SEJTMEMBRÁNOK KÖLCSÖNHATÁSA Ca^{2+}-MAL

SZÁSZ ILMA

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest

A sejtmembránok Ca^{2+}-mal való kölcsönhatásán egyrészt a Ca^{2+}-nak a membránokon keresztül történő transzportfolyamatait, másrészt a Ca^{2+}-nak membránokhoz való kötődését, ezekbe történő beépülését értjük. Fiziológiai jelentőségük miatt a nem-excitábilis sejtmembránok mellett külön ki szokás emelni az excitábilis sejtmembránok Ca^{2+}-mal való kölcsönhatásait. E helyen nem térünk ki az organellum membránokban (mitokondrium, szarkoplazmatikus retikulum) lejátszódó Ca^{2+}-membrán kölcsönhatásokra, transzportfolyamatokra.

I. Ca^{2+}-transzport

1. ATP-bontással járó Ca^{2+}-transzportfolyamatok

A Ca^{2+}-transzportfolyamatok egy része bizonyítottan ATP-igényes. Ilyet írtak le vörösvérsejtekben (1, 2), HeLa-sejtekben (3), L-sejtekben (4). Egyesek szerint idegsejtekben is létezik, de a bizonyítékok nem meggyőzőek (5). Az ATP igényes Ca^{2+}-transzport a Ca^{2+}-nak a sejtből való eltávolítását, kipumpálását hajtja végre, így természetszerűleg az intracelluláris Ca^{2+}-szint emelkedése aktiválja.

A folyamat jellemzői:

a) magas hőmérsékleti koefficiens,

b) intracelluláris ATP és Mg-igény,

c) az ATP elhasítása a Ca^{2+} transzportálása folyamán. (1 magasenergiájú foszfátkötés elhasadásakor mintegy 0,75 mol Ca^{2+}-ot dob ki a sejt),

d) a Ca^{2+}-efflux sajátságai messzemenően hasonlítanak a DUNHAM és GLYNN (6) által és WINS és SCHOFFENIELS (7) által a vörösvérsejtmembránban leírt Ca^{2+}-mal aktiválható ATPáz sajátságaihoz,

e) mind a Ca^{2+}-efflux, mind a CaATPáz ouabain és oligomycin-inszenzitív, ezzel szemben mindkettő gátolható különböző SH-reagensekkel (mersalyl, etakrinsav) és ritka földfémekkel (La^{3+}, Ho^{3+}, Pr^{3+}). A Sr^{2+} a Ca^{2+}-ot helyettesítheti (8),

f) WOLF vizsgálatai szerint a vörösvérsejtmembrán CaATPáza esetében a szubsztrát (MgATP) kötésében egy disszociált hisztidin-imidazol N vesz részt, valamint két disszociált karboxilcsoport. A Ca^{2+}-aktiváláshoz a Ca^{2+}-nak további két disszociált karboxil-csoporthoz való bekötődése szükséges, ami a fehérje konfiguráció változását hozza létre. Ezenközben a szubsztrát még egy disszociált hisztidin-imidazol N-nel, valamint egy nem disszociált aminosav-α-aminocsoporttal is kötődik és ez lehetővé teszi az ATP elhasadását (9),

g) a Ca^{2+}-effluxot a külső Na^{+}-koncentráció nem befolyásolja, K^{+} és Na^{+}-mentes (kolinklorid) közegben is létrejön. Nem ismeretes, hogy az elektroneutralitás fenntartása ellenion vagy kísérőion vándorlásával biztosított-e. Bár K^{+}, vagy Na^{+} a CaATPázt kismértékben tovább aktiválja (10, 11), SCHATZMANN és ROSSI szerint ez a hatás a K^{+}-Na^{+}-ATPáz Ca^{2+} jelenlétében megváltozott működésének tudható be és nem utal az univalens kationok ellenirányú vándorlására a Ca^{2+}-pumpa működése során (10). Hasonló végkövetkeztetésekre jutottak WHITTAM és SZÁSZ vörösvérsejteken és agymikroszómákon párhuzamosan követve a CaATPáz Na^{+} és K^{+} aktiválását és a foszforilált intermedier viselkedését (12). KNAUF és mtsai újabban arról számolnak be, hogy a CaATPáz és a K^{+}-Na^{+}-ATPáz foszforilált intermedierjeit gélelektroforezissel el tudják választani, bizonyítva a két enzim (pumpa) — eddig még vita tárgyát képező — különbözőségét (13).

