

Na⁺ + K⁺-AKTIVÁLHATÓ ADENOZINTRIFOSZFATÁZ: VIZSGÁLATOK FOSZFOLIPID VEZIKULÁKKAL ÉS ELLENANYAGOKKAL

SOMOGYI JÁNOS, HATFALUDI FERENC és VODNYÁNSZKY LAJOS

Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. és II. Kémiai—Biokémiai Intézet, Budapest

Az aktív iontranszport pontos mechanizmusának felderítése mind a mai napig nem megoldott. Annak ellenére, hogy közel 20 éve — SKOU 1957-ben közölt megfigyelése óta — tudjuk, hogy az aktív Na-pumpa enzimatiszta alapját a Na⁺ + K⁺-aktiválható ATPáz képezi, még ma sincs a kísérleti tényekkel mindenben egyező olyan modellünk, amely elfogadhatóan képes megmagyarázni, hogy 1 ATP hidrolízise során milyen mechanizmussal cserélődik ki 3 eredetileg intracelluláris Na⁺ 2 extracelluláris K⁺-al. Az elmúlt években számos transzport modellt szerkesztettek, melyek közül néhányat korábbi közleményeinkben (SOMOGYI 1973, SOMOGYI és SCHÖN 1976) ismertettünk.

Egy részleteiben is elfogadható modell megszerkesztéséhez az vitt közelebb, hogy az elmúlt években sikeresen oldották meg a Na⁺ + K⁺-ATPáz tisztítását, legalábbis néhány szövet esetében. Komoly előrehaladás tapasztalható továbbá tisztított ATPáz és foszfolipid vezikulák felhasználásával az ionpumpa rekonstrukciójára vonatkozó vizsgálatokban. Végül meg kell említenünk az enzimrendszer térszerkezetével foglalkozó újabb vizsgálatokat, melyeket immunológiai módszerekkel végeztek. Az alábbiakban ezeket a vizsgálatokat kívánjuk röviden összefoglalni.

Különböző szervekből — agy, vese, elektromos hal elektromos szerve, bizonyos halfajták rectális mirigye — sikerült aránylag nagy tisztaságú Na⁺ + K⁺-ATPáz előállítani. Erre elvileg két út kínálkozott. Az egyik szerint a membránból a nem ATPáz fehérjéket detergensekkel és/vagy NaJ kezeléssel távolították el, és így a visszamaradó csapadékban a Na⁺ + K⁺-ATPáz feldúsul. A másik eljárás lényege, hogy a membránt — Na⁺ + K⁺-ATPáz is — először szolubilizálták, azután vagy kicsapásos módszerrel, vagy gélszűréssel, vagy ioncserélő kromatográfiás eljárással, illetve ezek kombinációjával tisztították tovább az enzimet. Bár mindkét eljárásnak vannak előnyei, jelenleg mégis inkább a másodikat használják szélesebb körben. A tiszta Na⁺ + K⁺-ATPáz preparátumot Na-dodecil szulfáttal szolubilizálva, majd poliakrilamid elektroforézissel szétválasztva megállapították, hogy az enzim egy nagyobb, a különböző szerzők szerint 89 000—135 000 Dalton molekulású fehérje alegységből és egy kisebb, 35 000—57 000 Dalton molekulású glikoprotein alegységből áll. A nagyobb fehérje alegységet egyúttal katalitikus

alegységnek is nevezik, mivel ehhez kötődik az ATP-bontás több kimutatott részjelensége. A kinetikai vizsgálatok alegységenként ugyanis 1 foszforilációs helyet és 1 strofantin kötőhelyet mutattak ki (KYTE 1972, HOKIN 1974).

A kisebb alegység nagy mennyiségű neutrális, valamint töltéssel rendelkező szénhidrátot tartalmaz. A különböző eredetű preparátumok glikoprotein alegységének szénhidrát összetétele azonban eltérő lehet. Érdekes az a megfigyelés is, hogy az enzimpreparátumból enzimatiszta úton eltávolítva az összes szialinsavat, az enzim aktivitás nem károsodik (PERRONE és mtsai 1975, HOKIN 1974). A kisebb, glikoprotein alegység funkciója nem ismeretes. Az a körülmény azonban, hogy az enzim tisztítása során a kétféle alegység mennyisége párhuzamosan nő, a szoros funkcionális kapcsolatra utal.

