

A VÖRÖSVÉRTEST MEMBRÁN JELÖLÉSE ÉS KÉMIAI MÓDOSÍTÁSA. [MÓDSZEREK ÉS ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEK]

ORMOS GYÖRGY, MÁNYAI SÁNDOR és VÉGH ANTALNÉ

Országos Munka- és Üzemegészségügyi Intézet Biokémiai Osztály, Budapest

Bevezetés

A biológiai membránok kutatása az elmúlt évek során az érdeklődés homlokterébe került. A sejtmembrán szerepe nemcsak a külső tér felé való lehatárolásból áll. Mai felfogásunk szerint jelentős szerepet játszik az extra- és intracelluláris üzenetek közvetítésében, az immun sajátosságokban, a szövetek felépítésében és a legkülönbözőbb transzportfolyamatokban.

A membránkutatás módszerei között jelentős helyet foglal el a különböző jelölések és módosítások hatásának tanulmányozása és az ebből nyert információk felhasználása a szerkezeti felépítés és a funkciók megértéséhez. A módosítás természetesen igen tág fogalom, és a gyakorlatban meglehetősen bizonytalan élesen megkülönböztetni specifikus és aspecifikus, reverzibilis és irreverzibilis beavatkozásokat. Nincs éles határvonal a felszínen reagáló ún. vektoriális próbamolekulák és a permeáló reagensek között sem [122, 150]. Óvatosságra int, hogy az ilyen bizonytalanságok a kísérleti megfigyelések eltérő, vagy éppen ellentétes értelmezésére is alkalmat adhatnak.

Ennek a beszámolónak az anyagát a vörösvértest membránra korlátozzuk. Általánosabb kört ölel fel néhány, az elmúlt időszakban megjelent összefoglaló [23, 51, 149, 150]. Ugyanígy csak utalunk a kifejezetten biofizikai jellegű (fluoreszcencia, EPR, NMR) vizsgálati lehetőségekre [2, 5, 30].

Itt nem részletezett, sajátos membrán módosítást eredményeznek egyes antibiotikumok azáltal, hogy új permeációs csatornákat hoznak létre [72, 97, 129], továbbá a különböző lipidek hozzáadása pl. a membrándenzitás megváltoztatásával [64, 104]. A módosított vörösvértest membránon létrejövő hemolitikus jelenségek egy korábbi beszámoló anyagát képezték [89].

A membrán jelölési módszerek jó része a fehérjekémiából származik [136, 137, 148], elsődleges célja megfelelő markerek kiválasztása volt szolubilizált frakciók nyomon követésére [23, 65, 150]. Ehhez társult a másik alkalmazási lehetőség, a kémiailag módosított membrán működésének a tanulmányozása. Referátumunkban az utóbbi évek megfigyeléseinek és javasolt új módszereinek áttekintését kíséreljük meg. (A kézirat lezárása: 1976. márciusa.) A csoportspecifikus reagensek mellett indokoltnak látszott önállóan tárgyalni a kereszt-

kötés vizsgálatok eredményeit, végül az alkalmazási lehetőségeket néhány saját példán illusztráltuk.

Rövidítések:

ANS: 1-anilino-8-naftalinszulfonsav
 DAS: 4,4'-diacetamidostilbén-2,2'-diszulfonsav
 DIDS: 4,4'-diizotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav
 DNFB: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzol
 DNFFB: 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzol
 DTNB: 5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoesav)
 NAP-taurin: N-(4-azido-2-nitrofenil)-2-aminoetiil szulfonát
 NEM: N-etilmaleimid
 PCMB: p-klórmerkuribenzoesav
 PCMBs: p-klórmerkurifenilszulfonsav
 SITS: 4-acetamido-4'-izotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav
 TNBS: 2,4,6-trinitrobenzolszulfonsav

Aminoreagensek alkalmazása

Érthető az a kívánság, hogy a felhasznált reagens lehetőleg specifikusan, csak egy célba vett membrán komponenssel reagáljon. Indokolt az az igény is, hogy a próbamolekula csak a vizsgálni kívánt membrán felszínre hasson, azaz ne legyen képes a membránon átjutni, és ezáltal a támadás helye jobban körülhatárolhatóvá váljon. Ezekhez a szempontokhoz társul még az a kívánság is, hogy a kapcsolódás erős, lehetőleg kovalens legyen, különösen azokban az esetekben, amelyekben utólagos membrán szolubilizálással egybekapcsolva, pl. SDS-elektroforézissel követjük nyomon a fehérjefrakciókat.

Olyan vegyületeket, amelyek ezeket a maximális követelményeket kielégítenék, jelenleg nem ismerünk. Rendszeres kutatás folyik ezért egyre újabbak előállítására és kipróbálására. Minthogy az aminos csoportok jó része fiziológiás körülmények között protonnal asszociált lehet és pozitív töltéssel bír, a próbamolekulák gyakran anionos jellegűek.

A felületi csoportok jelölésére BRETSCHER [12] a ^{35}S -formil-metilszulfon-metilfoszfátot alkalmazta, hasonló céllal CABANTCHIK és mtsai [20] a piridoxálfoszfátot vizsgálták. A piridoxálfoszfát Schiff-bázist képez az aminos csoportokkal, reagál a különböző polipeptidekkel és glikoproteinekkal, bórhidrides redukcióval a kötés helye rögzíthető és egyidejűleg tríciummal is jelölhető. Mindkét anyag azonban csak igen óvatos kísérletekben alkalmazható felszíni reagensként, mert a plazmamembránon lassan penetrálnak.

Gyakran alkalmazzák a TNBS-t, amely a fehérjéken kívül foszfolipidekkel is készségesen reagál [10, 11]. Azt a feltételezést azonban, mely szerint a hemoglobint csak elhanyagolható mértékben jelöli (141), óvatosan kell kezelni. Általános probléma ugyanis az, hogy a fajlagos jelöltségben kifejezett eredmények a hemoglobinnak a membránhoz viszonyított óriási túlsúlya miatt

eltorzítják a valós helyzetet. Ha pl. a TNBS-sel végrehajtott reakció után anyagmérleg-szerűen értékeljük a jelölődést, összemérhető értékeket kapunk a két frakcióban [1].

WALLACH a kis molekulású reagensekkel nyert vizsgálati eredményeket úgy értékelte [150], hogy felszíni, vektoriális jelölésre való alkalmasságuk sohasem meggyőző. Az, hogy adott körülmények között a felület alatt milyen egyéb helyekkel képesek reagálni, a kérdéses csoportok elérhetőségétől, reaktivitásától és természetesen a reagens diffúziós sebességétől függ.

Nyilvánvaló, hogy a jelölt csoportok membránbeli elhelyezkedéséről csak alaposan ellenőrzött metodikák és összehasonlító vizsgálatok adhatnak értékelhető megállapítást. GORDESKY és mtsai [49] olyan, gondosan kidolgozott eljárást közöltek, amelyben elérhető, hogy a TNBS vektoriális próbaként viselkedjék, ill. emellett a reagens alkalmas foszfolipidek és fehérjék intramembrán átmeneti zónáinak felderítésére is.

A membrán módosítására számos anionos anyagot, — egy részük egyúttal fluoreszcens festék is, — próbáltak ki (ANS: 41, 42; diazotált jódszulfanilsav: 128; diaminostilbén: 78; izotiocianostilbén származékok: 17, 18, 155). Közös jellemzőjük, hogy a pozitív membránhelyekkel reagálva erős hatással vannak a vörösvértestek iontranszportjára is. PASSOW és ROTHSTEIN munkacsoportjai ezen vegyületek alkalmazásával tisztázták a membrán egyik fehérjekomponensének és az anionok kicserélődési diffúziójának kapcsolatát, amit a következőkben kísérünk meg röviden áttekinteni.

Kezdeti próbálkozások során SITS-szel a membrán külső felszínén levő amino- (és esetleg hisztidil-, valamint guanidin-) csoportokat kívánták jelölni. Nem volt azonban itt sem kizárható a hemoglobin jelölése [150], ami a vektoriális alkalmazhatóság ellen szólt. Másrészt a SITS erősen kötődött ugyan a membránfehérjékhez [75], azonban mint kiderült, ez a kapcsolat mégsem kovalens, ugyanis albumin jelenlétében végzett mosással a reagens java része eltávolítható volt. Csak egy kis, a kísérleti körülményektől függő része maradt rögzítve, ez feltehetően valóban kovalensen kötött [17]. Ezekkel a bizonytalanságokkal szemben a SITS azért különlegesen jelentős, mert a kation diffúzió befolyásolása nélkül specifikusan csak az aniontranszportot gátolta.

Előállítottak további származékokat is és sikerült olyanokra bukkanni, melyeknél a zavaró tulajdonságok elmaradtak. Így pl. a DIDS nem penetrál, a membránhoz irreverzibilisen kötődik és egyidejűleg már 10^{-6} M koncentrációban gátolja az aniontranszportot. Ép sejteken a kötődése egyetlen fehérjén következik be, a kb. 95 000 Dalton molekulású, ún. 3. frakción. A tripszines kezelés hatástalan erre a fehérjére, míg pronázzal vagy kimotripsinnel két részre hasítható: ezek közül a 65 000-es szegmens a DIDS -okozta aniontranszport gátlás helye, ép sejteken [19] és visszazárt ghostokon [21] egyaránt. Összhangban ezzel a megállapítással a pronázos emésztés önmagában is gátolja az aniontranszportot [113].

A DIDS specifikus kötődése lehetővé tette a sejtmembránon levő transzporthelyek számának becslését. Az I. táblázatban összegyűjtött adatok mellett összehasonlításul a szolubilizált fehérjék elemzési eredményeit is feltüntettük. Az egyes vizsgálati módok szolgáltatta értékek erősen eltérőek, ami különböző okokra vezethető vissza. Nem zárható ki a 3. fehérjében szubfrakciók létezése, amelyek DIDS-szel szembeni reaktivitása különböző lehet. Magyarázhatja az eltéréseket az is, ha a SITS és a DIDS molekulánként több, pl. három kötőhellyel reagál, ami fedésbe hozná az eredményeket (a DNFB monofunkcionális). Lehetséges azonban, hogy kísérleti hibák állnak az eltérések mögött [155], amelyek a nyomjelzett DIDS-szel vannak összefüggésben. A kutatások mindenesetre összefüggést teremtettek a 3. fehérjefrakció és az aniontranszport között. Jóllehet a fehérje kötőhelyei a külső felszín közelében helyezkednek el, a fehérje egyéb vizsgálatok tanulsága szerint átszeli a membránt [12, 103].

I. táblázat

A 3. fehérjekomponens mennyisége és specifikus jelöltsége vörösvértest membránban (db/sejt)

Kötődés	Reagens	3. fehérje	Hivatkozás
$40 \cdot 10^5$	^{125}I -DIDS		17
$3 \cdot 10^5$	^3H -DIDS	$9,4 \cdot 10^5$	18
		$11,6 \cdot 10^5$	140
$8 - 12 \cdot 10^5$	SITS hatása DNFB kötődésre		155
			149
$3 \cdot 10^5$	l-izotiociano-4-benzolszulfonsav		57

A DNFB az előbbi vegyülettípustól eltérően az aminocsoportok nemionos formájával reagál. Ennek megfelelően a dinitrofenilálási reakciónak a pH emelése kedvez. POENSGEN és PASSOW [115] megállapították, hogy a DNFB bejut a sejtbe és csak egy kis töredéke az, ami a membránt jelöli. A membránban a fehérjék mellett készségesen reagál a lipidekkel is, elsősorban foszfatidiletanolaminnal [50]. További jellemzője, hogy különböző funkcionális csoportokkal képes kölcsönhatásokba lépni, az aminocsoportok mellett SH-, imidazol- és fenolos hidroxilcsoportokkal is. Ezen okok miatt érthetően nem alkalmas specifikus jelölésre, transzportfolyamatok tanulmányozásával társítva azonban hasznosnak bizonyult.

