

A CA-PUMPA SAJÁTSÁGAINAK VIZSGÁLATA ÉP EMBERI VÖRÖSVÉRSEJTEKEN, IZOLÁLT MEMBRÁN FRAGMENTUMOKON ÉS KIFORDÍTOTT MEMBRÁN VEZIKULÁKON*

SZÁSZ ILMA, SARKADI BALÁZS, HASITZ MÁRIA, ENYEDI ÁGNES és GÁRDOS GYÖRGY

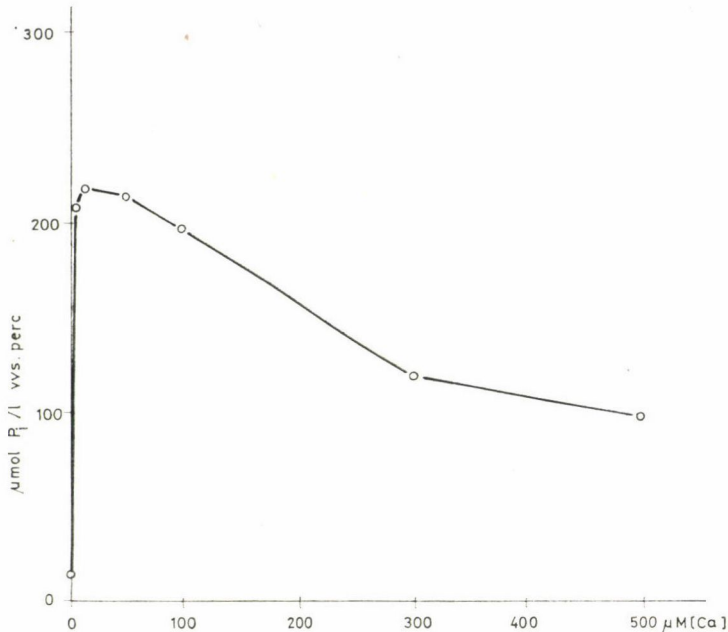
Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest és DOTE Orvosi Vegytani
Intézet, Debrecen

I. Aktív Ca-transzport, CaMgATPáz aktivitás és Ca-függő membrán foszforiláció ép vörösvérsejtekben

A Ca-pumpa Ca-affinitása

Korábbi munkáinkban beszámoltunk arról az eljárásunkról, amelynek során A23187 kalcium-ionofór segítségével sikerült az emberi vörösvérsejteket „megtöltenünk” kalciummal úgy, hogy az ionofór eltávolítása után kalcium transzport vizsgálatokra alkalmasak voltak (SARKADI és mtsai 1976). Megállapítottuk, hogy intakt vörösvérsejtekben a Ca-pumpa sebessége a belső Ca-szint emelésével 1 mM $[Ca]_i$ -ig fokozatosan nő (K_{mCa} 300–500 μM) (SARKADI és mtsai 1977). Módszert dolgoztunk ki arra is, hogy az intakt sejtekben a CaMgATPáz aktivitását megmérjük (SZÁSZ 1970). A CaMgATPáz Ca-érzékenysége a Ca-pumpáéhoz hasonló volt (SARKADI és mtsai 1977). QUIST és ROUFOGALIS (1975) Ca-töltött vörösvérsejt ghostokon az aktív Ca-transzport és a CaMgATPáz aktivitás Ca-érzékenységét szintén relatíve alacsonynak találta. Az aktív Ca-transzport A23187 jelenlétében természetesen nem mérhető, a CaMgATPáz aktivitás viszont igen. Érdekes, hogy A23187 jelenlétében a CaMgATPáz Ca-affinitása jelentősen megnő: 10–100 μM kalcium koncentrációnál maximális aktivitás mérhető, magasabb koncentrációk már gátló hatásúak ($K_i > 200 \mu M$) (1. ábra). Normál vérek között a görbe jellegében nem, de az abszolút értékekben jelentős különbségek észlelhetők (a maximum 40–350 $\mu mol P_i/1$ vvs. perc értéktartományban változott). Fizikai módszerekkel kimutatható, hogy az A23187 az általunk is alkalmazott koncentráció tartományban a membránszerkezetet már megváltoztatja (KLAUSNER és mtsai 1979). Ez a változás valószínűleg elősegíti a CaMgATPáz „aktiválódását”. Ez az aktiválódás nem következik be, ha a sejtet acetilfenilhidrazin előkezelésnek (20 mg/ml vvs.) tesszük ki (2. ábra), ami Heinz-test képződéshez és a Heinz-testek és a membrán kölcsönhatásához vezet, de a membrán számára is közvetlen oxidatív ártalmat jelent (SZELÉNYI

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15–18 között Sümegen elhangzott előadás.



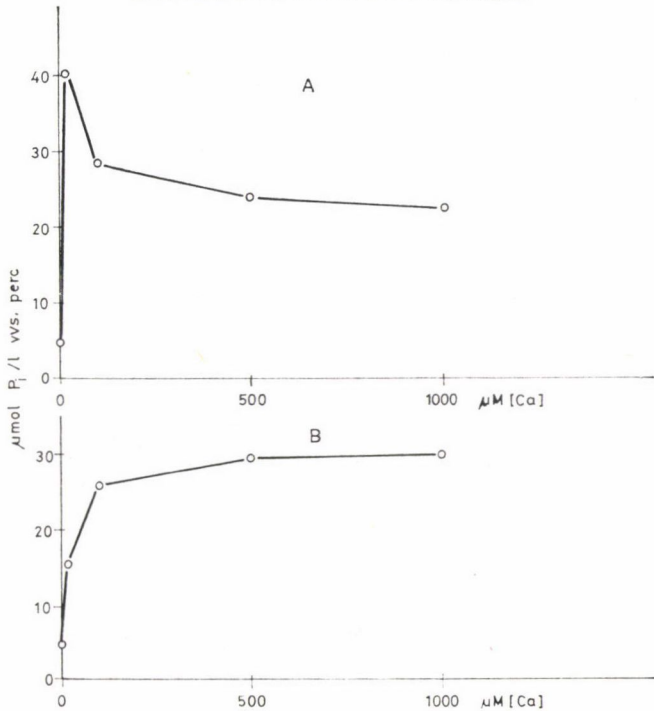
1. ábra. CaMgATPáz aktivitás intakt vörösvérsejteken A23187 jelenlétében. 150 mM NaCl + + 2,5 mM MgCl₂ (pH 7,4) oldattal ötször mosott vörösvérsejteket inkubáltunk 37 °C-on. Közeg: 2 µM A23187, 0,1 mM ouabain, 5 mM jódcetamid, emelkedő Ca-koncentráció (1, 10, 50, 100 ill. 500 µM) 0,155 M KCl-ben. Hkt: 16%. Az enzimaktivitás értékeket az első 10 percen felszabaduló anorganikus foszfát mennyiségéből számítottuk. A foszfort HAYASHI (1976) által módosított Murphy—Riley módszerrel határoztuk meg

és mtsai 1972). Az ionofór által előidézett aktiváló hatás kialakulását tehát az acetilfenilhidrazin által előidézett oxidatív ártalom megakadályozza.

