

A MITOKONDRIÁLIS ATPÁZ SZERKEZETE ÉS FUNKCIÓJA

SZABADOS GYÖRGY és GUBA GYÖNGYVÉR

Semmelweis Orvostudományi Egyetem II. sz. Kémiai-Biokémiai Intézete, Budapest

A mitokondriális ATPázról LARDY és ELVEHJEM (1945) közleménye után kezdtek intenzíven vizsgálni, melyben leírták azt a feltételezést, hogy az ATP szintézis az oxidatív foszforilációban és a mitokondrium ATPáz aktivitása meghatározott kapcsolatban van egymással. Az ezt követő 30 év alatt szinte megszámlálhatatlan közleményben igyekeztek ezt a kapcsolatot megvilágítani. Az utóbbi évek néhány jó összefoglalója (MACLENNAN 1970, TZAGOLOFF 1971) rendszerezte a mitokondrium ATPázra vonatkozó kb. 1970-ig összegyűlt ismeretanyagot.

A vizsgálatok során az egyik alapvető tisztázandó kérdés az volt, hogy a mitokondriumban régóta ismert Mg^{2+} -aktiválható, ill. dinitrofenol szenzitív ATPáz aktivitás (LARDY és WELLMAN 1953, PACKER 1958) ugyanazon molekulának különböző körülmények között észlelt tulajdonsága-e, vagy egymástól elkülöníthető molekulákhoz kapcsolt. Ezt elsősorban abban a vonatkozásban vizsgálták, hogy a mitokondriális ATPáz aktivitás a szintetikus mechanizmus megfordított reakciója-e, vagy az ATP szintézistől független enzimműködés eredménye. Ismételten jelentkezett ugyanis az irodalomban az a vélemény, hogy csak a dinitrofenollal aktiválható ATPáz képezi részét az oxidatív foszforilációs mechanizmusnak (SIEKEVITZ és mtsai 1958), míg a Mg^{2+} -mal aktiválható ATPáz önálló, az ATP szintézissel nem kapcsolatos enzim.

A mitokondriumban dinitrofenol koncentráció függés, pH függés, stb. alapján több ATPáz létezését tételezték fel (SWANSON 1956, HEMKER 1963, SLATER 1966), míg mások (FONYÓ és mtsai 1966) csak pH 9-nél tudtak ATPáz aktivitás maximumot kimutatni. Kiderült azonban, hogy az oxidatív foszforilációhoz a Mg^{2+} elengedhetetlenül szükséges (KIELLEY és BRONK 1957, PULLMAN és mtsai 1960), továbbá, hogy a dinitrofenollal stimulálható ATPáz aktivitással rendelkező mitokondrium preparátumok kötött magnéziumot tartalmaznak, ill. azok a szubmitokondriális preparátumok, melyek magnéziumot nem tartalmaznak (BRONK és KIELLEY 1957), dinitrofenollal sem aktiválhatók (RACKER 1965). A döntő bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a dinitrofenol-, ill. a Mg^{2+} stimulált ATPáz aktivitás a mitokondrium ugyanazon, az oxidatív foszforilációban résztvevő molekulájának sajátja az szolgálta, hogy az oldható ATPáz (Racker F_1 kapcsoló faktora), mely az oxidatív

foszforilációban az ATP szintézisben vesz részt (PULLMAN és mtsai 1960), Mg^{2+} -mal és dinitrofenollal egyaránt aktiválható (RACKER 1965, RACKER 1970). Az F_1 igazi szubsztrátja a Mg-ATP (SELWYN 1967); a szabad ATP és szabad Mg gátolja az enzimműködést, a dinitrofenol pedig alacsony koncentrációban aktiválja, magasabb koncentrációban gátolja az F_1 aktivitását (STOCKDALE és SELWYN 1971). Az F_1 ATPáznak az oxidatív foszforilációban játszott szerepét bizonyították azok a vizsgálatok, melyek során kimutatták, hogy az F_1 ATPáz hiányos részecskékben (ASU részecskék) képes helyreállítani az oxidatív foszforiláció részreakcióit a mitokondriális légzőlánc ATP szintézissel kapcsolt mindhárom szakaszán (FESSENDEN és RACKER 1966, HINKLE és mtsai 1967). Az F_1 ellen termelt ellenanyag (FESSENDEN és RACKER 1966) az F_1 ún. kapcsoló szerepét képes megakadályozni (FESSENDEN és mtsai 1966, HINKLE és mtsai 1967).

