

VÖRÖSVÉRTEST FOSZFÁT TRANSZPORT

LATZKOVITS LÁSZLÓ

SZOTE Agykutató Intézete, Szeged

A foszfát transzport vizsgálatát vörösvértesteknél önálló, különleges problémává teszi az a tény, hogy a sejtbe penetráló foszfát — egyéb anorganikus anionoktól eltérően — jelentős sebességgel belép az anyagcserebe. Ilyen módon a foszfát felvétel egyúttal intracelluláris organikus foszfát észterekbe történő inkorporációt is jelent. Ezért a radioaktív nyomjelzéses technikával végzett kísérletek interpretálása lényegesen több adat együttes értelmezését teszi szükségessé, mint más anorganikus anionok vizsgálata esetén.

A foszfát transzport és anyagcsere szoros kapcsolata a vörösvértestekben (WHITTAM 1964) kétoldalú: egyrészt a sejt anorganikus foszfát szint emelkedése megnöveli a glikolízist (ROSE, WARMS és O'CONNELL 1964), másrészt utóbbi megváltoztathatja a sejtben a foszfát koncentrációt. Ilyen módon az anyagcsere változása foszfát koncentráció gradienst eredményezhet a sejt és médium között (WHITTAM 1964, IMARISIO és JAMISON 1967).

Tovább komplikálják a folyamat vizsgálatát a következő tényezők:

a) A foszfát felvétel egyensúlya viszonylag lassan, 2—3 óra múlva áll csak be (CHEDRU és CARTIER 1966, VESTERGAARD—BOGIND és HASSELBO 1960). Radiokémiai egyensúly a médium és a sejt foszfát poolok között napokat igényel (TILL, KÖHLER, RUSCHKE, KÖHLER és LÖSCHE 1973).

b) A foszfát anion a pH-től függően két anion: egy bivalens és egy monovalens anion elegye. A kettő aránya pH 7,4-nél — ahol a legtöbb vizsgálatot végeztek — 8/2 (WHITTAM 1964).

c) A vörösvérttest anorganikus foszfát pool és az azzal anyagcserekapcsolatban álló organikus foszfát poolok kompartmentalizáltak (TILL és mtsai 1973, LATZKOVITS 1971, LATZKOVITS, FAJSZI és SZENTISTVÁNYI 1972).

A fentiek érthetővé teszik, hogy az irodalomban hosszú ideig folyt a vita a vörösvérttest foszfát transzport jellegéről. Felfogásuk szerint a szerzők két csoportba sorolhatók:

1. Azok, akik a foszfát felvételt aktív transzportnak tekintették, vagy legalábbis feltételezték egy karrier mechanizmus, illetve organikus foszfát észterekbe történő beépülés elsődleges és kizárólagos szerepét a membránon át történő penetrációban.

2. Mások felismerték a foszfát transzport passzív jellegét: vagy egy-

szerű passzív diffúziót, vagy olyan „egyensúlyi karriert” tételeztek fel, mely legfeljebb csak extrém magas foszfát koncentrációk mellett telítődik.

Noha a vita eldöntöttnek tekinthető, amennyiben ma egységesen elfogadott, hogy a vörösvérttest foszfát felvétel passzív transzport útján történik (PASSOW 1969), érdemes megismerni az egyes szerzők nézeteit. Az egyes feltételezések ugyanis részben olyan kísérleti tényeken alapultak, melyek nem bizonyultak tévesnek és amelyek értelmezése nem tekinthető lezártnak.

HALPERN (1936) közlése az egyetlen az irodalomban, mely uphill foszfát transzportról számol be. Ezeket a vizsgálatokat egyetlen későbbi szerző sem erősítette meg.

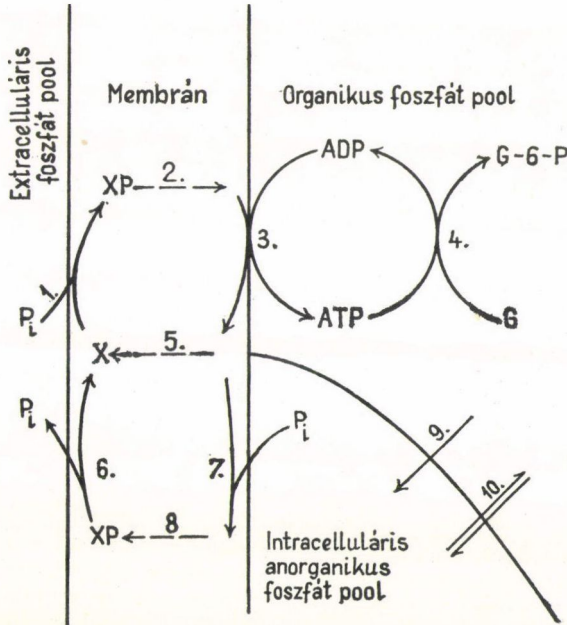
Más szerzők (GOURLEY 1951, 1952a, 1952b, 1954, GOURLEY és MATSCHINER 1953, PRANKERD és ALTMAN 1954) leírták, hogy a glikolízis gátlása csökkenti, illetve gyakorlatilag megszünteti a ^{32}P jelzett foszfát felvételét vörösvérttestbe.

