α ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและ sialic acid จำนวนมาก (รูปที่ 7) จึงเป็นเหตุผลอธิบายว่า เกล็ดเลือด

มีประจุลบสูง⁴⁶ gpIb/IX complex มีลักษณะเป็นแท่งยาวรีปลาย N-terminal ยื่นออกนอกเมมเบรน มีความสำคัญต่อการทำงานของเกล็ดเลือด โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการยึดเกาะผนังหลอดเลือด

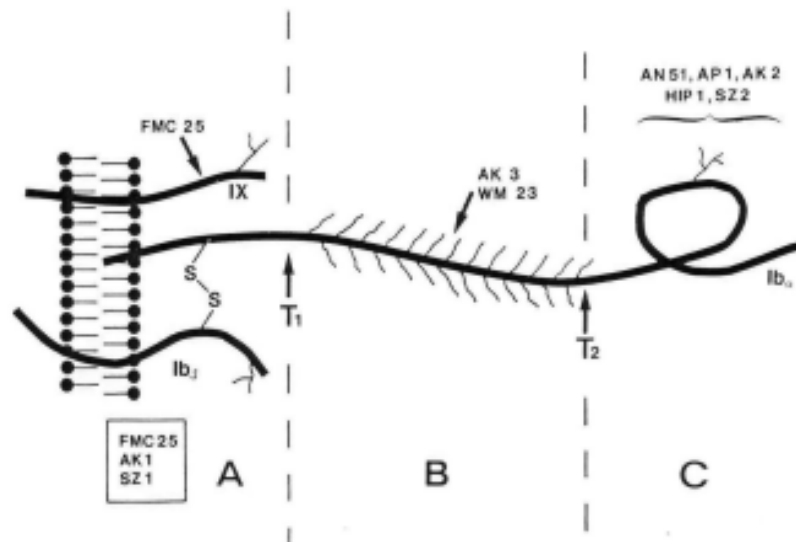


รูปที่ 7 Structure of platelet gpIb α

(ดัดแปลงจาก Alan D. Michelson. Platelets. New York, AP Academic Press, 2002)

External domain ในบริเวณส่วนที่ใกล้กับ trans-membrane domain มีความไวต่อการย่อยด้วย protease หลายชนิด⁴⁷ (ได้แก่ calpain, plasmin, trypsin, elastase) ทำให้เกิด soluble fragment เรียกว่า glycofibrin ดังนั้น การพบ glycofibrin ในปริมาณสูงกว่าปกติ (plasma

normal level 1-3 g/ml) ช่วยระบุภาวะ platelet turnover ได้เป็นอย่างดี และช่วยแยกภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่เกิดจากการสร้างลดลงหรือมีการทำลายมากขึ้นด้วย⁴⁸ รูปที่ 8 แสดง glycofibrin เมื่อ gpIb/IX ถูกตัดด้วย trypsin (T1 และ T2)



รูปที่ 8 Glycocalyx (B region) เมื่อถูกตัดด้วย trypsin (T1 และ T2)

(รูปภาพดัดแปลงจาก platelet Immunobiology: Molecular and clinical aspects, Kunicki TJ, 1989)

gpV เป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ gpIb/IX โดยจับกับ gpIb/IX ด้วย noncovalent bond โครงสร้างร่วมของทั้งหมดจึงประกอบด้วย gpIb: gpIX: gpV เป็น 2:2:1 (รูปที่ 6) ผู้ที่มีความผิดปกติในการแสดงออกของ gpV เกิดเลือดทำงานผิดปกติและมีเลือดออกง่าย จึงเชื่อว่า gpV น่าจะมีบทบาทต่อ stability และการทำหน้าที่ของ gpIb/IX complex