A DNFB hatékony, irreverzibilis gátlója a karrier-közvetített cukortranszportnak a vörösvértest membránban. Sajátos módon szubsztrát jelenlétében a gátló hatás jelentékenyen módosul [38, 131]. Ép sejteken a külső térben levő 120 mM glukóz növelte a DNFB gátló hatását, míg intracellulárisan ellentétes befolyást gyakorolt. Ez arra látszik utalni, hogy bármilyen széles körű is a DNFB hatása a membránra, bizonyos szelektivitás észlelhető abban az érte-

lemben, hogy eltérő reaktivitást mutat a glukóz-karrier két konformációjával szemben, amelyek a külső, ill. a belső glukóz hatására alakulnak át egymásba. Ezekkel a megfigyelésekkel mutatnak kapcsolatot a differenciáljelölési technikával nyert eredmények is [37, 66]. A glukóz jelenlétében, ill. távollétében DNFB-vel reagáltatott izolált membránfehérjék SDS-elektroferogramjainak összehasonlítása szerint a glukóz jelenlétében megnövekedett kötődésért egyetlen, 180 000-es molekulasúlyú fehérjefrakció látszik felelősnek. A DNFB felhasználásával a cukortranszportban szerepet játszó funkcionális csoportok felderítésére is voltak törekvések [7], azonban a reagens nem-specifikus volta miatt ezek kevésbé értékelhetők.

Szulfhidril-reagensok

Az alkalmazási célkitűzéseket és az eredmények megbízhatóságát tekintve általában azok az általános szempontok érvényesek az SH-reagensok használatakor is, amelyekre az aminoreagensok kapcsán kitértünk. Mindenesetre a szulfhidril-reagensok alkalmazását némileg egyszerűsíti az, hogy a membránlipidek kiesnek a lehetséges célpontok közül.

Egy-egy reagens többnyire az SH-csoportok különböző populációjával képes kölcsönhatásba lépni, ami azzal a következménnyel járhat, hogy egyidejűleg különböző transzportfolyamatokat is befolyásol. Bizonyos specifikitást sikerült kimutatni a jódiacetátnál, ami óvatos eljárás során és ép sejteken csak egyetlen, 35 000-es molekulasúlyú fehérjét jelölt [25]. Ez a reagens ismert gátlószere a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáznak [31, 56], az intramembrán jelölése is feltehetően itt jön létre [23]. Miután az enzim a membrán citoplazma felé eső oldalán helyezkedik el, ez a megfigyelés egyúttal arra is figyelmeztet, hogy pusztán abból a tényből, hogy valamely próbamolekula specifikusan reagál, semmiképp sem következtethetünk annak vektoriális, azaz nem-penetráló jellegére.

A reagensok felszíni hatásának biztosítására a próbamolekulák méretének növelése látszik a legeredményesebbnek. Ily módon egyes maleimid származékok [29, 88] alkalmasak lehetnek erre a célra; polimerekhez kapcsolt SH-reaktív ágensek pedig már eddig is igen hasznos felvilágosításokkal szolgáltak, és alkalmazásuk további kiterjesztése várható. Ezt az elvet valósították meg dextránszármazékok és PCMB, vagy maleimid összekapcsolásával, és így nem-penetráló, reaktív makromolekulákat nyertek [4, 133, 150.] Ezek segítségével sikerült kimutatni a ouabain-érzékeny ATPáz és a hexóz-karrier működésében a felszíni SH-csoportok szerepét.

A vörösvértest membrán transzportfolyamatainak tanulmányozásában a szulfhidril-reagensok azokban az esetekben is kiemelkedő szerepet játszanak, amelyekben nem kizárólag felszíni hatásokat vizsgálunk. Így, túlmenően a

felszíni SH-csoportokon a glukóztranszportban a szulfhidril-csoportok szerepe jódiacetammal [7], NEM-mel [4], PCMBs-sel és klórmerodinnal [135, 156] egyaránt bizonyított. Hasonlóképp részt vesznek bizonyos SH-csoportok a víz [13] és az uridintranszportban [39], a kationok diffúziójában [74, 75, 101, 130], az ATPáz működésben és a membrán kationkötő képességében is [121, 144].

A kísérleti megfigyelések értelmezésénél szükségszerűen felvetődik az a kérdés, jogos-e a membránműködés, pl. a transzporttulajdonságok megváltozását a reagens specifikus kölcsönhatásával magyarázni, vagy lehet-e az egy járulékos, másodlagos károsodás következménye is? Apoláros spin-labellekkel nyert eredmények azt mutatják, hogy az SH-reagensek nem hoznak létre észrevehető elváltozásokat a membránmátrixban [117]. Ez a megfigyelési mód azonban, gyakorlatilag csak a lipídregiókra korlátozódik, amelyben különben is valószínűtlenek SH-reagensek hatására az elváltozások. Értékesebbek azok a megfigyelések, amelyeket az SH-reagensek a víz permeálásával kapcsolatban szolgáltatnak. A membrán SH-csoportok nagy részével reagáló NEM és jódiacetamid ugyanis nem befolyásolja az ozmotikus víztranszportot, ezért feltehetően nem befolyásolja az útvonal hidrofíl pórusainak állapotát sem. A DTNB ezzel szemben, bár reaktivitása az SH-csoportok jóval szűkebb körére terjed ki, gátolta a víztranszportot, ezt a hatást viszont BROWN és mtsai már egy specifikus, a 3. fehérjén létrejövő reakcióval hozzák összefüggésbe [13].

Vörösvértetek módosítása keresztkötésekkel

A két vagy több reaktív csoportot tartalmazó anyagok ugyanazokkal a membránhelyekkel lépnek kölcsönhatásba, amelyekkel a monofunkcionális analógjaik. Mégis indokoltnak látszik önállóan kezelni őket, mert az utóbbi évek kutatásaiban egyre növekszik a jelentőségük. A keresztkötéses vizsgálatok is izolált fehérjéken kezdődtek (szérumalbumin: 35, 142; inzulin: 58, 106; glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz: 33, 54; hemoglobin: 85), az erre épülő membranológiai felhasználásokban a szerkezet merevítésének a szerepét, különösen pedig a membránfehérjék egymáshoz viszonyított elhelyezkedését tisztázhatjuk ezzel a technikával. A fehérjék összekapcsolás utáni elektroforetikus viselkedése, egyes frakciók eltűnése és újabbak megjelenése ad alapot az ilyen vizsgálatokhoz.

Ahhoz, hogy a kívánt behatásokat minél kevesebb mellékjelenség torzítsa, igen lényeges az, hogy az eredeti membránbeli töltésviszonyok fennmaradjanak. Úgy látszik, ennek a követelménynek a glutaraldehid és a különböző bifunkcionális iminoészterek eleget tesznek [137] azzal a megszorítással, hogy az új pozitív csoportok elhelyezkedése és pK-értéke azért többé-kevésbé eltér a kiindulástól.

A keresztkötéses vizsgálatok értékelésénél figyelembe veendő, hogy a reagensek általában kevésbé specifikusak. A diiminoészterek főleg lizil- ϵ -amino-csoportok amiinálásával kovalens keresztkötéseket hoznak létre [58, 105], emellett azonban egyéb átmeneti terméket is szolgáltatnak [15, 16]. A vörösvértest membránban a különböző fehérjék, közöttük glikoproteinek mellett [62] lipidekkel is reagálnak [63]. Ép sejteket vizsgálva valamennyi diimino-észterrel megfigyelhető a hemoglobin keresztkötése is [55, 87, 152]. Ismeretes, hogy a keresztkötések következtében a sejtek hemolitikus hatásokkal szemben ellenállóvá válnak. Miután a reagens bejut a vörösvértestekbe és a hemoglobinnal is reakcióba lép, nem dönthető el, hogy a rezisztencia vajon a membránra gyakorolt hatásnak, a membrán belső felszínének és a hemoglobin összekapcsolásának, vagy a hemoglobin molekulasúly-növekedésének a következménye-e. Spin-label vizsgálatok azt mutatták, hogy a keresztkötések hatására a membrán belseje teljesen immobilissá válik [77], utalva a membránban létrejövő jelentős elváltozásokra, amelyek egyébként a továbbiakban tárgyalt szolubilizált fehérje-molekulasúlyokban is megmutatkoznak. Újabban elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a merevvé tett sejtek membránja hipotóniás körülmények között felhasadozik, és a keletkezett nyílások már lehetővé tennék a hemoglobin kilépését [49]. Ennek a megfigyelésnek az alapján a hemolízis elmaradásában a hemoglobin polimerizációjának lenne a legnagyobb szerepe.

Vegyes reakciók lépnek fel az iminoészterekhez hasonlóan a DNFFB és a glutáraldehid hatására is. A DNFFB szintén hemolízis-rezisztenciát idéz elő [6], keresztkötéseket létesít a membrán foszfolipidjei, elsősorban a foszfatidiletanolamin molekulák [90, 91], továbbá a foszfolipidek és a fehérjék között [92, 93]. Az egyes reakciók mértékét a kísérleti körülmények jelentősen befolyásolják. Kevesebb adattal rendelkezünk a glutáraldehidet illetően, úgy látszik, reagál a membránban a lipidekkel [47] és egyes fehérjékkel [40], kivéve a glikoproteineket [22], ami az iminoészterekhez képest eltérést jelent [62].

A keresztkötött sejteknek megváltoznak az áramlási [112] és ülepedési [61] tulajdonságai. Bifunkcionális iminoészterekkel kóros sejteken anti-sickling sajátságokat sikerült kimutatni *in vitro* [87, 153]. Azt, hogy ez a keresztkötés eredménye lenne, megkérdőjelezni látszik egy újabb beszámoló. A monofunkcionális acetimidát ugyanis, ami keresztkötéseket nem hoz létre, szintén rendelkezik ezzel a tulajdonsággal [28].

Újabban a diiminoészterek további származékait is előállították, nagyobb szelektivitás [146], hidrolízissal szembeni stabilitás [43], távoli helyek összekötése (143) és fluoreszcens csoport bevitele céljából (125). Az új reagensek egy másik csoportja diszulfidhidat tartalmaz. Ilyenek a 3,3'-ditiobisz-propionimidát észterek, amelyek reverzibilis keresztkötést hoznak létre, minthogy a diszulfidkötés enyhe redukcióval hasítható [119, 152].

Keresztkötéseket a membrán különböző helyei között egyéb módon is

létrehozhatunk. Oxidálószerrek, mint a káliumjodát, vagy különösen az o-fenantrolin Cu^{++} -komplex diszulfidhidat képesek kialakítani. Bár a reakció reverzibilis, az összekötött molekulák nyomonkövethetők a szolubilizált membrán-fehérjék között [139, 151].

A transzglutamináz enzimek aciltranszfer reakciót katalizálnak a fehérjék glutamilesoportjai és lizil- ϵ -aminocsoportok között, így szintén képesek intra- és intermolekuláris keresztkötésekre a membránban [36]. Az eljárás egyik lehetséges változatának tekintjük azt, amikor ezzel a reakcióval egy kívülről bejuttatott ament, ill. annak származékát kötjük kovalens jelölés céljából a fehérjékhez [86].

