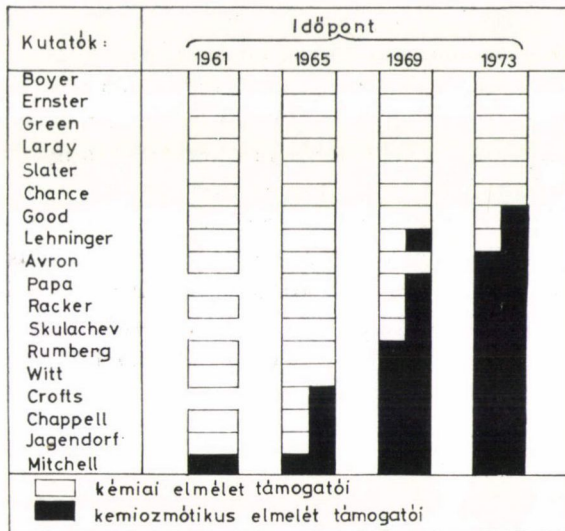


MITCHELL KEMIOZMOTIKUS ELMÉLETE A MITOKONDRIÁLIS ION-TRANZSPORT FOLYAMATOK TÜKRÉBEN*

LIGETI ERZSÉBET

Semmelweis OTE Klinikai Kísérleti Kutató és II. sz. Élettani Intézet, Budapest

Az 1940-es évektől a sejtbiológiai ismeretek szaporodásával egyre inkább előtérbe kerültek a mitokondriumokban és más biológiai membránokban zajló energia-átalakító folyamatok. A fő probléma: a szubsztrátok oxidatív lebontásából származó energia hogyan alakul át magas energiájú kémiai kötéssé, azaz ATP-vé? Kezdetben a glikolízis során végbemenő, szubsztrát-szintű foszforilációhoz hasonló, tisztán kémiai mechanizmust tételeztek fel (SLATER 1953). Eszerint a légzési lánc valamelyik tagjából magas energiájú vegyület keletkezik, amelyről egy vagy több intermedieren keresztül végülis ADP-re kerül át a magas energiájú kötés. Ezen időszakban a kutatások főként magas energiájú, kovalens kötésekkel tartalmazó közti termékek kimutatására irányultak. Részben ezen próbálkozások sikertelensége vezette Mitchellt arra



1. ábra. A Mitchell-teória támogatói (fekete téglalapok) és ellenzői (üres téglalapok) MITCHELL 1976 nyomán

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

hogy alapjaiban új mechanizmust keressen. Kemiozmotikus elméletében a légzési lánc és az ATP szintézis közötti kapocs nem egy kémiai vegyület, hanem a membrán két oldala között kialakuló elektrokémiai potenciál-különbség. Ez volt az a merőben új gondolat, amely olyan sok vitát váltott ki, s amelyet — mint az 1. ábra mutatja — csak igen lassan fogadtak el a kutatók. S bár az utóbbi években az elmélet alapjait már senki sem kérdőjelezte meg, a részletes elképzelés körül — mint a későbbiekben látni fogjuk — továbbra is élénk vita folyik.

A kemiozmotikus elmélet lényege

Az első közleményben (MITCHELL 1961) 4 postulátumban foglalta össze az elméletet.

1. A mitokondrium belső membránjában egy anizotróp ATP-áz rendszer foglal helyet, amelynek aktív centruma H^+ ionok számára csak a membrán egyik oldala felől megközelíthető, OH^- ionok számára viszont csak a másik oldal felől. Így az enzim működésével kapcsolatban H^+ vándorlás jön létre a membrán által elválasztott két vizes fázis között, ami H^+ elektrokémiai potenciál-különbség kialakulásához vezet. Ez egyben azt is jelenti, hogy az enzim működésének irányát a két vizes fázisban fennálló H^+ elektrokémiai aktivitás aránya fogja meghatározni. MITCHELL 1961 számításai szerint ahhoz, hogy az ATP/ADP arány 1 legyen, a membrán két oldala között 7 egység pH-különbségnek vagy 420 mV membránpotenciálnak kell kialakulnia (ezen számításokhoz az anorganikus foszfát koncentrációját 10 mM-nak vette).

2. A membránban elhelyezkedő oxido-redukciós rendszer (a légzési lánc) miközben a szubsztrátból származó elektronokat az oxigénhez juttatja el, egyidejűleg H^+ -kat mozgat a membránon keresztül, s így H^+ elektrokémiai potenciál-különbséget alakít ki a két vizes fázis között.

3. A membrán ion-transzlokátorokat is tartalmaz, amelyek 1:1 arányú H^+ -kation vagy OH^- -anion kicserélést végeznek. Ezek működése a fennálló pH-különbség csökkenését és a membrán-potenciál növekedését eredményezi.

4. Az előbbi 3 rendszer töltött részecskék számára igen alacsony permeabilitású membránban foglal helyet. Ha a membrán H^+ -permeabilitása foko-

Rövidítések

ATP	—	adenozin-trifoszfát
ADP	—	adenozin-difoszfát
BLM	—	black lipid membrane
BM	—	n-butyl-malonát
DNP	—	2,4-dinitrofenol
DTT	—	dithiothreitol
FCCP	—	p-trifluormetoxi(karbonilcianid)fenilhidrazon
NAD	—	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid
NEM	—	N-etilmaleimid
TMPD	—	N, N, N', N'-tetrametil-1H-fenilendiammoniumdiklorid

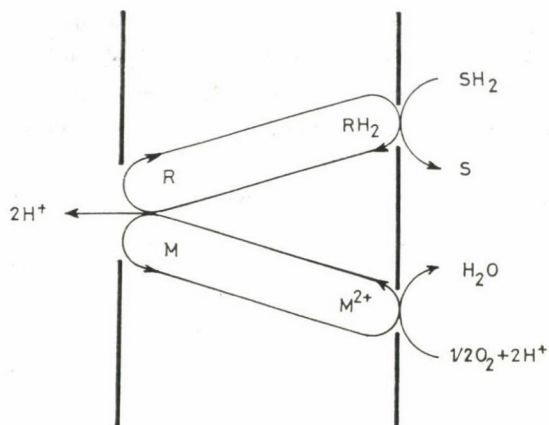
zódik, a rendszer hatékonysága romlik és szétkapcsolás jön létre. Ezt lipid-oldékony reagensek (pl. DNP) okozhatják, amelyek H^+ vagy OH^- ionok ekvilibrálódását teszik lehetővé a membránon keresztül.

A kemiozmotikus elmélet alapján érthető, miért voltak sikertelenek a magas energiájú intermedierek kimutatására irányuló kísérletek. Legnagyobb előnye azonban, hogy megmagyarázza, az oxidatív és a fotoszintetikus foszforiláció miért kötött membrán strukturához.

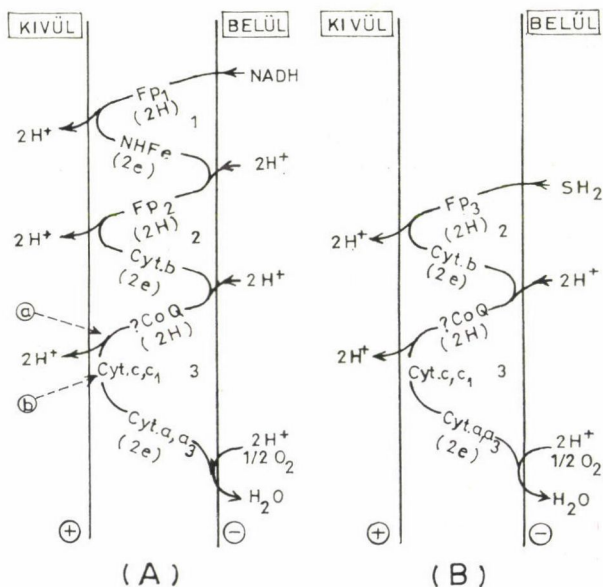
MITCHELL 1961-ben az egész teóriát elméleti megfontolásokra alapozta, a kísérleti bizonyítás több, mint 10 évig tartott. Néhány alapvető kísérleti adat birtokában (MITCHELL és MOYLE 1965) 1966-ban részletesebb formában is kifejtette elképzeléseit (MITCHELL 1966), amelyben már az oxidoredukciós lánc H^+ -transzlokáló működésének mechanizmusára is kitért. A légzési lánc — a 2. ábrán látható módon — két részből állna: egy H -t transzportáló (R) és egy elektront transzportáló (M) összetevőből, amelyek a membránban hurkot képeznek. A H -karrier tehát a membrán belső oldalán átvesz 2 H atomot az oxidálandó szubsztráttól. A külső felszín közelében 2 elektront átad a légzési lánc következő, elektront szállító tagjának, 2 H^+ iont pedig kipumpál a mitokondriumon kívüli térbe. Önmaga oxidált állapotban visszatér a membrán belső felszínére. Az elektron-karrier viszont a belső felszín közelében adja át a 2 elektront az oxigénnek és oxidált állapotában a külső felszín felé halad. Végeredményben 2 H^+ tűnt el a belső térből, és 2 H^+ jelent meg a mitokondriumon kívüli térben. A folyamat közben 1 molekula ATP termelődik. A 3. ábra mutatja ezt az elképzelést az egész légzési láncra alkalmazva. Látható, hogy NAD-függő szubsztrát esetén (3A ábra) a légzési lánc 3 hurkot képez, s miközben 2 elektront juttat el a szubsztrátról az oxigénre, összesen $3 \times 2 = 6 H^+$ -t pumpál ki és 3 molekula ATP-t szintetizál. Szukcinát szubsztrát esetén (3B ábra) viszont csak 2 hurkot képez és összesen 4 H^+ jelenik meg a külső térben, miközben 2 molekula ATP keletkezik. A légzési lánc H^+ -transzportáló működésének ezen elképzelése a „hurk-teória”, amelynek lényege tehát, hogy 2 elektron végighaladása a szubsztráttól az oxigénig hurkonként 2 H^+ kipumpálásával jár együtt. Egy hurk tulajdonképpen 1 molekula ATP szintézisének megfelelő energiát biztosít, tehát ez ún. magas energiájú hely — angol kifejezéssel „site” —, rövidítve \sim .