Más vizsgálatok, elsősorban röntgen inaktivációs analízis alapján az enzim molekuláris súlyát kb. 250 000-nek becsülik (KEPNER és MACEY 1968). A molekuláris súlyra vonatkozó nem egészen pontos adatok miatt bizonytalan a fehérjealegységek aránya a teljes enzimben. HOKIN (1974), PERRONE és mtsai (1975) szerint 2 nagyobb fehérjealegység kapcsolódik 1 kisebb alegységgel az elektromos szervből, ill. a rectális mirigyből preparált ATPáz esetében, KYTE (1972) szerint viszont a kutyaveséből preparált enzimben 1 nagyobb alegység 2 kicsivel kombinálódik. Az intakt membránban az ATPáz-fehérjét lipid veszi körül. SIMKINS és HOKIN (1974) röntgendiffrakciós vizsgálatai szerint az enzimpreparátum lipidje tipikus bilayer struktúrát mutat. GRISHAM és BARNETT (1972) ESR-vizsgálatai szerint a lipid az ATPáz körülvevő bilayer struktúrában sokkal rendezettebb, mint az átlagos lipid bilayerben. A lipid funkcionális szerepe az ATPáz működésében mind a mai napig nem világos. A rendelkezésre álló, egymással többszörösen ellentmondó adatokból talán annyi vonható le, hogy a foszfolipid eltávolítása biztosan az enzim inaktiválódását okozza, azonban hogy a reaktiválós kísérletekben milyen foszfolipidet kell a lipidmentes enzim fehérjéhez hozzáadnunk, az elsősorban attól függ, hogy milyen egyéb összetevők vannak az enzim környezetében. Érthető tehát, hogy a kevésbé és a teljesen tisztított enzimpreparátum foszfolipid specificitása más lehet, sőt speciosek és ezen túlmenően a preparálás körülményei szerint is eltérések lehetnek.

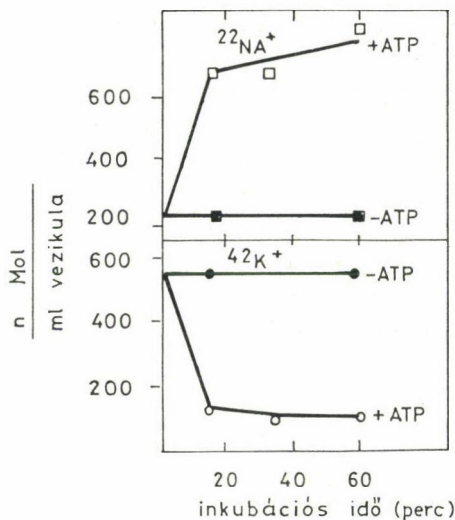
Nem ismeretes az ATPáz alakja, sőt molekuláris struktúrája sem az intakt membránban. Bár egyesek, pl. BAKER és WILLIS (1972) végeztek számításokat, hogy mekkora „helyet” foglal el egy ATPáz molekula a membránban, ez rendkívül széles határok között változhat: a vörösvértest esetében pl. $1 \mu^{-2}$, míg az agysejt membránjánál $1500 \mu^{-2}$ értéket adnak meg. Ami az ATPáz elhelyezkedését illeti a membránban, az bizonyosan aszimmetrikus. Erre az aszimmetrikus ionaktiválhatóságon és strofantinnal történő gátolhatóságon túlmenően (részletesebben l. SOMOGYI 1968) részben a foszfolipid vezikulákkal végzett rekombinációs vizsgálatok, illetve specifikus ellenanyagokkal végzett kísérletek alapján következtethetünk.

JAIN és mtsai (1972) voltak az elsők, akik megpróbálták az aktív kation pumpát rekonstruálni BLM-ből és agyból izolált nem tisztított $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPáz}$ preparátumból. Általánosságban ma kétféle módszert alkalmaznak az enzimek beépítésére foszfolipid vezikulákba. Az egyik módszer szerint a liposzómák készítésére szolgáló klasszikus eljárást alkalmazzák: a transzport fehérjét foszfolipidek jelenlétében ultrahanggal kezelik. Tekintettel arra, hogy az ultrahangkezelés önmagában nagyobb mértékben inaktíválja az ATPáz-t, mint ahogy szolubilizálja azt a membránból (SOMOGYI és mtsai 1968), nem meglepő, hogy a szonikációs módszerrel eddig nem tudtak olyan aktív vezikulákat előállítani, amely képes lett volna a Na^+ és K^+ kapcsolt transzportjára. RACKER (1972, 1973) egy újabb módszert dolgozott ki, amelynek lényege, hogy a foszfolipid-cholát-transzportfehérje keverék igen lassú dialízisével érhető el a transzportfehérje beépülése a foszfolipid molekulákba. Újabb ezt a módszert sikerrel alkalmazzák a $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPáz}$ rekonstrukciós vizsgálatokban is.

Már a vörösvérsejtekkel végzett kezdeti kísérletek alapján is kiderült, hogy az ATP-bontó aktivitás a membrán belső oldalához kötött, mivel az ép vörösvérsejtek nem bontják az ATP-t, s az ATP nem tud átjutni az ép membránon. A lassú dialízis technikával előállított, a tisztított $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPáz}$ t beépítve tartalmazó foszfolipid vezikulákról fel kellett tételezni, hogy az ATPáz aktív centrumának orientációja, azaz, hogy az a vezikula belső vagy külső felszínén helyezkedik-e el, statisztikus eloszlást mutat. Vannak tehát olyan vezikulák, melyek a belső oldalon tartalmazzák az ATP-kötőhelyet, míg mások a külső oldalon. Az előbbi ép vezikulák nem fogják bontani a rendszerhez adott ATP-t, erre csak az utóbbiak lesznek képesek. Pillanatnyilag nem rendelkezünk olyan módszerrel, amelynek segítségével a kétféle vezikulákat egymástól el tudnánk választani. Az ATP-kötőhelyet a külső oldalukon tartalmazó vezikulák az ATP-bontás mellett iontranszportra is képesek. Nyilvánvaló, hogy ebben az esetben a Na^+ -transzport a vezikulák belseje felé irányul, míg a K^+ -mozgás ezzel ellentétes lesz. Megfelelő kísérleti körülmények között (optimális pH, hőmérséklet és a vezikulák előzetes „feltöltése” a megfelelő ionokkal) a vezikulákhoz adott Mg^{++} és ATP hatására a radioaktív Na^+ és K^+ , ill. Rb^+ egymással ellenkező irányban transzportálódott. Ha ATP-t nem adtak a rendszerhez, nettó transzport nem volt kimutatható (HILDEN és mtsai 1974, HILDEN és HOKIN 1975). Megjegyzendő továbbá, hogy a rekonstruált vezikulumokon mért Na^+/K^+ -transzport nukleozidtrifoszfát specificitása megegyezik az intakt sejtek, ill. az ATPáz preparátumok nukleozid specificitásával. Az 1. ábra szemlélteti az elmondottakat.