A vörösvértest membránban a fehérjék asszociációját és egymáshoz viszonyított elhelyezkedését igen nehéz közvetlenül tanulmányozni. A keresztkötő ágensek, legalábbis elvileg lehetőséget nyújtanak a natív membránban uralkodó helyzet rögzítésére, amit azután a detergenssel szolubilizált fehérjéken nyomonkövethetünk. Az derült ki, hogy keresztkötés után az 1. és 2. fehérjekomponensek (spektrin) egymással kapcsolódva alkotnak 400 000 és annál nagyobb molekulasúlyú származékokat. Meglehetősen biztonsággal volt kimutatható a 3., 5. és 7. fehérjekomponens di- és trimerizálódása is [139] és a $2 + 4,5$, valamint a spektrin + 4,1 fehérjék kapcsolódása [151]. A felsoroltakon kívül nagyon sok további keresztkötött származék is jelentkezett ugyan, de lényegesen kisebb intenzitással.

Figyelembe véve a lehetséges kombinációk óriási számát, az aránylag kevés kitüntetett kapcsolódásból arra kell következtetnünk, hogy a membrán polipeptidjei nem random módon, hanem egymáshoz képest specifikus elrendezésben helyezkednek el. Különösen érvényes ez azokra a fehérjékre, amelyek dimerizálódásra hajlamosak, feltehető, hogy ezek a natív membránban asszociált oligomerekként léteznek.

Ép sejteken a hemoglobin is részt vehet a polimerizált származékokban, amennyiben ezt térbeli okok lehetővé teszik. WANG és RICHARDS [152] azt találták, hogy valamennyi membránfehérje, kivéve az 5. fehérjét, kapcsolódik a hemoglobinnal, tehát a citoplazma oldalról elérhető.

További kutatási lehetőséget nyújtanak azok a vizsgálatok, amelyekben a keresztkötő reagens funkcionális csoportjai különböző maximális távolságra vannak. A glutáraldehid alkalmatlan ilyen célra, mivel reaktív formája aldolkondenzációval keletkező, különböző szénlánc-hosszúságú polimerekből áll [98]. Megfelelőek azonban az iminoészterek. A funkcionális csoportok maximális távolsága a malonimidátban 4,9; a szukcinimidátban 6,1; az adipimidátban 8,6 és a szuberimidátban 11 Å. Megfigyelték, hogy a glikoproteinek keresztkötését nem befolyásolta ennek a távolságnak a változtatása, azonban az is kiderült, hogy a nagyobb távolság áthidalására képes adipimidát és szuberimidát hatására glikolipidek és fehérjék között is kapcsolódás lépett fel [63]. Egyelőre ismeretlen, hogy melyik polipeptid vett ebben részt.

Hasonló elképzelés alapján kísérelték megbecsülni a foszfolipidek egymás közötti távolságát DNFFB és származékainak segítségével, melyekben a funkcionális csoportok 5–18 Å távolságban voltak. Egyes kísérletek szerint a reagensnek mintegy 9 Å távolságot kell áthidalnia két foszfolipid molekula (foszfatidiletanolamin és foszfatidilszerin) között [91], míg más mérések alapján [92] erre az 5 Å távolságot képviselő DNFFB is hasonlóan képes.

Az eddigiekkel szemben alig kihasználtak a keresztkötéses vizsgálatok a membrántranszport területén. Feltehető, hogy segítségükkel adott esetben el lehet dönteni egy transzport mobilis karrierjének létezését. Egyelőre annyit állapítottak meg, hogy az aldehidekkel merevített membránon nem változik meg az ozmotikus víztranszport [134] és néhány nem-elektrolit diffúziója [69].

Vegyes eljárások

Az előbbieken idézett csoportspecifikus reagenseken kívül még sok módszert próbáltak ki a vörösvértest membrán jelölésére és tulajdonságainak módosítására. A publikációk óriási száma miatt nem célunk ezen a helyen részletes ismertetést adni, a lehetőségeket néhány példán kíséreljük meg szemléltetni.

A lektinek a membránfelszín sajátosságait megváltoztatva agglutinációt idéznek elő [110, 132, 147]. A kötőhelyek száma mintegy 10^5 [3], ezeknek azonban már néhány százalékban való lekötése kiváltja az agglutinációt [123]. A lektinek felszíni elhelyezkedése az intramembrán partikulák elhelyezkedését tükrözi [145], és a membránkomponensek átrendeződését vonja maga után [14], ugyanakkor a szerkezet keresztkötésekkel való merevítése nem akadályozza meg az agglutinációt [94]. Egyes adatok arra mutatnak, hogy a konkanavalin-A receptorait a membrán glikoproteinek felszíni D-mannozil csoportjai képezik [114]. A konkanavalin-A kötődése igen erős, ennek alapján Ho és GIUTTORI (57) feltételezték, azt is képes megakadályozni, hogy a receptorfehérje elmozdulhasson a membránban. Abból, hogy a foszfáttranszportban feltételezésük szerint részt vevő glikoprotein rögzítése konkanavalin-A-val nem befolyásolta a transzportsebességet, arra következtettek, hogy a folyamat a glikoprotein rotációja nélkül megy végbe.

Oxidáció hatására a vörösvértest membrán jelentősen módosul, a korábban említett diszulfidhidak mellett egyéb elváltozások is fellépnek. A perjodát fő támadáspontja a felszíni szíalsav [8], hatására különböző sejtek ionpermeabilitása is megváltozik [9, 70, 71]. Oxidálhatunk enzimatisz uton is, ilyen a laktoperoxidázos, a galaktóoxidázos és a mieloperoxidázos [73] módszer. A reagáló membránhelyek a kivált elemi jód megkötésén keresztül, bórhidrides redukcióval, vagy jelzett metionin hidrazin származékkal [59] nyomon követhetők.

Ilyen kezelések hatására főleg a glikoproteinek jelölődnek [24, 25], de izolált membránon a galaktóoxidázzal még további membránfehérjék is [23]. Ép sejtek laktoperoxidázos jelölése a külső oldalon a glikoproteinek mellett csak a 3. fehérjét érinti, míg a belső oldalon valamennyi fehérjére kiterjed [102, 103, 116]. Ez az eredmény egyértelműen bizonyítja a fehérjék aszimmetrikus elrendeződését, másrészt azt, hogy a 3. fehérje átnyúlik a membránon. A bevitt jód kovalensen rögzítődik, és a keringésbe visszajuttatott sejtekből sem távozik el [154].

A fehérjebontó enzimek alkalmazására már néhány eset során kitértünk. Az enzimatis memránmódosítás egy további példája a szialsav neuramindázos eltávolítása a külső felszínről, ami a felületi csoportok reaktivitását [24] és a sejtek élettartamát [46, 60] egyaránt befolyásolja. A téma részletes áttekintése és összefoglalása, amelyre itt nem térünk ki, önálló feldolgozást igényel.

További reagensek kipróbálása specifikus transzporthelyek felderítését célozta. CASS és mtsai szerint a nitrobenziltioinozin specifikusan kötődik a membrán nukleozidtranszport helyeihez [26, 27]. Az N-acetimidazol valószínűleg a ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-függő ATPáz ATP-kötőhelyére specifikus [95, 96]. Kationos próbamolekulák segítségével a hidrofíl permeálási csatornák vizsgálatát célozták [99].

Érdekes membránjelölési módszert dolgoztak ki STAROS és mtsai [138]. Ennek a fotokémiai eljárásnak az a lényege, hogy a NEP-aurin megvilágítás hatására reaktív nitrénszármazékká alakul, ami kovalens jelölést hoz létre valamennyi detektálható fehérjén.

A membránmódosítás alkalmazási lehetőségei a vörösvértestek aniontranszportjában

Az anionok kétféle módon juthatnak át a vörösvértest membránon. A konduktív diffúzió során az elektroneutralitást megegyező irányú kationmozgás tartja fenn, ennél azonban sokkal gyorsabb az anionok egy másfajta diffúzója, ami a membránon át történő gyors $\text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{HCO}_3^-$ kicserélődést tesz lehetővé, és ezért különös fiziológiai jelentőséggel bír. Ebben a kicserélődési transzportban aminoreagensekkel a 95 000-es molekulasúlyú 3. frakció fehérjekomponens szerepe tisztázható volt.

A kicserélődési diffúzió mechanizmusára két alternatív elképzelés létezik, facilitált diffúzió hidrofíl csatornákon keresztül, ill. karriermediált transzport, amely szerint a sebességmeghatározó tényező az anion-karrierkomplex mozgékonyága a membránban. Az idevágó vizsgálatok áttekintése egy korábbi összefoglaló anyagát képezte [108]. Az anionok kicserélődésével kapcsolatban jelenleg a következő kérdések állnak az érdeklődés középpontjában:

- a) közös mechanizmus érvényes-e az egy- és a kétértékű anionokra;
- b) helytálló-e a mobilis karrier feltételezése — amennyiben igen,
- c) átszeli-e az egész membránt úgy, mint azt a 3. frakciófőhárjánél feltételezzük?

Az aniontranszportnak specifikus reagensekkel való gátolhatóságára az aminoreagensek tárgyalásakor már kitértünk. Sok más anyag is gátló hatású, így az aromás nitroszármazékok [52, 107], az ANS [43, 44], helyi érzéstelenítők [53] és szulfonamid származékok [32, 100]. A hatásukra bekövetkező transzportgátlásokat általában nehéz értelmezni. Nem zárható ki, hogy az anionos anyagoknak a pozitív membránhelyekhez való kötődése mellett egyéb kölcsönhatások is szerepet játszanak.

A transzport mechanizmusával kapcsolatban érdekes felvilágosítást nyújtott a florizin, ami egyúttal számos nem-elektrolit transzportját is gátolja [80, 81, 111]. PASSOW és munkatársai kimutatták, hogy a florizin gyorsította a klorid kondukciós diffúzióját [67], és meglepő módon, aszimmetrikusan csak a membrán külső felszíne felől gátolta a klorid és a szulfát kicserélődési diffúzióját [84, 124]. A jelenség magyarázatául szolgáló membrán-féloldalasságot a felületi reagensekkel [18, 68] és a külső membránfelszín pronázos emésztésével [19, 113] nyert eredmények is alátámasztották. A pronázos kezelés után megváltozik a transzport mechanizmusa, lényegesen lassúbb lesz, és csökken a hőmérsékletfüggése [126, 127].

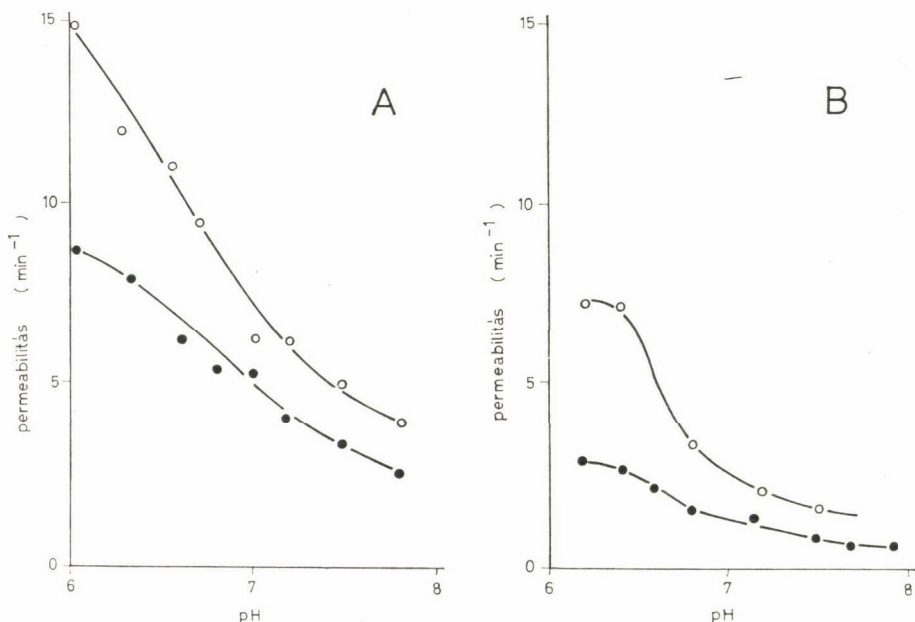
Újabb megfigyelések azzal az eredménnyel szolgáltak, hogy a florizin nem befolyásolja a 3. fehérje dinitrofenilálhatóságát DNFB-vel [155], az aniontranszport egyik hatékony gátlójával. Ennek alapján is arra kell gondolnunk, hogy a membránban a 3. fehérje anionkötő helyei mellett még további funkcionális egységek is szerepelnek a vörösvértestek aniontranszportjában.