Mitchell elképzelése szerint az ATP-áz rendszer hasonlóan szigorú sztöchiometriával, de a légzési láncsal ellentétes irányban működik. Tehát amennyi H^+ jelenik meg a szubsztrát-oxidáció során a külső térben, ugyanannyi kerül vissza az ATP-áz rendszeren keresztül az ATP szintézise során. Fennáll tehát a következő egyenlőség:

$$\frac{ATP}{O} = \frac{H^+/O}{H^+/ATP}$$



2. ábra. A transzmembrán H^+ -transzport Mitchell-féle hurok-teóriája. MITCHELL 1966 nyomán



3. ábra. A mitokondrium légzési láncja a hurok-teória alapján. GREVILLE 1969 nyomán

A $H^+/\sim = 2$ arány feltételezése egyben azt is jelenti, hogy Mitchell számításai szerint az $ATP/ADP = 1$ arány eléréséhez a membrán két oldala közötti 3,5 egységnyi pH-különbség vagy 210 mV membrán-potenciál kialakulása is elegendő.

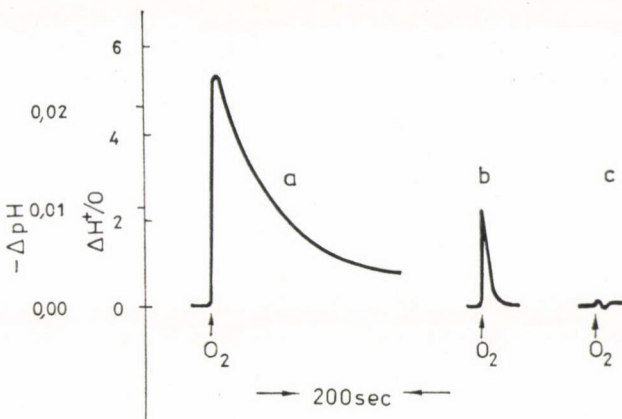
A kemiozmotikus elmélet bizonyítékai

1. A H^+ -transzlokáló ATP-áz rendszer

Az ATP lebontás során történő H^+ -vándorlást elsőként MITCHELL mérte meg (MITCHELL és MOYLE 1965). Kis mennyiségű ATP hozzáadása után a külső közeg pH-változását regisztrálták. Négy kísérlet átlagában — bonyolult korrekciók után — úgy találták, hogy 1 molekula ATP elbontása során $1,88 H^+$ jelenik meg a külső környezetben, tehát a H^+/ATP arány kerekítve 2 volt.

2. A légzési lánc H^+ -transzportáló működése

Ezen a téren szintén MITCHELL közölte az első kísérleteket (MITCHELL és MOYLE 1965, 1967b). Anaerob, szubsztrátot tartalmazó mitokondrium-szuszpenzióhoz kis mennyiségű oxigént adtak, és mérték a külső közeg pH-változását (4. ábra). A kezdeti gyors savanyodás a léggzéssel kapcsolatos H^+ -kipumpálásnak, az ezt követő lassú lúgosodás pedig a membránon keresztül történő fokozatos H^+ -visszáramlásnak felel meg. Az ordinátán már a H^+/O érték is fel van tüntetve, β -hidroxibutirát szubsztrát esetén ez 5,45 volt (4A ábra). A kezdeti H^+ -visszáramlást is korrekcióba véve 16 kísérlet átlaga $5,90 \pm 0,33$. Szukcinát szubsztráttal a H^+/O érték $4,07 \pm 0,11$. A 4C ábra ugyanezt a kísérletet mutatja Triton X-100 detergens jelenlétében, tehát elroncsolt membrán struktúrán, ahol az oxigén hozzáadása nem okoz pH-változást. Mivel 1 atom oxigén elhasználásával β -hidroxibutirát esetén 3, szukcinát esetén 2 molekula ATP termelődik, a H^+/\sim arány mindkét szubsztrátnál 2. Tulajdonképpen ezekre a kísérletekre alapozta Mitchell a hurokteóriát.



4. ábra. Oxigén hatására létrejövő mitokondriális H^+ -ejectio. A közeg tartalmaz: a. szubsztrátot, b. szubsztrátot és szétkapcsoló szert, c. szubsztrátot és Triton X-100 detergenst. MITCHELL and MOYLE 1965 nyomán

SKULACHEV és munkacsoportja bizonyította be, hogy mind szubsztrát-oxidáció, mind ATP-hidrolízis során izolált mitokondriumokban és szubmitokondriális partikulumokban egyaránt kialakul membrán-potenciál (GRINIUS et al. 1970, BAKEEVA et al. 1970). Kémiailag igen különböző szerkezetű, szintetikus lipid-oldékony kationok és anionok felvételét mérték. A mitokondrium membrán energizálása (bármilyen oxidálható szubsztráttal, vagy ATP-vel) kation-felvételt és a külső közeg savanyodását eredményezte, ilyenkor az előzetesen akkumulált anion leadása is megtörtént. Deenergizálás (a légzés gátlása, vagy oligomycin adása ATP-energizálás esetén, vagy szétkapcsoló anyag jelenléte) mindezeket a folyamatokat megfordítja. Szubmitokondriális partikulumokban az energizálás anion-felvételt és a közeg lúgosodását okozza — összhangban avval, hogy ezen részecskék membránja az intakt mitokondriumhoz képest ki van fordítva. Mindkét kísérleti objektum esetén csak az ion töltése volt lényeges, igen különböző kémiai szerkezetű ionokkal reprodukálhatók voltak a jelenségek. Tehát az energizálás hatására a membrán két oldala között kialakuló elektromos potenciál-különbség az ion-felvétel hajtóereje.

A szintetikus kationok légző mitokondriumokon ugyanolyan hatásokat hoztak létre, mint amit korábban már Ca^{2+} -felvétel (CHANCE 1965), ill. valinomycinnel indukált K^{+} -akkumuláció (összefoglalva PRESSMAN 1976) során leírtak: átmeneti légzésfokozódás és NADH-oxidáció, egyidejű H^{+} -ejectio és permeáló anion jelenlétében duzzadás. Ez viszont arra enged következtetni, hogy a természetes és a szintetikus kationok felvétele hasonló mechanizmussal megy végbe.

A H^{+} elektrokémiai potenciál-grádiens két összetevőjét — a pH-különbséget és a membrán-potenciált — először MITCHELL próbálta megmérni (MITCHELL és MOYLE 1969) — erősen indirekt módszerekkel. A későbbi években finomabb technikák terjedtek el mind a ΔpH , mind a membrán-potenciál mérésére (ROTTENBERG 1975). Bár az abszolút értékek az egyes szerzőknél jelentősen eltérnek, abban megegyeznek a közlemények, hogy légző mitokondriumban 100 mV nagyságrendű, belül negatív membrán-potenciált és 0,3—0,8 egységnyi pH-különbséget (kívül savanyú) találtak.

3. Ion-karrierok a mitokondrium membránjában

Az 1960-as évek második felében egymás után írták le a különböző ion-transzportáló rendszereket a mitokondrium membránban: a foszfát karriert (FONYÓ és BESSMAN 1968, FONYÓ 1968, TYLER 1968, TYLER 1969), a di- és a trikarboxilát karriert (CHAPPELL és HAARHOFF 1967, MEIJER 1971), az adenin-nukleotid karriert (BRUNI 1966, CHAPPELL és CROFTS 1965, összefoglalva FONYÓ et al. 1976). Ezek mind kicseréléses diffúziót végeznek, a következő specificitással:

foszfát-karrier	$H_2PO_4^- - OH^-$ $H_2PO_4^- - H_2PO_4^-$	kicserélés
dikarboxilát-karrier	dikarboxilát ²⁻ — dikarboxilát ²⁻ dikarboxilát ²⁻ — HPO_4^{2-}	kicserélés
trikarboxilát-karrier	trikarboxilát ²⁻ — trikarboxilát ²⁻ trikarboxilát ²⁻ — dikarboxilát ²⁻	
adenin nukleotid-karrier	$ADP^{3-} - ATP^{4-}$	kicserélés

Érdemes megfigyelni, hogy a foszfát-karrier működésével a foszfát transzport irányába még egy H^+ transzportja is történik (HOEK et al. 1971), az adenin nukleotid-karrier működése pedig egy elektromos töltést mozgat a membránon keresztül (LANOUE et al. 1978, KLINGENBERG és ROTTENBERG 1977). A többi karrier nem okoz sem elektromos, sem pH-változást a membrán két oldala között.