Ha a rendszerhez strofantint adtak, transzportgátlást nem tudtak kimutatni. Ez érthető, ha meggondoljuk, hogy a szívglikozidok csak akkor gátolják a pumpa működését, ha a sejt külső oldalán kerülnek alkalmazásra (BAKER és MANIL 1968, GARDNER és CONLON 1972). A korábbiakból következik, hogy

a működő vezikulákban a strofantin kötőhely a membrán belső oldala felé tekint. Ha a vezikulákat megfelelő koncentrációjú strofantin jelenlétében preparálták, hogy az a vezikula záródásakor a belső térbe kerülhessen, akkor ki lehetett mutatni a kation transzport gátlását (HILDEN és HOKIN 1975). A rekonstruált vezikulákkal végzett transzport kísérletek értékelésénél azon-



I. ábra. $^{22}\text{Na}^+$ felvétel és $^{42}\text{K}^+$ leadás időfüggése foszfolipid-ATPáz vezikulákban 25 °C-on [HILDEN és HOKIN (1975) nyomán]

ban azt a körülményt is figyelembe kell vennünk, hogy a vezikulák egy része nem záródik tökéletesen, így a „lyukakon” az ionok az ATP, ill. a strofantin átjutva, befolyásolhatja az eredményeket. A transzport stöchiometriája a következő volt: a Na^+/ATP arány 1,48; a K^+/ATP arány 1,04. Ez bár a fele annak az értéknek, amelyet ép sejtek alkalmazásával mértek (1 ATP bontása 3 Na^+ és 2 K^+ ellentétes irányú transzportját biztosítja), azonban a vezikulákon mért Na^+/K^+ -transzport hányados 1,43, amely már nagyon közel esik az ép sejtek 3 $\text{Na}^+ / 2 \text{K}^+$ arányához. Igen érdekesek azok az eredmények, melyeket a vezikulák foszfolipid összetételének változtatásával nyertek. HILDEN és HOKIN (1976) az ATPáz-t tartalmazó foszfolipid vezikulákban WARREN és mtsai (1974) módszerével az endogén foszfolipideket tojás lecitinre cserélte ki és mérhető, strofantin gátolható Na^+/K^+ -transzportot tudtak mérni. Ez az első sikeres ilyen irányú kísérlet, mivel a korábbiakban az eredeti foszfolipid kicserélése a transzport megszűnését eredményezte. Nem ismeretes ez ideig olyan vizsgálat, hogy sík BLM-be sikerült volna $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz-t beépíteni a kapcsolt ionmozgás katalizálására.

A vezikulákkal végzett kísérletek eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a tisztított $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz beépíthető a foszfolipid veziku-

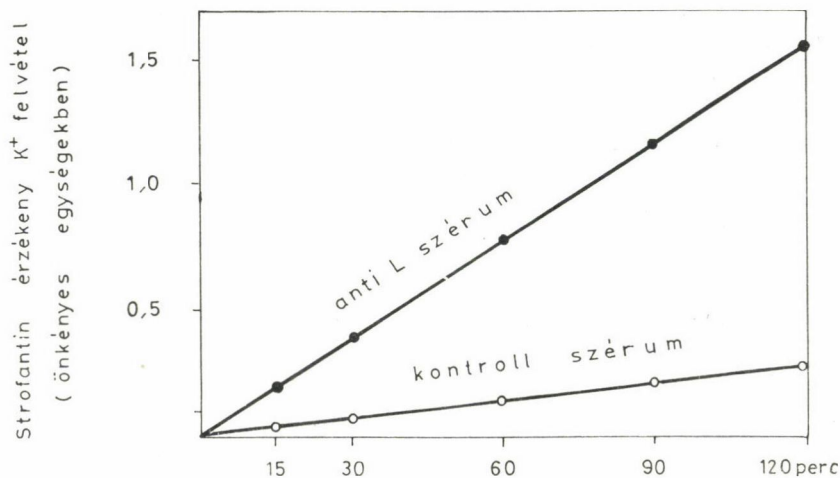
lákba és a rekonstruált rendszer lényegileg azonos tulajdonságokkal rendelkezik, mint az intakt membrán, azaz: 1. $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktiválható, szívglükózidokkal gátolható ATPáz aktivitást mutat, 2. ATP függő kapcsolt $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ transzporttal rendelkezik, amelynek működéséhez specifikusan Na^+ -ra van szükség, míg a K^+ Rb^+ -al helyettesíthető, 3. a mért transzport nukleozidtrifoszfát specificitása megegyezik az intakt membránéval, 4. az ATPáz ugyanúgy orientáltan helyezkedik el a vezikulákban, mint a natív membránban, azaz a Na^+ és ATP kötőhely a membrán egyik, a K^+ és szívglükózid kötőhely a másik felszín felől férhető hozzá kizárólag. Ezek a kísérletek egyértelműen bizonyítják tehát, hogy a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pumpa carrierje maga a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivált ATPáz.