Fontos volt a foszfát transzport megítélése szempontjából annak a megállapítása, hogy egyes foszfát észterek a vörösvérttestben ^{32}P jelzett foszfát felvételét követően lényegesen magasabb fajlagos aktivitás értéket mutatnak, mint az intracelluláris anorganikus foszfát. GOURLEY (1952a) közölte először, hogy az ATP fajlagos aktivitás éri el a legmagasabb értéket. PRANKERD és ALTMAN (1954) ezzel szemben a 2,3-DPG fajlagos aktivitását találták minden más foszfát észternél, illetve az anorganikus foszfátnál is nagyobbak. Későbbi vizsgálatok egyértelműen GOURLEY észlelését igazolták: a 2,3-DPG fajlagos aktivitása az anorganikus foszfát fajlagos aktivitását sem éri el, viszont az ATP fajlagos aktivitás számottevően nagyobb, mint az anorganikus foszfáté (GERLACH és mtsai 1958, TATIBANA és mtsai 1960, BARTLETT 1961, ZIPARSKY és mtsai 1962, SCHAUER és HILLMANN 1961, LATZKOVITS és mtsai 1971, 1972, TILL és mtsai 1973).

Az említett észlelések érthető módon nehezítették a foszfát transzport mechanizmusának magyarázatát. Amennyiben ugyanis az anyagcsere lépések konzekutív módon követik a foszfát transzportot, az anorganikus foszfát az organikus foszfát észterek perkurzora. Ezért nem egyszerű annak a magyarázata, hogyan lehet magasabb az ATP fajlagos aktivitás az anorganikus foszfátéhoz képest. Érthető tehát, hogy a szerzők egy része arra a következtetésre jutott, hogy a foszfát felvétel valamilyen anyagcsere lépést jelent: a foszfát nem anorganikus anionként jut a sejtbe, hanem a membránon át történő penetráció már organikus kötés kialakulását tételezi fel.

BARTLETT (1958), GOURLEY (1954), illetve PRANKERD és ALTMANN (1954) szerint a transzport első lépéseként a foszfát egy karrier molekulához kötődik a membrán külső felszínén. Ezt követően a foszfát—karrier komplex a membrán belső felszínéhez vándorol, ahol ADP veszi át a foszfátot, így ATP képződik. BARTLETT (1958) és PRANKERD (1954, 1961) feltételezték, hogy a karrier—foszfát komplex az 1,3-DPG. (Ez magyarázná egyúttal a 2,3-DPG általuk

észlelt magas fajlagos aktivitását.) A GOURLEY által javasolt mechanizmus szerint a foszfát transzportot úgy kell tekinteni, mint egy karrier-közvetítette kicserélődést az extracelluláris foszfát és az intracelluláris ATP között (GOURLEY 1952a, 1952b, 1954), ahol a karrier mobilis a membránon belül. GOURLEY szerint a karrier nem lehet az 1,3-DPG. Lényegében ugyanezt a mechanizmust fejtik ki SCHAUER és HILLMANN (1961) egy „membrán-foszfát-akceptor”



1. ábra. A vörösvértest foszfátfelvétel karrier mechanizmus szerint történő „aktív” felvételének sematikus ábrázolása B. VESTERGAARD-BOGIND dolgozatában (Biochim. Biophys. Acta 66. 93–109 1963)

P_i: anorganikus foszfát

X: a különböző szerzők által feltételezett foszfát karrier vagy „membrán foszfát akceptor”

XP: a karrier-foszfát komplex

G: glükóz

1., 2., 3. és 4.: a foszfát felvételt eredményező lépések

5.: a karrier „diffúziója” a membránon belül

6., 7. és 8.: a foszfát leadást eredményező lépések

9. és 10.: a sejten belül az organikus foszfátok lebomlása, ill. szintézise

feltételezésével, mely közvetítené az ATP és az extracelluláris foszfát kicserélődését. Utóbbi két szerzőnek sikerült izolálni a vörösvértest membránból olyan foszfolipid (pontosan nem identifikált) jellegű vegyületet, melyben a foszfát fajlagos aktivitás meghaladta az ATP fajlagos aktivitását is. Úgy gondolták, hogy ez a vegyület lehet az említett „membrán-foszfát-akceptor”.

A leírt hipotéziseknek megfelelő mechanizmus vázlatát adja az 1. ábra.

Az említett szerzők a foszfát transzport kinetikáját nem vizsgálták,

illetve az ilyen kísérletek adatait nem vették figyelembe. Nem tanulmányozták azt sem, hogy a foszfát efflux a vörösvérttestből értelmezhető-e hipotézisük alapján.

Azt az elképzelést, hogy a vörösvérttest foszfát felvétel passzív transzport útján történik HAHN és HEVESY (1942) fogalmazták meg először, bár ők kísérleteikben nem észlelték a felvétel függését az extracelluláris foszfát koncentrációtól.

Azt a tényt, hogy az anorganikus foszfátfelvétel az extracelluláris koncentráció függvénye már IVERSEN (1921) észlelte. Ő azonban még nem tudta eldönteni, hogy a sejtben a felvett foszfát anorganikus vagy organikus foszfátként van-e jelen.

Későbbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a vörösvérttest intracelluláris anorganikus foszfát koncentrációja a médium foszfát koncentrációjának a függvénye (VESTEGAARD-BOGIND és HASSELBO 1960, DUNKER és PASSOW 1953, PASSOW 1964). DUNKER és PASSOW (1953), illetve PASSOW (1964) ismerik fel, hogy a foszfát transzport a passzív foszfát—klorid kicserélődés kinetikáját követi és feltűnően egyezik a szulfát transzport kinetikájával. Felismerik továbbá, hogy az extracelluláris és intracelluláris foszfát koncentrációk arányát a Donnan-egyensúly határozza meg (PASSOW 1964) éppen úgy, mint a szulfát és egyéb anorganikus anion esetén.