Expression and function

พบการแสดงออกของ gpIb ได้บนผิวเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HEL ซึ่งใช้เป็นแหล่งของการโคลนยีนสำหรับการศึกษา gpIb

gpIb/IX มีหน้าที่ในการจับกับ vWF และส่งสัญญาณเข้าในเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการเพิ่ม cytosolic Ca^{2+} ร่วมกับ hydrolysis ของ phospholipids ได้ TXA_2 (รูปที่ 9)⁴⁹ สามารถยับยั้งการกระตุ้นด้วย Aspirin ได้ แต่หากการจับของ vWF เกิดขึ้นร่วมกับมี collagen พบว่าจะเสริมฤทธิ์การกระตุ้นเกล็ดเลือดได้ Interaction ระหว่าง vWF และ gpIb/IX ก่อให้เกิดปฏิสัมพันธ์กับ actin cytoskeleton ผ่านบริเวณ Actin-binding protein (ABP) ของ cytoplasmic domain (รูปที่ 6) เกิดการหดตัวและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือด ในผู้ป่วย BSS ซึ่งขาด gpIb/IX จะพบเกล็ดเลือดมีขนาดใหญ่⁵⁰ ซึ่งเป็นผลจาก

actin skeleton ไม่ทำงาน ทำให้เมมเบรนของเกล็ดเลือดยืดหยุ่น ไม่มีการหดตัว⁵¹

III. Immunoglobulin family cell adhesion receptors

บนผิวเกล็ดเลือดมีไกลโคโปรตีนที่มีโครงสร้างชีวเคมีจัดอยู่ในกลุ่ม adhesion receptors ได้แก่ PECAM-1, FcγRII, ICAM-2 และ HLA class I ซึ่งไม่ได้มีบทบาทมากเท่ากับ gpIb/IIIa และ gpIb/IX นัก จึงขอล่าวเพียงเล็กน้อย

1. PECAM-1 (Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1)

พบได้ทั้งบนเมมเบรนของเกล็ดเลือด ผนังหลอดเลือด monocytes myeloid cells และ lymphocyte⁵² เนื่องจากสามารถจับได้กับโมเลกุลใดๆ ที่มีโครงสร้างคล้าย heparin จึงเชื่อว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ของเกล็ดเลือดด้วยกันเอง หรือระหว่างเกล็ดเลือดกับเซลล์อื่น PECAM-1 บนผนังหลอดเลือดพบในบริเวณรอยต่อของเซลล์ ซึ่งน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวออกสู่เนื้อเยื่อ (transmigration)⁵³

2. *FcγRII*

เป็นตัวรับจำเพาะสำหรับส่วน Fc ของ immunoglobulin สามารถจับกับ immune complex⁵⁴ พบว่าการกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด ต้องอาศัย *FcγRII* ด้วย⁵⁵ นักวิจัยตั้งข้อสังเกตว่า การกระตุ้นที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี นอกจากนี้ ปริมาณ *FcγRII* บนผิวเกล็ดเลือดแตกต่างกันในบุคคลแต่ละคน

3. *ICAM-2 (Intracellular adhesion molecule-2)*

มี ligand เฉพาะคือ LFA-1 ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว จึงน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาว โดยปกติพบ *ICAM-2* ในเมมเบรนของ OCS และ plasma membrane⁵⁶