A szolubilis ATPáz azonban nemcsak az oxidatív foszforiláció részreakcióit állítja vissza hiányos rendszerekben, szerepet játszik a fordított elektronáramlásban (FESSENDEN—RADEN 1969), az energiaigényes transzhidrogenáz reakcióban (LEE és ERNSTER 1965, FESSENDEN—RADEN 1969), az ATP energiával folyó iontranszlokációban (KAGAWA 1972), vagyis a mitokondriumban az energiatermelést és az ATP energiájának felhasználását az energiaigényes folyamatokban ugyanaz a bonyolult szerkezetű ATPáz enzim-komplex biztosítja.

A mitokondrium ATPáz aktivitásáért az F_1 felelős — oldatban képes adozintrifoszfátot ADP-re és anorganikus foszfátra hidrolizálni — azonban az aktivitása jelentősen módosul, ha membránhoz kötött állapotban az ATPáz komplex többi alegységéhez kapcsolódik. A szolubilis (F_1) és a membránhoz kötött ATPáznak más a hőérzékenysége (PULLMAN és mtsai 1960), nukleotid specificitása (RACKER 1965, TZAGOLOFF és mtsai 1968), a különböző inhibitorok, mint az oligomycin, higanyvegyületek, diciklohexilkarbodiimid (DCCD) iránti érzékenysége (PULLMAN 1960, TZAGOLOFF és mtsai 1968).

További nehézséget okoz az, hogy a táblázatban egy oszlopban feltüntetett rekonstitúciós kísérletekben használatos membránhoz kötött ún. oligomycin szenzitív, detergensnek jelenlétében szolubilizált ATPáz preparátumok is különböznek egymástól abban a vonatkozásban, hogy az ATPáz komplex alegységeit milyen kombinációban tartalmazzák. Ezért nagyon nehéz a különböző mitokondriális ATPáz preparátumokkal nyert adatok összehasonlítása.

A legalább 10 különböző alegységből felépülő mintegy 450 000 molekulasúlyú (TZAGOLOFF és MEACHER 1971, STEKHOVEN és mtsai 1972) enzimkomplexnek, melyet tisztán mindezideig nem sikerült izolálni, funkcionálisan és strukturálisan három része különíthető el (MACLENNAN 1970, TZAGOLOFF 1971). A komplexből, ill. ép mitokondriumokból is viszonylag könnyen kivonható a mintegy 9 nm átmérőjű, elektronmikroszkóppal már régen kimu-

I. táblázat

A mitokondriális ATPáz szerkezete és néhány tulajdonsága

	F ₁	F ₁ inhibitor	OSCP	Membrán szektor	Membránhoz kötött (oligomycin-érzékeny) ATPáz
Izolálható alegységek száma	5 ^{1,2}	1 ¹	1 ³	4 ^{4,5}	10 ⁶ 13–14 ⁷
Molekulasúly	360 000 ⁸ 384 000 ¹⁰	10 500 ¹	18 000 ⁹	70 000* ⁶	468 000 ⁶
Oldékonyság	vízoldékony ¹¹	híg lúgban oldódik ¹²	híg lúgban oldódik ³	detergens jelenlé- tében oldódik ⁶	detergens jelenlé- tében oldódik ^{13, 14}
Hidegérzékenység	hideg-labilis ¹⁰	—	—	—	hideg-érzékeny ¹¹
Oligomycin-érzékenység	érzékeny ^{11, 14}	—	—	—	érzékeny ^{14, 13}
Higany-érzékenység	érzékeny ¹⁴	—	érzékeny ¹⁵	—	érzékeny ¹⁴

* = számított érték.