4. Az alacsony permeabilitású membrán

A mitokondrium membrán H^+ -permeabilitását először MITCHELL mérte meg (MITCHELL és MOYLE 1967a): légzés-gátolt mitokondrium szuszpenzió pH-ját regisztrálta, s kis adag savval vagy lúggal létrehozott pH-változás lassú lecsengéséből számította a membrán H^+ -konduktivitását. $pH = 7,2$ -nél $0,45 \mu\text{ohm}/\text{cm}^2$ értéket kapott, ami az ismert természetes membránok közül messze a legalacsonyabb.

Másrészt a szétkapcsoló anyagok hatását tanulmányozták. MITCHELL és MOYLE 1967a mérései szerint DNP valamint FCCP mintegy 10—15-szörösére fokozta a mitokondrium membrán H^+ -konduktivitását. A 4B ábra is mutatja, hogy FCCP szétkapcsoló jelenlétében alkalmazva az oxigén-pulzust, lényegesen kisebb pH-változást tapasztalunk, a lecsengés fázisa viszont jelentősen gyorsabb.

Mások mesterséges lipid membránokban vizsgálták a szétkapcsoló anyagok hatását, és az elektromos vezetőképesség fokozódását észlelték (CHAPPELL és HAARHOFF 1967, BIELAWSKI et al. 1966, TING et al. 1970) amelyet a H^+ -permeabilitás növekedésével lehetett magyarázni (HOPFER et al. 1968). SKULACHEV et al. 1967 még korrelációt is talált a H^+ -permeabilitást fokozó és a szétkapcsoló hatás között.

Látjuk tehát, hogy MITCHELL mind a négy posztulátuma az évek folyamán igazolódott, mindaz, amit 1961-ben elméleti megfontolások alapján írt le, kísérletes bizonyítást nyert.

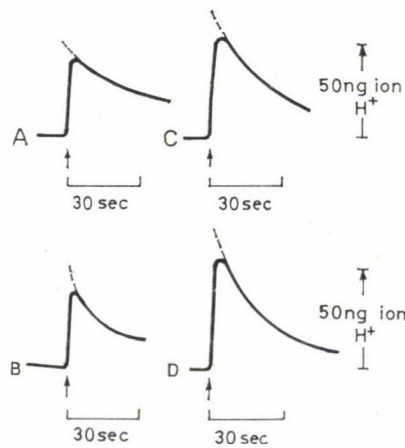
Viták a H^+/\sim sztöchiometria körül

A MITCHELL által mért (MITCHELL és MOYLE 1965, 1967b) majd a hurok-teóriába beillesztett $H^+/\sim = 2$ arány körül az utóbbi években igen élénk vita alakult ki.

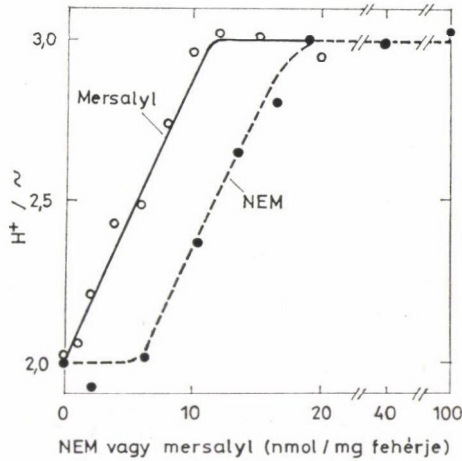
A szerzők egy része termodinamikai megközelítésből indul ki (SLATER et al. 1973, NICHOLLS 1974, 1977, WIECHMANN et al. 1975, ROTTENBERG 1975). Megmérték a mitokondrium belső membránjának két oldala között kialakuló H^+ elektrokémiai potenciál-különbséget ($\Delta\mu_{H^+}$) valamint ugyan-ezen körülmények között az ADP, ATP és az anorganikus foszfát koncentrációját, ez utóbbiakból számították az ATP-szintézishez szükséges szabad-energia változást (a foszforilációs potenciált). Úgy találták, hogy $2H^+/\sim$ arányt feltételezve, a létrejött $\Delta\mu_{H^+}$ nem biztosítja az ATP-szintézishez szükséges energiát.

A kutatók másik része az ion-transzport folyamatok vizsgálata alapján vonta kétségbe a $H^+/\sim = 2$ sztöchiometriát. E vizsgálatok nagy részét LEHNINGER munkacsoportja közölte.

BRAND et al. 1976b megismételték MITCHELL méréseit (MITCHELL és MOYLE 1965, 1967): anaerob mitokondrium-szuszpenzióhoz oxigént adtak, és mérték a külső közeg pH-változását (5. ábra). A légzés során történő H^+ -kipumpálás azonban csak akkor mérhető helyesen a külső közeg pH-változása alapján, ha minden más, H^+ -mozgással kapcsolatos folyamatot kiküszöbölünk. A foszfát-karrier már említett sajátossága ($H_2PO_4^- - OH^-$ kicserélés) miatt kezdték az említett szerzők az anorganikus foszfát szerepét vizsgálni a H^+/\sim meghatározásban. Az 5. ábra görbéi oxigén-pulzus után észlelhető pH-változást mutatnak működő (5A és 5B) és NEM-del gátolt (5C és 5D) foszfát-karrier esetén. A regisztrátumon is látható, hogy C és D



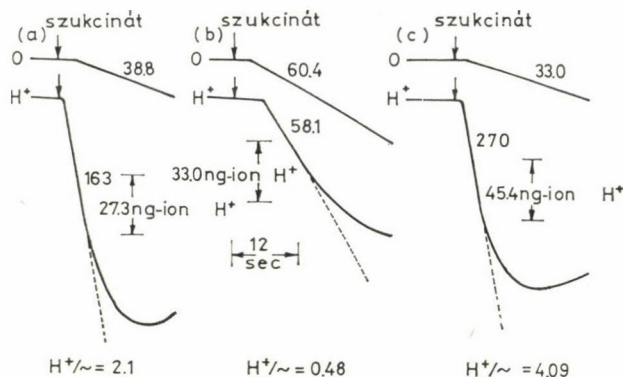
5. ábra. Oxigén hatására létrejövő mitokondriális H^+ -ejectio. A, B: működő foszfát-karrier, C, D: NEM-del gátolt foszfát-karrier. BRAND et al. 1976b nyomán



6. ábra. A H^+ /site arány a foszfát-karrier aktivitásának függvényében. BRAND et al. 1976b nyomán

görbék magasabbak, mint A és B görbék, tehát ugyanannyi oxigén hozzáadása után NEM jelenlétében több H^+ megjelenése mérhető az extramitokondriális térben. A kezdeti H^+ -visszaáramlást is korrekcióba véve A és B esetben a $H^+/\sim = 2$, C és D esetben viszont $H^+/\sim = 3$. Meggyőző a 6. ábrán látható kísérletük: a foszfát-karriert mersalyllal, ill. NEM-del titrálták, és mérték a H^+/\sim (H^+ /site) arány változását, amely fokozatosan emelkedett 2-ről 3-ra. A titrálás megfelel a foszfát-karrier más rendszerekben közölt titrálási görbéjének (FONYÓ et al. 1975). BRAND et al. 1976b azt is megmérték, hogy a mitokondriumok anaerob körülmények között (így pl. a preparálás és a kísérlet elvégzése közötti tárolás idején) foszfát-tartalmuk igen jelentős részét elvesztik, majd a légzés megindulásakor visszaveszik. Tehát foszfát-mentes médiumot használva is mindig jelen van bizonyos mennyiségű, a mitokondriumokból származó anorganikus foszfát.

REYNAFARJE et al. 1976 viszont aerob mitokondrium szuszpenzióban szubsztráttal indította a légzést és egyidejűleg mérte a külső közegben az oxigén tenzió és a H^+ -koncentráció változását (7. ábra). A görbék kezdeti, lineáris szakaszainak sebességéből számoltak. Foszfát-mentes médiumban, működő foszfát-karrier esetén (7a ábra) $H^+/\sim = 2$; 0,5 mM foszfátot tartalmazó médiumban működő foszfát-karrier esetén az érték 0,5 (7b ábra); gátolt foszfát-karrier mellett azonban $H^+/\sim = 4$ (7c ábra). Nem tisztázott, hogy a kétfajta kísérlet (a légzés oxigénnel, ill. szubsztráttal való indítása) között mi a különbség, és miért kaptak H^+/\sim aránynak az egyik esetben maximálisan 3-at, a másik esetben pedig 4-et. Az azonban világos mindkét fajta kísérletből, hogy a légzéssel egyidejűleg történő foszfát-felvétel meghamisítja — csökkenti — a mért H^+/\sim arányt. Továbbá az is nyilvánvaló, hogy a foszfát-felvétel kiküszöbölése után a H^+/\sim arány 2-nél több.