Saját kísérleteink célja az volt, hogy a kétértékű anionok transzport jellegzetességeinek összehasonlítása révén próbáljunk meg választ adni a felvetett kérdések közül néhányra. A halogenidekkel szemben a szulfát és a többi kétértékű anion diffúziója sokkal lassúbb, percek, órák alatt megy végbe, tehát kényelmesen nyomon követhető. A szulfát kicserélődési diffúzióját általában egyensúlyi körülmények között vizsgáltuk. A másik anion, az összehasonlításhoz szolgáló kromát, a sejtekbe jutva Cr(III)-má redukálódott formában a hemoglobinhoz kötődik, ezért ennek csak nettó, befelé irányuló, nem-egyensúlyi fluxusa mérhető. Koncentrációját azonban olyan kicsire választottuk — általában 0,05 mM —, hogy ez a többi ion eloszlását ne befolyásolja. Az alkalmazott módszerek a korábban leírtak [109] voltak.

Kiindulási megfigyelésünk szerint a kromát átjutása a vörösvértest membránon bizonyos hasonlóságot mutat a szulfáttranszportéhoz, pl. a jellegzetes pH-függés tekintetében (1. ábra). Ezzel szemben a kromátdiffúzió aktiválási energiája csak mintegy harmada a szulfáténak, 10 kcal/mól. Arra követ-

keztettünk, hogy a két anion transzportjának mechanizmusa legalábbis részben eltérő, és érdemes az eltérések okait firtatni.

Lényeges azt tudnunk, milyen körülmények között alkalmas a kromát anion transzport kinetikai vizsgálatokhoz. A 2. ábra mutatja, hogy a kromát eltávozása a külső térből csak kis koncentrációban, 0,1 mM alatt független a



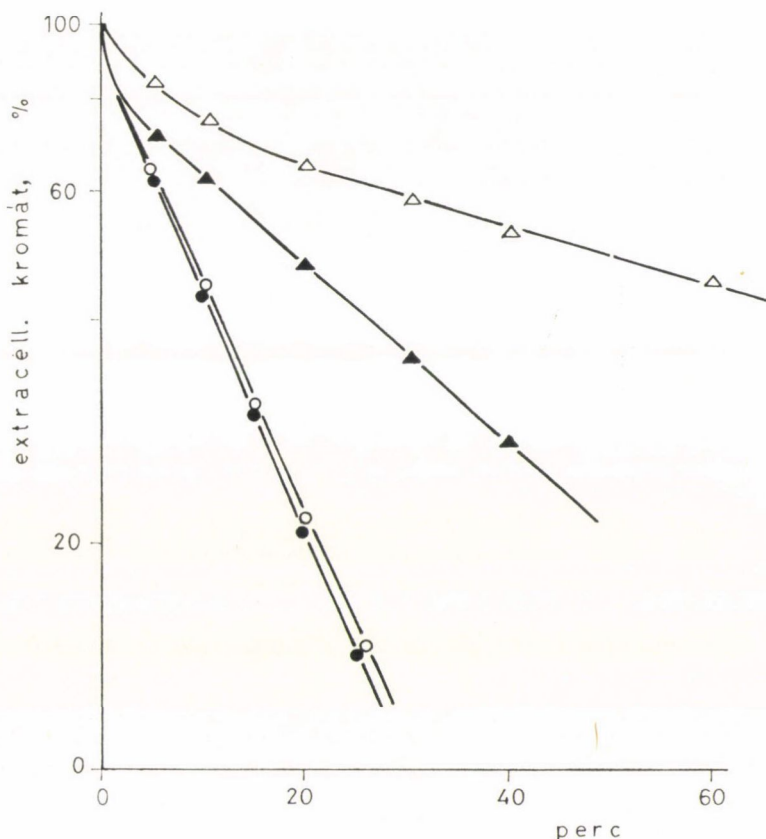
I. ábra. A kloridkoncentráció és a pH hatása a kromát diffúziójára vörösvértestekbe. ●: 150 mM NaCl; ○: 65 mM NaCl, 185 mM szacharóz A: 0,1 mM kiindulási CrO_4^{2-} , 20°, B: 1 mM CrO_4^{2-} , 30°

kiindulási koncentrációtól, ekkor egy gyors kezdeti szakasz után egyetlen sebességi állandóval jellemezhető. Nagyobb koncentrációban a relatív felvételi sebesség, ill. a sebességi állandó jelentősen csökken, bár a jellegzetes pH-függés ilyenkor is megmarad (1. ábra).

A DNFB-ről ismeretes, hogy a szulfátranszportot gátolja [115], mi azt vizsgáltuk, hogyan hat a kromátfelvételre. Mivel lehetséges, hogy a reagens egy része a kezelés alatt dinitrobenzollá alakul, ez pedig szintén befolyásolja, méghozzá reverzibilisen az aniontranszportot [107], a kromátfelvétel mérése előtt ismételtelen mostuk a kezelt sejteket. A 3. ábrán bemutatott eredmények szerint DNFB-vel a felvételi sebesség erőteljes gátlása érhető el, de teljesen nem szüntethető meg. Ez a megfigyelés, valamint a maximális hatás eléréséhez szükséges, mintegy 8 μmol DNFB/ml sejt érték teljes egyezést mutat a szulfátra közlött [115], és a két ion diffúziós útvonalának közös szakaszával lehet összefüggésben.

A DNFB a membránfehérjéknek legalább három különböző populációját képes dinitrofenilálni [155], továbbá még aminolipideket is [50], ezért a két transzportra gyakorolt egyező hatásából nem következik, hogy a gátlás támadáspontja is szükségképp azonos.

A SITS az aniontranszportot specifikusan gátolja, és a membránfehérjékhez is szelektívebben kötődik, mint a DNFB. A kromát felvételét a DNFB-

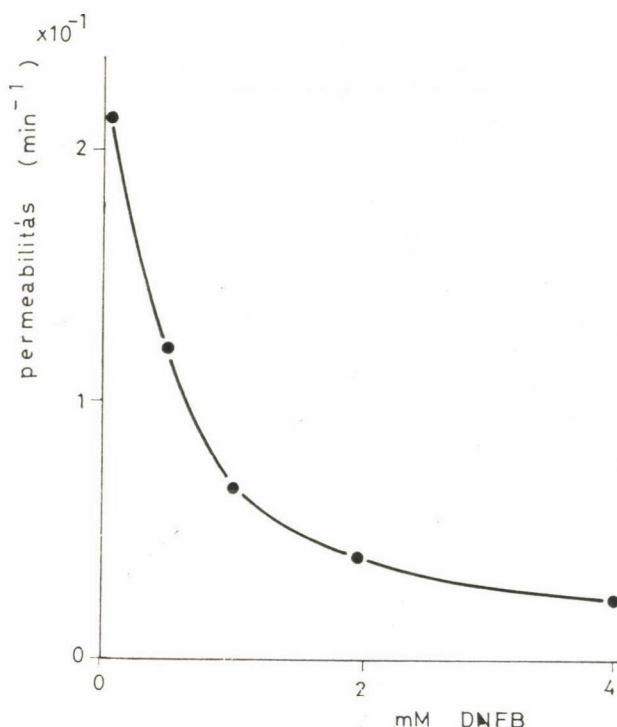


2. ábra. A kromát vörösvértestekbe jutása a közegből különböző kezdeti koncentrációk mellett. Hőmérséklet 37°; pH 7,4; Hematokrit 33%; Médium 150 mM NaCl. Kezdeti kromátkoncentrációk (100%) = ●: 0,03 mM; ○: 0,10 mM; ▲: 0,30 mM; △: 1,0 mM

nél kb. tízszer kisebb koncentrációban gátolja (4. ábra). A gátlást nem lehetett 90% fölé emelni még nagy reagens felesleggel sem. A kísérletek alkalmával, kihasználva a SITS erős kötődését, a kezelés és a transzportmérés között a reagens feleslegét mosással eltávolítottuk, nehogy esetleg zavarja a redukcióna érzékeny kromátot. A kinetikai görbékből megfigyelhető, hogy a SITS a kromát kezdeti, gyors felvételét is csökkenti, sőt nagyobb koncentrációban

teljesen megszünteti. Eszerint a diffúziónál gyorsabb kezdeti jelenségben felszíni membránhelyek, esetleg éppen az aniontranszport helyei vesznek részt.

A kromátfelvétel sebességének pH-függéséből, valamint DNFB-val és SITS-szel való gátlhatóságából, különösen pedig abból, hogy a hatások a szulfáttranszportnál észleltekkal egyező mértékűek, arra következtetünk, hogy



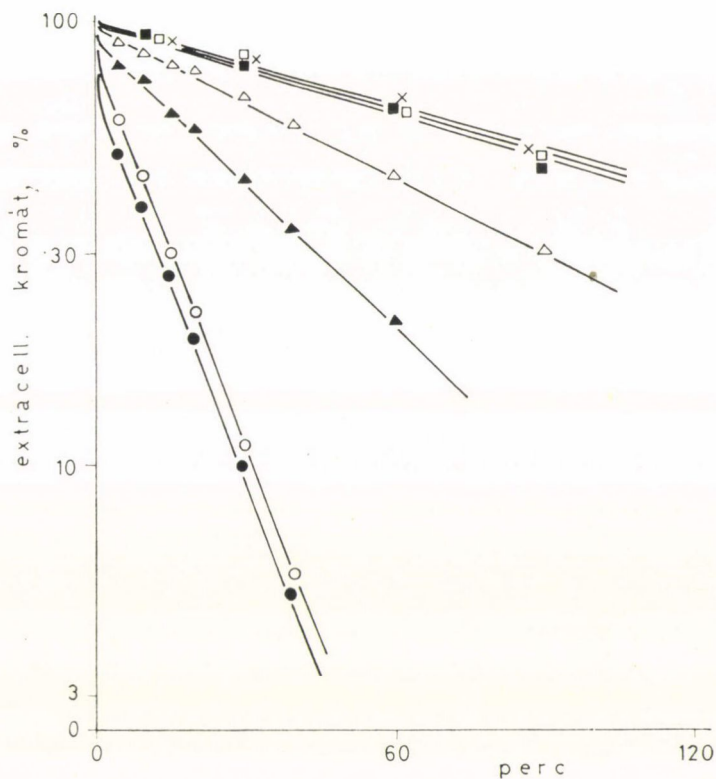
3. ábra. DNFB hatása vörösvértestek kromátfelvételére. Kezelés: pH 7,50; Hematokrit 50%; Hőmérséklet 37°; Idő 90 perc. Kromátfelvétel: kezelt sejtek kétszeres mosása után, 37°, pH 7,50. Médiumban: 60 mM NaCl, 185 mM szacharóz. Kezdeti kromátkoncentráció: 0,10 mM

a kromát diffúziójában is szerepet játszanak a 3. fehérjekomponens specifikus anionkötő helyei. A mérések egyúttal azt is megmutatták, hogy a kromátfelvétel mérése kis koncentráció esetén, 0,1 mM alatt értékelhető transzportkinetikai eredményeket ad.