¹ BROOKS és SENIOR (1971).² KNOWLES és PENEFSKY (1972).³ MacLENNAN és TZAGOLOFF (1968).⁴ TZAGOLOFF (1971).⁵ TZAGOLOFF és MEAGHER (1972).⁶ TZAGOLOFF és MEAGHER (1971).⁷ STEKHOVEN és mtsai (1972).⁸ LAMBERTH és LARDY (1971).⁹ SENIOR (1971).¹⁰ PENEFSKY és WARNER (1965).¹¹ PULLMAN és mtsai (1960).¹² PULLMAN és MONROY (1963).¹³ KAGAWA és RACKER (1966).¹⁴ TZAGOLOFF és mtsai (1968).¹⁵ SENIOR (1973).

tatott gömb alakú képződmény (RACKER és HORSTMAN 1967), az ún. *fej-* vagy *gömbszektor*, melyet először RACKER laboratóriumában izoláltak (PENEFSKY és mtsai 1960) és neveztek el F_1 kapcsoló faktornak. Ez a jelölés azóta az irodalomban közhasználatú lett. A fejet híg ammóniával kivonható, az F_1 oligomycin-érzékenységét helyreállító ún. OSCP (oligomycin-sensitivity conferring protein) (MACLENNAN és TZAGOLOFF 1968) mint egy nyél kapcsolja a mitokondrium belső membránhoz tartozó ún. *membrán szektorhoz*.

A mitokondriális ATPáz szerkezetének és működésének tisztázásában jelentős előrehaladást jelentettek az utóbbi évek azon eredményei, melyek során sikerült a mitokondriális ATPáz alegységeit tisztán izolálni. A továbbiakban az ATPáz enzimkomplexszel kapcsolatos ismereteket a fent említett szerkezeti tagolódásban tárgyaljuk.

Az F_1 ATPáz

A szolubilis, oligomycin-érzéketlen F_1 ATPáz különböző módszerekkel kivonható és tisztítható marhaszív-mitokondriumból (PULLMAN és mtsai 1960, DATTA és PENEFSKY 1970, SENIOR és BROOKS 1970, HORSTMAN és RACKER 1970), patkánymáj-mitokondriumból (CATTERALL és PEDERSON 1971) és élesztőmitokondriumból (TZAGOLOFF és MEACHER 1971). Az F_1 régóta ismert hidegérzékenységét az okozza, hogy alacsony hőmérsékleten a hidrofób kötések fellazulása miatt a szolubilis ATPáz alegységeire esik szét, és elveszti ATPáz aktivitását (PENEFSKY és WARNER 1965). 30 °C-on az alegységek ismét asszociálnak és az ATPáz aktivitás helyreáll. Megjegyzendő, hogy a hidegérzékeny F_1 nem lipoproteid (RACKER 1970), a hidrofób kötések aminosav oldalláncok biztosítják, habár a hidegérzékenység H^+ és sóérzékenysége arra mutat, hogy az alegységek összetartásában elektrosztatikus erők is szerepet kapnak (PENEFSKY és WARNER 1965).