Ugyancsak a foszfát transzport kinetikájának vizsgálata során ismerik fel más szerzők is, hogy az passzív folyamat (VESTEGAARD-BOGIND 1963, GERLACH, DEUTICKE és DUHM 1964, CHEDRU és CARTIER 1966, DEUTICKE 1967). pH függése éppen úgy értelmezhető a fixált töltés hipotézis alapján, mint más anionok transzportja (PASSOW 1969).

PASSOW (1969) hangsúlyozza, hogy a szulfát és foszfát transzport teljesen azonos sajátosságokat mutat. Mindkettő esetén a fluxus nem közvetlenül a médium, hanem az intramembrán anion koncentrációtól függ. Azonos körülmények között elvégzett kísérletben a foszfát fluxus ugyanazzal a formulával adható meg, mint a szulfát esetén (PASSOW 1964, DEUTICKE 1967). A két anion viselkedésének szoros párhuzama tulajdonképpen meglepő, még akkor is, ha mindkettő transzportja a fixált töltés hipotézissel értelmezhető passzív folyamat. A foszfát anion ugyanis a pH-tól függően nem egységes: a HPO_4^{2-} , illetve H_2PO_4^- anionok elegyből áll. A foszfát heterogén összetétele ellenére megfigyelhető párhuzam magyarázatára a foszfát és szulfát között PASSOW (1969) A. Katchalsky személyes közlésére hivatkozik, mely szerint a magas töltésközponttal rendelkező intramembrán térben a H_2PO_4^- disszociációs konstansa szükségképpen magasabb, mint oldatban. Indokolt ezért annak feltételezése, hogy a membránon belül a foszfát kizárólagosan bivalens anionként van jelen.

A foszfát transzport hőmérséklet függése — hasonlóképpen, mint a szulfaté — nehezen értelmezhető a fixált töltés hipotézis alapján (PASSOW

1969). A különböző szerzők eltérő, de magasabb aktiválási energiaértékeket adnak meg, mint amilyen érték: 8–12 kcal/mól a fixált töltés hipotézis alapján várható lenne. A különböző szerzők által meghatározott aktiválási energiaértékek a foszfát transzportra a következők: 25 kcal/mól (GERLACH és mtsai 1964), az influxra vonatkozóan és 32 kcal/mól (GLADER és OMACHI 1968), az effluxra. Érdemes összevetni ezen értékeket a szulfát esetén nyert megfelelő értékekkel: 33, illetve 32 kcal/mól az influxra (SCHNELL 1972, illetve WIETH 1970) és 27 kcal/mól az effluxra (GLADER és OMACHI 1968). Látható tehát, hogy a foszfát transzport még olyan tulajdonságaiban is szoros párhuzamot mutat a szulfát transzporttal, melyek nem értelmezhetők az anion transzportot magyarázó fixált töltés hipotézissel.

GLADER és OMACHI (1968) részletesen vizsgálták resealed ghostok foszfát effluxát és megállapították, hogy passzív transzportra jellemző kinetikát mutat.

Az ismertetett adatok alapján érthető, hogy általánosan elfogadott a foszfát transzport passzív jellege. Hogyan magyarázható azonban ez esetben az ATP említett magas fajlagos aktivitása, mely az intracelluláris anorganikus foszfát fajlagos aktivitását is meghaladja —³²P jelzett foszfáttal végzett transzport kísérletben? A kérdésre adott válasz igen fontos annak megítélése szempontjából, mi a passzív foszfát transzport és anyagsere kapcsolata vörösvértetekben.

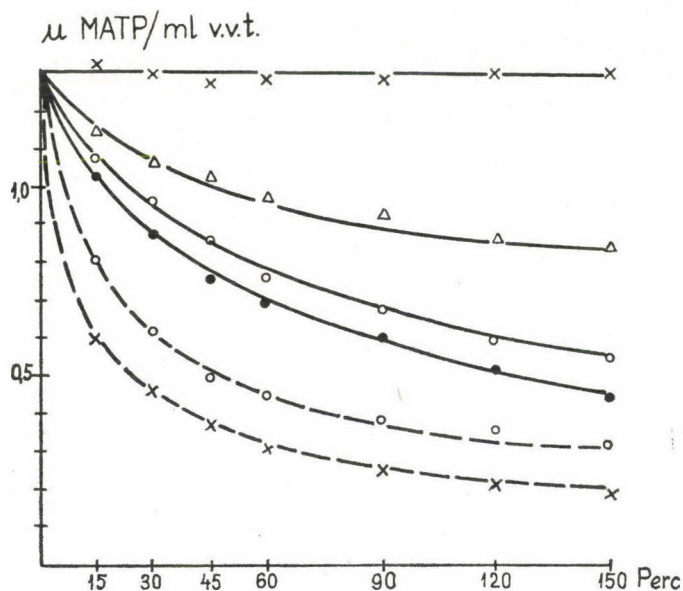
Mindenekelőtt figyelembe kell venni, hogy radioaktív jelzéssel végzett kísérletben a sejten belül kialakul a transzportált foszfát fajlagos aktivitás gradiense, mely szükségképpen a membránon, annak belső környezetében mutat maximumot. Következésképpen az esetben, ha a vörösvértest enzimek olyan módon kompartmentalizáltak, hogy a membránon lehetséges ATP képződés, míg a glikolízis „fő tömege” a citoszol fázisban játszódik le, az ATP fajlagos aktivitás kiemelkedően magas értéket érhet el. Ezért igen fontosak azok a vizsgálatok, melyek kimutatták, hogy a vörösvértest membrán gliceraldehid-foszfát-dehidrogenáz (GAPD-EC 1.2.1.12) és foszfo-glicerát-kináz (PGK-EC 2.7.2.3) aktivitással rendelkezik (RONQUIST 1968, GREEN és mtsai 1965, RONQUIST és AGREN 1966, RONQUIST 1967, SCHRIER 1963, 1966, 1967). Ugyanakkor más szerzők kimutatták, hogy a vörösvértest membránhoz ATP kötött (WELT és mtsai 1963, SZÁSZ 1970, HACKENBROCK 1966, KARJALAINEN 1968, GASIK és STEWART 1968, MATSUDA és mtsai 1968, LÖWE és JUNG 1969). Saját vizsgálatainkban azt találtuk, hogy ³²P jelzett foszfátot tartalmazó médiumban inkubált vörösvértetekből ghostokat izolálva, az azokon kötött ATP legalább ötször nagyobb fajlagos aktivitást mutat, mint a „szabad” ATP (LATZKOVITS és mtsai 1974). Bizonyítottnak tekinthető tehát, hogy vörösvértetekben az ATP legalább részben a membránon képződik a GAPD—PGK enzimrendszer közreműködésével ADP, illetve anorganikus foszfátból.