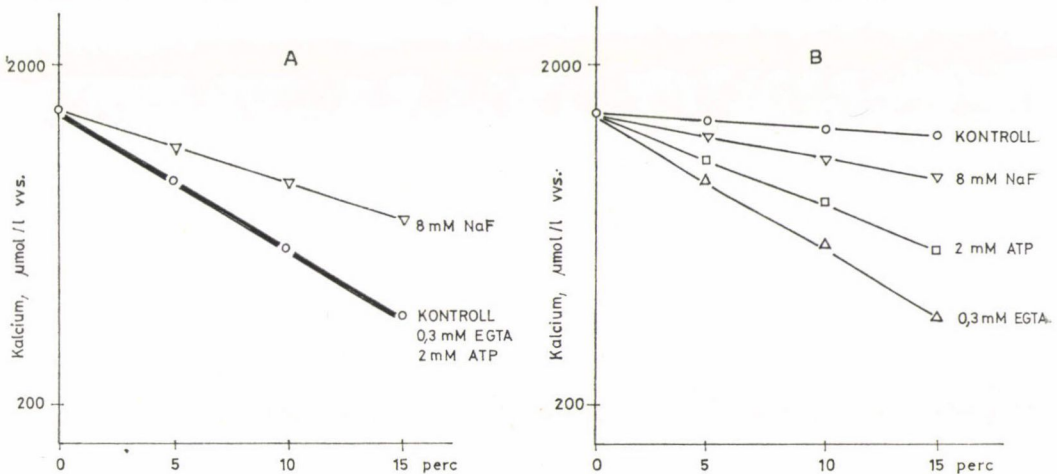
A fenti eredményeket összehasonlítva más adatokkal, pl. azon közlésekkel, amelyek szerint a Ca-EGTA pufferrel töltött vörösvérsejt ghostokban mind az aktív Ca-transzport, mind a CaMgATPáz aktivitás Ca-affinitása nagy (SCHATZMANN 1973), feltételezhető, hogy a membránban elhelyezkedő Ca-pumpa kétféle, kis és nagy Ca-affinitású állapotban fordulhat elő.

A Ca-pumpa gátlószerei

A Ca-töltött intakt vörösvérsejteken (amelyekből az ionofórt eltávolítottuk), a Ca-pumpát a következő anyagok gátolják jelentősen: lantán (és lantanidák), Hg²⁺, rutheniumvörös, fluorid, SH-reagensek. Ezek közül gyakorlatilag impermeábilis a lantán (QUIST, ROUFOGALIS 1975, SARKADI és mtsai 1977) és a higany (SZEINBERG, CLEJAN 1964, SHAMOO 1975). A lantán a külső felszínhez kötődve viszonylag könnyen leválasztható nemcsak EDTA-val, EGTA-val, de extracelluláris ATP-vel is, sőt a részleges Ca-pumpa gátlást előidéző fluorid (amely lantánnal jól oldható sőt képez) a lantános gátlást



2. ábra. CaMgATPáz aktivitás intakt vörösvérsejteken A23187 jelenlétében acetilfenilhidrazin előkezelés után. 150 mM NaCl + 2,5 mM MgCl₂ (pH 7,4) oldattal ötször mosott vörösvérsejteket 37 °C-on 2 órán át inkubáltuk A. 0,16 M KCl (pH 7,4)-ben, B. 0,16 M KCl (pH 7,4)-ben oldott 20 mg/ml vvs acetilfenilhidrazinnal. Az enzimaktivitás mérés feltételeit 1. az 1. ábra magyarázatánál



3. ábra. Lantánnal reagáló vegyületek hatása Ca-töltött intakt vörösvérsejtek Ca-kiáramlására és CaMgATPáz aktivitására. A vörösvérsejteket A23187 segítségével jelzett Ca-mal töltöttük, majd az ionofórt eltávolítottuk (SARKADI és mtsai 1977). A Ca-kiáramlást a ⁴⁵Ca-nak a felülészóban való megjelenése alapján mértük. Közeg: 130 mM KCl + 30 mM imidazol HCl (pH 7,4) + 2,5 mM CaCl₂. A. lantán nélkül, B. 0,2 mM LaCl₃

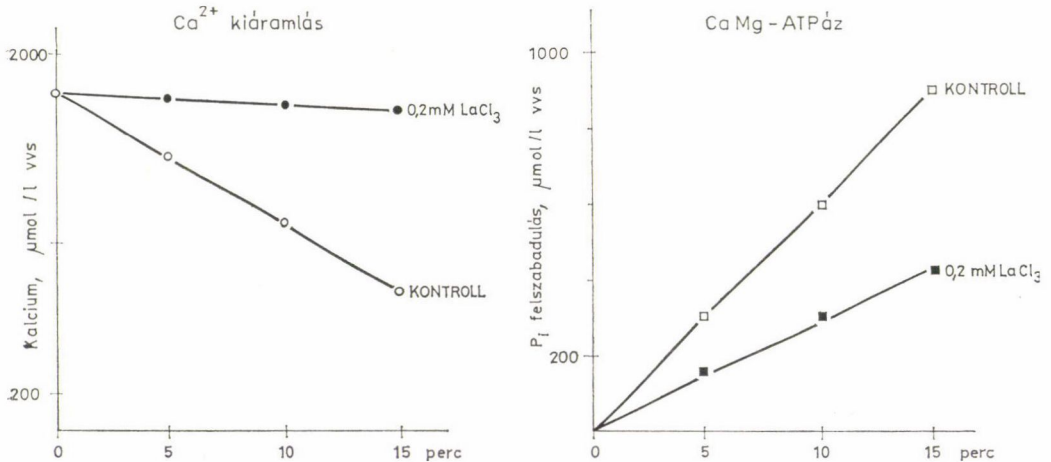
jelentősen csökkenti (3. ábra). Ezek az eredmények világosan mutatják, hogy a lantán nem penetrál, hanem a sejt külső felszínén fejti ki Ca-pumpa gátló hatását.

A Ca-pumpa sztöchiometriája

Az ATPáz aktivitást azon elv alapján mértük, hogy foszfoglicerinaldehid-dehidrogenáz (PGAD) és 2,3-difoszfoglicerát foszfatáz (2,3-DPGáz) gátolt vörösvérsejteken a felszabadult anorganikus foszfát gyakorlatilag ATP-ből származik. Előző vizsgálatainktól eltérően a két enzim gátlásához nem a jódcetát-tetratiónt kombinációt használtuk, hanem 5 mM jódcetamidot önmagában, mivel kimutattuk, hogy ez az SH-reagens ebben a koncentrációban nemcsak a PGAD-t, hanem a 2,3-DPGáz-t is gátolja, ugyanakkor a Ca-pumpára hatástalan. Azt tapasztaltuk, hogy a Ca-pumpa impermeábilis gátlószerei, a lantán (és a higany) 250 μM koncentrációban a Ca-effluxot mintegy 90–95%-ban, a CaMgATPáz aktivitást mintegy 50%-ban gátolták (4. ábra). Az impermeábilis gátlószerek számára nem hozzáférhető „CaMgATPázok” mögött feltételezhetően a következő enzimaktivitások állhatnak: foszfolipáz C-digliceridkináz-foszfatisav foszfatáz, valamint CaMgproteinkináz-proteinfoszfatáz enzimrendszerek, és esetleg „szétkapcsolódott” Ca-pumpa molekulák. A lantán-szenzitív CaMgATPáz-t a lantán szenzitív Ca-effluxhoz viszonyítva a Ca : ATP sztöchiometria 2 : 1-nek adódik (SARKADI és mtsai 1977).