4. *HLA-class I*

พบได้บนเกล็ดเลือด แต่ส่วนใหญ่จะไม่พบ HLA-B และบางส่วนของ HLA-C antigens⁵⁷

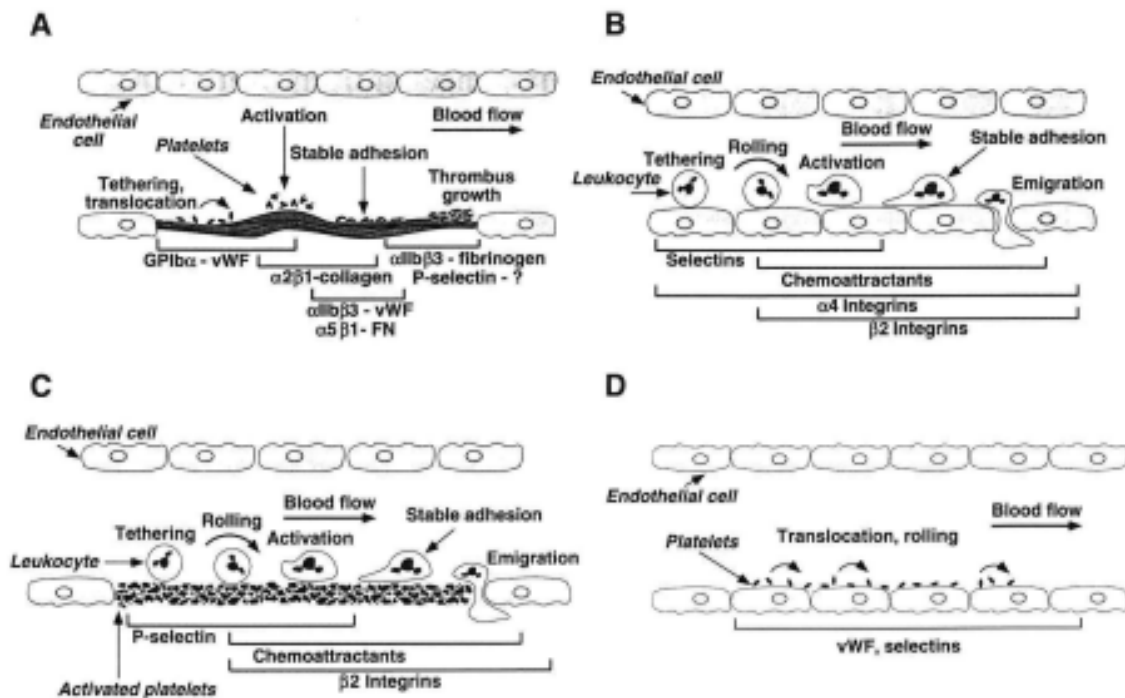
IV. Selectin

แบ่งเป็น 3 ชนิดคือ E-selectin พบบนผนัง

หลอดเลือด L-selectin พบบนเซลล์เม็ดเลือดขาวและ P-selectin พบบนเกล็ดเลือด

P-selectin หรือ GMP-140 หรือ PADGEM พบได้บนเมมเบรนของ α -granule หลังการกระตุ้นเกล็ดเลือด และเนื่องจากเมมเบรนของเกรนูลเชื่อมต่อกับ OCS ดังนั้น จึงสามารถตรวจพบ P-selectin ได้บน plasma membrane ของเกล็ดเลือด การแสดงออกของโมเลกุลนี้บนผิวเกล็ดเลือด ช่วยระบุได้ว่าการกระตุ้นเกล็ดเลือดในร่างกาย⁵⁸

P-selectin กำหนดการสร้างโดยยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 1⁵⁹ มีบทบาทเกี่ยวกับการเกาะติดของเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาว โดยใช้ lectin domain ของ P-selectin จับกับ SLe (sialyl-3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine) บน L-selectin ของเม็ดเลือดขาว⁶⁰ นอกจากนี้ P-selectin อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด thrombus ด้วย เนื่องจากการทดลองพบว่าในสภาวะที่มีแอนติบอดีต่อ P-selectin สามารถยับยั้งการเกิด platelet thrombus ได้⁶¹ และในผู้ป่วย thrombotic consumption platelet disorders ระดับ serum P-selectin ยังสูงกว่าปกติ รูปที่ 9 แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาว และผนังหลอดเลือดผ่านโปรตีนในกลุ่ม Selectin



รูปที่ 9 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาวและผนังหลอดเลือด
ผ่านโปรตีนในกลุ่ม Selectin

(ดัดแปลงจาก Alan D. Michelson. Platelets. New York, AP Academic Press, 2002)