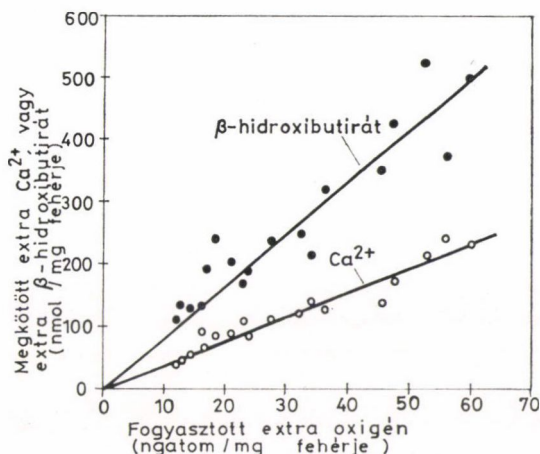


7. ábra. A H^+/\sim arány számítása az oxigén-fogyasztás és a H^+ -ejectio kezdeti sebessége alapján. a) a közeg nem tartalmaz kívülről bevitt foszfátot, b) 0,5 mM anorganikus foszfátot tartalmaz a közeg, c) 0,5 mM anorganikus foszfátot és NEM-et tartalmaz a közeg. REYNAFARJE et al. 1976 nyomán

A továbbiakban a kation-felvétel alapján próbálták a H^+/\sim arányra következtetni. Már BAKEEVA et al. 1970 kísérleteiből láttuk, hogy a légzés megindulásakor kialakuló membrán-potenciál elektroforetikus kation-felvételt tesz lehetővé. Ez azonban csak akkor lesz jelentős mértékű, ha permeáló, gyenge sav-anion is jelen van. LEHNINGER 1974 szerint ilyenkor a pH-különbség hatására a gyenge sav bejut a mitokondrium belsejébe, ott H^+ -t disszociál le, ezzel támogatja a légzési lánc H^+ -pumpa működését, a benn maradó anion pedig a membrán-potenciált növelve jelentős mértékű kation-felvételt tesz lehetővé. Ily módon a bekerült anion mennyisége tulajdonképpen a kation-felvétel során kipumpált H^+ ionok számára utal.

BRAND et al. 1976a a mitokondriumok kalcium és β -hidroxibutirát felvételét, valamint az oxigén-fogyasztást mérték (8. ábra). Légzési szubsztrát szukcinát volt, a bejutó β -hidroxibutirát oxidációját rotenonnal gátolták. Arra az eredményre jutottak, hogy 1 atom oxigén elfogyasztása árán 4 kalcium és 8 β -hidroxibutirát anion felvétele történik. Mivel szukcinát szubsztrát esetén 2 magas energiájú hely működik, $Ca^{2+}/\sim = 2$, β -hidroxibutirát/ $\sim = 4$ és végeredményben $H^+/\sim = 4$ arányt mértek. Érdekes kiemelni, hogy ezen mérések szerint a felvett kalcium/ β -hidroxibutirát arány 2, ami arra mutat, hogy a kalcium divalens kationként jut be a mitokondrium belsejébe. Ugyanerre a következtetésre jutunk AKERMAN 1978, valamint CHAPPEL et al. 1978 közleményéből, akik kálium-kalcium kicserélődést mérve $1 Ca^{2+} = 2 K^+$ arányt állapítottak meg. ROTTENBERG és SCARPA 1974 pedig a membrán-potenciált számították kálium, ill. kalcium megoszlás alapján. A kalcium töltését 2-nek véve, azonos értéket kaptak a kétféle ion-megoszlás alapján.

REYNAFARJE és LEHNINGER 1978 közleményében K^+ -felvétel alapján határozták meg a H^+/\sim arányt, így is 4-et mértek.



8. ábra. A mitokondriumok kalcium és β -hidroxibutirát felvétele az oxigén fogyasztás függvényében, szukcinát szubsztrát esetén. BRAND et al. 1976a nyomán

Viszont BRAND et al. 1976a kalcium-felvételen alapuló méréseit megismételve és a kalcium-kötődést is számításba véve (NICHOLLS 1977) kalcium/ \sim = 1,5 arány alapján a H^+ / \sim arány 3-nak adódott.

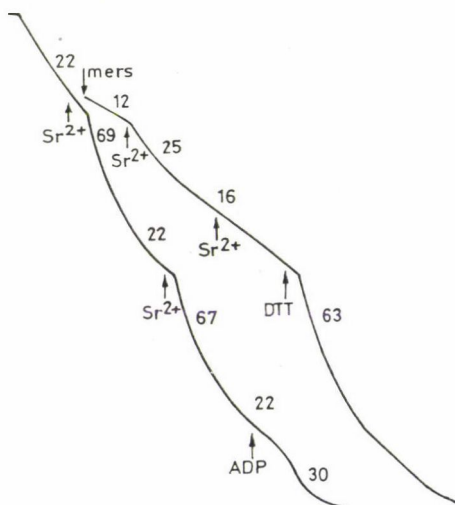
Az ismertetett irodalmi adatok — mint látjuk — egymásnak sok mindenben ellent mondanak, egy azonban közös mindhárom kísérlet típusban (a termodinamikai megközelítésben, a direkt H^+ -kipumpálás, valamint az ion-felvétel alapján történő mérésben): a H^+ / \sim értéke több, mint 2.

MITCHELL — főként LEHNINGER munkacsoportjának kísérleteire reflektálva — újra megmérte a H^+ / \sim arányt, s továbbra is 2-nek, valamint a foszfát-transzporttól függetlennek találta (MOYLE és MITCHELL 1978). A kalcium-felvétel sztöchiometriáját vizsgálva a kalcium/ H^+ arányt 1-nek mérte, tehát szerinte minden bejutó kalcium ion csak 1 pozitív töltés felvételét jelenti (MOYLE és MITCHELL 1977a). Az ellentmondó kísérleti tények magyarázatára speciális kalcium-foszfát symport mechanizmust tétélezett fel a mitokondriumban (MOYLE és MITCHELL 1977b), amelyben $\text{Ca}_2^+\text{HPO}_4^-$ lenne a transzportált forma. Ez a komplex 2 nettó pozitív töltéssel rendelkezne, s így valóban létrejöhetne az a helyzet, hogy 1 kalcium ion belépése csak 1 pozitív töltés felvételét jelentené. A továbbiakban kalcium-monokarboxilát symport mechanizmust is feltételeztek (MOYLE és MITCHELL 1977c). MOYLE és MITCHELL 1977a kalcium/ H^+ arány meghatározását később LEHNINGER technikai alapon cáfolta (REYNAFARJE és LEHNINGER 1977).

És itt kapcsolódnak saját kísérleteink az eddig részletezett gondolatkörhöz. A mi kérdésünk ugyanis az volt: szükséges-e anion-felvétel a mitokondriumok kation-felvételéhez? Ezen kérdés megválaszolásához az intramitokondriális foszfát szerepét kezdtük vizsgálni.

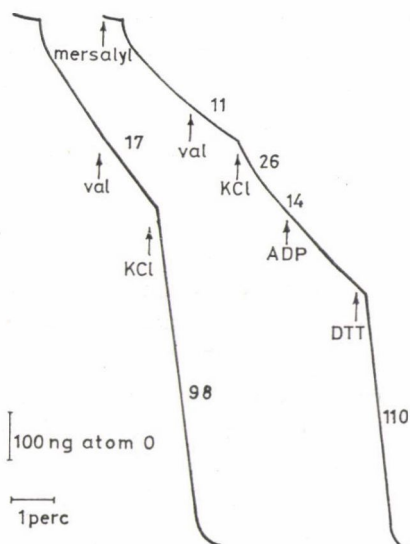
Az intramitokondriális foszfát-tartalom szerepe a kation-felvételben

Régóta ismert jelenség (CHANCE 1965), hogy ha légző mitokondriumokhoz kalciumot vagy stronciumot* adunk, a légzés átmenetileg fokozódik, majd amikor a kation elfogy a közegből, az oxigén-fogyasztás visszaáll eredeti, alacsony értékére (9. ábra). A légzésfokozódás az aktív kation-felvétellel kapcsolatos, és mindaddig kiváltható, amíg oldott oxigén van a közegben. Ha ugyanezt a kísérletet permeáló anion hiányában végezzük el (a 9. ábrán bemutatott kísérletben foszfát volt az egyetlen permeáló anion, ennek transzportját pedig mersallyllal gátoltuk), a stroncium hozzáadása sokkal rövidebb ideig tartó és kisebb mértékű légzésfokozódást okoz csak. Ez esetben újabb Sr^{2+} -adaggal a jelenség nem ismételhető. Ha viszont permeáló aniont adunk a rendszerhez (a bemutatott kísérletben a foszfát-karriert szabadítottuk fel DTT-vel), az oxigén-fogyasztás azonnal fokozódik. Ugyanez a jelenség mutatható ki KCl hozzáadásával, ha a membránt valinomycinnel K^+ számára permeabilissá tesszük (10. ábra). Permeáló anion nélkül (mersallyllal blokkolt foszfát-karrier) KCl hozzáadása is csak igen kismértékű légzés-fokozást vált ki.



9. ábra. Stroncium hatása a mitokondriumok oxigén-fogyasztására aktív és gátolt (mersallyllal) foszfát-karrier esetén

* A két kation transzportja és a transzporttal kapcsolatosan mérhető változások teljesen azonos módon zajlanak le. Nagy mennyiségű kalcium felvétele azonban strukturális változásokat és szétkapcsolást eredményez a mitokondriumban, míg stroncium-akkumuláció nem jár hasonló következményekkel. Ezért a következő kísérletek egy részében kalcium helyett stronciumot alkalmaztunk, így a két kationt a továbbiakban szinonimaként fogom használni.