Különböző kationok szerepe a Ca-pumpa működésében

A Ca-pumpa sebességét kívülről hozzáadott egyértékű kationok (K, Na) nem befolyásolják. Fontos azonban az intracelluláris Mg jelenléte. A23187

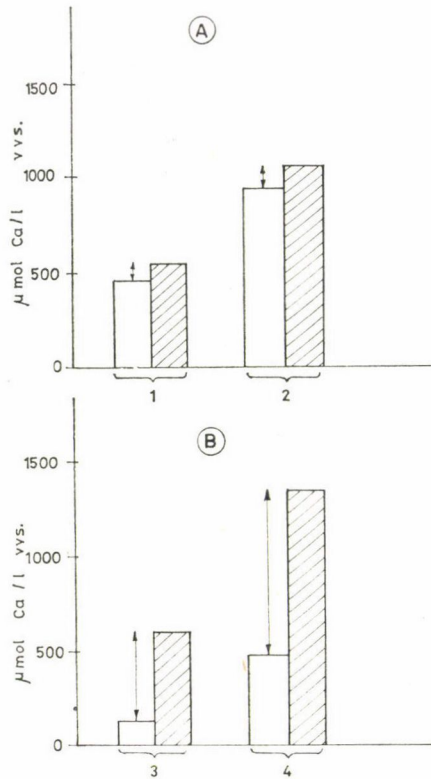


4. ábra. Lantán hatása Ca-töltött intakt vörösvérsejtek Ca-kiáramlására és CaMgATPáz aktivitására. Ca-töltés és efflux mint a 3. ábránál, foszfor meghatározás HAYASHI (1976) szerint. A rendszerek 5 mM jódcetamidot is tartalmaztak

+ EDTA kezeléssel előidézett Mg-depléción a sejteket microsphaerocyttákká alakítja, az aktív Ca-transzportot és a CaMgATPáz aktivitást teljesen leállítja, viszont a passzív Ca-felvétel mellett jól mérhető, lantán-szenzitív Ca : Ca exchange jelentkezik (Szász és mtsai 1978b). További vizsgálatokat igényel annak eldöntése, hogy ez a transzportjelenség a Ca-pumpa egy sajátos működésének tekinthető-e.

Klinikai vizsgálatként alkalmazható CaMgATPáz aktivitásmérés

Mint már említettük, az A23187 jelenlétében mért CaMgATPáz aktivitásnak normál vérek esetében is igen nagy szórása van, ezért klinikai vizsgálatra nem alkalmazható. Az ionofóros Ca-töltést követően az ionofór eltávolítása után mért értékeknél már jól megállapítható a normál tartomány : összCaMgATPáz : $59,8 \pm 7,2$ (SD), lantánszenzitív frakció : $27,8 \pm 2,4$ (SD); az eljárás azonban klinikai vizsgálatok céljára túlságosan bonyolult. Ezért az ionofóros töltési eljárást követő lépéseket úgy módosítottuk, hogy a CaMgATPáz mérési eljárás klinikai vizsgálatra alkalmas legyen. Az eredeti töltési eljárás után alkalmazott ötszörös, nagy térfogatban végzett albuminos mosás helyett csak kétszeres, kisebb térfogatban alkalmazott albuminos mosást iktatunk be. A szuszpenzióban maradt ionofór nyomokat részben lekötöttük a rendszerhez adott 0,8% albuminnal, részben pedig Mn-nal reagáltattuk. A mangán alkalmazásának célja az volt, hogy megakadályozzuk a sejtek ionofór mediált lantán felvételét. Az A23187 ugyanis 200-szor jobban köti a mangánt és kétszer jobban a magnéziumot, mint a kalciumot, a lantánt pedig a kalciumnál is kevésbé. $200 \mu\text{M}$ Mn, 2 mM Ca, 2 mM Mg és $0,2 \text{ mM}$ La koncentráció mellett ionofór-mediált lantán transzporttal már nem kell számolnunk, a lantán nem lép be a sejtek belsejébe. Kísérleteink szerint mangán jelenlétében nemcsak ionofór mediált lantán transzporttal, de még jelentős ionofór mediált kalcium transzporttal sem kell számolnunk, még akkor sem, ha a külső közegből a kalciumot és magnéziumot is elhagyjuk. Amikor a sejt kalciummal töltött, a közegben mangán és lantán van jelen, és a rendszer ionofór nyomokat tartalmaz, a lantán-szenzitív Ca-efflux és CaMgATPáz aktivitás megfelel az ionofór mentes Ca-töltött vörösvérsejtekben észlelteknél. Mangán hiányában viszont a sejtek az intracelluláris kalciumtól megszabadulni nem tudnak, jelezve, hogy a rendszerben maradt ionofór nyomok kalciumot transzportálnak (5. ábra). A rendszerben maradt szabad ionofór mennyisége azonban messze kevesebb, mint azok a koncentrációk, amelyek membránszerkezet változást okoznak. Módszerünkkel 10 normál véren $1-2 \text{ mM}[\text{Ca}]_i$ mellett a teljes CaMgATPáz aktivitás $50,84 \pm 7,4$ (SD)-nek, a lantán szenzitív CaMgATPáz aktivitás $32,8 \pm 6,4$ (SD)-nek adódott. Jelen vizsgálati rendszerünkben a lantán inszenzitív frakció jelentősen alacsonyabb ($18,04 \pm 6,7$), mint az ionofór teljes eltávolítása után mért korábbi értékeink ($32,0 \pm 5,3$). Ennek oka valószínűleg a Mn protein-



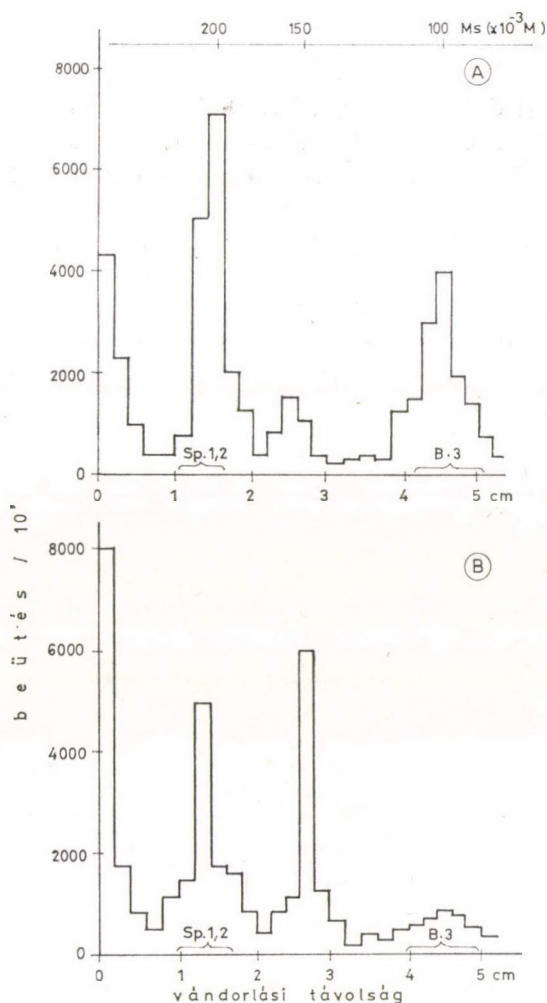
5. ábra. Ca-efflux $200 \mu\text{M Mn}^{2+}$ mellett A23187 nyomok jelenlétében. A vörösvérsejteket A23187 segítségével töltöttük jelzett Ca-mal, az ionofórt csak részlegesen távolítottuk el (két mosás $3 \times$ -os térfogatú, $0,5\%$ albumin tartalmú $0,16 \text{ M KCl}$ -ben). A sejtek ^{46}Ca aktivitását mértük 10 perces 37°C -os inkubálás után. Inkubáló közeg: $1,25\%$ albumin tartalmú $0,16 \text{ M KCl}$ ($\text{pH } 7,0$). A. Mangán nélkül, B. $200 \mu\text{M MnCl}_2$ -dal. Üres hasáb: kontroll, vonalkázott hasáb: $0,2 \text{ mM LaCl}_3$. Nyíl: La-szenzitív Ca-efflux (10° . Kiinduló sejt $[\text{Ca}]$: 1 = $656 \mu\text{mol/l}$; 2 = $1218 \mu\text{mol/l}$; 3 = $654 \mu\text{mol/l}$; 4 = $1565 \mu\text{mol/l}$)