DE VERDIER (1963) szerint a GAPD—PGK enzimrendszer izotóp kicse-

rélődést is eredményez az anorganikus foszfát és ATP között. Ez a folyamat szintén hozzájárulhat ahhoz, hogy tracer kísérletben a membránon, annak belső környezetében nagy fajlagos aktivitású ATP képződik. DE VERDIER véleménye ez ideig nem nyert megerősítést.

Az elmondottak szerint a passzív foszfát transzport és az anyagsere kapcsolatában fontos szerepet játszik a glikolitikus enzimek kompartmentalizációja.

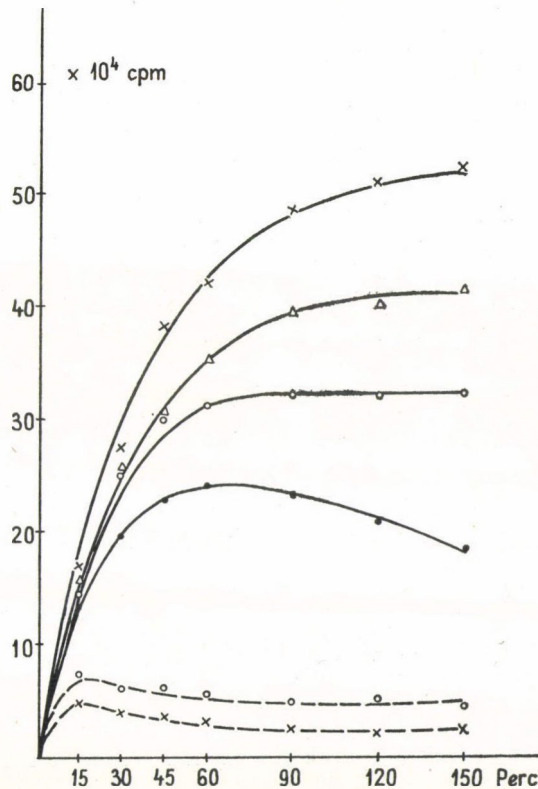
Saját adataink arra utalnak, hogy a GAPD—PGK enzimrendszer kompartmentalizációjával összefüggésben a vörösvértest ATP pool is kompartmentalizált: a membránhoz lokalizált ATP metabolikusan jelentős mértékben önálló szubkompartmentet jelent. Megfigyeltük, hogy alacsony pH (6,8) mellett ^{32}P jelzett foszfátot tartalmazó médiumban inkubált sejtekben az ATP tartalom csökken, de az ATP fajlagos aktivitás emelkedik; miután az ATP-be történő radioaktív foszfát inkorporáció kisebb mértékű csökkenést mutat, mint az ATP szint (LATZKOVITS 1971). Ez az eredmény arra utal, hogy a „forró” membrán ATP pool nem változik olyan mértékben, mint a citoszol „hideg” ATP pool-ja.



2. ábra. Az ATP koncentráció változása vörösvértestben (μM ATP/ml vörösvértest).

- x---: kontroll (Krebs—Ringer médium, 100 mg % glukóz, pH 7,4)
- Δ---: médium pH 6,8
- : glukóz mentes médium
- : 10 mM NaF a médiumban
- : 9 mM arzenát
- x-- : 1 mM mono-jód-acetát

Az értékek legalább 5 kísérlet átlagértékei. A standard hiba kisebb mint 6%.

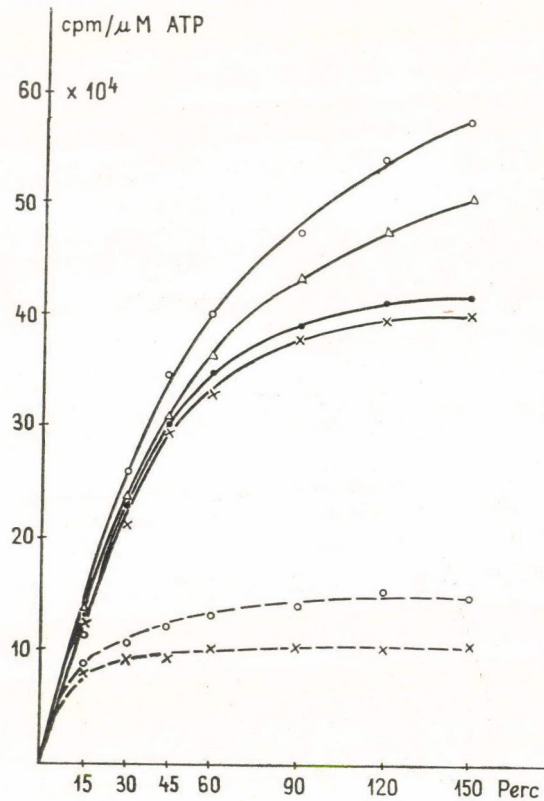


3. ábra. Az ATP összaktivitás változása (ATP cpm/ml vörösvértest).