10. ábra. KCl hatása valinomycin jelenlétében a mitokondriumok oxigénfogyasztására aktív és mersallyllal gátolt foszfát-karrier esetén

A továbbiakban a mitokondriumok endogén foszfát-tartalmát változtattuk s ennek hatását vizsgáltuk a kation-felvételre, gátolt foszfát-karrier mellett és minden más, permeáló anion távollétében (FONYÓ és LIGETI 1978a).

Légző mitokondriumok a közegből bizonyos mennyiségű foszfátot vettek fel, így sikerült megtölteni őket. A foszfát-karrier mersallyllal történő gátlása

I. táblázat

Káliummal, ill. stronciummal kiváltott extra oxigén-fogyasztás különböző endogén foszfát-tartalmú mitokondriumokban

Anyagok sorrendje	Endogén foszfát (nmol/mg feh.)	Extra oxigén-fogyasztás (ngatom O/mg feh.)	
		K ⁺ (+val.)	Sr ²⁺
Valinomycin, mersalyll, szukcinát, P	19,2	2,9	5,0
Mersalyll, szukcinát, P	22,0	3,2	7,9
Szukcinát, P, mersalyll	33,0	4,7	10,8
Szukcinát, P, mersalyll, ADP, oligomycin	20,3	3,6	6,5
Mersalyll, szukcinát, P, ADP, oligomycin	21,2	2,7	7,0
Mersalyll, szukcinát, P	28,5	3,5	11,3
Szukcinát, P, mersalyll	37,0	5,0	13,2
Szukcinát, P, mersalyll, ADP, oligomycin	28,0	3,9	7,7

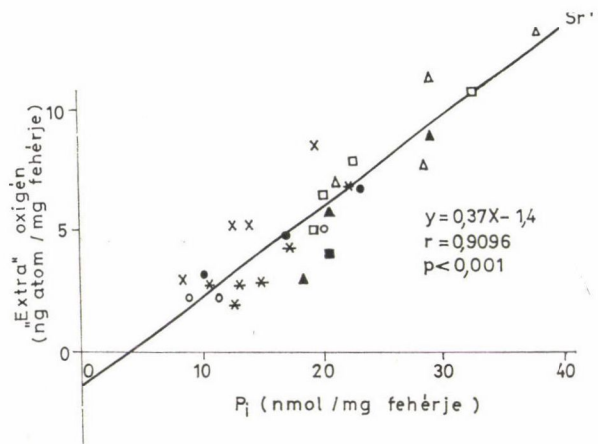
után, ADP jelenlétében az intramitokondriális foszfát-tartalom egy része ATP-szintézishez használódik fel. A keletkezett ATP későbbi lebomlását oligomycinnel gátoltuk. Ugyancsak foszfát-depléciót lehetett elérni, ha nem légző mitokondriumokból valinomycinnel K^+ -kiáramlást hoztunk létre (1. táblázat). Ezen módszerekkel 7,8 és 38,7 nmol foszfát/mg fehérje szélső értékeket sikerült elérni, egy napi preparátumon általában 10–15 nmol/mg változást kaptunk.

Ezután a különböző endogén foszfát tartalmú mitokondriumokban vizsgáltuk a kation-felvétellel járó légzésfokozódás mértékét. (Az „extra” oxigén-fogyasztást LEHNINGER 1977 alapján számítottuk, ami azt jelenti, hogy a stimulált légzés sebességéből levonjuk a state 4 értékét.)

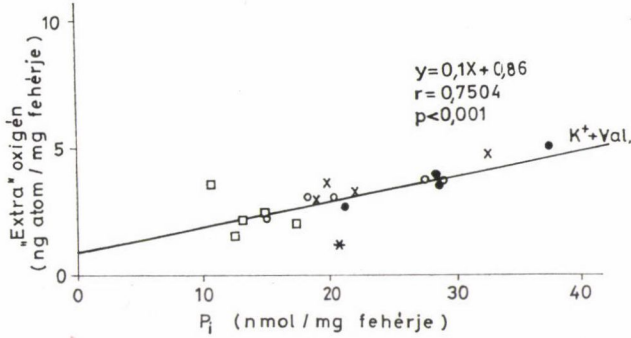
Két jellegzetes kísérletet tüntettünk fel az 1. táblázatban. Látható, hogy az intramitokondriális foszfát-tartalom növelésével fokozódik mind a káliummal (valinomycin jelenlétében), mind a stronciummal kiváltott extra oxigén-fogyasztás. Bármely módon történő foszfát-depléció viszont a kationokkal stimulált oxigén-fogyasztás csökkenését eredményezi.

Több kísérlet adatait összegzi a 11. ábra. A különböző jelölések különböző napi preparátumon kapott értékeket tüntetnek fel. Lineáris összefüggést találtunk a stronciummal kiváltott extra oxigén-fogyasztás mértéke és az endogén foszfát-tartalom között. Ezenkívül a stronciummal stimulált légzés sebessége is a mitokondriumon belüli foszfát-szint függvénye volt (nincs ábrázolva).

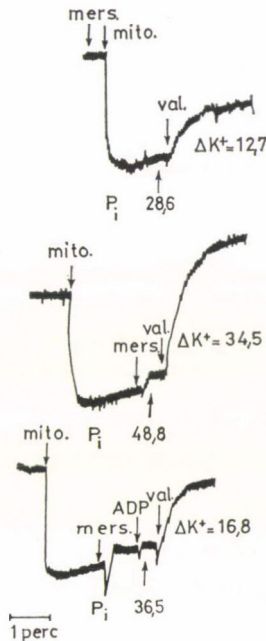
A valinomycin jelenlétében káliummal kiváltott extra oxigénfogyasztás szintén lineáris összefüggést mutatott az intramitokondriális foszfát-tartalommal (12. ábra). Jelentős különbséget tapasztaltunk viszont a kétféle kationnal kiváltott légzés-fokozódás abszolút értékei között. Mind az 1. táblázatban,



11. ábra. A stronciummal kiváltott extra oxigén fogyasztás és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggése



12. ábra. Káliummal valinomycin jelenlétében kiváltott extra oxigénfogyasztás és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggése



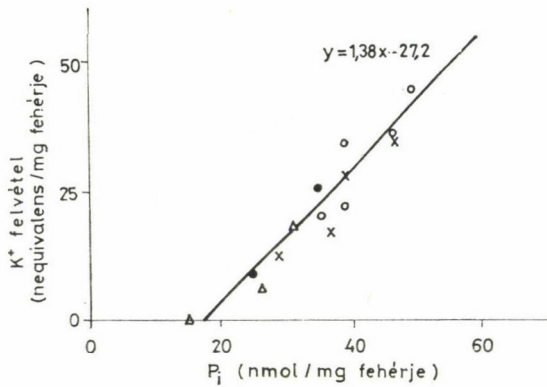
13. ábra. Valinomycinnel indukált kálium-felvétel különböző intramitokondriális foszfát-tartalom esetén

mind a regressziós egyenesek meredekségén látható, hogy Sr^{2+} mindig lényegesen nagyobb extra oxigén-fogyasztást okozott, mint K^+ . Lehetséges, hogy a különbséget abban kell keresnünk, hogy a bejutott Sr^{2+} a mátrixban bizonyos mértékben oldhatatlan csapadékot képez, míg K^+ esetében ilyen jelenség nem játszódik le.

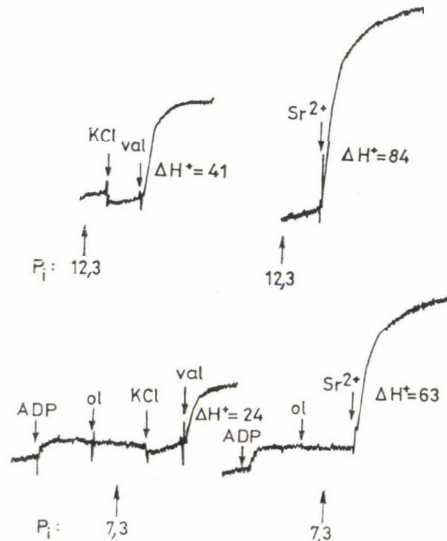
Felmerülhet a kérdés, hogy a kationokkal kiváltott légzés-stimulálás valóban aktív ion-felvételt tükröz-e? Ezt direkt, K^+ -elektródos mérésekkel igazoltuk (LUKÁCS G., LIGETI E., FONYÓ A. — közlésre előkészítve). Ugyan-

csak gátolt foszfát-karrier mellett és minden egyéb permeáló anion távollétében mértük a valinomycin jelenlétében történő K^+ -felvételt, miközben a már részletezett módon változtattuk a mitokondriumok endogén foszfát-tartalmát. Magasabb foszfát-szint valóban nagyobb K^+ -felvételt eredményezett, míg foszfát-depléción hatására csökkent a K^+ -felvétel (13. ábra). Több kísérlet összegezésekor ez esetben is megkaptuk a lineáris összefüggést (14. ábra).