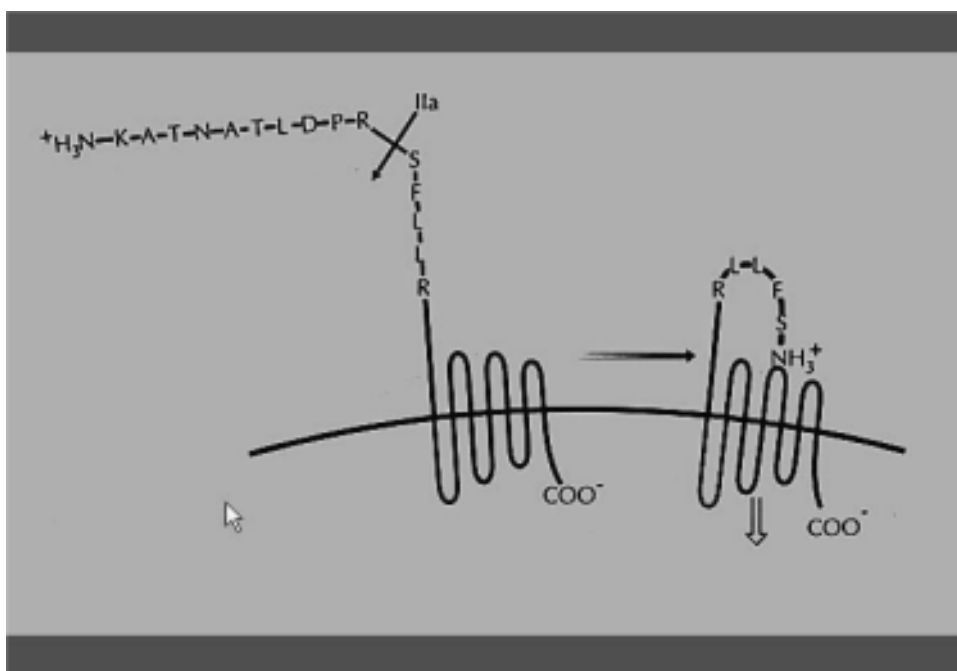
V. Seven transmembrane domain (G protein-linked)

ได้แก่ Thrombin receptor ซึ่งเมื่อได้รับการกระตุ้นจาก thrombin จะส่งสัญญาณเข้าในเกล็ดเลือดผ่าน G protein ที่เมมเบรนของเกล็ดเลือด ทำให้เกิด calcium influx และ phospholipids hydrolysis สุดท้ายมีการเปลี่ยนแปลงของ cytoskeleton กระตุ้นเกล็ดเลือดและมี released action จากแกรนูล

Thrombin receptor มีตำแหน่งที่ถูกตัดได้ด้วย thrombin คือ Arginine 41 (R41) กลไกการทำงานคือ thrombin เข้าจับกับ thrombin receptor และ peptide ปลาย N-terminal ที่ตำแหน่ง R41⁶² ปลาย N-terminal ที่เกิดขึ้นใหม่ (เรียกว่า Tethered ligand) จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างและม้วนตัวเข้าไปจับกับปลาย C-terminal ของ thrombin receptor ที่อยู่ในเมมเบรน⁶³ (รูปที่ 10) เกิดการ

ส่งสัญญาณผ่าน G protein เข้าสู่ภายในเกล็ดเลือดต่อไป และพบว่าแอนติบอดีจำเพาะต่อส่วน tethered ligand สามารถยับยั้งการกระตุ้นเกล็ดเลือดได้⁶⁴ ซึ่งเป็นการยืนยันกลไกการกระตุ้นเกล็ดเลือดผ่าน thrombin receptor

ในส่วนของ N-terminal ที่ถูกตัดออกโดย thrombin มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับปลาย C-terminal ของ Hirudin และสามารถจับกับ thrombin ได้ จากการศึกษาพบว่าลำดับกรดอะมิโนจำนวน 9 ลำดับที่ปลาย N-terminal นับจากตำแหน่ง R41 มีความสำคัญในการกระตุ้น thrombin receptor ได้เช่นกัน จากการสังเคราะห์ peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าว (SFLNPNDK)⁶⁵ และนำมาใช้ศึกษาพบว่า peptide สามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดแทน thrombin ได้ จึงเรียกชื่อว่า thrombin receptor activating peptide (TRAP)