Az F_1 -nek ez a tulajdonsága, hogy már 25 °C-on is részben alegységeire esik eredményezte, hogy a molekulásúlyát sokáig a valóságosnál alacsonyabbnak, 280 000-nek találták (PENEFSKY és WARNER 1965, RACKER 1970). Csak az utóbbi évek vizsgálatai alapján sikerült megállapítani, hogy a különböző forrásokból — szívizom, máj, élesztő — származó F_1 molekulásúlya meglehetősen közeli, 350 000–380 000 dalton (TZAGOLOFF és MEACHER 1971, CATTERALL és PEDERSON 1971, KNOWLES és PENEFSKY 1972). A szolubilis F_1 alegységeit poliakrilamid-gél-elektroforézissel sikerült egymástól elválasztani. Marhaszívból, patkánymájából és élesztőből izolált mitokondriumok szolubilis F_1 ATPáza öt különböző típusú alegységet tartalmaz. Az alegységek molekulásúlyát nátrium dodecilsulfát-gél-elektroforézissel (CATTERALL és PEDERSON 1971, BROOKS és SENIOR 1971, LAMBETH és LARDY 1971, SENIOR és BROOKS 1971, KNOWLES és PENEFSKY 1972), 6 M guanidin hidrokloridban gélfiltrációval és egyensúlyi ultracentrifugálással (KNOWLES és PENEFSKY 1972) is meghatároz-

ták. A marhaszívből, patkánymájából és élesztőből származó alegységek esetében nagyon hasonló értékeket kaptak. A két nagyobb alegység molekulásúlya kb. 50 000, ennél jelentősen kisebb (kb. 30 000) a harmadik alegység molekulásúlya. Ez a három alegység alkotja az F_1 ATPáz döntő tömegét. A két kisebb, kb. 15 000, ill. 8000 molekulású alegység az enzim tömegének nem több mint 3%-át teszi ki (CATTERALL és mtsai 1973). Az egyes alegységeket egymástól izolálva meghatározták az alegységek aminosav összetételét.

II. táblázat

Az F_1 ATPáz és alegységeinek aminosav összetétele
A táblázatban szereplő adatok a frakciókban a legkisebb mennyiségben jelenlevő aminosavhoz viszonyított mennyiséget jelölnék

Aminosav	F_1^*	F_1^{**}	Alegység**				
			1	2	3	4	5
			aminosav-maradék/mol				
Lizin	15	17	32	24	26	5	8
Hisztidin	4	4	6	8	5	2	1
Arginin	14	15	27	19	16	4	3
Aszparaginsav	19	22	42	35	27	12	3
Treonin	14	15	25	27	17	10	3
Szerin	15	14	37	24	26	10	6
Glutaminsav	28	35	58	58	29	22	5
Prolin	10	12	18	24	18	6	1
Glicin	22	27	57	46	18	10	4
Alanin	25	28	50	48	32	27	7
Karboximetilcisztein	1	1	3	1	—	—	—
Valin	18	23	40	40	15	16	4
Metionin	5	5	8	9	6	2	1
Izoleucin	15	20	35	30	25	5	3
Leucin	21	26	45	41	24	15	2
Tirozin	7	7	9	11	10	1	2
Fenilalanin	7	8	12	14	9	6	1
Alegységek mol-súlya			53 300	49 000	33 160	16 100	5 850

* E. RACKER: Membranes of Mitochondria and Chloroplasts, Von Nostrand Reinhold Comp. New York, pp. 127—171 és

** A. F. KNOWLES, H. S. PENEFSKY: J. Biol. Chem. 247, 6624—6630 (1972) — közleményei alapján.

Az alegységek sztöchiometriája

Az 1. és 2. alegység a gél-elektroforézises kísérletek adataiból következtetve körülbelül azonos mennyiségben szerepel a komplexben. A festés intenzitásából — ha pontos sztöchiometriai meghatározás nem is lehetséges (KNOWLES és PENEFSKY 1972) — arra lehet következtetni, hogy molárisan nagyobb mennyiségben vannak jelen, mint a kisebb alegységek. Az elektronmikrográfon látható hexameteres elrendeződésből (RACKER és HORSTMAN 1967, CATTERALL és PEDERSON 1971) és az SH-csoportok számából (az F_1