A vörösvérsejtek ATP-függő Ca^{2+}-pumpájának sajátosságai nagyon hasonlóak a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+}-akkumulációt végrehajtó ATP-dependens Ca^{2+}-pumpájáéhoz. A Ca^{2+}-mozgatás irányán kívül a döntő különbség az, hogy a retikulum pumpája már 10^{-8} M Ca^{2+}-koncentrációnál aktiválódik, míg a vörösvérsejt pumpa sokkal alacsonyabb Ca^{2+}-affinitással rendelkezik. Ez a különbség jelentős, mivel excitábilis szövetekben a Ca^{2+}-pumpának működnie kellene 10^{-7} M-nál alacsonyabb ionizált Ca^{2+}-koncentrációk mellett is. A vörösvérsejtek belsejében az ionizált Ca^{2+} koncentrációja nem ismert, de meglehet, hogy lényegesen magasabb, mint az excitábilis szövetekben.

Vörösvérsejtekből, valamint egyéb szövetekből (pl. agyból) preparált membrán fragmentumok, vezikulumok ATP jelenlétében aktívan akkumulálnak Ca^{2+}-ot (14, 15, 16, 17). Vörösvérsejtek esetében a Ca^{2+}-akkumuláció a CaATPáz aktivitással jó egyezést mutatott és az akkumuláció oxaláttal fokozható volt [akárcsak a szarkoplazmatikus retikulum esetében (14)]. Agy mikroszomáknál az ATP-függő Ca^{2+}-akkumuláció nem mutatott szoros párhuzamot a CaATPáz aktivitással és oxalát az akkumulációt jelentősen nem fokozta (15, 16, 17).

Feltételezik, hogy míg vörösvérsejtmembrán fragmentumok esetében valószínűleg az inside-out vezikulumok Ca^{2+}-akkumulációját észleljük, agy-

mikroszómákban az ATP-dependens Ca^{2+}-felvétel homeosztatikus szerepet játszik az idegszövet anyagcseréjében (17). EBASHI és munkatársai szerint a szinaptoszomák működésének eredménye, s a kémiai transzmitter release-hez szükséges Ca^{2+}-belépést követő regenerálódási (recovery) folyamat részjelensége (15).

2. Na^{+}-gradienstől függő Ca^{2+}-transzportfolyamatok

Perifériás idegszövetben (tintahal axonjában) a Ca^{2+}-kiáramlás sebessége függ a külső Na^{+}-koncentrációtól és cianid mérgezéssel nem blokkolható, sőt — a mitokondriumokból történő Ca^{2+}-felszabadulás miatt — jelentősen fokozódik. A pontosabb analízis adatai arra utalnak, hogy részben $Ca_i^{2+}-Ca_e^{2+}$, részben $Ca_i^{2+}-Na_e^{+}$ exchange folyamatokkal állunk szemben. Tintahal és rákidegben kimutatták, hogy a Ca^{2+}-influx szintén Na^{+}-efflux-szal társul. Ez a Ca^{2+}-influx-szal társult Na^{+}-efflux nem tetrodotoxin (TTX) érzékeny (5). $Ca^{2+}-Na^{+}$ counter-transzportot az említett idegeken kívül myelin hüvely nélküli nyúl vagus idegben (19), emlős agy szinaptoszomában (20) és szívizomban (21, 22) is észleltek.

Egyesek szerint a szívglikozidok pozitív inotróp hatása szintén a $Na^{+}-Ca^{2+}$ counter-transzport jelenségéhez kapcsolódik. A Na^{+}-pumpa szívglikozidok okozta részleges gátlása ui. megemeli az intracelluláris Na-szintet, ez $Na^{+}-Ca^{2+}$ exchange-hez vezet és növeli az intracelluláris Ca^{2+}-koncentrációt. Ez szívizomban kontrakciós válaszban nyilvánul meg. (A mellékvesevelőben, pancreas β-sejtekben fellépő szekretoros választ hasonlóképpen magyarázzák.) (5).

3. A Ca^{2+}-permeabilitás potenciálfüggő változásai

Külön kell megemlékeznünk az akciós potenciál folyamán bekövetkező Ca^{2+}-transzport változásokról. Az akciós potenciál alatt Ca^{2+}-felvétel történik (5). Ennek döntő jelentőségére vonatkozóan a biionos akciós potenciál vizsgálatok nyújtanak felvilágosítást. Ezek szerint az akciós potenciál létrejöttéhez az egyetlen nélkülözhetetlen külső kation a Ca^{2+} (23). Valószínűleg bizonyos Ca^{2+}-membrán kölcsönhatások egyben a Na^{+}-ill. K^{+}-csatorna kialakulásának is előfeltételei. Az akciós potenciál korai szakaszában a Ca^{2+}-ionok valószínűleg a Na^{+}-csatornán haladnak keresztül (TTX-szenzitív Ca^{2+}-felvétel). Az akciós potenciál késői szakaszában a Ca^{2+}-felvétel TTX-inszenzitív. A folyamat drogérzékenysége nem azonos a K^{+}-csatornáéval. Farmakológiai befolyásolhatósága alapján valószínűleg a transzmitter release-t előidéző Ca^{2+}-felvétel is a késői Ca^{2+}-felvételhez hasonló TTX-inszenzitív csatornán keresztül jön létre (5).