รูปที่ 10 กลไกการกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วย thrombin (IIa) ผ่าน thrombin receptor
(ดัดแปลงจาก Alan D. Michelson. Platelets. New York, AP Academic Press, 2002)

VI. Four-transmembrane domains (Quadraspanins)

โปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดที่อยู่ในกลุ่มนี้คือ p24 พบเป็นจำนวนมาก (ประมาณ 40,000 โมเลกุลต่อหนึ่งเกล็ดเลือด) สามารถพบได้บนผิวเซลล์ชนิดอื่นด้วย ได้แก่ endothelium, smooth muscle cell, fibroblast, lymphocyte, eosinophil และ basophil⁶⁶ มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ aggregation จากการศึกษโดยใช้แอนติบอดีต่อ p24 พบว่าสามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดผ่านแอนติบอดีนี้ แต่การกระตุ้นอาศัย FcγRII และ extracellular Ca^{2+} ร่วมด้วย กลไกการกระตุ้นผ่านเมตะบอลิซึมของ phosphatidylinositol ที่เมมเบรน⁴¹

VII. Two-transmembrane domain

โปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดที่อยู่ในกลุ่มนี้คือ gpIV พบประมาณ 20,000 โมเลกุลต่อหนึ่งเกล็ดเลือด หน้าที่และบทบาทยังไม่ชัดเจน เชื่อว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการเป็นตัวรับจำเพาะของ collagen⁶⁷ และ throm-

bospondin⁶⁸ อย่างไรก็ตามพบว่าคนที่ขาดโมเลกุลนี้เกล็ดเลือดก็ยังจับกับ thrombospondin ได้อยู่โดยใช้ตัวรับอื่น นอกจากพบบนเกล็ดเลือดแล้ว ยังพบ gpIV ได้บนผิวเซลล์ชนิดอื่นได้แก่ monocyte, endothelium, hematopoietic cell line และ melanoma cell⁴¹

เอกสารอ้างอิง

1. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, et al. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. Blood 1988; 71: 831
2. Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. Cell 1987; 48: 549
3. Hynes RO. The complexity of platelet adhesion to extracellular matrixes. Thromb Haemost 1991; 66: 40
4. Peerschke EIB. Platelet membranes and receptors. In Schafer AI, Loscalzo J (Eds), Thrombosis and hemorrhage. Boston: Blackwell

- scientific, 1994: 219
5. Bennett JS. The molecule biology of platelet membrane proteins. *Semin Hematol* 1990; 27: 186
 6. Sosnoski DM, Emanuel BS, Hawkins AL, et al. Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptor subunits and for platelet glycoprotein IIb and IIIa. *J Clin Invest* 1988; 81: 1993
 7. Rosa JP, McEver RP. Processing and assembly of integrin, glycoprotein IIb-IIIa by HEL cells. *J Biol Chem* 1989; 264:12596
 8. Fitzgerald LA, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (Eds), *Hematostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*, 2nd Edition. Philadelphia, JB Lippincott, 1987: 572
 9. Parker RI, Gralnick HR. identification of platelet glycoprotein gpIIb/IIIa as the major binding site for released platelet-von Willebrand factor. *Blood* 1986; 68: 732
 10. Clemetson KJ, McGregor JL, McEver RP, Jacques YV, Bainton DF, Domzig W, Baggiolini M. Absence of platelet membrane glycoproteins IIb/IIIa from monocytes. *J Exp Med* 1985; 161:972
 11. Fitzgerald LA, Leung B, Phillips DR. A method of purifying the platelet membrane GPIIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1985; 151: 169
 12. Newman PJ, Kahn RA. Purification of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa using high performance liquid chromatography gel filtration. *Anal Biochem* 1983; 132: 215
 13. Paraise LV, Phillips DR. Fibronectin-binding properties of the purified platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1986; 261: 14011
 14. Poncz M, Eisman R, Heidenreich R, Silver SM, Vilaire G, Surrey S, Schwartz E, Bennett JS. Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the α subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *Science* 1986; 231: 1559
 15. Fitzgerald LA, Steiner B, Rall SC Jr, Lo S-S, Phillips DR. Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J Biol Chem* 1987; 262: 3936
 16. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 1986; 46: 271
 17. Collier BS. Inherited disorders of platelet function. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (Eds), *Haemostasis and thrombosis*. 3rd Edition. Edinbergh: Churchill Livingstone, 1994: 721-66
 18. Bennett JS, Hoxie JA, Leitman SF, et al. Inhibition of fibrinogen binding to stimulated human platelets by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2417
 19. Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, et al. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa: Member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science* 1986; 231: 1559-62
 20. Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, et al. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen: Synthesis and structure-function relationship of peptide corresponding to the carboxy-terminal segment of gamma chain. *Biochemistry* 1984; 23: 1767
 21. Phillips DR, Jennings LJ, Edwards HH. Identification of membrane proteins mediating the