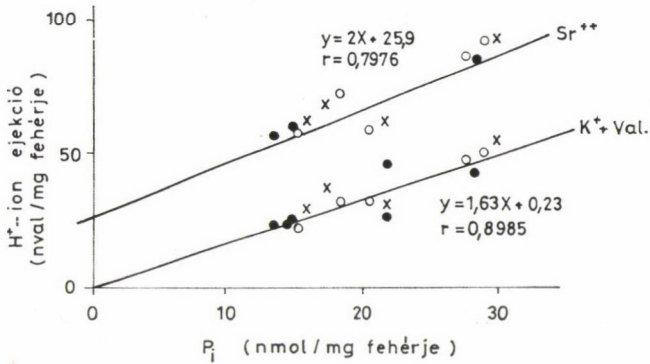
Eddigi eredményeink egyértelműen mutatják, hogy bizonyos mennyiségű kation — stroncium éppúgy mint kálium — felvétele kísérő anion nélkül is



14. ábra. A valinomycinnel indukált kálium-felvétel és az intramitochondriális foszfát-tartalom összefüggése



15. ábra. Kation-felvételt kísérő H^+ -ejectio foszfáttal megtöltött (felső sor) és foszfát-depletált (alsó sor) mitokondriumokból

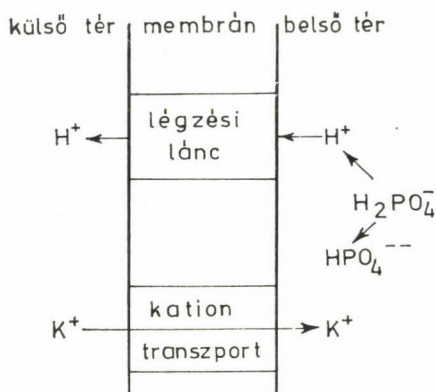


16. ábra. A kation-felvételt kísérő H⁺-ejectio és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggése

végbemeget, s ezen kation-felvétel mértékét a mitokondriumon belüli anorganikus foszfát-szint határozza meg. Arra gondoltunk, hogy az intramitokondriális foszfát a légzési lánc H⁺-pumpa működését segíti, s ezen keresztül szabályozza a kation-felvételt. Ez esetben a kation-akkumulációt kísérő H⁺-ejectio és az endogén foszfát-szint között is kell összefüggést találnunk.

További kísérleteinkben ezt vizsgáltuk (FONYÓ és LIGETI 1978b). Alacsony puffer-kapacitású elegyben érzékeny üvegelektroddal regisztráltuk a mitokondrium-szuszpenzió pH-ját. Az endogén foszfát-szintet változtatva mértük a K⁺ + valinomycin, ill. Sr²⁺ hozzáadására bekövetkező pH-változást, amelyből megfelelő kalibráció segítségével számítottuk a H⁺-ejectio mértékét. A 15. ábra felső görbéi foszfáttal megtöltött, alsó görbéi ADP-vel depletált mitokondriumon készültek. Látható, hogy foszfát-depléció csökkentette mind a K⁺ + valinomycinnel, mind a Sr²⁺-mal kiváltott H⁺-ejectiot. A 16. ábra ismét több kísérletet összegezve mutatja a H⁺-ejectio és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggését. A kapcsolat mindkét kation esetében lineáris, a Sr²⁺-felvételt kísérő H⁺-kipumpálás számértéke ismét lényegesen magasabb.

Eredményeink alapján a következőképpen képzeljük el az intramitokondriális foszfát szerepét (17. ábra): a mitokondrium belsejében levő anorganikus foszfát egyensúlyban van a légzési lánc H⁺-pumpájával, szükség esetén H⁺-disszociációval támogatja annak működését. Az ily módon keletkező negatív töltés többlet (HPO₄²⁻) pedig elektroforetikus kation-felvételt tesz lehetővé. Így válhat az intramitokondriális foszfát-tartalom a kation-transzport meghatározójává. Mint már az előzőekben említettem, LEHNINGER 1974 hasonló mechanizmust tétélezett fel a kationnal egyidejűleg *transzportált* gyenge sav anionok szerepére. A mi kísérleteink viszont arra mutatnak, hogy nincs szükség anion-transzportra, hanem a mitokondrium belsejében már eleve jelenlevő anionok — pl. a H₂PO₄⁻ — is betölthetik ezt a funkciót. Elképzelhető, hogy adott esetekben más anionok is játszhatnak hasonló szerepet — erre utaló



17. ábra. Az intramitokondriális foszfát szerepe a mitokondriumok kationfelvételében

jelet látunk a 16. ábrán, ahol a stronciummal kapott regressziós egyenes pozitív értéknél metszi az ordinátát.

Másrészt viszont kísérleteink valószínűtlenné teszik egy kalcium-foszfát symport mechanizmus működését. A kálium transzportot vizsgálva ugyanis megkaptuk mindazokat a jelenségeket, amelyeket stroncium-transzport esetén észleltünk: mindkét kation felvételét kísérő légzés-fokozódás és H^+ -ejectio az intramitokondriális foszfát tartalom függvénye volt. A valinomycinnel indukált káliumtranszport esetében viszont nem jöhet létre kation-anion symport.

A kalcium-foszfát symport direkt cáfolata

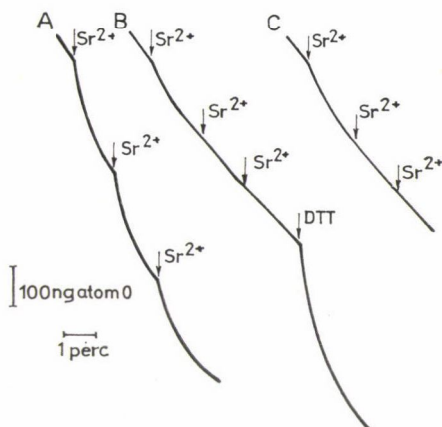
MOYLE és MITCHELL 1977b a kalcium-foszfát symport elképzelést a foszfát-karrier gátlószerei (mersalyl és NEM) iránt nem érzékeny, La^{3+} -érzékeny foszfát-transzport kimutatására alapozták. Két kísérleti ténytet írtak le:

1. Mersalyl vagy NEM jelenlétében is létrehozható stronciummal átmeneti légzésfokozódás, amely szerintük a stroncium-felvétellel egyidejűleg történő foszfát-felvételt bizonyít.

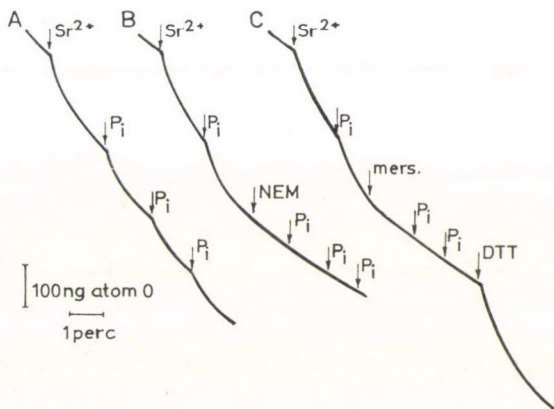
2. Mersalyl vagy NEM jelenlétében a kalcium felvételt fele mennyiségű foszfát felvétele kíséri, amely szerintük a kalcium-karrieren keresztül történik.

Kísérleteinkben mindkét jelenséget tovább vizsgáltuk (LIGETI et al. 1979).

Mint az előzőekben láttuk, kationok gátolt foszfát-karrier esetén is létrehozhatnak bizonyos mértékű légzésfokozódást — az endogén foszfát terhére. A körülmények szerencsés összejátszása esetén — ha az oldat nem tartalmaz anorganikus foszfátot, a mitokondriumok endogén foszfát tartalma viszont magas — a foszfát-karrier blokkolása valóban nem okoz jelentős különbséget a stronciummal kiváltható légzés-stimulálásban. Ez a helyzet állott elő MOYLE és MITCHELL 1977b kísérleteiben. A következő ábrák azonban egyértelműen



18. ábra. Stroncium hatása a mitokondriumok légzésére A. működő, B. mersallyl, C. NEM-del gátolt foszfát-karrier esetén



19. ábra. Stroncium jelenlétében kis adag foszfát légzés-stimuláló hatása A. működő, B. NEM-del C. mersallyl gátolt foszfát-karrier esetén

mutatják, hogy a stroncium légzés-stimuláló hatása mind mersalyl, mind NEM iránt érzékeny. A 18. ábrán bemutatott kísérletben a közeg tartalmazott foszfátot. 18A görbén aktív foszfát-karrier mellett kis adag stronciummal mindaddig létrehozhattunk légzés-stimulálást, amíg a közegben oldott oxigén volt jelen. Ha azonban gátolt (18B kísérletben mersallyl, 18C-ben NEM-del) foszfát-karrier esetén ismétljük meg, csak az első adag stroncium fokozza kis mértékben a légzést, a továbbiak hatástalanok. A foszfát-karrier felszabadítása (DTT-vel) után megkapjuk a légzésfokozódást (18B). A 19. ábrán bemutatott kísérletekben a közeg nem tartalmazott anorganikus foszfátot. Nagy adag — az előzőekben alkalmazott dózis 5-szöröse — stroncium csak rövid ideig stimulálta a légzést — a mitokondriumokból anaerob körülmények között

kidiffundált foszfát visszavétele és az endogén foszfát H^+ -disszociációja biztosította ezt. A továbbiakban aktív foszfát-karrier mellett (19A) kis adag foszfáttal mindaddig lehetett fokozni az oxigén-fogyasztást, amíg stroncium és oldott oxigén jelen volt a közegben. A foszfát-karrier blokkolása után adott foszfát azonban hatástalan volt (19B és 19C). A foszfát-karrier revertálása ismét légzés-fokozódást eredményezett (19C).