kináz gátló hatásában keresendő. Klinikai CaMgATPáz mérő módszerünkkel a lantán szenzitív frakció (vagyis a Ca-pumpához rendelt ATPáz) csökkenését észleltük sarlósejtes anaemiában szenvedő betegeken.

A membrán Ca-függő foszforilációja

^{32}P -ATP tartalmú intakt vörösvérsejtekben eddig csak a spektrin és a band 3 membrán régiókban mutattak ki ^{32}P -beépülést (GREENQUIST, SHOHEI 1975). Mi adenin-inozin- ^{32}P előkezeléssel a sejt ATP készletét intenzíven jeleztük (SZÁSZ és mtsai 1978a). Ezt követően különböző kezelésekkel (A23187, propranolol, ATP-depléció, Mg-depléció) Ca-felvételt idéztünk elő, majd a sejteket hemolizáltuk és WOLF és SCHATZMANN (SCHATZMANN 1973) szerint membránt preparáltunk belőlük. A membrán SDS-poliakrilamidgél elektroforetogramján a $150\,000$ daltonos régióban intenzív jelölődést észleltünk.

Ez a jelölődés ATP- és Mg-depletált sejtekben is megjelent (6. ábra). Amennyiben az ATP-depleció folyamán lantán is volt a rendszerben, ebben a régióban a foszforiláció még intenzívebb volt. (A hemolízis időpontjában a sejtekben már csak $0,1 \mu\text{M}$ nagyságrendű ATP volt, ami a hemolízis során tízszeresére hígult. Ehhez a hemolizátumhoz a megfelelő koncentrációban adott lan-



6. ábra. Membrán polipeptidek foszforilációja Ca-felvétel során ^{32}P -ATP tartalmú intakt vörösvérsejtekben. Az ATP kiinduló specifikus aktivitása a sejtekben: 20 000–40 000 cpm/ μmol . Inkubációs közegek: A. 150 mM NaCl, 1 mM Trisz-EDTA, 5 mM Trisz-HCl (pH 7,0). B. 145 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , 2 mM jódatetamid, 10 mM inozin, 5 mM Trisz-HCl (pH 7,0). Inkubációs idő: 90 perc. $t = 37^\circ\text{C}$. Hkt: 30%. Vörösvérsejt ATP koncentráció 90° -nél: A. 1,6 mM, B. 1 μM . Inkubálás után a sejtekből hűtve membránt preparáltunk (SCHATZMANN 1973). 100 μg membrán fehérjét SDS-poliakrilamid gél elektroforézisnek vetettünk alá (SHAPIRO és mtsai 1967). A gél-szegmentumok radioaktivitás mérése GEZELIUS (1977) szerint történt

tán a foszforilációt nem befolyásolta, hatását tehát az intakt sejt inkubációs időszakára tehetjük.) Feltételezhető, hogy az inkubáció során a lantán az aktiválódó Ca-pumpa molekulák foszforilált formájához kapcsolódott a sejt külső felszínén és azok defoszforilációját akadályozta meg. (Hg^{2+} előkezelés után a jelenség nem volt észlelhető, valószínűleg a haemoglobin nagy Hg^{2+} affinitása miatt, ami a hemolízis során a Hg^{2+} haemoglobinhoz való átkötődését eredményezhette.)

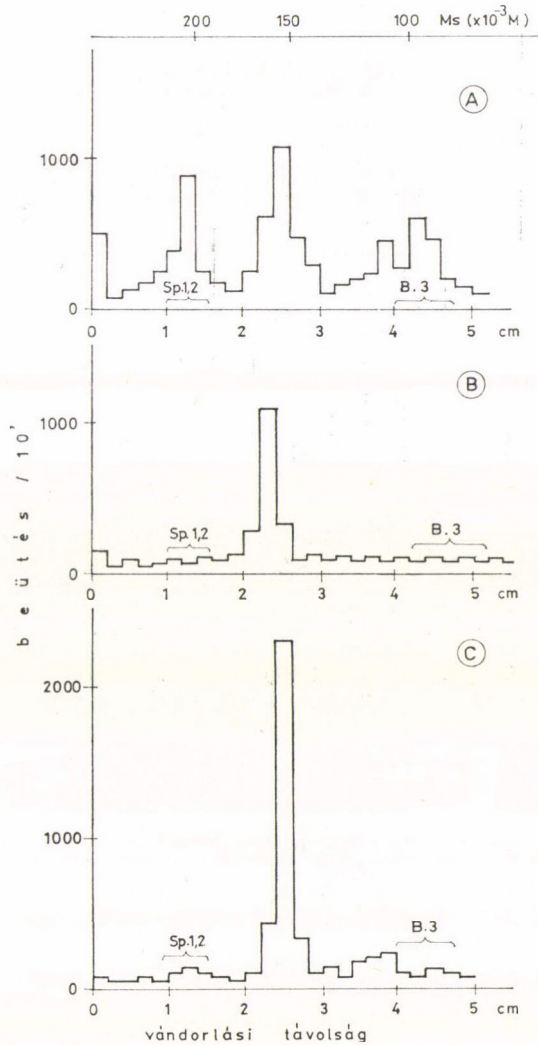
II. CaMgATPáz, Ca-függő membránfoszforiláció izolált membrán-fragmentumokon és kifordított membrán vezikulákon (inside-out vesicles, IOV), aktív Ca-transzport vizsgálata IOV-n