- interaction of human platelets. *J Cell Biol* 1980; 86: 1767
22. Horwitz A, Duggan K, Buck C, et al. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin: a transmembrane linkage. *Nature* 1986; 320: 531
 23. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Further evidence that glycoprotein IIb-IIIa mediates platelet spreading on subendothelium. *Thromb Haemost* 1991; 65: 202
 24. Harrison P. Platelet α -granular fibrinogen. *Platelets* 1992; 170: 1745
 25. Miles LA, Ginsberg MH, White JG, et al. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *J Clin Invest* 1986; 77:2001-9.
 26. Powling MJ, Hardisty RM. Glycoprotein IIb-IIIa complex and Ca^{2+} influx into stimulated platelets. *Blood* 1985; 66:731
 27. Ameison JC, Joseph M, Caen JP, et al. A role of glycoprotein IIb-IIIa complexes in the binding of IgE to human platelets and platelet IgE-dependent cytolytic function. *Br J Haematol* 1986; 64: 21
 28. Santoro SA. Molecular basis of platelet adhesion to collagen. In: Jamieson GA (Ed), *Platelet membrane receptors: Molecular biology, immunology, biochemistry and pathology*. New York, Liss, 1988: 219
 29. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptor. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 375
 30. Coller BS, Cheresh DA, Asch E, et al. Platelet vitronectin receptor expression differentiates Iraqi-Jewish from Arab patients with Glanzmann's thrombasthenia in Israel. *Blood* 1991; 77: 75
 31. Lawler J, Hynes RO. An integrin receptor on normal and thrombasthenic platelets which binds thrombospondin. *Blood* 1989; 74: 2022
 32. Beckstead JH, Stenberg PE, McEver RP, et al. Immunohistochemical localization of membrane and α -granule proteins in human megakaryocytes: Application to plastic embedded bone marrow biopsy specimen. *Blood* 1986; 67: 285
 33. Davies J, Warnick J, Totty N, et al. The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J Cell Biol* 1989; 109: 1817
 34. Cherish DA, Berliner SA, Vincente V, et al. Recognition of distinct adhesive on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 1989; 58:945
 35. Savill J, Dransfield I, Hogg H, et al. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 170
 36. Tsuji T, Tsunehisa S, Watanabe Y, et al. The carbohydrate moiety of human platelet glycolcalicin. *J Biol Chem* 1983; 258: 6335
 37. Choi ET, Engle L, Callow AD, et al. Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking $\alpha_v\beta_3$ integrin with a small peptide antagonist Gpengrgdspca. *J Vasc Surg* 1994; 19: 125
 38. Du X, Beutler L, Ruan C, et al. Glycoprotein iB and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood* 1987; 69: 524
 39. Lopez JA, Leung B, Reynolds CC, et al. Efficient plasma membrane expression of a functional platelet glycoprotein Ib-IX complex requires the presence of its three subunits. *J Biol Chem* 1992; 267: 12851
 40. Wicki AN, Clemetson KJ. Structure and function of platelet membrane glycoprotein Ib and V: Effects of leukocyte elastase and protease on platelet response to vWF and thrombin. *Eur J Biochem* 1985; 153: 1