Tehát gátolt foszfát-karrier mellett és egyéb permeáló anion hiányában a stronciummal létrehozható légzés-stimulálás az endogén foszfát terhére jön létre, ennek kimerítése után pedig a további oxigén-fogyasztás fokozódás, azaz Sr^{2+} -felvétel a foszfát-karrieren keresztül történő foszfát-felvételhez kötött.

Másrészt mi is megvizsgáltuk kalcium-, ill. stroncium-felvétel során a mitokondriumok foszfát-tartalmának alakulását. Azt tapasztaltuk, hogy gátolt foszfát-karrier esetén a kétértékű kationok felvételét valóban kíséri bizonyos mértékű foszfát-felvétel, de ez preparátumonként igen változó mértékű volt. Változó sztöchiometriájú kalcium-foszfát symportot viszont nehéz elképzelni. Ezért más mechanizmust kerestünk. Korábban már szó volt arról, hogy a dikarboxilát-karrier is képes foszfátot szállítani (dikarboxilát²⁻ — HPO_4^{2-} kicserélődés). Így a következőkben megvizsgáltuk, mi történik, ha ezt a karriert is gátoljuk n-butilmalonáttal. A 2. és 3. táblázatban bemutatott kísérletekben aszkorbát + TMPD szubsztrátot alkalmaztunk, amely kívülről kapcsolódik a légzési láncba, s így transzport mechanizmust nem igényel. A 2. táblázatban csak a mitokondriumokhoz hozzáadott kalcium mennyiségét tüntettük fel, mivel a kalcium-felvételre csak indirekt úton, hozzávetőlegesen tudtunk következtetni. Látható, hogy mersalyl és BM együttes jelenlétében — tehát gátolt foszfát és dikarboxilát karrier esetén — a kalcium-felvételt kísérő foszfát-felvétel szinte teljesen megszűnik. A 3. táblázat már az atom-

2. táblázat

A kalcium-felvételt kísérő foszfát-felvétel mitokondriumokban a foszfát- és a dikarboxilát-karrier gátlószereinek jelenlétében

Inhibitor	kalcium-hozzáadás (nmol/mg feh.)	foszfát-felvétel (nmol/mg feh.)
—	35	30,7
	70	63,0
BM	35	34,9
	70	65,2
mersalyl	35	10,0
	70	26,7
mersalyl + BM	35	1,1
	70	2,1

3. táblázat

Kalcium- és foszfát-felvétel mitokondriumokban a foszfát-transzport különböző gátlószereinek jelenlétében.

Inhibitor	foszfát-felvétel (nmol/mg feh.)	kalcium-felvétel (nmol/mg-feh.)
—	49,7	55,9
BM	49,1	62,4
mersalyl	22,8	56,4
mersalyl + BM	3,9	49,6
NEM	20,5	48,5
NEM + BM	0,3	31,1

abszorpciós fotometriával meghatározott kalcium-felvételt is feltünteti. Ismét az látható, hogy a kalcium-akkumulációval egyidejűleg történő foszfát-bejutás igen jelentősen lecsökken vagy megszűnik, ha a mersalyl, ill. az NEM mellett BM is jelen van.

Ezek a kísérletek egyértelműen bizonyítják, hogy gátolt foszfát-karrier mellett a kalcium-, ill. stroncium-felvételt kísérő foszfát-transzport a dikarboxilát-karrieren és nem a kalcium-karrieren keresztül történik, tehát cáfolják a kalcium-foszfát symport elképzelést. A preparátumonként változó mértékű foszfát-felvétel a preparátumok változó dikarboxilát-tartalmával vagy a dikarboxilát-karrier különböző aktivitásával magyarázható.

További kérdés, hogy kétértékű kationok akkumulációját miért kíséri foszfát-felvétel, amikor a kálium-transzportot vizsgálva soha nem tapasztaltunk ilyen jelenséget. A bejutó kalcium, ill stroncium azonban az intramitokondriális foszfát egy részével oldhatatlan csapadékot képez, ily módon erősen lecsökken a belső foszfát-koncentráció. A mitokondriumon kívüli térben van foszfát, viszont nincs dikarboxilát. Így a két anion koncentráció-grádiensének megfelelően, a dikarboxilát-karrieren keresztül kicserélődik.

Kísérleteink tehát alátámasztják az eredeti elképzelést, amely szerint a kalcium elektroforetikusan, 2 pozitív töltéssel jut be a mitokondrium belsejébe. Egyben megerősítik BRAND et al. 1976a kalcium-felvétel alapján végzett H^+/\sim meghatározásait.

A kemiozmotikus elmélet összefoglaló értékelése

Az előzőekben részletezett adatok alapján a kemiozmotikus elmélet körüli vitákat ma így összegezhethetjük: MITCHELL eredeti elképzelését, az 1961-ben feltételezett 4 pontot bebizonyították, ugyancsak egyértelműen kimutat-

ták az elmélet lényegét képező H^+ -elektrokémiai potenciál-különbség létrejöttét a mitokondrium és más biológiai membránok két oldala között. A teória legnagyobb érdeme talán, hogy megmagyarázta, az oxidatív és a fotoszintetikus foszforiláció miért kötött szigorúan membrán struktúrához. A részletesebb, molekuláris mechanizmusra vonatkozó elképzelések — a hurokteória és a $H^+/\sim = 2$ sztöchiometria —, valamint az ezek védelmére és megerősítésére szolgáló későbbi feltételezések — pl. a kalcium/ $H^+ = 1$ arány vagy a kalcium-foszfát symport — az újabb kísérletek fényében nem állják meg a helyüket. A H^+/\sim arányról nyert adatok jobban magyarázhatók a PAPA 1976 által elképzelt H^+ -pumpa mechanizmussal, a membrán Bohr effektussal. Ennek lényege: a légzési lánc egyes fehérjéinek oxidált állapotban más lenne a pK értékük, mint redukált állapotban, ami az oxido-redukciós változásokkal szinkron protonálódást — deprotonálódást eredményezne. Ily módon vektoriális H^+ -mozgás jöhet létre (PAPA 1976). A citokrom b régióban valóban leírtak olyan komponenst, amelynek redox potenciálja pH-függő volt (URBAN és KLINGENBERG 1969, STRAUB és COLPA BOONSTRA 1962). A Bohreffektus alapján működő H^+ -pumpa elképzelés előnye, hogy nem feltételez sem szigorú sztöchiometriát, sem alternáló hidrogén- és elektron-karriereket a légzési láncban. Nincs ellentétben avval a legújabban megjelent adattal sem, amely szerint a légzési lánc 3 magas energiájú helyén nem lenne azonos a H^+/\sim arány (BRAND et al. 1978).

Másrészt viszont HINKLE 1973 mesterséges membránokon — liposzómákon és BLM-en — végzett kísérleteiben kimutatta, hogy pH-különbség és membrán-potenciál kialakulhat tényleges H^+ -transzlokáció nélkül, pusztán transzmembrán elektron-transzfer útján.

Végezetül még két gondolatot szeretnék megemlíteni, amelyek a legutóbbi években merültek fel (ERNSTER 1977), és mégcsak adekvát kísérleti megközelítés sincs velük kapcsolatban:

1. A biológiai membránokban kialakuló H^+ elektrokémiai potenciálgrádiens az itt zajló energia-átalakító folyamatok primer lépése-e, avagy megelőzi esetleg egy konformációs változást?

2. Az energia-átalakítás csak az egész membránra kiterjedő H^+ -grádiens közbeiktatásával történhet-e, vagy lehetségesek direkt mechanizmusok a membrán kisebb régióiban?

Mindezek a felvetett gondolatok, nyitva hagyott kérdések és bebizonyítatlan elképzelések világosan mutatják, hogy a Mitchell-féle kemiozmotikus teória — bár nagy vonalaiban elfogadták, s szerzője megkapta a Nobel-díjat — továbbra is élénken foglalkoztatja a kutatók fantáziáját.

Az Egészségügyi Minisztérium I-07-0306-01-1/F számú kutatási főirányához kiemelt, szintre elfogadott kutatási témában végzett kutatómunka alapján.