Az, hogy a kromátfelvétel teljes gátlását egyik reagenssel sem tudtuk elérni, egyezik a más anionoknál tapasztaltakkal. Hasonló ugyanis a helyzet a szulfáttranszport gátlásakor DIDS-szel [18] vagy SITS-szel [74] és a DAS-szal gátolt kloridtranszportnál is [68]. Valószínű, hogy a maximális gátlás után fennmaradó ionfluxus nagyjából a konduktációs útvonalnak felel meg. Miután ez kromátnál is a teljes transzportnak legfeljebb csak a tized részét teszi ki,

jogosnak látszik feltenni, hogy minden 10%-osnál nagyobb gátló hatás a fő diffúziós útvonal befolyásolását tükrözi.

Kísérleti körülményeink között a kromát százalékban kifejezett felvétele 0,1 mM koncentráció fölött nagyjából a koncentrációval arányosan lassult le, azaz a bejutott mennyiség sem növekedett. Ebből azonban nem következett



4. ábra. A kromát vörösvértestekbe jutásának gátlása SITS-szel. Kezelés: adott SITS koncentráció mellett 60 perc; 0 °C pH 7,4; 37°; Hematokrit 40%. Kromátfelvétel: kezelt sejtek 0° C-os mosása után; pH 7,4; 37°; Hematokrit 32%. Kezdeti kromátkoncentráció (100%) = 0,056 mM. SITS koncentrációk: ●: kontroll; ○: 0,03 mM; △: 0,05 mM; ▲: 0,07 mM; ■: 0,5 mM; □: 1,0 mM; ×: 1,5 mM

hetünk az aniontranszport specifikus helyeinek telítésére, mert az minden más anion esetében csak igen nagy koncentrációnál, 150–300 mM-nál következik be, de azért sem, mert a kromát 1 mM koncentrációig sem a szulfát, sem a foszfát transzportjára nem volt észrevehető hatással. Inkább arra kell gondolkodnunk, hogy a kritikus koncentráció felett a kromát a membrán olyan károsodását idézi elő, ami saját diffúziójának lassulásával is jár. Kísérleteinknél a kromát koncentráció ez alatt a toxikus szint alatt tartottuk. Nem zárható

természetesen ki, hogy esetleg más szempontból ennek a mennyiségnek a toxicitása sem elhanyagolható.

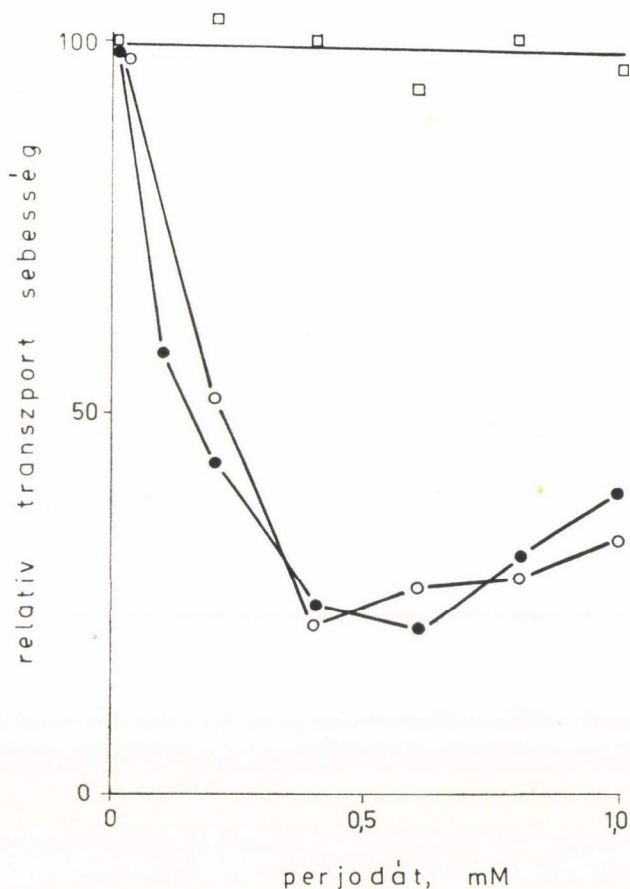
Jogosnak látszott feltenni, hogy a kromát a membránt elsősorban oxidáció révén befolyásolja. Ha ez igaz, az is várható, hogy különböző oxidálószeres befolyásolják a kromát diffúzióját. Ezzel a feltételezéssel összhangban a perjodát erőteljesen fékezte a kromátfelvételt. Valamivel enyhébb gátlást okozott a bromát, míg ferricianiddal nem lehetett a sebességet észrevehetően befolyásolni. Tudjuk, hogy ez utóbbi anion számára a vörösvértest membrán gyakorlatilag átjárhatatlan.

BLUMENFELD és mtsai [8] azt állapították meg, hogy a perjodátos oxidáció fő támadáspontja a membránfelszín szialoglikoproteinje, ezért annak ellenőrzésére, hogy a kromátfelvétel gátlása ezzel van-e összefüggésben, a perjodát hatását neuraminidázos emésztés után is vizsgáltuk. Az 5. ábra azt mutatja, hogy a szialsav eltávolítása nem változtatja meg a perjodát hatását, mindkét esetben létrejön a maximális 75%-os gátlás 0,4 mM perjodátkoncentráció mellett. A koncentráció további növelésekor megfigyeltük, a gátlás kismértékű csökkenését is, amit egyelőre nem tudunk értelmezni. A perjodát kizárólag a kromátfelvételre hatott, a szulfáttranszportot ebben a koncentrációban nem befolyásolta. A szialsav eltávolítása önmagában sem a szulfát-, sem a kromáttranszportot nem befolyásolta.

Ezeknek a megfigyeléseknek az alapján valószínűnek látszott, hogy a kromátkoncentráció növelésekor is oxidációs jelenségek váltják ki a sebességi állandó csökkenését (2. ábra), a kromát valamilyen membránhelyek oxidálásával saját felvételének gátlását idézi elő. Ezt az elképzelést látszik alátámasztani egy másik megfigyelés is. Az extracelluláris térben nyomon követhető a ferricianid elredukálódása. Ennek a glikolízissel kapcsolatos redukciónak az értelmezésére feltételezett a membránon át egy egyelőre ismeretlen mechanizmussal végbemenő elektrontranszport. Ha a kromát képes a membránban redoxhatásokat kifejteni, úgy gondoltuk, annak tükröződnie kell az elektrontranszportban, következésképp a külső ferricianid redukciójában is. Valóban, a kromát már 0,01—0,10 mM koncentrációban gátolja a ferricianid redukcióját (6. ábra). A koncentráció viszonyok olyanok ebben az esetben, hogy kizárható a redukció elmaradásának okai közül a kromát elektronokért való versengése.

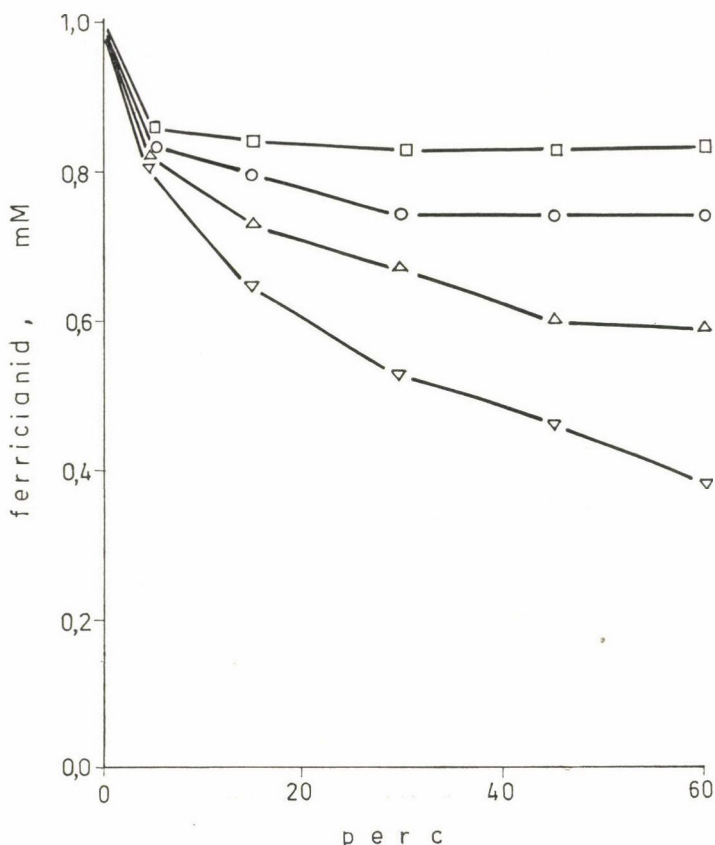
Az, hogy a perjodát kizárólag a kromátdiffúzióra hatott, a szulfáttranszport érintetlenül hagyása mellett, egyúttal megmutatta, hogy a két anion transzportmechanizmusa részleteiben eltér, annak ellenére, hogy a membrán specifikus pozitív helyei mindkettőt regulálják.

A PCMB és a PCMBs hatástalanok a szulfáttranszportra [74, 118], úgy látszik, hogy ebben a folyamatban a membrán SH-csoportjai nem vesznek részt. A kromátfelvétel oxidációra való érzékenysége mégis felvetette a gondolatot, hátha ennek az anionnak különleges transzportsajátságai mögött SH-csoportok részvétele áll. A 7. ábrán a kromát diffúziójának alakulását mutatjuk



5. ábra. Perjodát hatása szulfát és kromát diffúziójára emberi vörösvértesteken. Perjodátos kezelés: 30 min.; 37°; Hematokrit 40%. Transzportmérés: 37°; pH 7,4; Médium: 135 mM NaCl, 10 mM Na-foszfát, 5 mM Na-szulfát. □: szulfát egyensúlyi kicserélődés; ●, ○: kromátfelvétel (0,048 mM kiindulási koncentráció) kontroll és neuraminidázal kezelt ($93 \pm 5\%$ szial-sav eltávolítás) sejteken

be néhány SH-reagenssel való különböző idejű expozíció után. A PCMBS, a jódiacetát és a jódiacetamid gátolták, a DTNB nem befolyásolta a felvétel sebességét. A gátlás teljes kifejlődése jódiacetamid esetében a leggyorsabb, 15 perc után már megközelítette a maximális értéket. A gátló reagens koncentrációjának növelésével (8. ábra) 75–80%-os gátlást értünk el, ami valamivel kisebb az aminoreagenssekkkel észlelnél, de pontosan egyezik a perjodátnál tapasztaltal. Ezt a gátlást olyan kísérletekben sem tudtuk tovább fokozni, amikor a sejteket először maximális gátlást okozó perjodátos kezelésnek, utána PCMBS hatásának tettük ki (9. ábra). Mindebből úgy látszik, hogy a kromát diffúzóójában szulfhidrilcsoportok, ill. ezeknek valamilyen szűkebb populációja vesz részt. Ez utóbbi lehetőséget az veti fel, hogy a DTNB, ami specifikusan az