komplex összesen 12 szabad, ill. összekapcsolt SH-csoportot tartalmaz; az 1. alegységben három, a 2. alegységben egy SH-csoport található, a 3–5 alegység, ill. az ATPáz inhibitor ciszteint valószínűleg nem tartalmaz) spekulatív úton arra következtethetnek, hogy az F_1 komplex három-három 1. és 2. alegységet és egy-egy 3., 4., ill. 5. alegységet tartalmaz (SENIOR és BROOKS 1971, CATTERALL és mtsai 1973). Ennek megfelelően az F_1 alegység szerkezete, ha az alegységeket a csökkenő molekulásúly sorrendjében az abc nagybetűivel jelöljük, $A_3 B_3 C D E$ -nek adódik.

A szolubilis F_1 -en két, egy erős és egy laza nukleotid kötőhely különíthető el. HILBORN és HAMMES (1973) marhamájából izolált F_1 -en az erős kötőhelyen az ADP-re $K_D = 0,28 \mu\text{M}$ (2 mM Mg^{2+} jelenlétében), ill. $K_D = 11 \mu\text{M}$ (EDTA jelenlétében) értékeket kaptak. Ez a kötőhely nagyfokú nukleotid specificitást mutat: IDP, UDP, AMP, ITP, UTP, ATP nem kötődik hozzá. Egyedül az ϵ ADP 3- β -D-ribofuranozil imidazo-[2,1-i]purin-5'-difoszfát kötődik jól. Ez arra utal, hogy a kötés a purin 6. szénatomján levő szubsztituensre és difoszfátra specifikus. Mivel az F_1 sem lipidet, sem prosztetikus csoportot nem tartalmaz (PENEFSKY és WARNER 1965), a nukleotid kötődést minden valószínűséggel aminosav oldalláncok biztosítják. A gyenge kötőhely kevésbé specifikus ADP-re. Különböző nukleozid di- és trifoszfátok jól kötődnek hozzá. A $K_D(\text{ADP}) = 0,47 \mu\text{M}$, $K_m(\text{ATP}) = 220 \mu\text{M}$. Az ADP gátolja a laza helyhez kötött ATP hidrolízisét, $K_i(\text{ADP}) = 30 \mu\text{M}$. CATTERALL és PEDERSON (1972) patkánymájából izolált F_1 ATPázon $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapásos módszerrel csak egy erős kötőhelyet tudott kimutatni $K_D(\text{ADP}) = 1 \mu\text{M}$ (Mg^{2+} nélkül) és $K_D(\text{ADP}) = 2 \mu\text{M}$ (Mg^{2+} jelenlétében). Azonban mivel Mg^{2+} és magas koncentrációjú szaharóz gátolja az F_1 ATPáz aktivitást annak ellenére, hogy nem gátolja az erős kötőhelyen a nukleotid kötődést, és a $K_i(\text{ADP}) = 240 \mu\text{M}$ kb. 100–200-szor magasabb az erős kötőhely ADP disszociációs konstansánál, ezek a szerzők is feltételeztek egy laza hidrolitikus kötőhelyet az F_1 molekulán. A két kötőhely szerepe egyelőre nem teljesen tisztázott. A kinetikai és „egyensúlyi” mérésekből nyert adatok jól összeegyeztethetők azzal az elképzeléssel, hogy a laza kötőhely az ATPáz molekula hidrolitikus (ATPáz) katalitikus centruma (HILBORN és HAMMES 1973). Az erős kötőhely egyik lehetséges funkciója — a kloroplasztok szolubilis CF_1 ATPáz erős kötőhely (NELSON és mtsai 1972) analógiája alapján — alloszterikus inhibitor kötőhely lehet. Ennek az elképzelésnek azonban ellentmond az, hogy az erős kötőhelyet telítő ADP koncentráció nem gátolja az F_1 ATPáz aktivitást. Egy más elképzelés szerint erős kötőhely szerepelne az ATP szintézisben (CATTERALL és PEDERSON 1972). Ezt a lehetőséget támasztja alá egyrészt az, hogy az erős kötőhely ADP disszociációs konstansa és az oxidatív foszforilációban a $K_m(\text{ADP})$ (BYGRAVE és LEHNINGER 1967, KLINGENBERG és PFAFF 1968) nagyon közeli érték, másrészt az aurovertinnel kapott vizsgálati eredmények. Az aurovertin, ami az oxidatív foszforilációnak hatásos gátlószere (LARDY és mtsai 1964),