- x--: kontroll (Krebs-Ringer médium, 100 mg % glukóz, pH 7,4)
- △--: médium pH 6,8
- : glukóz mentes médium
- : 10 mM NaF
- : 9 mM arzenát
- x--: 1 mM mono-jód-acetát

Az értékek legalább 5 kísérlet átlagértékei. A standard hiba kisebb mint 6,5%.

Hasonló eredményt nyertünk újabb kísérleteinkben, ahol az intakt vörösvértestekben az ATP jelölődését és mennyiségének változását követtük glukóz megvonás esetén, illetve glikolitikus gátlók (fluorid 10 mM, arzenát 9 mM, monojódacetát 1 mM) jelenlétében. A 2., 3. és 4. ábra mutatja az ATP szint, összaktivitás, illetve fajlagos aktivitás változását a kontrollhoz képest az említett kísérletekben 1 ml vörösvértestre vonatkoztatva. Látható, hogy glukóz megvonás és fluorid alkalmazása kisebb mértékben csökkenti az ATP összaktivitást mint az ATP szintet — ami az ATP fajlagos aktivitás emelkedését eredményezi a kontrollhoz képest. Nem észlelhető az ATP fajlagos aktivitás emelkedése (az ATP szint és a radioaktív inkorporáció párhuzamos csökkenést mutat) a GAPD specifikus inhibitorainak, az arzenát, illetve monojódacetát alkalmazása esetén.



4. ábra. Az ATP fajlagos aktivitása változása (ATP cpm/ μ M ATP).

- ×--: kontroll (Krebs-Ringer médium, 100 mg % glukóz, pH 7,4)
- △--: médium pH 6,8
- : glukóz mentes médium
- : 10 mM NaF
- : 9 mM arzenát
- ×--: 1 mM mono-jód-acetát

Az értékek legalább 5 kísérlet átlagértékei. A standard hiba kisebb mint 5%.

A membránhoz lokalizált ATP szubkompartment különleges fiziológiai szerepet játszhat a vörösvértest alakfenntartó mechanizmusban (SZÁSZ ILMA 1970).

A fentiek alapján az a fontos kérdés merül fel, hogy a vörösvértestbe passzív transzport útján penetráló foszfát milyen mennyisége épül be ATP-be a membrán belső környezetében, illetve milyen mennyiségben jut a citoszólba, mint anorganikus foszfát, anélkül, hogy előzetesen ATP-be konvertálódna.

A kérdés vizsgálatára elvégeztük intakt vörösvértestek *in vitro* foszfát-felvételének izotóp kinetikai modell analízisét (LATZKOVITS és mtsai 1971, 1972). Az izotóp kinetikai leírasmód — mint minden formákinetikai eljárás — szükségessé teszi a vizsgált rendszer és folyamat jelentős egyszerűsítését, se-

matizálását (LATZKOVITS 1971). Így a foszfát inkorporációban szerepet játszó foszfát poolokat négy kompartmenttel reprezentáltuk, melyek a következők:

- A: extracelluláris anorganikus foszfát pool
- B: intracelluláris anorganikus foszfát pool
- C: az intracelluláris „savlabil” foszfát pool (1 N savas közegben 100 C°-on 10 perc alatt hidrolizálható foszfát)
- D: intracelluláris „savrezisztens” foszfát.

C jól reprezentálja az ATP, D a 2,3-DPG poolt.

Ugyancsak a folyamat elkerülhetetlen formalizálása teszi szükségessé, hogy a membrán belső környezetében lejátszódó P_i ATP konverziót úgy írjuk le, mint az extracelluláris anorganikus foszfát és az ATP közötti közvetlen kicserélődést. Az ATP-nek ugyanis — miután fajlagos aktivitása magasabb, mint az intracelluláris foszfáté — egyetlen lehetséges formális prekuzora az extracelluláris foszfát. Ezzel az eljárással semmiképpen sem követünk el jelentős hibát, ugyanis az anorganikus foszfát fajlagos aktivitása a membránban, illetve annak közvetlen belső környezetében nem lehet lényegesen kisebb, mint a médiumban, éppen a transzport passzív jellege miatt. A $P \rightleftharpoons ATP$ konverzió a kinetikai leírásban tehát mint $A \rightleftharpoons C$ kicserélődés jelentkezik. Ezen leírás módnak megfelelően a foszfát penetrációja a citoszólba, melyet nem előz meg az ATP-be történő konverzió, mint $A \rightleftharpoons B$ kicserélődés szerepel.

Elvégeztük mindenekelőtt olyan kísérletek elemzését, ahol az extra- és intracelluláris anorganikus foszfát poolok nincsenek egyensúlyban: előbbi csökken, utóbbi nő a kísérlet során a koncentráció gradiensnek megfelelően, a Donnan-egyensúly beálltáig (LATZKOVITS és mtsai 1971, 1972). Az 5. ábra mutatja azt az izotóp kinetikai modellt, mely a kísérleti adatokkal kizárólagosan kompatibilis. A modell feltűnő tulajdonsága, hogy az $A \rightleftharpoons B$ kicserélődés helyett „egyirányú” $A \rightarrow B$ foszfát felvételt jelez. (Ez azt jelenti, hogy az a modell, melyben feltételeztük az $A \rightleftharpoons B$ kicserélődést, a kísérleti adatokkal ellentmondásosnak bizonyult.) A modell ezen tulajdonságát csak úgy lehet értelmezni, hogy a vizsgált nem egyensúlyi feltételek mellett a foszfát efflux elhanyagolhatóan kicsi az influxhoz képest.