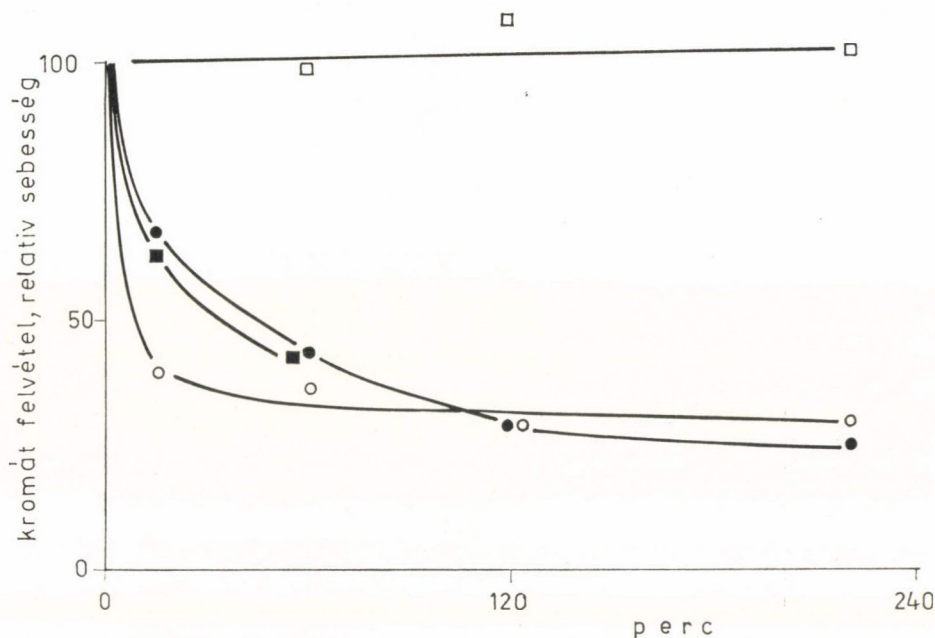


6. ábra. Extracelluláris ferricianid vörösvértestek okozta redukciójának gátlása kromáttal. Médium: 150 mM NaCl; Hematokrit: 25%; Hőmérséklet 37°; pH 7,4. Kromátkonzentrációk: ▽: 0; △: 0,01 mM; ○: 0,03 mM; □: 0,10 mM

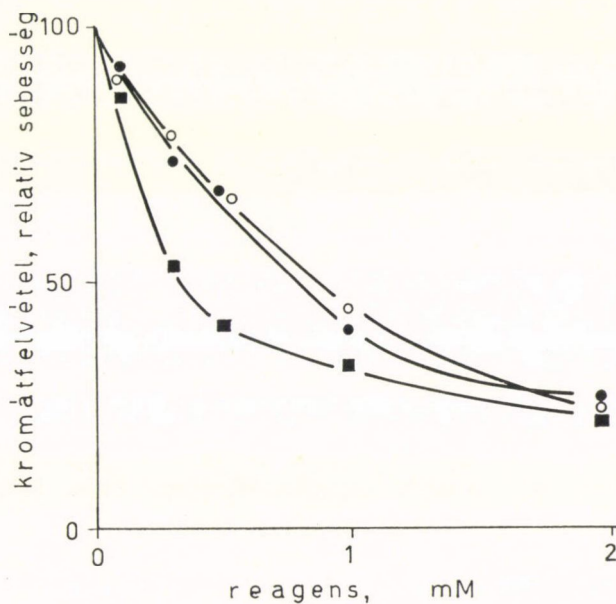
ozmotikus víztranszport SH-csoportjaira hat [13], nem gátolta a kromát felvételét.

A perjodátos oxidációval és az SH-reagensekkel nyert eredményeink egybeesése igen valószínűvé teszi azt, hogy a kromátfelvétel gátlása mindkét kísérlet típusban azonos membránhelyek módosításával valósul meg.

A kromátranszportban szereplő szulfhidril csoportok jellegére némi támpontul szolgálhat az az irodalmi adat, mely szerint a jódacetát a belső felszínhez asszociált glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázra specifikus [25, 32]. A felvétel jódacetáttal való gátlhatósága azt a vonzó gondolatot ébreszti, hogy ezek a helyek lehetnek felelősek a SH-érzékenységet, és a kromát redukciója, ami a hemoglobinhoz kötődését megelőzi, itt következhet be. Végső bizonyítékul azonban csak több, különböző kutatási eljárás egyező eredményei fogadhatók el, ezért a transzportvizsgálatokból levont következtetéseket egyúttal további vizsgálatok kiindulópontjának kell tekintenünk.

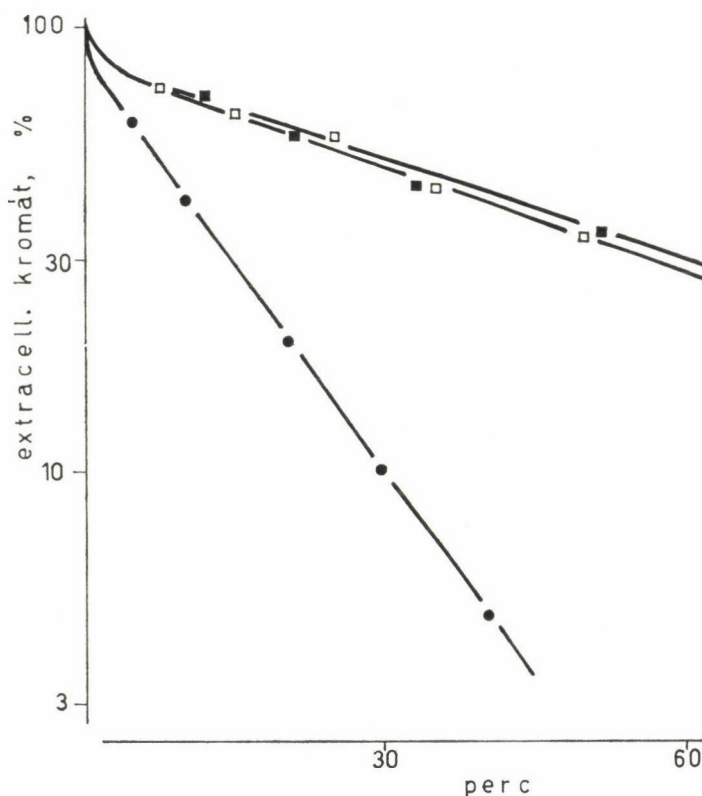


7. ábra. Kromátfelvétel sebessége szulfhidril reagensek jelenlétében. Médium: 130 mM KCl + + 20 mM foszfát (pH 7,4); hematokrit: kezelés alatt 40%; transzportméréskor 32%. Hőmérséklet: 37°. Kezdeti kromátkoncentráció: 0,057 mM. Reagenskoncentráció: 1 mM. ●: jódatet; ○: jódatamid; ■: PCMBs; □: DTNB



8. ábra. Kromátfelvétel gátlása szulfhidril reagensek különböző koncentrációival. PCMBs kísérleti médiumban: 130 mM KCl + 20 mM foszfát (pH 7,4) + 33 mM szacharóz, további kísérleti körülményeket és jelöléseket l. a 7. ábrán

A kromát diffúziójának mérése metodikai szempontból egyszerűbb a szulfáténál. Erdemleges előnyt jelenthet ez akkor, ha sorozatvizsgálatokat kell végezni. A kromát ilyen alkalmazására az ad alapot, hogy mint láttuk, felvételét éppúgy, mint a szulfáttranszportot, megszabja az anionokra specifikus pozitív membránhelyek állapota. Minthogy a kromát más membrán komponen-

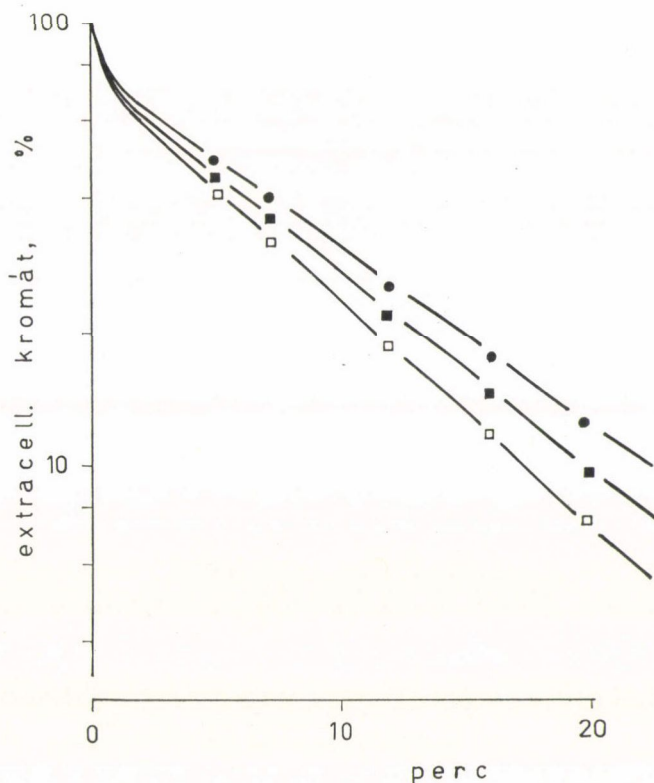


9. ábra. Perjodát és PCMBs együttes hatása a kromátfelvételre. 37°; pH 7,4. Hematokrit: 32%. Kezdeti kromátkoncentráció (100%) = 0,025 mM. Kezelési idők: perjodát 60 min; PCMBs 10 min. ●: kontroll; □: 0,4 mM perjodát, kezelés után sejtek mosva; ■: 0,4 mM perjodát, kezelés után sejtek mosva, majd 1 mM PCMBs-sel kezelve

seken keresztül is befolyásolható, a transzportjára hatásos anyagokkal ezután a szulfáttranszportot vizsgálva megkísérélhető a támadáspont pontosabb körülhatárolása.

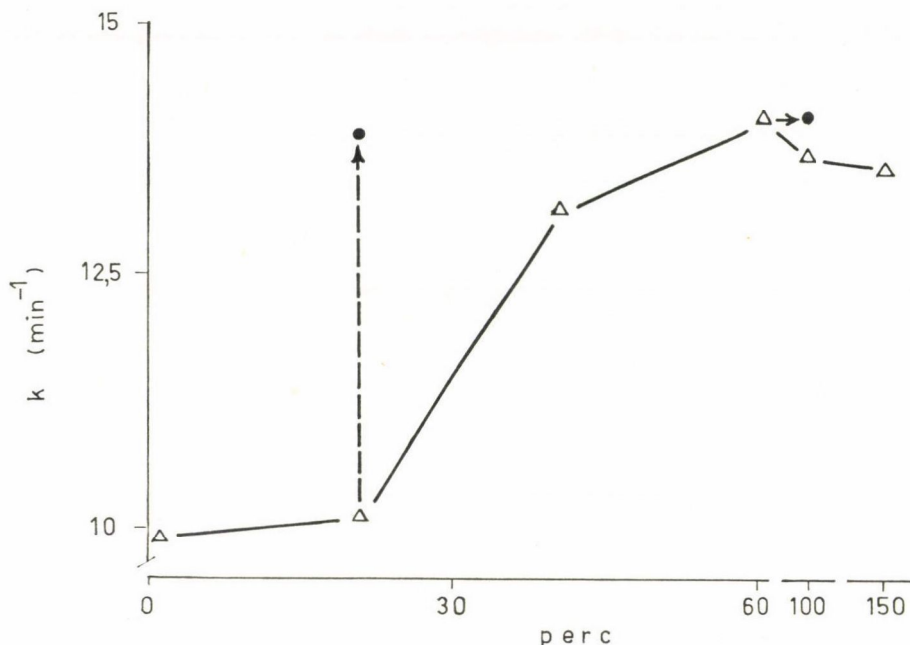
Sorozatvizsgálatokat végeztünk toxikus, az iparban gyakran használatos oldószerekkel. Koncentrációjukat általában 10–100 $\mu\text{mol/ml}$ sejt érték között változtattuk, kivéve ott, ahol a nagyobb értékek hemolízist eredményeztek. Azt találtuk, hogy a kromátfelvételt nem befolyásolják az alifás alkoholok (n-oktanolig), a ciklohexanol, az 1,2-propilén-glikol, továbbá a klórozott szén-

hidrogének (kloroform, széntetraklorid, triklóretilén). Hatástalanok voltak a benzolhomológok, a dioxán, tetrahidrofurán, tetrahidrotiofén és a különböző éterek is (dietil és diizopropiléter). A vizsgált anyagok közül az egyetlen, ami hatott a kromátfelvétel sebességére, mégpedig szignifikánsan gyorsította, a szén-szulfid volt (10. ábra). A vörösvértestek mosásával a szénkéreg hatását