4. Ca^{2+}-ionophorok

A teljesség kedvéért említjük meg, hogy legújabban a K^{+}-ionophor antibiotikumokhoz hasonlóan beszámoltak Ca^{2+} (és Mg^{2+}) specifikus struktúrák-

ról (pl. az A 23187 és az X 537 A jelzésű vegyületekről), amelyek Ca^{2+} carrierként alkalmazhatók.

II. Ca^{2+}-kötődés

A Ca^{2+} a membrán építőköve befolyásolja annak permeabilitását, felszínét, enzimaktivitásait. Nyilvánvaló, hogy mindezek a hatások többé-kevésbé specifikus Ca^{2+}-kötőhelyekkel (elsősorban fehérje-karboxil, fehérje-foszfát, foszfolipid, sziálsav-karboxil-csoportokkal) való kapcsolat révén valósulnak meg.

A sejtmembránhoz a Ca^{2+} laza és szoros kötésben kapcsolódhat. A laza kapcsolódás mosás, dialízis, ill. bármilyen fehérjementesítési eljárás hatására megszűnik. KWANT és SEEMAN (24) technikájával, amely a ^{45}Ca-tartalmú oldat membránnal való reakciója után az oldat ^{45}Ca-tartalmának visszamérésén alapszik, nyilvánvalóan egyaránt mérjük a laza és szoros kötésben reagáló Ca^{2+} mennyiségét. FORSTNER és MANERY (25, 26) technikájával, amely a ^{45}Ca és a membrán inkubálása után az alaposan mosott membránban visszamaradt ^{45}Ca mennyiségének mérésén alapszik a szorosan kötött Ca^{2+} mennyisége határozható meg. Az ATP mint Ca^{2+}-kelátor általában vetekszik a membrán Ca^{2+}-kötőhelyekkel, s a kisebb affinitású helyekről a Ca^{2+}-ot leválasztva annak membránhoz kötődését csökkenti. A CaATPáznak már puszta léte bizonyítja azonban, hogy vannak kötőhelyek, amelyek ATP jelenlétében is reagálnak Ca^{2+}-mal. DUFFY és SCHWARZ (27) be is számolnak arról, hogy ATP és Mg^{2+} jelenlétében magasabb membrán Ca^{2+}-kötődést észleltek. Mivel azonban a Mg^{2+} jelenléte perdöntő a jelenség létrehozásában és ugyanakkor azt is tudjuk, hogy a Mg^{2+} a ghostok vezikulációját idézi elő, korántsem biztos, hogy itt valódi kötődéssel állunk szemben (28). Az előbbiekben említett szerzők (24, 25, 27) megegyeznek abban, hogy a szorosan kötődő Ca^{2+} mintegy 80%-a fehérjéhez kötött, kb. 15%-a a lipid frakcióban volt található, a maradék a kivonások kapcsán a vizes fázisba eluálódott. Karbodiimiddel végzett vizsgálatok a fehérje-karboxil csoportok döntő szerepére utaltak. A reagenssel módosítva a karboxil-csoportokat a Ca^{2+}-kötődés 77%-kal csökkent (26). Agyszövetben leírtak Ca^{2+}-kötő foszfoproteineket is (29). A lipidek közül úgy látszik, a foszfoinozitidek játsszák a legjelentősebb szerepet a Ca^{2+}-kötésben (24, 30, 31). Az egyes jelenségekben szerepet játszó membrán-Ca^{2+} kölcsönhatások kötőhely típusairól azonban sajnos, még semmit nem mondhatunk.

Példaként említjük meg, hogy a vörösvérsejtek ún. Ca^{2+}-dependens gyors K^+-kiáramlása (amelynek strukturális bázisa lehet, hogy rokon az excitábilis szövetek K^+-csatornájáéval) laza-típusú Ca^{2+} membrán kölcsönhatásokon alapszik, korong-gömb alakváltozási jelensége viszont szorosabb típusú kölcsönhatásokon (32). Ugyanakkor hangsúlyoznunk kell, hogy a membrán orientáltsága miatt nem közömbös a kölcsönhatás helye sem. Mindkét példaként említett jelenség esetében ez a membrán belső felszínén lokalizálható

(32, 33). Jóllehet a membrán belső felszínéről eluáltak Ca^{2+}-mal reagáló fehérjéket (35) pontosabb kötőhely meghatározás szempontjából korai lenne találgatásokba bocsátkozni.