Ca és La hatása a membrán és IOV foszforilációjára és defoszforilációjára

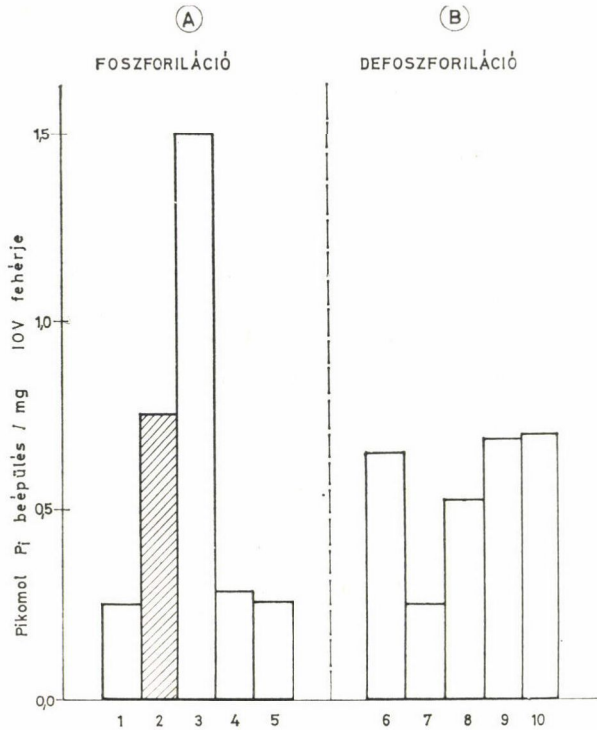
Amennyiben izolált membrán fragmentumokat kezeltünk ^{32}P -ATP-vel, EGTA + Ca puffer-rendszerekben a spektrin 2, a band 3 és a 150 000 daltonos régió egyaránt foszforilálódott, és a teljes membránba épült radioaktivitás szabad Ca jelenlétében az EGTA-s rendszerhez viszonyítva nem nőtt, hanem csökkent. (Ugyanígy csökken a foszforiláció szabad Ca jelenlétében az IOV-k Ca-transzportjának vizsgálatára összeállított rendszerekben: ATP 500 μM , Mg 5 mM, Ca 1–300 μM .) EDTA + Ca tartalmú rendszerekben azonban csak a 150 000 daltonos régióban kaptunk ^{32}P -beépülést, és 250 μM szabad Ca az EDTA-s kontrollhoz viszonyítva jelentősen megemelte a teljes membránba épült radioaktivitás mértékét (7. ábra). A 150 000 daltonos régió foszforilálódó fehérje komponensét a Ca-pumpa foszforilálódó alegységének tekinthetjük (KNAUF és mtsai 1974). A foszforilációs reakció Ca-affinitása magas ($K_{\text{mCa}} : 0,2 \mu\text{M}$), és mint láttuk, Mg-ot nem igényel. Lantán hatására mind izolált membránon, mind IOV-n létrejön a foszforiláció ($K_{\text{mLa}} : 0,005 \text{ nM}$) és mértéke sokkal nagyobb, mint Ca esetében (8. ábra). 8 mM KF jelenléte a lantánnal indukált foszforiláció mértékét nem csökkenti, hanem fokozza.

Nagy mennyiségű hideg ATP hozzáadásakor a Ca-foszforilált membrán defoszforilációja követhetővé válik. 250 μM lantán ezt a defoszforilációt mintegy 70%-ban gátolja. Ez a gátlás azonos mértékű izolált membrán fragmentumon és IOV-n, holott az utóbbi objektumon a transzport lépést követően a kalcium kötőhelyek a vezikula belseje felé fordulnak, s így lantán számára nem hozzáférhetőek. A gátlás hasonló mértéke arra utal, hogy a Ca-pumpa működése ciklusában csak rövid ideig fordulnak a kalcium kötőhelyek a vezikula belseje felé. A defoszforiláció teljes gátlása csak magasabb (500–1000 μM) lantán koncentrációknál észlelhető, amelyek már a foszforilációt is gátolják (8. ábra). Lantánnal foszforilált membrán hideg ATP hozzáadására csak részlegesen defoszforilálódik, mutatva, hogy a lantános foszfori-

láció „zsákutca”, a teljes reakciólánc lejátszódását a lantán meggátolja. Felhívjuk még a figyelmet arra, hogy izolált membránfragmentumokon és IOV-n a lantán hatása teljesen azonos volt, jelezve, hogy ha a belső Ca-kötőhelyek a lantán számára hozzáférhetőek, akkor azokkal reagál, s innen — szemben az ép vörösvérsejtekkel — ATP-vel, F^- -dal le nem választható.



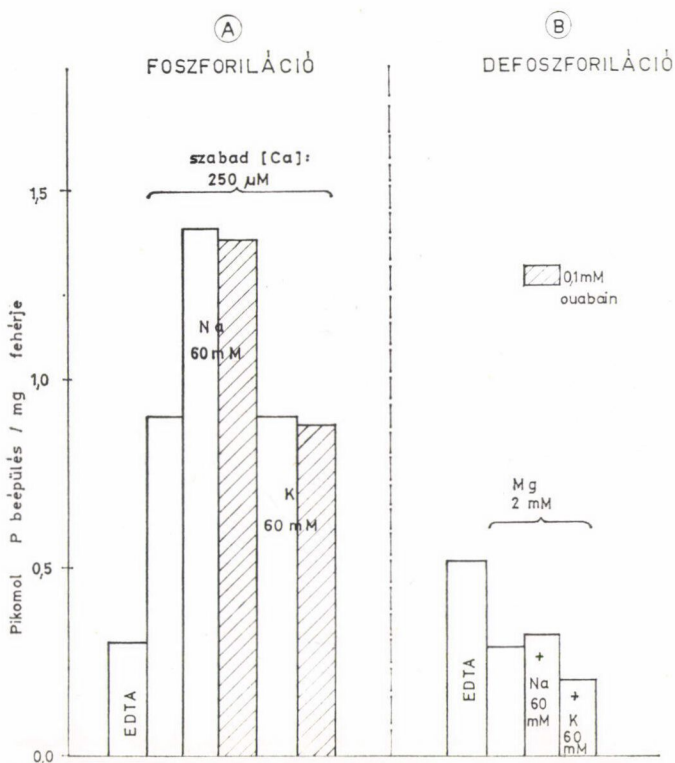
7. ábra. Izolált membrán foszforilációja ^{32}P -ATP-ről, Ca, EDTA + Ca, EDTA + La jelenlétében (SDS-poliakrilamidgél elektroforézis vizsgálat). SCHATZMANN (1973) szerint preparált membránt használtunk (0,4 mg fehérje/ml kísérleti elegy). Inkubációs közeg: $0,5 \mu M$ ^{32}P -ATP, 30 mM imidazol-HCl (pH 7,0) + A. 0,25 mM $CaCl_2$, B. 0,5 mM Trisz-EDTA + 0,75 mM $CaCl_2$, C. 0,5 mM Trisz-EDTA + 0,75 mM $LaCl_3$. Inkubációs idő: 30 mp. $t = 0^\circ C$. Alapos 6% TCA, 1 mM ATP, 10 mM H_3PO_4 -val való mosás után elektroforézis és mérés, mint a 6. ábránál