IRODALOM

- AKERMAN, K. E. O.: Charge transfer during valinomycin-induced Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria. *FEBS Letters* **93**, 293—296 (1978).
- BAKEEVA, L. E., GRINIUS, L. L., JASAITIS, A. A., KULIENE, V. V., LEVITSKY, D. O., LIBERMAN, E. A., SEVERINA, I. I., SKULACHEV, V. P.: Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 13—21 (1970).
- BIELAWSKI, J., THOMPSON, T. E., LEHNINGER, A. L.: The effect of 2,4-dinitrophenol on the electrical resistance of phospholipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **24**, 948—954 (1966).
- BRAND, M. D., CHEN, CH. H., LEHNINGER, A. L.: Stoichiometry of H^+ ejection during respiration-dependent accumulation of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**, 968—975 (1976a).
- BRAND, M. D., REYNAFARJE, B., LEHNINGER, A. L.: Re-evaluation of the H^+ /site ratio of mitochondrial electron transport with the oxygen pulse technique. *J. Biol. Chem.* **251**, 5670—5679 (1976b).
- BRAND, M. D., HARPER, W. G., NICHOLLS, D. G., INGLEDEW, W. J.: Unequal charge separation by different coupling spans of the mitochondrial electron transport chain. *FEBS Letters* **95**, 125—130 (1978).
- BRUNI, A.: The mechanism of action of atractyloside. in: Regulation of metabolic processes in mitochondria eds.: J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E. C. Slater Elsevier, Amsterdam, London, New York pp. 275—291 (1966).
- CHANCE, B.: The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **240**, 2729—2748 (1965).
- CHAPPELL, J. B., CROFTS, A. R.: The effect of atractylate and oligomycin on the behaviour of mitochondria towards adenine nucleotides. *Biochem. J.* **95**, 707—716 (1965).
- CHAPPELL, J. B., HAARHOFF, K. N.: The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations. in: Biochemistry of mitochondria eds.: E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak Academic Press London and New York and PWN Warszawa pp. 75—93 (1967).
- CHAPPELL, J. B., ARRABACA, J. D., DEANNA, R., MATHIEN—SHIRE, Y.: The requirement for anion symport for Ca^{2+} -transport by liver mitochondria. in: Abstracts of the 12-th FEBS Meeting Dresden, 1978. Abstract No. 2025 (1978).
- ERNSTER, L.: Chemical and chemiosmotic aspects of electron transport-linked phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* Vol. **46**, pp. 981—995 (1977).
- FONYÓ, A.: Phosphate carrier of rat liver mitochondria: its role in phosphate outflow. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **32**, 624—628 (1968).
- FONYÓ, A., BESSMAN, S. P.: Inhibition of inorganic phosphate penetration into liver mitochondria by p-mercuribenzoate. *Biochem. Medicine* **2**, 145—163 (1968).
- FONYÓ, A., LIGETI, E., PALMIERI, F., QUAGLIARIELLO, E.: Carrier mediated transport of phosphate in mitochondria. in: Biomembranes, Structure and Function. eds.: G. Gárdos and I. Szász, Akadémiai Kiadó Budapest and North Holland, Amsterdam pp. 287—306 (1975).
- FONYÓ, A., PALMIERI, F., QUAGLIARIELLO, E.: Carrier-mediated transport of metabolites in mitochondria. in: Horizons in Biochemistry and Biophysics, Vol. 2. eds.: E. Quagliariello, F. Palmieri, Th. P. Singer; Addison-Wesley Publishing Comp. London pp. 60—105 (1976).
- FONYÓ, A., LIGETI, E.: The role of intramitochondrial P_i in stimulation of respiration by calcium and strontium. *FEBS Letters* **93**, 289—292 (1978).
- FONYÓ, A., LIGETI, E.: Intramitochondrial phosphate is the source of protons in the response of liver mitochondria to cations. *FEBS Letters* **96**, 343—345 (1978).
- GREVILLE, D. G.: A scrutiny of Mitchell's chemiosmotic hypothesis on respiratory chain and photosynthetic phosphorylation. in: Current topics of bioenergetics, Vol. 3. ed: R. Sanadi; Academic Press, New York and London pp. 1—78 (1969).
- GRINIUS, L. L., JASAITIS, A. A., KADZIAUSKAS, YU. P., LIBERMAN, E. A., SKULACHEV, V. P., TOPALI, V. P., TSOFINA, L. M., VLADIMIROVA, M. A.: Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 1—12 (1970).
- HINKLE, P. C.: Electron transfer across membranes and energy coupling. *Fed. Proc.* **32**, 1988—1992 (1973).
- HOEK, J. B., LOFRUMENTO, N. E., MEIJER, A. J., TAGER, J. M.: Phosphate transport in rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **226**, 297—308 (1971).
- HOFFER, V., LEHNINGER, A. L., THOMPSON, T. E.: Protonic conductance across phospholipid

- bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **59**, 484—490 (1968).
- KLINGENBERG, M., ROTTENBERG, H.: Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane. *Eur. J. Biochem.* **73**, 125—130 (1977).
- LANOUE, K., MIZANI, S. D., KLINGENBERG, M.: Electrical imbalance of adenine nucleotide transport across the mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **253**, 191—199 (1978).
- LEHNINGER, A. L.: Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of Ca^{++} by mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 1520—1524 (1974).
- LEHNINGER, A. L.: *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. New York (1977).
- LIGETI, E., IKRÉNYI, K., FONYÓ, A.: The inhibitor-sensitivity and pathways of P_i uptake during calcium and strontium accumulation in liver mitochondria. *FEBS Letters* **107**, 205—208 (1979).
- MEIJER, A. J.: Anion translocation in mitochondria. Academic Service, Ruinzicht 118, Amsterdam (1971).
- MITCHELL, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144—148 (1961).
- MITCHELL, P.: Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Glynn Res. Ltd. Bodmin (1966).
- MITCHELL, P.: Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling. *Biochem. Soc. Trans.* **4**, 399—430 (1976).
- MITCHELL, P., MOYLE, J.: Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. *Nature* **208**, 147—151 (1965).
- MITCHELL, P., MOYLE, J.: Acid-base titration across the membrane system of rat liver mitochondria. Catalysis by uncouplers. *Biochem. J.* **104**, 588—600 (1967a).
- MITCHELL, P., MOYLE, J.: Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **105**, 1147—1162 (1967b).
- MITCHELL, P., MOYLE, J.: Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **7**, 471—484 (1969).
- MOYLE, J., MITCHELL, P.: Electric charge stoichiometry of calcium translocation in rat liver mitochondria. *FEBS Letters* **73**, 131—136 (1977a).
- MOYLE, J., MITCHELL, P.: The lanthanide-sensitive calcium phosphate porter of rat liver mitochondria. *FEBS Letters* **77**, 136—140 (1977b).
- MOYLE, J., MITCHELL, P.: Lanthanide-sensitive calcium-monocarboxylate symport in rat liver mitochondria. *FEBS Letters* **84**, 135—140 (1977c).
- MOYLE, J., MITCHELL, P.: Measurement of mitochondrial H^+/O quotients: effects of phosphate and N-ethylmaleimide. *FEBS Letters* **90**, 361—365 (1978).
- NICHOLLS, D. G.: The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton electrochemical gradient across the inner membrane of rat liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur. J. Biochem.* **50**, 305—315 (1974).
- NICHOLLS, D. G.: Stoichiometries of proton translocation by mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* **5**, 200—203 (1977).
- PAPA, S.: Proton translocation reactions in the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 39—85 (1976).
- PRESSMAN, B. C.: Biological application of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.* Vol. **45**, pp. 501—530 (1976).
- REYNAFARJE, B., BRAND, M. D., LEHNINGER, A. L.: Evaluation of the H^+/site ratio of mitochondrial electron transport from rate measurements. *J. Biol. Chem.* **251**, 7442—7451 (1976).
- REYNAFARJE, B., LEHNINGER, A. L.: Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **77**, 1273—1279 (1977).
- REYNAFARJE, B., LEHNINGER, A. L.: The K^+/site and H^+/site stoichiometry of mitochondrial electron transport. *J. Biol. Chem.* **253**, 6331—6334 (1978).
- ROTTENBERG, H.: The measurement of transmembrane electrochemical proton gradients. *Bioenergetics* **7**, 61—74 (1975).
- ROTTENBERG, H., SCARPA, A.: Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. *Biochemistry* **13**, 4811—4817 (1974).
- SKULACHEV, V. P., SHARAF, A. A., LIBERMAN, E. A.: Proton conductors in the respiratory chain and artificial membranes. *Nature* **216**, 718—719 (1967).
- SLATER, E. C.: Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature* **172**, 975 (1953).
- SLATER, E. C., ROSING, J., MOL, A.: The phosphorylation potential generated by respiring mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 534—553 (1973).

- STRAUB, J. P., COLPA BOONSTRA, J. P.: The effect of pH on the oxidation-reduction potential of cytochrome b in heart muscle preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 650—652 (1962).
- TING, H. P., WILSON, D. F., CHANCE, B.: Effects of uncouplers of oxidative phosphorylation on the specific conductance of bimolecular lipid membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**, 141—146 (1970).
- TYLER, D. D.: The inhibition of phosphate entry into rat liver mitochondria by organic mercurials and by formaldehyde. *Biochem. J.* **107**, 121—123 (1968).
- TYLER, D. D.: Evidence of a phosphate-transporter system in the inner membrane of isolated mitochondria. *Biochem. J.* **111**, 665—678 (1969).
- URBAN, P. F., KLINGENBERG, M.: On the redox potentials of ubiquinone and cytochrome b in the respiratory chain. *Eur. J. Biochem.* **9**, 519—525 (1969).
- WIECHMAN, A. H. C. A., BEEM, E. P., VAN DAM, K.: The relationship between H⁺ translocation and ATP synthesis in mitochondria. in: *Electron transfer chains and oxidative phosphorylation* eds.: E. Quagliariello et al. North-Holland Comp., Amsterdam pp. 335—342 (1975).