nagy affinitással kötődik az F_1 -hez, fluorescens komplexet képezve (CHANG és PENEFSKY 1973). A fluorescens spektroszkópiás vizsgálatok szerint ADP jelenlétében egy F_1 molekulához 1 molekula aurovertin kapcsolódik (CHANG és PENEFSKY 1973) és az aurovertin gátolja az erős kötőhelyen az ADP kötődést (CATTERALL és PEDERSON 1972). Ezzel szemben az ATP struktúranalógja, melyben a terminális foszfátot oxigén helyett nitrogén kapcsolja az ADP-hez, az AMP-PNP nem gátolja sem az ADP kötődését az erős kötőhelyhez, sem az oxidatív foszforilációt rekonstituált rendszerben, ellenben kompetitíve nagyon erősen gátolja az ATPáz aktivitást (PEDERSON és mtsai, közlés alatt). Ezen adatok alapján feltételezik (CATTERALL és PEDERSON 1972), hogy az F_1 molekula erős ADP kötőhelye az oxidatív foszforilációval, az ATP szintézissel kapcsolatos, a laza kötőhely pedig az ATPáz aktivitással. Ez a laza kötőhely elsődlegesen kapcsolódhat olyan mitokondrium funkciókhoz, amelyek aktivitását ATPáz biztosítja (ASAMI és mtsai 1970).

Az ATPáz inhibitor

PULLMAN és MONROY (1963) izoláltak marhaszív-mitokondriumból egy specifikus ATPáz inhibitor fehérjét. A vízdékony F_1 ATPáz preparátumok az izolálási körülményektől függően különböző mennyiségű inhibitor fehérjét tartalmazhatnak, attól különböző kezeléssel elválaszthatók (WARSHAW és mtsai 1968, HORSTMANN és RACKER 1970). Az F_1 ATPáz Mg^{2+} és ATP jelen-

III. táblázat

Az ATPáz inhibitor aminosav ötszetétele*

Aminosav	$\mu\text{mól}/100 \mu\text{mól}$ aminosav-maradék
Lizin	12,44
Hisztidin	6,15
Arginin	9,52
Aszparaginsav	8,75
Treonin	—
Szerin	6,88
Glutaminsav	22,15
Prolin	—
Glicin	7,01
Alanin	11,71
Valin	2,32
Metionin	—
Izoleucin	4,64
Leucin	5,01
Tirozin	1,09
Fenilalanin	2,27
Cisztein	nem határozták meg
Triptofán	nem határozták meg

* J. C. BROOKS, A. E. SENIOR: Arch. Biochem. Biophys. **147**, 467—470 (1971) közleményéből.

létében képes a kb. 10 300 molekulasúlyú (BROOKS és SENIOR 1971, NELSON és mtsai 1972) inhibitor molekulát megkötni (PULLMAN és MONROY 1963, VAN DE STADT és mtsai 1972). Ezért az inhibitor a marhaszív mitokondriumból izolált F_1 alegységeként fogható fel. A legújabb adatok szerint a korábbi közléssel (TZAGOLOFF 1971, SENIOR 1973) ellentétben sikerült élesztőből és májból is inhibitor fehérjét izolálni (EBNER 1974, SATRE és DEJERPHANION 1974, PEDERSON és mtsai, sajtó alatt). A tiszta inhibitornak meghatározták az aminosav összetételét (BROOKS és SENIOR 1971, NELSON és mtsai 1972).