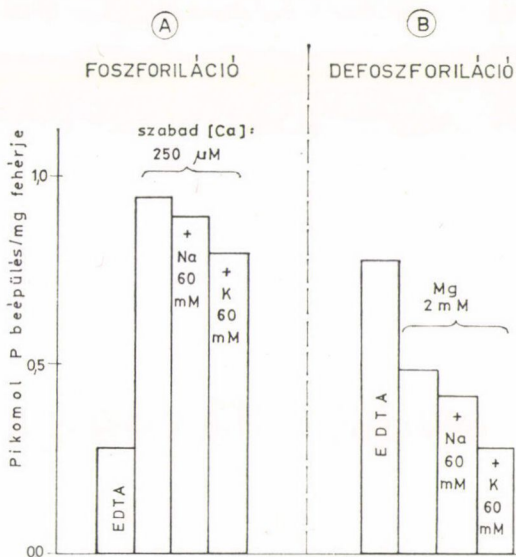
8. ábra. Lantán hatása IOV foszforilációjára és defoszforilációjára. Inkubációs közeg: $2,5 \mu\text{M}$ ^{32}P -ATP, 125 mM KCl, 30 mM imidazol HCl (pH 7,0). A. Foszforilációs kísérletek. 1 $0,5 \text{ mM}$ Trisz-EDTA, 2 $0,5 \text{ mM}$ Trisz-EDTA + $0,75 \text{ mM}$ CaCl_2 , 3 $0,5 \text{ mM}$ Trisz-EDTA + $0,75 \text{ mM}$ LaCl_3 , 4 $0,5 \text{ mM}$ Trisz-EDTA + $1,5 \text{ mM}$ LaCl_3 , 5 $250 \mu\text{M}$ CaCl_2 + $250 \mu\text{M}$ HgCl_2 . Inkubációs idő: 30 mp, $t = 0^\circ\text{C}$. B. Defoszforilációs kísérletek. Foszforiláció 2. rendszer szerint. 30 mp-nél + 1 mM ATP + 6 $0,5 \text{ mM}$ Trisz-EDTA, 7 $0,5 \text{ mM}$ MgCl_2 , 8 $0,5 \text{ mM}$ MgCl_2 + $0,25 \text{ mM}$ LaCl_3 , 9 $0,5 \text{ mM}$ MgCl_2 + 1 mM LaCl_3 , 10 $0,5 \text{ mM}$ MgCl_2 + $0,25 \text{ mM}$ HgCl_2 . Inkubálási idő: 15 mp. Mosás, mint a 6. ábránál, szolubilizálás, mérés Szász és mtsai (1978a) szerint

K és Na hatása a membrán és IOV Ca-indukált foszforilációjára és a defoszforilációra

Mint már említettük ép vörösvérsejten a külső K vagy Na jelenléte a Ca-pumpa sebességét nem befolyásolta; IOV-n a Ca-transzport sebességét növelte (SARKADI és mtsai 1978). Izolált membránfragmentumok CaMgATPáz aktivitását szintén fokozta (BOND, GREEN 1971, SCHATZMANN, ROSSI 1971). A vörösvérsejt membrán (valamint az agy mikroszóma) foszforilációja $\text{Mg} + \text{Ca} + \text{Na}$ jelenlétében nőtt, míg $\text{Mg} + \text{Ca} + \text{K}$ jelenlétében csökkent az univalent kationt nem tartalmazó kontrollokhoz viszonyítva (Szász 1975). Mivel ouabain az előbbi esetben csökkentette, utóbbi esetben növelte a foszforiláció mértékét, feltételezhetjük, hogy a foszforilációban a $\text{K} - \text{Na}$ pumpa foszforilált intermedierje is szerepet játszik. A $\text{K} - \text{Na}$ -pumpa Mg hiányában nem foszforilálódik, míg — mint az előbbieken láttuk — a Ca-pumpa



9. ábra. Ca + Na vagy K (\pm ouabain) hatása a vörösvérsejt membrán foszforilációjára és defoszforilációjára. A foszforiláció és defoszforiláció feltételeit l. 8. ábra magyarázatában

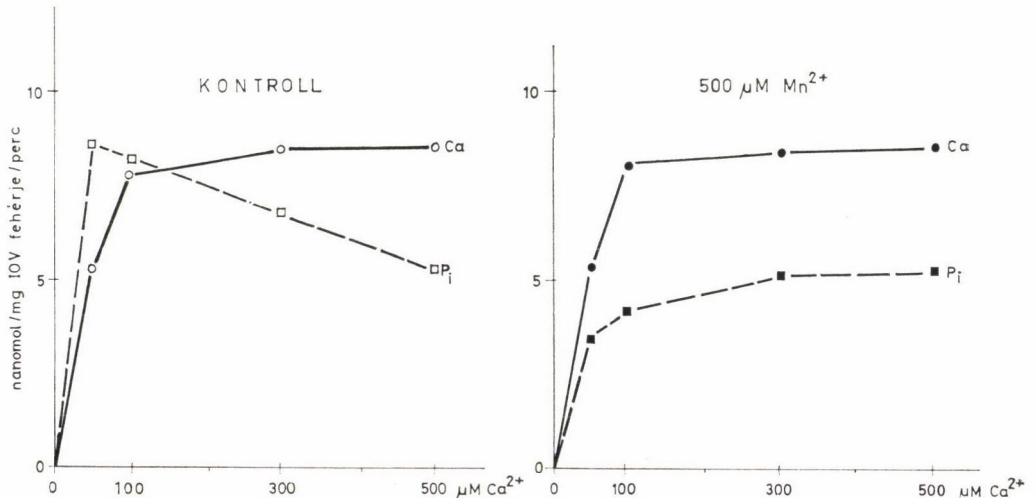


10. ábra. Ca + Na vagy K hatása IOV-k foszforilációjára és defoszforilációjára. Feltételeket l. 8. ábra magyarázatában

igen. Ezért a Na vagy K hatását a Ca-pumpa foszforilációjára EDTA + Ca jelenlétében vizsgáltuk meg. Izolált membránon a Na jelen esetben is fokozta, K pedig csökkentette a foszforilációt, a ouabain azonban hatástalan volt (9. ábra). Foszforilációt csak a 150 000 daltonos régióban észleltünk, a K—Na-pumpa foszforilálódó alegységének megfelelő 105 000 daltonos régióban nem. IOV-n mind a Na, mind a K csökkentette a foszforilációt (Na kisebb mértékben), s jól látható volt a defoszforiláció gyorsítása (10. ábra). Úgy látszik tehát, hogy fragmentált membránon, amennyiben megakadályozzuk a K—Na-pumpa foszforilációját, még mindig van Na-mal stimulálható foszforiláció (CaMgNa proteinkináz aktivitás?). Ennek molekuláris hordozóit IOV preparálás folyamán majdnem teljesen elveszítjük. A fenti eredményeket összegezve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Ca-pumpa működése során mind a Na, mind a K a membrán belső felszínével reagálva a defoszforilációt gyorsítja. Ez a következtetés összhangban van azzal a közléssel, hogy a vörösvérsejtmembrán p-nitrofenilfoszfátáz aktivitása Ca jelenlétében K vagy Na hatására fokozódik (REGA és mtsai 1973).