Farmakonok egész sora (pl. local anaestheticumok, antihisztaminok) változtatja meg — kvantitatíve és/vagy kvalitatíve — a membrán-Ca^{2+} kölcsönhatásokat. Ez egyben effektusuk magyarázata is. E sokrétű kölcsönhatások vizsgálata azonban meghaladja a jelen beszámoló kereteit.

IRODALOM

1. Schatzmann, H. J.: Experientia **22**, 364 (1966).
2. Schatzmann, H. J., Vincenzi, F. F.: J. Physiol. London **201**, 369 (1969).
3. Borbe, A. B.: J. Gen. Physiol. **53**, 43 57 (1969).
4. Lamb, J. F., Lindsay, R.: J. Physiol. **218**, 651 (1971).
5. Baker, P. F.: Progr. in Biophysics and Molecular Biology **24**, 179 (1972).
6. Dunham, E. T., Glynn, I. M.: J. Physiol. **156**, 274 (1961).
7. Wins, P., Schoffeniels, E.: Biochem. Biophys. Acta **120**, 341 (1966).
8. Schatzmann, H. J., Tschabold, M.: Experientia **27**, 59 (1971).
9. Wolf, H. U.: Biochim. Biophys. Acta **266**, 361 (1972).
10. Schatzmann, H. J., Rossi, G. L.: Biochim. Biophys. Acta **241**, 379 (1971).
11. Bond, G. H., Green, J. W.: Biochim. Biophys. Acta **241**, 393 (1971).
12. Whittam, R., Szász, I.: Közlés alatt
13. Knauf, P. A., Proverbio, F., Hoffman, J. F.: J. Gen. Physiol. Közlés alatt.
14. Cha, Y. N., Shin, B. C., Lee, K. S.: J. Gen. Physiol. **57**, 202 (1971).
15. Otsuka, M., Ohtsuki, I., Ebashi, S.: J. Biochem. (Tokyo) **58**, 188 (1966).
16. Robinson, J. D.: J. Neurochem. **15**, 1225 (1968).
17. Robinson, J. D., Lust, W. D.: Acta Biochem. Biophys. **125**, 286 (1968).
18. Baker, P. F., Blaustein, M. P.: Biochim. Biophys. Acta **150**, 167 (1968).
19. Kalix, P.: Pflügers Arch. **326**, 1 (1971).
20. Blaustein, M. P., Wiesmann, W. P.: Proc. Nat. Acad. Sci. **66**, 664 (1970).
21. Reuter, H., Seitz, N.: J. Physiol. **155**, 451 (1969).
22. Glitsch, H. G., Reuter, H., Scholz, H.: J. Physiol. **155**, 451 (1970).
23. Watanabe, A., Tasaki, I.: in Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis Eds: Nicohls, G., Wassermann, R. H., Acad. Press. New York, London 77 o. (1971).
24. Kwant, W. O., Seeman, P.: Biochim. Biophys. Acta **193**, 338 (1969).
25. Forstner, J., Manery, J. F.: Biochem. J. **124**, 563 (1971).
26. Forstner, J., Manery, J. F.: Biochem. J. **125**, 343 (1971).
27. Duffy, M. J., Schwarz, H.: Biochim. Biophys. Acta **330**, 294 (1973).
28. Steck, T. L., Weinstein, R. S., Straus, J. H., Wallach, D. F. H.: Science **168**, 255 (1970).
29. Wolff, D. J., Huetner, J. A., Siegel, F. L.: J. Neurochem. **19**, 2855 (1972).
30. Buckley, J. T., Hawthorne, J. N.: J. Biol. Chem. **247**, 7218 (1972).
31. Michell, R. H., Lapetina, E. G.: Nature New Biology **240**, 258 (1972).
32. Szász, I., Teitel, P., Gárdos, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **5**, 409 (1970).
33. Blum, R. M., Hoffman, J. F.: J. Membr. Biol. **6**, 315 (1971).
34. Blum, R. M., Hoffman, J. F.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **46**, 1146 (1972).
35. Rosenthal, A. S., Kregenow, F. M., Moses, H. C.: Biochim. Biophys. Acta **196**, 254 (1970).