Az ATPáznak a membránon belüli elhelyezkedését direkt vizsgálatokkal is sikerült megközelíteni. Erre az ellenanyagokkal végzett vizsgálatok biztosítottak lehetőséget. A kísérletek egy részében szívglükózidokkal szemben termelt ellenanyagokkal vizsgálták a szívglükózidok hatásának, illetve kötődésüknek a módosulását. Mint kiderült, az ellenanyagokkal ezeknek a szereknek a hatását farmakológiai preparátumokon módosítani lehetett, a toxikus jelenségek kivédhetőek voltak (I. SCHWARTZ és mtsai 1975), azonban nagy valószínűséggel az ellenanyag nem reagál az ATPáz szívglükózid kötőhelyével. Feltételezhetően hatásuk a nem kötött glükózid eltávolításával, hanem a glükózid-enzim komplex disszociációjának fokozásával magyarázható (SMITH és mtsai 1972, GARDNER és mtsai 1973).

Az ellenanyagokkal végzett vizsgálatok másik része a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATP-ázzal szemben termelt ellenanyagok hatásainak tanulmányozására irányult.

Mint korábbi vizsgálatokból ismeretessé vált, egyes birkák vörösvértestjei genetikailag determinált módon több, míg másoké kevesebb K^+ -t tartalmaznak. Az előzőket HK (high K^+), az utóbbiakat LK (low K^+) típusú sejteknek nevezzük. A kétféle típusú sejt iontranszportjának minden mérhető paraméterét leírták az utóbbi években (az ionfluxusok sebessége, pumpahelyek száma/sejt, átviteli szám, ATPáz aktivitás stb.). ELLORY és TUCKER (1969) hívták fel a figyelmet az ellenanyagok használatának jelentőségére a transzportfolyamatok tanulmányozásában. Kimutatták ugyanis, hogy LK típusú sejtekkel szemben termelt ellenanyagokat hozzáadva szintén LK típusú sejtekhez, azok K^+ transzportja jelentősen fokozódott az ellenanyagokat nem tartalmazó kontroll rendszerhez képest. Ezt a jelenséget azután TOSTESON és munkacsoportja tanulmányozta részleteiben is (LAUF és mtsai 1970, BLOSTEIN és mtsai 1971, LAUF és TOSTESON 1972). Megállapították többek között, hogy míg az ellenanyag jelenléte a 4–6-szorosára fokozza a K^+ -influxot, addig a strofantin kötőhelyek száma csak kb. megkétszereződött (2. ábra). Az LK típusú sejtek tehát az LK ellenanyag hatására a HK típusú sejtekhez váltak hasonlókká, bár azokkal azonosak nem lettek. A jelenség magyarázatára különféle elképzelés született (aktív „helyek” demaszkirozódása, a membrán „lyukak” aktív pumpahelyekké történő alakulása, a K^+ , illetve a Na^+ iránti

szelektív affinitás fokozódása, a transzport bizonyos további paramétereinek változása, gátló hatású fehérjék vagy peptidek eltávolítása az ellenanyaggal stb.), azonban a pontos magyarázat még ma is várat magára. GLYNN és ELLORY (1972) vörösvérsejt membrán preparátumok strofantin érzékeny ATPáz aktivitásainak tanulmányozása révén igyekeztek megközelíteni az ellen-



2. ábra. Kontroll és anti-L szérum hatása az LK/LL birka vörösvértettek strofantin érzékeny ⁴²K⁺ felvételre [LAUF (1974) után]

anyagoknak az aktív ionpumpára gyakorolt hatásait. Véleményük szerint az ellenanyag hatására a transzport rendszer Na⁺ iránti érzékenysége fokozódik, ez a fokozódás azonban nincsen összekapcsolva a membrán külső oldalán levő K⁺ kötőhely affinitásának változásával.

SACHS és mtsai (1974) viszont arra következtettek, hogy az ellenanyag nagy valószínűséggel csökkenti a K⁺ affinitását a Na⁺ kötőhely iránt, azaz más szavakkal, az ellenanyag a K⁺-nak a Na⁺-kötőhelyre gyakorolt gátló hatását függeszti fel.