10. ábra. Széndiszulfid hatás a kromátfelvétel sebességére vörösvértesteken. pH 7,4. Hematokrit 30%. Hőmérséklet 37°. Kiindulási kromátkoncentráció (100%) = 0,05 mM; CS₂ kezelés ideje: 60 min; ●: kontroll; ■: 32 μM CS₂/ml; □: 64 μM CS₂/ml

nem lehetett megszüntetni, még akkor sem, ha a sejteket az inkubálás kezdete után igen rövid idővel, még a hatás kifejlődése előtt mostuk (11. ábra). Ez a megfigyelés mindenképp arra utalt, hogy a jelenség fellépéséhez szükséges idő nem ahhoz kell, hogy a széndiszulfid bejusson a membránba, hanem arról lehet szó, hogy a membrán belsejében a hatás helyéhez történő diffúzió, vagy éppen a kiváltott effektus az, ami időigényes. A kölcsönhatás jellegére nézve valószínűtlennek tűnik, hogy a membránmátrixszal való aspecifikus kölcsönhatás, az apoláros részbe való beoldódás állna a jelenség mögött, hiszen a legkülönbözőbb lipofilitású oldószerek hatástalannak mutatkoztak.



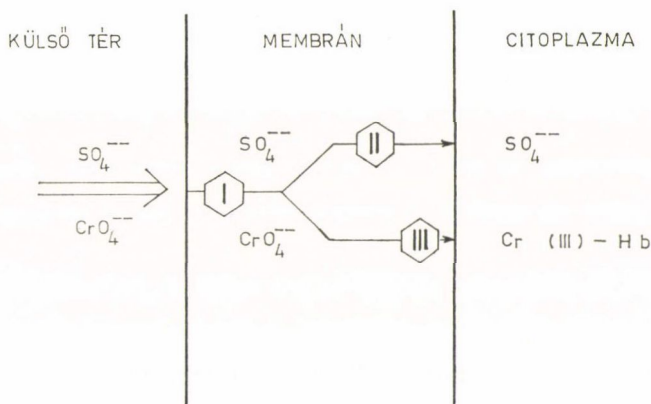
11. ábra. Széndiszulfidos kezelés időtartamának hatása a kromátdiffúzió sebességi állandójára, pH 7,30. Hematokrit 30%; kiindulási kromátkoncentráció: 0,05 mM; CS₂: 30 μmól/ml; -----> kromátfelvétel a széndiszulfiddal kezelt sejtek kimosása után

Figyelmet érdemel a szénkéneg befolyásának egy másik jellegzetessége az, hogy nem változtatta meg a szulfátranszport sebességét. Ez viszont azt mutatja, hogy nem az aniontranszport közös helyeit módosítja a membránban. Miután a szulfát- és a kromátranszport különbözőségében a membrán SH-csoportjainak szerepét kimutattuk, valószínű, hogy a szénkéneg hatása valamilyen módon ezekkel kapcsolatos. Reagálhat azonban a szénkéneg fehérjék aminos csoportjaival is, miközben ditiokarbamátok képződnek [82, 83]. Nem zárható ki, hogy a szénkéneg befolyása a kromátdiffúzióra ezek révén alakul ki.

Az aniontranszport egy másik jellegzetessége, hogy a médiumban levő anionok általában képesek befolyásolni egymás mozgását. Na-foszfát közegre térve át a NaCl-ról például a szulfation transzportja meggyorsul. Ugyancsak növekszik a transzport sebességi állandója, ha a transzportra vizsgált szulfát koncentrációját növeljük a többi ion rovására. Megfigyeléseink szerint a kromát diffúziója alapvetően eltér ettől, mert a kísérő anionok minősége nem befolyásolja [109].

Ennek a megállapításnak és a membrán kémiai módosításán alapuló vizsgálatok eredményeinek egybevetéséből a szulfát és kromát anionok diffúziójára olyan mechanizmust (12. ábra) javasolunk, amely szerint ez a két anion a membrán külső felszíne közelében hasonlóképp, a mélyebben fekvő régiókban

pedig különbözően jut át. A bemutatott eredmények azt sugallják, hogy ez utóbbiban helyezkednek el egyrészt a kromátdiffúzióra ható SH-csoportok, továbbá azok a szulfátranszportot befolyásoló helyek, amelyek szerepe a kísérő anionok hatásán keresztül mutatkozik meg.



12. ábra. Javasolt mechanizmus a szulfát és kromát diffúziójára vörösvértest membránon át. I: specifikus, pozitív kötőhelyek; II: anionok minőségére érzékeny régió; III: kromátdiffúziót befolyásoló SH-csoportok

Hangsúlyozni kell, hogy a feltüntetett séma nem jelent szükségképpen geometriai értelmezést, vagyis a diffúziós útvonalak elágazását. Lehetséges az is, hogy a transzportok közös útvonalon mennek végbe, de eltérő mechanizmussal. Elképzelésünk egyúttal összhangban van újabb irodalmi közlésekkel is [53, 155], amelyek szerint legalább két különböző típusú membránhely vesz részt az aniontranszport szabályozásában.

A kutatási eredmények, közöttük a bemutatott vizsgálataink azt igazolják, hogy a membránfehérjék topográfiai elemzésének fegyvertára jelentősen képes hozzájárulni a membrán transzportjelenségeinek megértéséhez is.

IRODALOM

1. ARROTTI, J. J., GARVIN, J. E.: Biochim. Biophys. Acta **255**, 79 (1972).
2. AZZI, A.: Quart. Rev. Biophys. **8**, 237 (1975).
3. BÄCHI, T., SCHNEBLI, H. P.: Exptl. Cell Res. **91**, 285 (1975).
4. BATT, E. R., ABBOTT, R. E., SCHACHTER, D.: Fed. Proc. **34**, 250 (1975).
5. BELÁGYI J.: MTA Biol. Oszt. Közl. **18**, 21 (1975).
6. BERG, H. C., DIAMOND, J. M., MARFEY, P. S.: Science **150**, 64 (1965).
7. BLOCH, R.: J. Biol. Chem. **249**, 1814 (1974).
8. BLUMENFELD, O. O., GALLOP, P. M., LIAO, T. S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **48**, 242 (1972).
9. BOHN, B., BROSSMER, R.: in Erythrocytes, Thrombocytes, Leucocytes p. 28 (Eds. Gerlach, E., Moser, K., Deutsch, E., Wilmanns, W.) G. Thieme Publ., Stuttgart (1973).
10. BONSALL, R. W., HUNT, S.: Biochim. Biophys. Acta **249**, 281 (1971).
11. BONSALL, R. W., HUNT, S.: Biochim. Biophys. Acta **249**, 266 (1971).

12. BRETSCHER, M. S.: *J. Molec. Biol.* **58**, 775 (1971).
13. BROWN, P. A., FEINSTEIN, M. B., SHA'AFI, R. I.: *Nature* **254**, 523 (1975).
14. BROWN, S. S., RAVEL, J. P.: *J. Cell Biol.* **68**, 629 (1976).
15. BROWNE, D. T., KENT, S. B. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 126 (1975).
16. BROWNE, D. T., KENT, S. B. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 133 (1975).
17. CABANTCHIK, Z. I., ROTHSTEIN, A.: *J. Membrane Biol.* **10**, 311 (1972).
18. CABANTCHIK, Z. I., ROTHSTEIN, A.: *J. Membrane Biol.* **15**, 207 (1974).
19. CABANTCHIK, Z. I., ROTHSTEIN, A.: *J. Membrane Biol.* **15**, 227 (1974).
20. CABANTCHIK, Z. I., BALSHIN, M., BREUER, W., ROTHSTEIN, A.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5130 (1975).
21. CABANTCHIK, Z. I., BALSHIN, M., BREUER, W., MARKUS, H., ROTHSTEIN, A.: *Biochim. Biophys. Acta* **382**, 621 (1975).
22. CAPALDI, R. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **50**, 656 (1973).
23. CARRAWAY, K. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 379 (1975).
24. CARRAWAY, K. L., COLTON, D. G., SHIN, B. C., TRIPLETT, R. B.: *Biochim. Biophys. Acta* **382**, 181 (1975).
25. CARRAWAY, K. L., SHIN, B. C.: *J. Biol. Chem.* **247**, 2102 (1972).
26. CASS, C. E., GAUDETTE, L. A., PATERSON, A. R. P.: *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 1 (1974).
27. CASS, C. E., PATERSON, A. R. P.: *Biochim. Biophys. Acta* **419**, 285 (1976).
28. CHAO, T. L., BERENFELD, M. R., GABUZDA, T. G.: *FEBS Lett.* **62**, 57 (1976).
29. CHEN, L. F., RICHARDSON, T.: *Pharmacol. Res. Commun.* **6**, 581 (1974).
30. COLOWICK, S. P., KAPLAN, N. O.: (Eds. in chief) *Methods in Enzymology*, Vol. XXXI. *Biomembranes*, Part A.; Vol. XXXII. *Biomembranes*, Part B. Academic Press, New York (1974).
31. CORI, G. T., STEIN, M. W., CORI, C. F.: *J. Biol. Chem.* **173**, 605 (1948).
32. COUSIN, J. L., MOTAIS, R.: *J. Physiol.* **256**, 61 (1976).
33. DAVIES, G. E., STARK, G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**, 651 (1970).
34. DIOPH, J., OLOMUCKI, M.: *Abstr. 10th FEBS Meeting, Paris* (1975). No 559
35. DUTTON, A., ADAMS, M., SINGER, S. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 730 (1966).
36. DUTTON, A., SINGER, S. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 2568 (1975).
37. EADY, R. P., WIDDAS, W. F.: *Quart. J. Exptl. Physiol.* **58**, 59 (1973).
38. EDWARDS, P. A. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **307**, 415 (1973).
39. EDWARDS, P. A. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 123 (1973).
40. EITAN, A., ALONI, B., LIVNE, A.: *Biochim. Biophys. Acta* **426**, 647 (1976).
41. FORTES, P. A. G., ELLORY, J. C.: *Biochim. Biophys. Acta* **413**, 65 (1975).
42. FORTES, P. A. G., HOFFMAN, J. F.: *J. Membrane Biol.* **5**, 154 (1971).
43. FORTES, P. A. G., HOFFMAN, J. F.: in *Erythrocytes, Thrombocytes, Leucocytes* p. 92 (Eds. Gerlach, E., Moser, K., Deutsch, E., Wilmans, W.) G. Thieme Publ., Stuttgart (1973).
44. FORTES, P. A. G., HOFFMAN, J. F.: *J. Membrane Biol.* **16**, 79 (1974).
45. GAHMBERG, C. G.: *J. Biol. Chem.* **251**, 510 (1976).
46. GATTEGNO, L., BLADIER, D., CORNIOLOTT, P.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 391 (1975).
47. GIGG, R., PAYNE, S.: *Chem. Phys. Lipids* **3**, 292 (1969).
48. GODIN, D. V., SCHRIER, S. L.: *J. Membrane Biol.* **7**, 285 (1972).
49. GORDESKY, S. E., MARINETTI, G. V., LOVE, R.: *J. Membrane Biol.* **20**, 111 (1975).
50. GORDESKY, S. E., MARINETTI, G. V., SEGEL, G. B.: *J. Membrane Biol.* **14**, 229 (1973).
51. GULIK-KRZYWICKI, T.: *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 1 (1975).
52. GUNN, R. B., TOSTESON, D. C.: *J. Gen. Physiol.* **57**, 593 (1971).
53. GUNN, R. B., COOPER, J. A.: *J. Membrane Biol.* **25**, 311 (1975).
54. HAJDU, J., SOLT, M., FRIEDRICH, P.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **10**, 7 (1975).
55. HALBHUBER, K. J., BENSER, A., BRANDT, H., FEUERSTEIN, H., GEYER, G.: *Folia Haematol.* **101**, 220 (1974).
56. HARRIS, I., MERIWETHER, B. P., PARK, J. H.: *Nature* **198**, 154 (1963).
57. HO, M. K., GUIDOTTI, G.: *J. Biol. Chem.* **250**, 675 (1975).
58. HUNTER, M. J., LUDWIG, M. L.: *Am. J. Chem. Soc.* **84**, 3491 (1962).
59. ITAYA, K., GAHMBERG, C. G., HAKOMORI, S. I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 1028 (1975).
60. JANCIK, J., SCHAUER, R.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 395 (1974).
61. JAY, A. W. L., CANHAM, P. B.: *J. Cell Physiol.* **80**, 367 (1972).
62. JI, T. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 93 (1974).
63. JI, T. H.: *J. Biol. Chem.* **249**, 7841 (1974).