Ezt az értelmezést igazolják újabb kísérleteink, melyek során a Donnan-egyensúly beállása után vizsgáltuk intakt vörösvértestek foszfát felvételét. Kísérleteinket két eltérő anorganikus foszfát koncentráció mellett végeztük. Az 1. táblázat mutatja mindkét foszfát koncentráció mellett az egyes kompartmentek foszfát mennyiségét. A 6. és 7. ábra mutatja a fajlagos aktivitás értékeket.

Az anorganikus foszfát értékek megfelelnek a Donnan-egyensúlynak, a savlabil és savrezisztens foszfát mennyisége a két kísérletben egyezik (1. táblázat). A foszfát koncentráció értékek időben hibahatáron belül állandónak bizonyultak.

I. táblázat

A foszfát koncentrációja a különböző kompartmentekben egyensúlyi kísérletek esetén. ($\mu\text{g P/ml}$ médium, ill. vörösvértest)

| | I. | II. |
|-----|-------------|--------------|
| *A: | 19 \pm 2 | 319 \pm 3 |
| B: | 8 \pm 1,5 | 136 \pm 2 |
| C: | 95 \pm 5 | 98 \pm 4 |
| D: | 305 \pm 9 | 300 \pm 11 |

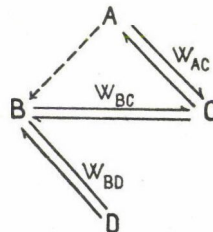
I.: „Alacsony” médium foszfát koncentráció mellett végzett egyensúlyi kísérlet.
 II.: „Magas” médium foszfát koncentráció mellett — előinkubálás után — végzett egyensúlyi kísérlet.

A: médium anorganikus foszfát
 B: intracelluláris anorganikus foszfát
 C: savlabil foszfát
 D: savrezisztens foszfát

Valamennyi érték legalább 10 kísérlet átlaga a standard hibával.

Mindkét anorganikus foszfát koncentráció mellett végzett kísérleteink elemzése azonos modell kompatibilitását igazolta. Ezt a modellt mutatja a 8. ábra.

Látható, hogy a modell szerkezete azonos az 5. ábrán demonstrált modellel. Az egyensúlyi kísérletek adatainak feldolgozásával nyert modell azonban tartalmazza az $A \rightleftharpoons B$ kicserélődést (8. ábra) — az egyirányú $A \rightarrow B$ felvétel helyett (5. ábra).



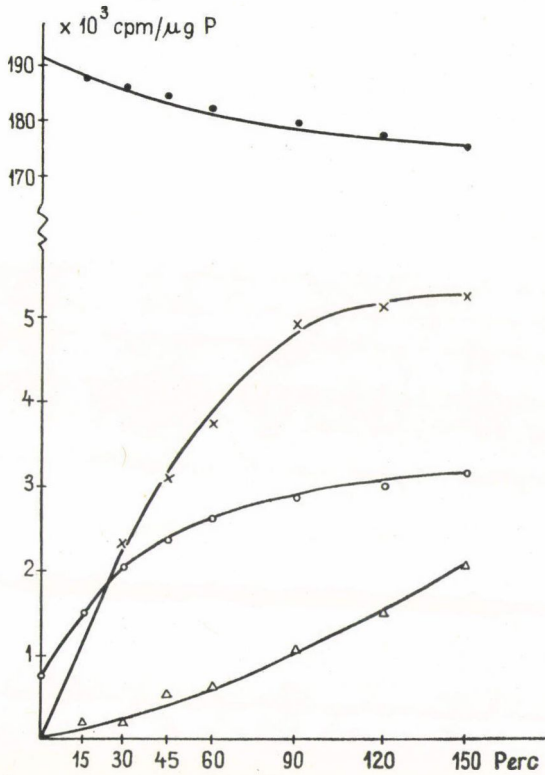
5. ábra. A nem egyensúlyi kísérletek analizisével nyert izotóp kinetikai modell.

A: Extracelluláris foszfát kompartment
 B: Intracelluláris anorganikus foszfát kompartment
 C: Savlabil foszfát kompartment
 D: Savrezisztens foszfát kompartment

W_{AC} , W_{BC} , W_{BD} : az indexek által jelzett kompartmentek közötti foszfát kicserélődés sebessége. ($\mu\text{g P/perc/ml}$ vörösvértest)

A szaggatott nyíl a foszfát koncentráció változását eredményező foszfát felvételt jelzi. Sebessége: $-dA/dt = dB/dt$

Érdeemes ezek után összehasonlítani az $A \rightleftharpoons B$ és $A \rightleftharpoons C$ kicserélődés, illetve a nem egyensúlyi kísérletekben az $A \rightarrow B$ influx útján transzportált foszfát mennyiségét (2. táblázat). A számszerű értékeket a W_{AB} , W_{AC} , illetve $\frac{dA}{dt}$ vagy $\frac{dB}{dt}$ sebességértékek integrálja adja a kísérlet időtartamára — a sebességértékeket az izotóp kinetikai feldolgozás során nyerjük (LATZKOVITS és mtsai 1971, 1972).



6. ábra. A foszfát kompartmentek fajlagos aktivitásának változása alacsony médium foszfát koncentráció (0,6 mM) és Donnan-egyensúly esetén.