Emberi vörösvérteteken végzett vizsgálataik során ÅVERDUNK és mtsai (1969) a Na⁺+K⁺-ATPáz katalikus aktivitásának gátlását tapasztalták ellenanyag hatására. ASKARI és RAO (1972) pedig patkánygyóból származó ATPáz ellen állítottak elő ellenanyagot, amely szinte teljesen inaktíválta a Na⁺+K⁺-ATPáz, ugyanakkor alig volt hatással a K⁺-aktivált p-nitrofenilfoszfát hidrolízisére. Feltételezve a két főbb lépésből álló ATPáz reakciómechanizmust, ez azt jelenti tehát, hogy az ellenanyag gátolja a Na⁺-függő enzimfoszforilációt, de hatástalan a K⁺-dependens defoszforilációs lépésre. Ez a megfigyelés azonban arra is utal, hogy a két részreakcióért felelős enzimcentrum antigenitás vonatkozásában valószínűleg különböző.

JØRGENSEN és mtsai (1973) vese eredetű nagy tisztaságú ATPÁzzal szemben állítottak elő ellenanyagot, amely teljes mértékben gátolta az enzim katalitikus aktivitását. Érdekes, hogy ez a vese ATPÁzzal szemben nyúlban termelt ellenanyag képes volt emberi vörösvértest preparátumok strofantin érzékeny Na⁺-effluxának a gátlására is. Ha az ellenanyagot ellenben ép vörösvértestekhez adták, az hatástalan maradt. Ez a megfigyelés csak úgy magyarázható, hogy az ellenanyag a membrán belső oldalán kötődik az ATPáz katalikus helyéhez. JØRGENSEN és mtsai (1973) azt is kimutatták, hogy az ellenanyag marhaagyból származó ATPáz preparátum ³H-strofantin kötőképességét is csökkenti (mint ismeretes a szívglikozid kötőhely a membrán külső oldalán található). Itt említendő meg SMITH és mtsai (1973), illetve McCANS és mtsai (1975) megfigyelése is, amely szerint a kutyavese ATPÁzzal szemben termelt ellenanyag nemcsak a vese, hanem a kutyaszív és emberi vörösvértest ATPázainak az aktivitását is gátolja, azonban hatástalan a strofantinnal nem gátolható, monovalens kationokkal nem befolyásolható ún. Mg⁺⁺-ATPázra, illetve az ép vörösvértestek aktív Rb⁺ felvételére.

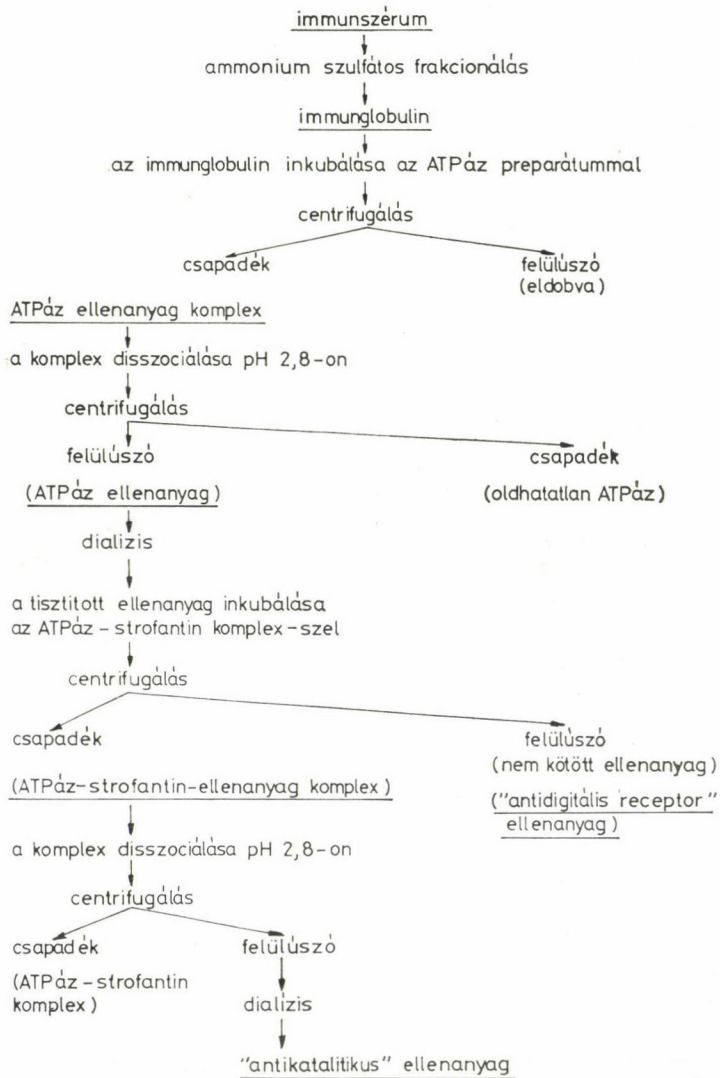
A felsorolt vizsgálatok csak akkor értelmezhetők, ha feltételezzük, hogy a termelt ellenanyag legalább két összetevőt, az ATPáz katalikus helye ellen termelt ellenanyag mellett a szívglikozid kötőhely elleni ellenanyagot is tartalmazza. E feltételezést McCANS és mtsai (1974) rendkívül szellemes kísérletekkel bizonyították be.