64. JI, T. H., NICOLSON, G. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 2212 (1974).
65. JULIANO, R. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **300**, 341 (1973).
66. JUNG, C. Y., CARLSON, L. M.: *J. Biol. Chem.* **250**, 3217 (1975).
67. KAPLAN, J. H., PASSOW, H.: *J. Membrane Biol.* **19**, 179 (1974).
68. KAPLAN, J. H., SCORAH, K., FASOLD, H., PASSOW, H.: *FEBS Lett.* **62**, 182 (1976).
69. KAPLAN, M. A., HAYS, R. M., BLUMENFELD, O. O.: *J. Membrane Biol.* **20**, 181 (1975).
70. KEANA, J. F., STÄMPFELI, R.: *Biochim. Biophys. Acta* **373**, 18 (1974).
71. KENT, J. L., POGO, B. G. T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 161 (1964).
72. KINSKY, S. C.: *Annu. Rev. Pharmacol.* **10**, 119 (1970).
73. KLEBANOFF, S. J., CLARK, R. A.: *Blood* **45**, 699 (1975).
74. KNAUF, P. A., ROTHSTEIN, A.: *J. Gen. Physiol.* **58**, 190 (1971).
75. KNAUF, P. A., ROTHSTEIN, A.: *J. Gen. Physiol.* **58**, 211 (1971).
76. KNÜFERMANN, H., BHAKDI, S., SCHMIDT-ÜLLRICH, R., WALLACH, H. D. F.: *Biochim. Biophys. Acta* **330**, 356 (1973).
77. KOBLIN, D. D., WANG, H. H.: *Fed. Proc.* **33**, 1592 (1974).
78. KOTAKI, A., NAOI, M., YAGI, K.: *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 547 (1971).
79. KRAMER, P. A., LI, T. K.: *Biochem. Pharmacol.* **24**, 341 (1975).
80. LACKO, L., BURGER, M.: *J. Biol. Chem.* **238**, 3478 (1963).
81. LACKO, L., BURGER, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 563 (1964).
82. LÉONIS, J., LEVY, A. L.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**, 779 (1959).
83. LEVY, A. L.: *J. Chem. Soc.* 404 (1950).
84. LEPKE, S., PASSOW, H.: *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 529 (1973).
85. LOCKHART, W. L., SMITH, D. B.: *Can. J. Biochem.* **53**, 861 (1975).
86. LORAND, L., SHISHIDO, R., PARAMESWARAN, K. N., STECK, T. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 1158 (1975).
87. LUBIN, B. H., PENA, V., MENTZER, W. C., BYMUN, E., BRADLEY, T. B., PACKER, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 43 (1975).
88. MACHIDA, M., USHIMA, N., MACHIDA, M. I., KANAOKA, Y.: *Chem. Pharmac. Bull.* **23**, 1385 (1975).
89. MÁNYAI S.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **18**, 51 (1975).
90. MARFEY, S. P., TSAI, K. H.: *Fed. Proc.* **33**, 1592 (1974).
91. MARFEY, S. P., TSAI, K. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 31 (1975).
92. MARINETTI, G. V., LOVE, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 30 (1974).
93. MARINETTI, G. V., BAUMGARTEN, R., SHEELEY, D., GORDESKY, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**, 302 (1973).
94. MARQUARDT, M. D., GORDON, J. A.: *Exptl. Cell Res.* **91**, 310 (1975).
95. MASIÁK, S. J., D'ANGELO, G.: *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 651 (1973).
96. MASIÁK, S. J., D'ANGELO, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **382**, 83 (1975).
97. McLAUGHLIN, S., EISENBERG, M.: *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **4**, 335 (1975).
98. MONSAN, P., PUZO, G., MAZORGUIL, H.: *Biochimie* **57**, 1281 (1975).
99. MORENO, J. H., DIAMOND, J. M.: *J. Membrane Biol.* **21**, 197 (1975).
100. MOTAIS, R., COUSIN, J. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **419**, 309 (1976).
101. MOTAIS, R., SOLA, F.: *J. Physiol.* **233**, 423 (1973).
102. MUELLER, T. J., MORRISON, M.: *J. Biol. Chem.* **249**, 7568 (1974).
103. MUELLER, T. J., MORRISON, M.: *Biochemistry* **14**, 5512 (1975).
104. NICOLSON, G. L.: *Int. Rev. Cytol.* **39**, 89 (1974).
105. NIEHAUS, W. G., WOLD, F.: *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 170 (1970).
106. OBERMEIER, R., GEIGER, R.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 1631 (1975).
107. OMACHI, A.: *Science* **145**, 1449 (1964).
108. ORMOS Gy., MÁNYAI S.: *MTA Biol. Oszt. Közl. megjelenés alatt*
109. ORMOS, Gy., MÁNYAI, S.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 197 (1974).
110. OSTRAND-ROSENBERG, S.: *Vox Sang.* **30**, 268 (1976).
111. OWEN, J. D., STEGALL, M., EYRING, E. M.: *J. Membrane Biol.* **19**, 79 (1974).
112. PALMER, A. A., BETTS, W. H.: *Biorheology* **12**, 283 (1975).
113. PASSOW, H.: *J. Membrane Biol.* **6**, 233 (1971).
114. PODOLSKY, D. K., WEISER, M. M.: *Biochem. J.* **146**, 213 (1975).
115. POENSGEN, J., PASSOW, H.: *J. Membrane Biol.* **6**, 210 (1971).
116. REICHSTEIN, E., BLOSTEIN, R.: *J. Biol. Chem.* **250**, 6256 (1975).
117. RIGAUD, J. L., GARY-BOBO, C. M., TAUPIN, C.: *Biochim. Biophys. Acta* **373**, 211 (1974).
118. ROTHSTEIN, A., TAKEHITA, P. A., KNAUF, P. A.: in *Passive Permeability of Cell Membranes* (Eds. Kreuzer, I., Slegers, J. F. G.) Plenum Press, New York (1972).
119. RUOHO, A., BARTLETT, P. A., DUTTON, A., SINGER, S. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 417 (1975).

120. SAGONE, A. L., BALCERZAK, S. P., METZ, E. N.: *Blood* **45**, 49 (1975).
121. SANUI, H.: *Experientia* **31**, 199 (1975).
122. SCHMIDT-ULLRICH, R., KNÜFERMANN, H., WALLACH, D. F. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **307**, 353 (1973).
123. SCHNEBLI, H. P., BÄCHI, T.: *Exptl. Cell Res.* **91**, 175 (1975).
124. SCHNELL, K. F., GERHARDT, S., LEPKE, S., PASSOW, H.: *Biochim. Biophys. Acta* **318**, 474 (1973).
125. SCHRAMM, H. J.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 1375 (1975).
126. SCHWOCH, G., RUDLOFF, V., WOOD-GUTH, I., PASSOW, H.: in *Erythrocytes, Thrombocytes, Leucocytes* p. 77 (Eds. Gerlach, E., Moser, K., Deutsch, E., Wilmanns, W.) G. Thieme Publ. Stuttgart (1973).
127. SCHWOCH, G., RUDLOFF, V., WOOD-GUTH, I., PASSOW, H.: *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 126 (1974).
128. SEARS, D. A., REED, C. F., HELMKAMP, R. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **233**, 716 (1971).
129. SHAMOO, A. E.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **264**, 1 (1975).
130. SHAPIRO, B., KOLLMANN, G., MARTIN, D.: *J. Cell Physiol.* **75**, 281 (1970).
131. SHIMMIN, E. R. A., STEIN, W. D.: *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 308 (1970).
132. SHORE, B., SHORE, V.: *Biochim. Biophys. Acta* **373**, 313 (1974).
133. SIMON, B.: *Agents and Actions* **5**, 125 (1975).
134. SIRTS, J. A.: *J. Physiol.* **205**, 147 (1969).
135. SMITH, R. P. P., ELLMAN, G. L.: *J. Membrane Biol.* **12**, 177 (1973).
136. STARK, G. R.: *Biochemistry* **4**, 2363 (1965).
137. STARK, G. R.: *Adv. Prot. Chem.* **24**, 261 (1970).
138. STAROS, J. V., RICHARDS, F. M., HALEY, B. E.: *J. Biol. Chem.* **250**, 8174 (1975).
139. STECK, T. L.: *J. Molec. Biol.* **66**, 295 (1972).
140. STECK, T. L.: *J. Cell. Biol.* **62**, 1 (1974).
141. TARONE, G., PRAT, M., COMOGLIO, P. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 214 (1973).
142. TESSER, G. I., HOOG-DECLERCK, R. A. O. M. M., WESTERHUIS, L. W.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 1625 (1975).
143. TINBERG, H. M., NAYUDU, P. R. V., PACKER, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 734 (1976).
144. TOLBERG, A. B., MACEY, R. I.: *J. Cell. Physiol.* **79**, 43 (1972).
145. TRICHE, T. J., TILLACK, T. W., KORNFELD, S.: *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 540 (1975).
146. TROMMER, W. E., KOLKENBROCK, H., PFLEIDERER, G.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 1455 (1975).
147. TURNER, R. H., LIENER, J. E.: *Anal. Biochem.* **68**, 651 (1975).
148. VALLEE, B. L., RIORDAN, J. F.: *Annu. Rev. Biochem.* **38**, 733 (1969).
149. WALLACH, D. F. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 61 (1972).
150. WALLACH, D. F. H., LIN, D. S.: *Biochim. Biophys. Acta* **300**, 211 (1973).
151. WANG, K., RICHARDS, F. M.: *J. Biol. Chem.* **249**, 8005 (1974).
152. WANG, K., RICHARDS, F. M.: *J. Biol. Chem.* **250**, 6622 (1975).
153. WATERMAN, M. R., YAMAOKA, K., CHUANG, A. H., COTTAM, G. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 580 (1975).
154. WEINTRAUB, M., GERSON, K., SILBER, R.: *Blood* **43**, 549 (1974).
155. ZAKI, L., FASOLD, H., SCHUMANN, B., PASSOW, H.: *J. Cell. Physiol.* **86**, 471 (1975).
156. ZIPPER, H., MAWE, R. C.: *Biochim. Biophys. Acta* **356**, 207 (1974).