CaMgATPáz és sztöchiometria vizsgálatok IOV-n

IOV-n igyekeztünk a Ca-akkumuláció Ca : ATP sztöchiometriáját igazolni. A CaMgATPáz aktivitás Ca függése azonban ezen az objektumon erősen eltért a Ca-transzportétól. Míg a Ca-transzport K_{mCa} értéke $50 \mu M$ körül volt és $200\text{--}300 \mu M$ Ca maximálisan aktiváló hatású volt, a CaMgATPáz a μM oláris Ca-tartományban már maximális aktivitást adott és $200 \mu M$ Ca

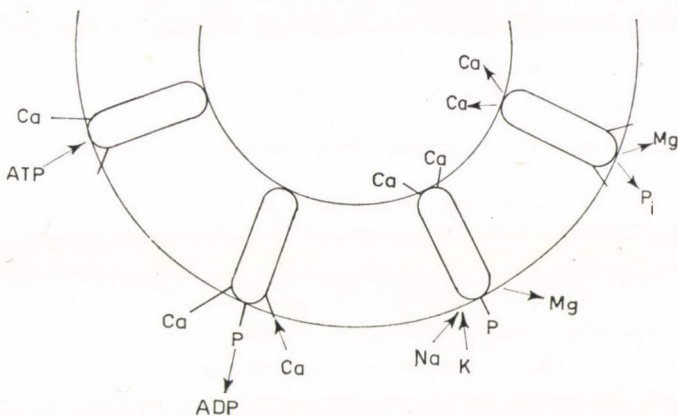


11. ábra. Mn hatása IOV-k aktív Ca felvételére és CaMgATPáz aktivitására különböző Ca koncentrációknál. $0,4 \text{ mg IOV fehérje/ml}$ rendszer. Közeg: $550 \mu M$ ATP, 5 mM Mg , 120 mM KCl , $30 \text{ mM imidazol HCl}$ (pH 7,0). Inkubációs idő: 10 perc . $t = 37^\circ C$. Foszfor meghatározás HAYASHI (1976) szerint, Ca-felvétel mérés SARKADI és mtsai (1978) szerint

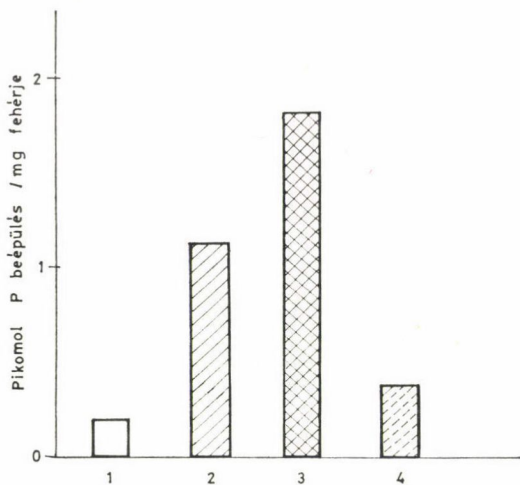
koncentrációnál hanyatlott (11A ábra). Az izolált membránfragmentumok CaMgATPáz aktivitásának Ca-érzékenysége is igen hasonló (Szász és mtsai 1977). Feltételeztük, hogy a membrán belső felszínén a nem Ca-pumpához rendelt egyéb enzimszerek zavaró hatásával állunk szemben (bár meg kell jegyeznünk, hogy ép vörösvérsejtekben ezek aktivitása közel párhuzamos volt a Ca-pumpa ATPázával). A membrán belső oldalán ható, szelektív Ca-pumpa gátlószert nem találtunk, lantán, higany, vanadát, quercetin, acetilfenilhidrazin minden Ca-aktivált ATPáz aktivitást eltüntetett. Trivalens kationokkal (Al, Fe) gátolva a foszfolipáz C aktivitását lényeges változást nem észleltünk. Egyedül a Mg-proteinkinázokat gátló Mn tette annyira hasonlóvá a Ca-transzport és a CaMgATPáz aktivitásának görbéit, hogy sztöchiometria számításokat is végezhetünk (11B ábra). A Ca : ATP arány 1,3—1,9 közötti értékeket adott, készítményenként jelentősen változó mértékben. Gondolnunk kell arra, hogy a Mn mint membránstabilizálószer hat, s az IOV-ben kis Ca koncentrációnál esetleg „szétkapcsolt” pumpa molekulák restitúcióját segíti elő. Az intakt sejtek A23187 jelenlétében Mn által előidézett lantán-inszenzitív CaMgATPáz aktivitás gátlása (l. fent) azonban arra utal, hogy a Ca-pumpától független ATP→Pi átalakulási folyamatok is gátlódnak. Hasonló, de még kifejezettebb hatást az IOV-k ATP nélkül 2—3 Mn Ca-mal történő előkezelése után is elértünk: 200 $\mu\text{M}[\text{Ca}]_i$ -nál 1,97—2,29 Ca : P sztöchiometria értékekkel. Mn jelenlétében és Ca előkezelés után nyert eredményeink a 2 : 1 Ca : ATP sztöchiometria arányt látszanak alátámasztani.

A Ca-pumpa mechanizmusa

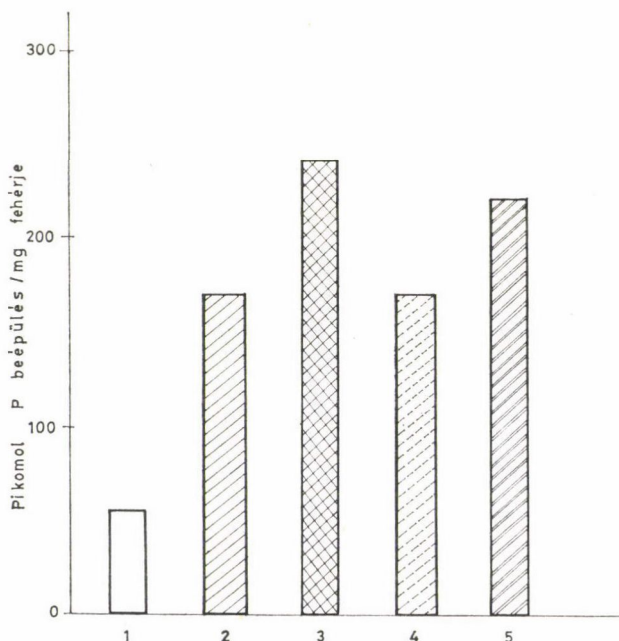
Kísérleteink alapján a Ca-pumpa működését a következőképpen képzeljük el (12. ábra): A magas Ca-affinitású Ca-kötőhelyre a membrán belső felszínén Ca kötődik és katalizálja 150 000 daltonos foszforiláló aleggység ^{32}P -ATP-ről történő foszforilációját. Ezt követően az alacsonyabb Ca-affini-



12. ábra. A Ca-pumpa működés feltételezett lépései IOV-n



13. ábra. Foszforiláz b kináz és foszforiláz foszfatáz hatása IOV-k foszforilációjára 0 °C-on. 0,4 mg IOV fehérje/ml. Közeg: ATP: 2,5 μ M 1. 500 μ M EDTA 2–4. 100 μ M Mg, 25 μ M Ca. Adalékok: 3. foszforiláz b kináz (0,015 E/ml) 4. foszforiláz foszfatáz (1,5 E/ml). Inkubációs idő: 1 perc. t = 0 °C



14. ábra. Foszforiláz b kináz, foszforiláz foszfatáz és kalmodulin hatása IOV-k foszforilációjára 37 °C-on. 0,4 mg IOV fehérje/ml. Közeg: ATP: 100 μ M 1. 500 μ M EDTA, 2–4. 5 mM Mg, 100 μ M Ca. Adalékok: 3 foszforiláz b kináz (0,015 E/ml), 4 foszforiláz foszfatáz (1,5 E/ml), 5 DEAE-cellulózra tisztított vörösvérsejt kalmodulin (0,05 mg/ml). Inkubációs idő: 1 perc. t: 37 °C

tású kötőhely is köt Ca-ot, s a molekula térszerkezete úgy változik meg, hogy két Ca-ot a membrán külső felszínére juttat (kérdéses, hogy a nagy affinitású kötőhelyhez kötődő Ca is transzportálódik-e, vagy a kis affinitású kötőhelyhez kapcsolódik két Ca?). A belső felszínen Mg és K vagy Na kötődik, katalizálja a molekula defoszforilációját, a Ca a pumpa molekuláról leválik és a pumpa felveszi kiinduló állapotát.