Kutyaveséből LANE és mtsai (1973) szerint nagy tisztaságú Na⁺ + K⁺-ATPÁzt állítottak elő, s ezzel szemben ellenanyagot termeltettek, a szérumból ammóniumszulfátos frakcionálással állították elő az immunglobulin frakciót. Ezt az ellenanyagot igen tömény tiszta ATPáz preparátummal inkubálták együtt úgy, hogy az antigén-ellenanyag reakcióban az ATPáz feleslegben legyen. A keverékből az ellenanyag-ATPáz komplexet centrifugálással távolították el. A következőkben ezt a komplexet pH 2,8-on inkubálták, amikor az összetevőire disszociált, lehetővé téve a médiumból az oldhatatlan ATPáz centrifugálással történő eltávolítását és az ellenanyag oldatban való tartását. Az ellenanyagot megfelelő dialízis után egy olyan ATPáz preparátummal reagáltatták, amelyhez előzetesen nagy feleslegben strofantint adtak. Az ellenanyag-ATPáz komplexet ismét centrifugálással üleptítették ki, majd pH 2,8-on történt kezeléssel az előzőeknek megfelelően kiüleptítették az oldhatatlan ATPÁzt. A visszamaradt ellenanyagot „antikatalitikus ellenanyag”-nak, míg az ellenanyagot a részét, amely nem kötődött az előzetesen strofantinnal kezelt enzimhez, „antidigitális receptor ellenanyag”-nak nevezték el. A kétféle ellenanyag előállításának vázlatát a 3. ábrán láthatjuk. Megjegyzendő, hogy a kétféle ellenanyag aránya kb. 1 : 1 volt. További vizsgálatok során megállapították, hogy az antikatalitikus ellenanyag gátolja az ATPáz aktivitást, de nem hat a ³H-strofantin kötődésére, míg az antidigitális receptor ellenanyag hatástalan az ATPáz aktivitásra, de kifejezetten gátolja mind a Mg⁺⁺ +

$+Na^+ + ATP$ stimulált, mind pedig a $Mg^{++} +$ anorg. P aktivált 3H -strofantin kötődést az enzimhez (4. ábra). Ezek az adatok egyértelműen bizonyítják tehát, hogy az ATPáz szívglükózid kötőhelye és az ATP bontó katalitikus helye különböző (4. ábra).

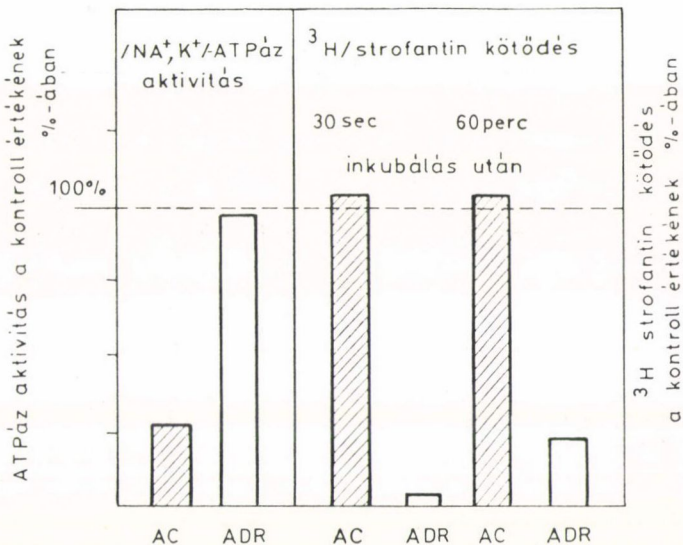
Az „antikatalitikus” és az „antidigitális receptor” ellenanyag szétválasztása

(Vázlat)



3. ábra. Az „antikatalitikus” és az „antidigitális receptor” ellenanyag szétválasztása (vázlat)

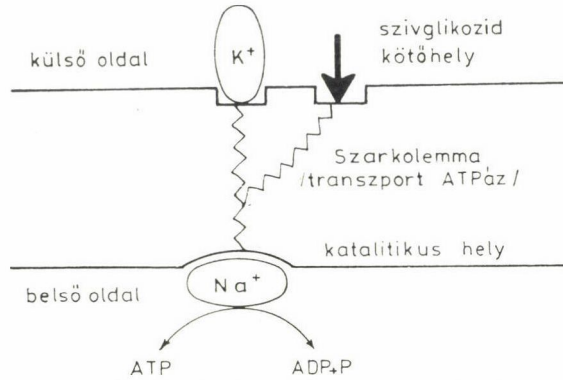
Erre egyébként KYTE (1974) szolgáltatott további bizonyítékokat. Az ATPáz katalitikus alegysége ellen termelt immunglobulint ferritinnel jelezte. Majd megállapította, hogy a ferritinnel jelzett ellenanyag kizárólag a membrán fragment egyik oldalára kötődött. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok



4. ábra. Az „antikatalitikus” (AC) és az „antidigitális receptor” (ADR) ellenanyagok hatása a Na⁺ + K⁺ – ATPáz aktivitásra, illetve a Mg⁺⁺ + anorg. P stimulált ³H-strofantin kötődésre az enzim preparátumhoz [McCANS és mtsai (1974) nyomán]

tanúsága szerint olyan eset nem fordult elő, hogy ugyanazon membrán fragment mindkét oldalán ellenanyagot lehetett volna kimutatni. Ha ezek után ezt a kísérletet úgy ismételte meg, hogy az inkubáló rendszer influenza vírusokat is tartalmazott, melyekről ismeretes, hogy azok kizárólagosan a membrán külső oldalához kapcsolódnak, azt tapasztalta, hogy a membrán fragmentek egyik oldalán a vírus, a másikon pedig a ferritinnel jelzett immunglobulin jelent meg. KYTE véleménye szerint ez a kísérlet egyértelművé teszi, hogy az enzim működésében elképzelhetetlen az enzim szerves részét képező bármilyen nagyobb centrum rotációs jellegű mozgása a membránban. Ez viszont azt jelenti, hogy az aktív Na⁺/K⁺ pumpa sem az enzim aktív helyeinek a membránban történő forgásával, sem pedig diffuzibilis mobil carrierként nem működhet. Az ATPáz katalitikus helyének és szívglikozid kötőhelyének térbeli elhelyezkedését az 5. ábrán láthatjuk.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy lényeges előrehaladás történt az aktív ionpumpa carrier molekulájának tiszta formában történő előállításában. Sikeres vizsgálatokat végeztek működőképes transzport rendszer előállítására



5. ábra. A Na^+/K^+ carrier ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz) katalitikus helyének és szívglükózid kötőhelyének orientált térbeli elhelyezkedése [vázlat SCHWARTZ és mtsai (1975) nyomán]

foszfolipidek és az ATPáz rekombinációja során. Azt is igazolták, hogy az ATPáz katalitikus centruma a membrán belső, míg a szívglükózid kötőhely a külső oldalon található. Ha ezek az adatok még nem is elégségesek egy a bevezetésben említett minden igényt kielégítő modell megszerkesztésére, mindenesetre behatárolják a lehetőséget, s a membránkomponensek rotációjának feltételezése helyett más jellegű változások tanulmányozásának szükségességére hívják fel a figyelmet.

IRODALOM

1. ASKARI, A., RAO, S. N.: Na^+ , K^+ -ATP-ase complex: Effects of anticomplex antibody on the partial reactions catalyzed by the complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 1323–1328 (1972).
2. ÁVERDUNK, R., GUNTHER, T., DORR, F., ZIMMERMAN, U.: Über die Wirkung von Antikörpern auf die ATP-ase-Aktivität und der aktiven Na-K-Transport von *E. coli* und Menschen-Erythrozyten. *Z. Naturforsch.* **24B**, 693–698 (1969).
3. BAKER, P. F., MANIL, J.: The rates of action of K^+ and ouabain on the sodium pump in squid axons. *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 560–562 (1968).
4. BAKER, P. F., WILLIS, J. S.: Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells. *J. Physiol.* **224**, 441–462 (1972).
5. BLOSTEIN, R., LAUF, P. K., TOSTESON, D. C.: Characteristics of Na^+ ATPase of low- K^+ sheep red cell membranes stimulated by blood group L antiserum. *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 623–627 (1971).
6. ELLORY, J. C., TUCKER, E. M.: Stimulation of the potassium transport system in low potassium type sheep red cells by a specific antigen antibody reaction. *Nature* **222**, 477–478 (1969).
7. GARDNER, J. D., CONLON, T. P.: The effects of sodium and potassium on ouabain binding by human erythrocytes. *J. Gen. Physiol.* **60**, 609–629 (1972).
8. GARDNER, J. D., KIINO, D. R., SWARTZ, T. J., BUTLER, V. P., Jr.: Specific antibodies in accumulation and binding of digoxin by human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **52**, 1820–1833 (1973).
9. GLYNN, I. M., ELLORY, J. C.: Stimulation of a sodium pump by an antibody that increases the apparent affinity for sodium ions of the sodium-loading sites. In *Role of Membranes in Secretory Processes*, pp. 224–237, North-Holland, Amsterdam (1972).
10. GRISHAM, C. M., BARNETT, R. E.: The interrelationship of membrane and protein structure in the functioning of the ($\text{Na} + \text{K}$)-activated ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **266**, 613–624 (1972).