Nem ismeretes az inhibitor lokalizációja az F_1 -ben, vagyis, hogy melyik alegységgel milyen kötés révén kapcsolódik. Az inhibitor funkciójáról korán megállapították, hogy gátolja az ATPáz aktivitást anélkül, hogy gátolná az ATP szintézist (PULLMAN és MONROY 1963, ASAMI és mtsai 1970).

ASAMI és mtsai (1970) kimutatták, hogy az inhibitor gátol szubmitokondriális részecskében minden energiaigényes reakciót, amihez az energiát ATP szolgáltatja. Feltételezik, hogy az inhibitor a mitokondriális ATPáz természetes regulátora, ami szabályozza az energiaáramlást az ATP-ről a mitokondriális energia-felhasználó rendszerekhez.

OSCP-protein

MACLENNAN és TZAGOLOFF (1968) vontak ki a mitokondriumból azt a fehérjefaktort, ami biztosítja az F_1 molekula kötődését (MACLENNAN és TZAGO-

IV. táblázat

Az OSCP aminosav összetétele*

Aminosav	$\mu\text{mól}/100 \mu\text{mól}$ aminosav-maradék
Cisztein	0,6
Aszparaginsav	4,6
Treonin	5,6
Szerin	6,7
Glutaminsav	12,4
Prolin	4,8
Glicin	6,3
Alanin	9,6
Valin	9,8
Metionin	3,3
Izoleucin	5,9
Leucin	12,5
Tirozin	2,25
Fenilalanin	2,2
Lizin	8,9
Hisztidin	0,7
Arginin	4,5

* A. E. SENIOR: J. Bioenerg. 2, 141–150 (1971) közleményéből.

LOFF 1968, MACLENNAN és ASAI 1968) a membránhoz és visszaállítja az F_1 ATPáz oligomycin érzékenységét. Innen kapta elnevezését — oligomycin-sensitivity conferring protein. A tisztán kinyert OSCP nátrium dodecilsulfát-gél-elektroforézissel (SENIOR 1971), ill. gél-filtrációval (MACLENNAN és TZAGOLOFF 1968) meghatározott 18 000 molekulasúlyú erősen bázikus fehérjének adódott.

Annak ellenére, hogy sem az F_1 , sem az OSCP nem higanyérzékeny (TZAGOLOFF és mtsai 1968, SENIOR 1971, SENIOR 1973) az oligomycin-szenzitív ATPázt higanyvegyületek erősen gátolják (TZAGOLOFF és mtsai 1968). Ez azért lehetséges, mivel az OSCP az F_1 szolubilis ATPázának nem állítja vissza az oligomycin érzékenységét. Az oligomycin érzékenység visszaállításához az ún. membrán szektor is szükséges.