A Ca-pumpa aktivitás regulációja

Az alacsony Ca affinitású Ca-kötőhelyek affinitása a pumpa aktíválódási folyamata során megnövekedhet. Az itt vázolt molekuláris mechanizmus működése tehát egy reguláló rendszer által szabályozott. Ez valószínűleg a bimolekuláris lipid réteg belső felszínén húzódó hálózatban lokalizálódik s IOV preparálásakor részben eltávolítjuk, míg a vörösvérsejt oldható, ún. aktivátor fehérjéjének hozzáadásakor visszaadjuk. Lehetséges, hogy egy — a vörösvérsejt membránban kimutatott — CaMgproteinkináz-proteinfoszfataz rendszer foszforilációs folyamattal szabályozza a Ca-pumpa működését. Azok az IOV-készítmények, amelyeknek Ca-pumpa rendszere magas Ca-affinitású volt, ugyanolyan magas „CaMgATPáz” aktivitásúak (~ 30 nmol P_i /mg fehérje . perc $10 \mu M$ Ca-koncentrációnál), mint az izolált membrán fragmentumok. Alacsony Ca-affinitással rendelkező IOV-készítmények „CaMgATPáz” aktivitása ennek csak mintegy 1/5-e volt. A foszforilációs reguláció vizsgálata érdekében már ismert Ca-dependens enzimeket, a COHEN (1975) szerint részlegesen tisztított nyúl vázizom foszforiláz b kinázt és a Brandt és mtsai (1974) szerint tisztított nyúl vázizom foszforiláz foszfatázt adtuk az IOV-khez. EDTA + Ca tartalmú rendszerekben ezek az enzimek a foszforilációt nem befolyásolták. Mg jelenlétében viszont a kináz a foszforilációt mintegy 1,5-szeresre emelte, a foszfatáz pedig jelentősen csökkentette (13. ábra). A Ca-transzportot a kináz fokozta, a foszfatáz viszont semmi hatást nem mutatott. Ezért a foszforilációs kísérleteket a transzport vizsgálatoknak megfelelő körülmények között (hőmérséklet, ATP koncentráció) megismételtük. Ilyenkor a kináz hatása megmaradt, a foszfatáz semmi hatást nem fejtett ki (14. ábra). A kináz enzim hatásossága hőkezelés után nem változott. Ez arra utal, hogy a hatásért hőstabil Ca-kötő alegysége, a kalmodulin (LARSEN, VINCENZI 1979) felelős. Lehetséges, hogy ez, az IOV-n megmaradt proteinkinázokhoz kapcsolódva hat, de még nem tekinthető bizonyítottnak, hogy foszforilációs reakció szerepet játszik a regulációban. A kalmodulin szerepe viszont igen valószínűnek tekinthető. A foszforiláció szerepének tisztázását nagyon megnehezíti az a tény, hogy Ca és Mg jelenlétében nagyszámú vörösvérsejt membránkomponens foszforilálódik, amelyek közül egyelőre nem tudjuk elkülöníteni az esetleg a Ca-pumpa működéshez kapcsolódó komponenset. Ezért a továbbiakban igyekszünk az IOV-t megtisztítani e foszforilálódó komponensektől és az aktiválást ismert tisztított frakciók hozzáadásával előidézni.

Köszönetnyilvánítás

A technikai kivitelezésben nyújtott lelkes, megbízható segítségért ezúton is köszönetet mondunk Andrásni Lászlóné, Dr. Sarkadi Ádámné és Dr. Stokum Gyuláné asszisztenseknek.

A munka az Egészségügyi Minisztérium 3. sz. „Életfolyamatok szabályozásának mechanizmusa (Bioreguláció)” megnevezésű tárcaszintű kutatás főirányhoz elfogadott „Vörösvérsejtek transzport folyamatainak mechanizmusa. Vörösvérsejtek funkcionális és anyagcsere vizsgálata” c. témában végzett kutatómunka alapján készült (6—03—0306—01—1/Gá).

IRODALOM

- BOND, G. H., GREEN, J. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 393 (1971).
 BRANDT, H., KILLILEA, S. D., LEE, E. Y. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 598 (1974).
 COHEN, P.: *Eur. J. Biochem.* **34**, 1 (1973).
 GEZELIUS, G.: *Anal. Biochem.* **80**, 627 (1977).
 GREENQUIST, A. C., SHOHEI, S. B.: in “Erythrocyte Structure and Function”, ed. Brewer, G. J., Alan, R. Liss, Inc., New York p. 515 (1975).
 HAYASHI, M.: *Anal. Biochem.* **76**, 9 (1976).
 KLAUSNER, R. D., FISHMAN, M. C., KARNOVSKY, M. J.: *Nature* **281**, 82 (1979).
 KNAUF, P. A., PROVERBIO, F., HOFFMAN, J. F.: *J. Gen. Physiol.* **63**, 324 (1974).
 LARSEN, F. L., VINCENZI, F. F.: *Science* **204**, 306 (1979).
 QUIST, E. E., ROUFOGALIS, B. D.: *FEBS Letters* **50**, 135 (1975).
 REGA, A. F., RICHARDS, D. E., GARRAHAN, P. J.: *Biochem. J.* **136**, 185 (1973).
 SARKADI, B., SZÁSZ, I., GÁRDOS, G.: *J. Membrane Biol.* **26**, 357 (1976).
 SARKADI, B., SZÁSZ, I., GERLÓCZY, A., GÁRDOS, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **464**, 93 (1977).
 SARKADI, B., MACINTYRE, J. D., GÁRDOS, G.: *FEBS Letters* **89**, 78 (1978).
 SCHATZMANN, H. J.: *J. Physiol.* **235**, 551 (1973).
 SCHATZMANN, H. J., ROSSI, G. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 379 (1971).
 SHAMOO, A. E., MACLENNAN, D. H.: *J. Membrane Biol.* **25**, 65 (1975).
 SHAPIRO, A. L., VINUELA, E., MAIZELS, J. V., Jr.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 815 (1967).
 SZÁSZ, I.: Vörösvérsejtek ATP-igényes folyamatainak vizsgálata. Kandidátusi értekezés (1970).
 SZÁSZ, I.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **10**, 25 (1975).
 SZÁSZ, I., SARKADI, B., GÁRDOS, G.: *J. Membrane Biol.* **35**, 75 (1977).
 SZÁSZ, I., HASITZ, M., SARKADI, B., GÁRDOS, G.: *Mol. Cell. Biochem.* **22**, 147 (1978a).
 SZÁSZ, I., SARKADI, B., SCHUBERT, A., GÁRDOS, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **512**, 331 (1978b).
 SZEINBERG, A., CLEJAN, L.: *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 564 (1964).
 SZELÉNYI, J. G., BREUER, J. H., GYÖRFFY, GY., HASITZ, M., HORÁNYI, M., HOLLÁN, S. R.: *Haematologia* **6**, 327 (1972).