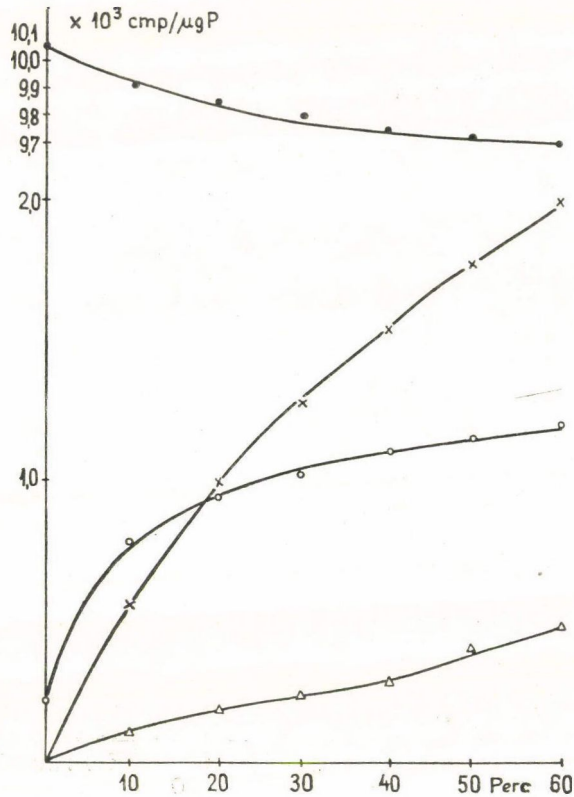
- : S_A , a médium anorganikus foszfát fajlagos aktivitása
 ---×---: S_C , a savlabil foszfát pool fajlagos aktivitása
 ---○---: S_B , az intracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitása
 ---△---: S_D , a savrezisztens foszfát pool fajlagos aktivitása

Az egyes értékek 10 kísérlet átlagértékeit jelentik. Standard hiba kisebb mint 5%.

II. táblázat

Egyensúlyi, ill. nem egyensúlyi kísérletek során az $A \rightleftharpoons B$ és $A \rightleftharpoons C$ kicserélődés, ill. az $A \rightarrow B$ fluxus által eredményezett foszfát felvétel értékei. ($\mu\text{g P}/150 \text{ Perc}/\text{ml}$ vörösvértest)

| | $\int_0^{150} -\frac{dA}{dt}$ | $150 \cdot W_{AB}$ | $150 \cdot W_{AC}$ |
|---|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| Donnan-egyensúly, médium foszfát koncentráció: 0,6 mM | 0,00 | 1,65 | 19,50 |
| Donnan-egyensúly, médium foszfát koncentráció: 10 mM | 0,00 | 4,65 | 182,00 |
| Nem egyensúlyi kísérlet: a médium foszfát koncentráció 11 mM-től csökken 10 mM-ig | 126,60 | 0,00 | 182,00 |



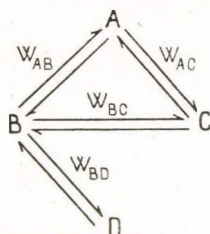
7. ábra. A foszfát kompartmentek fajlagos aktivitásának változása magas médium foszfát-koncentráció (10 mM) és Donnan-egyensúly esetén.

- : S_A , a médium foszfát fajlagos aktivitása
- ×—: S_C , a savlabil foszfát pool fajlagos aktivitása
- : S_B , az intracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitása
- △—: S_D , a savrezisztens foszfát pool fajlagos aktivitása

Az egyes értékek 10 kísérlet átlagértékeit jelentik. A standard hiba kisebb mint 5%.

A 2. táblázat adatai világosan mutatják, hogy még a nem egyensúlyi kísérletekben is az $A \rightleftharpoons C$ útján felvett foszfát mennyisége jelentős az $A \rightarrow B$ fluxushoz képest. Az egyensúlyi kísérletekben az $A \rightleftharpoons C$ csere sokszorosan több foszfát felvételt reprezentál, mint az $A \rightleftharpoons B$ lépés.

Megállapítható tehát, hogy a passzív úton penetrálódó foszfát jelentős része a membrán környezetében ATP-be épül. Az extra- és intracelluláris foszfát koncentráció arányától függ, hogy a foszfát milyen mennyisége penetrálódik a sejt citoszól kompartmentjébe anélkül, hogy előzetesen ATP-be inkorporálódna. A Donnan-egyensúly viszonyai között ez a mennyiség igen alacsony, összehasonlítva az ATP-be történő konverzióval. Amennyiben az extracelluláris foszfát koncentráció magas az intracelluláriséhoz képest, megnő a membránból anorganikus foszfátként a citoszólba belépő foszfát mennyisége.



8. ábra. A Donnan-egyensúly feltételei mellett végzett kísérletek analizésével nyert izotóp kinetikai modell.

- A: Extracelluláris foszfát kompartment
 B: Intracelluláris anorganikus foszfát kompartment
 C: Savlabil foszfát kompartment
 D: Savrezisztens foszfát kompartment

W_{AB} , W_{AC} , W_{BC} és W_{BD} : az indexek által jelzett kompartmentek közötti foszfátkicserélődés sebessége ($\mu\text{g P/perc/ml}$ vörösvérttest).

További vizsgálatokat igényel annak tisztázása, hogy a passzív foszfát transzport és az ATP szintézis kapcsolatát, melyet az enzim kompartmentalizáció determinál, milyen tényezők regulálják. A 2. táblázat adatai — az extracelluláris foszfátkoncentráció különbsége az egyensúlyi kísérletekben befolyásolja az $A \rightleftharpoons C$ csere útján inkorporált foszfát mennyiségét — arra utalnak, hogy a membránhoz lokalizált ATP szintézis függ a membrán foszfát-koncentrációjától.