11. HILDEN, S., HOKIN, L. E.: Active K⁺ transport coupled to active N⁺ transport in vesicles reconstituted from purified Na and K ion activated ATPase from the rectal gland of *Squalus acanthias*. *J. Biol. Chem.* **250**, 6296—6303 (1975).
12. HILDEN, S., HOKIN, L. E.: Coupled Na⁺-K⁺ transport in vesicles containing a purified (Na-K)-ATPase and only phosphatidyl choline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 521—527 (1976).
13. HILDEN, S., RHEE, H. M., HOKIN, L. E.: Sodium transport by phospholipid vesicles containing purified sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **249**, 7432—7440 (1974).
14. HOKIN, L. E.: Purification and properties of the (Na⁺-K⁺)-activated ATPase and reconstitution of Na⁺ transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **242** 12—23 (1974).
15. JAIN, M. K., WHITE, F. P., STRIKHOLM, A., WILLIAMS, E.: Studies concerning the possible reconstitution of an active cation pump across an artificial membrane. *J. Membr. Biol.* **8**, 363—388 (1972).
16. JØRGENSEN, P. L., HANSEN, O., GLYNN, I. M., CAVIERES, J. D.: Antibodies to pig kidney Na⁺, K⁺-ATPase inhibit the Na⁺ pump in human red cells provided they have access to the inner surface of the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 775—800 (1973).
17. KEPNER, G. R., MACEY, R. I.: Molecular weight estimation of membrane bound ATPase by in vacuo radiation inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 582—587 (1968).
18. KYTE, J.: Properties of the two polypeptides of sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **247**, 7642—7649 (1972).
19. KYTE, J.: The reactions of sodium and potassium ion-activated ATPase with specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **249**, 3652—3660 (1974).
20. LANE, L. K., COPENHAVER, J. H., JR., LINDENMAYER, G. E., SCHWARTZ, A.: Purification and characterization of and (³H) ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. *J. Biol. Chem.* **248**, 7197—7200 (1973).
21. LAUF, P. K.: Erythrocyte surface antigens and cation transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **242**, 324—342 (1974).
22. LAUF, P. K., TOSTESON, D. C.: Immunological aspects of cation transport in sheep red cells. In *Biomembranes*, ed. by F. Krenzer and J. F. G. Slegers **3**, pp. 229—236 Plenum Press, New York (1972).
23. LAUF, P. K., RASMUSSEN, B. A., HOFFMAN, P. G., DUNHAM, P. B., COOK, P., PARMELEE, M. L., TOSTESON, D. C.: Stimulation of active potassium transport in LK sheep red cells by blood group-L-antiserum. *J. Membr. Biol.* **3**, 1—13 (1970).
24. McCANS, J. L., LANE, L. K., LINDENMAYER, G. E., BUTLER, V. P., JR., SCHWARTZ, A.: Effects of an antibody to a highly purified Na⁺, K⁺-ATPase from canine medulla: Separation of the "holoenzyme antibody" into catalytic and cardiac glycoside receptor specific components. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 2449—2452 (1974).
25. McCANS, J. L., LINDENMAYER, G. E., PITTS, B. J. R., RAY, M. V., RAYNOR, B. D., BUTLER, V. P., JR., SCHWARTZ, A.: Antigenic differences in (Na⁺, K⁺)-ATPase preparations isolated from various organs and species. *J. Biol. Chem.* **250**, 7257—7265 (1975).
26. PERRONE, J. R., HACKNEY, J. F., DIXON, J. F., HOKIN, L. E.: Molecular properties of purified (Na + K)-activated ATPases and their subunits from the rectal gland of *S. acanthias* and the electric organ of *E. electricus*. *J. Biol. Chem.* **250**, 4178—4184 (1975).
27. RACKER, E.: Reconstitution of a calcium pump with phospholipids and a purified Ca⁺⁺-adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **247**, 8198—8200 (1972).
28. RACKER, E.: A new procedure for the reconstitution of biological active phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 224—230 (1973).
29. SACHS, J. R., ELLORY, J. C., KROPP, D. L., DUNHAM, P. B., HOFFMAN, J. F.: Antibody-reduced alterations in the kinetic characteristics of the Na : K pump in goat red cells. *J. Gen. Physiol.* **63**, 389—414 (1974).
30. SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G. E., ALLEN, J. C.: The Sodium-Potassium Adenosine Triphosphatase: Pharmacological, Physiological and Biochemical Aspects. *Pharmacol. Rev.* **27**, 3—134 (1975).
31. SIMPKINS, H., HOKIN, L. E.: Studies on the characterization of the Na-K transport adenosinetriphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 897—902 (1973).
32. SKOU, J. C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphate from peripheral nerves *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 394—401 (1957).
33. SMITH, T. W., WAGNER, H., JR., MARKIS, J. E., YOUNG, M.: Studies on the localization of the cardiac glycoside receptor. *J. Clin. Invest.* **51**, 1777—1789 (1972).

34. SMITH, T. W., WAGNER, H., Jr., YOUNG, M., KYTE, J.: Effects of antibodies specifically directed against Na^+ , K^+ -ATPase. *J. Clin. Invest.* **52**, 78a–79a (1973).
35. SOMOGYI J.: Az aktív iontranszport enzimatiske mechanizmusa. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **11**, 239–279 (1968).
36. SOMOGYI J.: Transzport-adenozintrifoszfátáz modellek. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **16**, 423–441 (1973).
37. SOMOGYI, J., BUDAI, M., NYIRŐ, L., KALUZA, G. A., NAGEL, W., WILLIG, F.: Activity and structural changes in Mg^{++} -dependent and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated adenosine triphosphatase prepared from rat brain following detergent treatment. *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **4**, 219–236 (1969).
38. SOMOGYI, J., SCHÖN, R.: Die enzymatische Grundlage des aktiven Ionentransports und seine mögliche Rolle beim aktiven Stofftransport. in: *Ergebn. exp. Med.* **23**, 55–63 (1976).
39. WARREN, G. B., TOON, P. A., BIRDSALL, N. J. M., LEE, A. G., METCALFE, J. C.: Complete control of the lipid environment of membrane-bound proteins: application to a Ca transport system. *FEBS Letters* **41**, 122–124 (1974).