41. Ware JA, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry and function. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ (Eds), Williams Hematology. 5th Edition. New York, McGraw-Hill Publishing Company, 1995; 1161
42. Wenger RH, Wicki AN, Kieffer N, et al. The 5' flanking region and chromosomal localization of the gene encoding human platelet membrane glycoprotein Ib alpha. *Gene* 1989; 85: 517
43. Howard MA, Firkin BG. Ristocetin: A new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh* 1971; 26: 362
44. Demarco L, Mazzucato M, Masotti A, et al. Localization and characterization of a thrombin binding site on platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 1994; 269: 6478
45. Ganguly P. Binding of thrombin to functionally defective platelets: A hypothesis on the nature of the thrombin receptor. *Br J Haematol* 1977; 37: 41
46. Fox JEB, Aggerbeck LP, Berndt MC. Structure of glycoprotein Ib-IX complex from platelet membrane. *J Biol Chem* 1988; 263: 4882
47. Solum NO, Hagen I, Filion-Myklebust C, et al. Platelet glyocalicin: Its membrane association in solvent and aqueous media. *Biochem Biophys Acta* 1990; 597: 235
48. Steinberg MH, Kelton JG, Collier BS. Plasma glyocalicin: An aid in the classification of thrombocytopenic disorders. *N Engl J Med* 1987; 317: 1037
49. Nurden AT, Dupuis D, Kunicki TJ, et al. Analysis of the glycoprotein and protein composition of Bernard-Soulier platelets by single and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1981; 67: 1431
50. Grottm KA, Solum NO. Congenital thrombocytopenia with giant platelets: A defect in the platelet membrane. *Br J Haematol* 1969; 16: 277
51. Bernard J. History of congenital hemorrhagic thrombocytopathic dystrophy. *Blood Cells* 1983; 9: 179
52. DeLisser HM, Yan HC, Newman PJ, et al. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1993; 268: 16037
53. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, et al. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endo CAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 1991; 114: 1059
54. Andreson GP, van de Winkel JGJ, Anderson CL. Anti-GPIIb/IIIa (CD41) monoclonal antibody-induced platelet activation requires Fc receptor-dependent cell-cell interaction. *Br J Haematol* 1991; 79: 75
55. Hildreth JEK, Derr D, Azorsa D. Characterization of a novel self-associating M_r 40,000 platelet glycoprotein. *Blood* 1991; 77: 121
56. Diacovo T, de Fongorolles AR, Bainton DF, et al. Intracellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) is present on resting and activated platelets and binds to purified leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *Blood* 1993; 82(suppl1): 34a
57. Mueller-Eckhardt B, Hauck M, Kayser W. HLA-C antigens on platelets. *Tissue Antigens* 1980; 16: 91
58. McEver RP. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells* 1990; 16: 73
59. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb*

- Haemost 1991; 65: 467
60. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. Blood 1990; 75: 550
61. Paiabrica T, Lobb R, Furie BC. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. Nature 1992; 359: 848
62. Vu T-KH, Wheaton VI, Hung DT, et al. Domains defining thrombin-receptor, interaction. Nature 1991; 353: 674
63. Vu T-KH, Wheaton VI, Hung DT, et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell 1991; 64: 1057
64. Hung DT, Vu T-KH, Wheaton VI, et al. Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. J Clin Invest 1992; 89: 1350
65. Liu L-W, Vu T-KH, Esomn CT, et al. The region of the thrombin receptor resembling hirudin binds to thrombin and alters enzyme specificity. J Biol Chem 1991; 266: 16977
66. Jennings LK, Fox CF, Kouns WC, et al. The activation of human platelets mediated by anti-human platelet p24/CD9 monoclonal antibodies. J Biol Chem 1990; 265: 3815
67. Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, et al. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. J Clin Invest 1987; 79: 1054
68. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA, et al. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. J Biol Chem 1989; 264: 7576