Ugyancsak további vizsgálatok szükségesek annak tisztázásához, hogy a vörösvérttest foszfát poolok sejten belüli kompartmentalizációja (TILL és mtsai 1973) hogyan befolyásolhatja a foszfát transzportot.

IRODALOM

- BARTLETT, G. R.: Ann. N. Y. Acad. Sci. U. S. **75**, 110 (1958).
- BARTLETT, G. R.: Abstracts Vth Int. Cong. Biochem. Moscow **17**, 22 174 (1961).
- CHEDRU, J. és CARTIER, P.: Biochim. Biophys. Acta **126**, 500 (1966).
- DEUTLICHE, B.: Pflügers Archiv **296**, 21 (1967).
- DUNKER, E. és PASSOW, H.: Pflügers Archiv **256**, 446 (1953).
- GASIK, G. és STEWART, C.: J. Cell. Physiol. **71**, 239 (1968).
- GERLACH, E. és mtsi: Pflügers Archiv **266**, 528 (1958).
- GERLACH, E. és mtsi: Pflügers Archi **280**, 243 (1964).
- GLADER, B. E. és OMACHI, A.: Biochim. Biophys. Acta **163**, 1 (1968).
- GOURLEY, D. R. H.: Am. J. Physiol. **164**, 213 (1951).
- GOURLEY, D. R. H.: Arch. Biochem. Biophys. **40**, 1 (1952).
- GOURLEY, D. R. H.: Arch. Biochem. Biophys. **40**, 213 (1952).
- GOURLEY, D. R. H. és MATSCHNER, J. T.: J. Cell. Comp. Physiol. **41**, 225 (1953).
- GOURLEY, D. R. H.: Virginia J. Sci. **5**, 20 (1954).
- GREEN, D. E. és mtsi: Arch. Biochem. **112**, 635 (1965).
- HACKENBROCK, C. R.: J. Cell. Biol. **30**, 269 (1966).
- HAHN, L. és HEVESY, G.: Acta Physiol. Scand. **3**, 193 (1942).
- HALPERN, J.: J. Biol. Chem. **114**, 747 (1936).
- IMARISIO, J. J. és JAMISON, T. R.: J. Lab. Clin. Med. **69**, 23 (1967).

20. IVERSEN, P.: *Biochem. Z.* **114**, 297 (1921).
21. KARJALAINEN, E.: in *Regulatory Functions of Biol. Membranes* (Ed.: Järnefelt, J.) Elsevier Publ. Comp. p. 107 (1968).
22. LATZKOVITS, L.: in *Kinetic Isotope Method and its Application* (Ed.: M. B. Neiman és D. Gál), Elsevier Publ. Comp., 10. fejezet, 255. o. (1971).
23. LATZKOVITS, L.: Abstracts IIIrd Int. Cong. Neurochem., Budapest p. 412 (1971).
24. LATZKOVITS, L. és mtsi: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **7**, 55 (1972).
25. LATZKOVITS, L. és mtsi: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **7**, 307 (1972).
26. LATZKOVITS, L. és mtsi: Abstracts of FEBS (IX.) Meeting (1974).
27. LÖWE, L. és JUNG, F.: *Acta Biol. Med. Germ.* **23**, 545 (1969).
28. MATSUDA, F. és mtsi: *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 545 (1968).
29. PASSOW, H.: in *The Red Blood Cell* (Eds.: Bishop, C. és Surgenor, D. M.), Academic Press New York p. 100 (1964).
30. PASSOW, H.: *Progress in Biophys.* **19**, 423 (1969).
31. PRANKERD, T. A. J. és ALTMAN, K. I.: *Biochem. J.* **58**, 622 (1954).
32. PRANKERD, T. A. J.: *The Red Cell*, Blackwell Sci. Publ., Oxford p. 80 (1961).
33. RONQUIST, G. és AGREN, G.: *Nature* **209**, 1090 (1966).
34. RONQUIST, G.: *Acta Chem. Scand.* **21**, 1484 (1967).
35. RONQUIST, G.: *Acta Physiol. Scand.* **74**, 594 (1968).
36. ROSE, A. I. és mtsi: *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **15**, 33 (1964).
37. SCHAUER, R. és HILLMANN, G.: *Z. Physiol. Chem. Hoppe—Seyler's* **325**, 9 (1961).
38. SCHNELL, K. F.: *Biochim. Biophys. Acta* **282**, 265 (1972).
39. SCHRIER, S. L.: *J. Clin. Invest.* **42**, 756 (1963).
40. SCHRIER, S. L.: *Amer. J. Physiol.* **210**, 139 (1966).
41. SCHRIER, S. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 591 (1967).
42. SZÁSZ ILMA: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **5**, 399 (1970).
43. TATIBANA, M. K. és mtsi: *J. Biochem. (Tokyo)* **48**, 685 (1960).
44. TILL, U. és mtsi: *Eur. J. Biochem.* **35**, 167 (1973).
45. DE VERDIER, C. H.: *Acta Physiol. Scand.* **57**, 301 (1963).
46. VESTERGAARD-BOGIND, B. és HASSELBO, T.: *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 117 (1960).
47. VESTERGAARD-BOGIND, B.: *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 93 (1963).
48. WELT, L. G. és mtsi: 18th Annual Meeting, Society of General Physiologists, Woods Hole p. 115 (1963).
49. WHITTAM, R.: *Transport and Diffusion in Red Blood Cells*, Baltimore, Williams and Williams Comp., p. 78 (1964).
50. WIETH, J. O.: *J. Physiol.* **207**, 581 (1970).
51. ZIPURSKY, A. D. és mtsi: *Canad. J. Biochem. Physiol.* **40**, 95 (1962).