Membrán szektor

Az ATPáz komplex ezen részét azért nevezzük membrán szektornak, mivel ez a része a legnehezebben szolubilizálható, s mint ilyen a legszorosabb kapcsolatban van a mitokondrium belső membránjával. Míg az F_1 vízben oldódó (PULLMAN és mtsai 1960) az OSCP híg lúggal kivonható (MACLENNAN és TZAGOLOFF 1968), addig a membrán szektor csak detergensekkel vihető oldatba (MACLENNAN és mtsai 1968, TZAGOLOFF és MEACHER 1971). A membrán szektor legalább 4 alegységből áll (TZAGOLOFF 1971, TZAGOLOFF és MEACHER 1972). Ezek közül egy 7800 molekulasúlyú fehérjét sikerült kivonni (TZAGOLOFF és mtsai 1973), mely extrém magas arányban tartalmaz apoláris aminosavakat, gyakorlatilag oldhatatlan vízben, jól oldódik néhány szerves oldószerben (MACLENNAN és mtsai 1968, TZAGOLOFF és MEACHER 1971). Az ugyan nyilvánvaló, hogy az ATPáz oligomycin érzékenységének visszaállításához a membrán szektorra szükség van, azonban nem ismeretes, hogy a membrán szektor pontosan milyen szerepet játszik ebben. Az oligomycin nem kötődik kovalensen a membrán egy komponenséhez sem. Néhány adat arra utal, hogy az oligomycin a membrán foszfolipidhez kapcsolódva fejt ki hatását (KAGAWA és RACKER 1966, TZAGOLOFF 1969). Az oligomycinnel hatásában analóg vegyület a diciklohexil-karbodiimid (DCCD) (BEECHEY és mtsai 1967) az intakt mitokondrium belső membrán meghatározott fehérjéjéhez kovalensen kötődik (CATTELL és mtsai 1971). Lehetséges, hogy ez az alegység azonos a TZAGOLOFF által izolált erősen apoláris alegységgel (TZAGOLOFF és mtsai 1973), mivel kloroplasztokon végzett vizsgálatok szerint a DCCD erősen hidrofób közegbe képes behatolni (ABRAMS és BARON 1970). A membrán szektor alegységeit azonban mindeztől nem sikerült tisztán előállítani, sőt még az alegységek száma is kérdéses, és attól függ, hogy milyen módszer szerint preparálják a membránhoz kötött ATPázt (PENEFSKY és mtsai 1960, SENIOR 1973).

Az utóbbi évek vizsgálatai alapján viszonylag tiszta képet nyertünk a mitokondriális ATPáz szerkezetéről. Sokkal kevesebb ismeretanyaggal rendelkezünk az ATPáz funkciójára vonatkozóan. Az eddig javasolt reakciómechanizmusok (BOYER 1967, LARDY és FERGUSON 1969, NELSON és RACKER 1973) nem támaszkodhattak a nukleotid kötőhely kémiai szerkezetének ismeretére, sőt mindezeideig foszforilált intermediert sem sikerült biztosan kimutatni. A nukleotid kötődésben úgy tűnik, hogy SH-csoport nem játszik szerepet, azonban tirozin oldalláncoknak tulajdonítanak jelentőséget az ATP hidrolízisében (SENIOR 1973). Az ATPáz hatásmechanizmusának tisztázásában jelentős segítséget nyújthatnak az utóbbi években elkezdett konformációs változás vizsgálatok (RYRIE és JAGENDORF 1972, McCARTY és mtsai 1972).

A reakciómechanizmus felderítését jelentősen elősegítheti a tisztán izolálható alegységekben a nukleotid kötőhely aminosav sorrendjének meghatározása.

Az eddigi eredmények alapján várható, hogy viszonylag rövid időn belül a mitokondriális ATPáz funkciójának vizsgálatában is jelentős előrehaladást érjünk el. Az ATPáz szerkezetének tisztázása, az alegységek tisztán történő izolálása lehetővé teszi nemcsak a nukleotid kötőhely vizsgálatát, de azt is, hogy az egyes alegységek milyen fehérje—fehérje kölcsönhatás révén kapcsolódnak egymáshoz és hogy ez a komplex hogyan valósítja meg az energia transzformációt az élő szervezetekben.

IRODALOM

- ABRAMS, A., BARON, C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 858—863 (1970).
 ASAMI, K., JUNTTI, K., ERNSTER, L.: *Biochim. Biophys. Acta* **205**, 307—311 (1970).
 BEECHEY, R. B., ROBERTON, A. M., HOLLOWAY, C. T., KNIGHT, I. G.: *Biochemistry* **6**, 3867—3879 (1967).
 BOYER, P. D.: *Curr. Top. Bioenerg.* **2**, 99—149 (1967).
 BRONK, J. R., KIELLEY, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 440—441 (1957).
 BROOKS, J. C., SENIOR, A. E.: *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 467—470 (1971).
 BYGRAVE, F. L., LEHNINGER, A. L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **57**, 1409—1415 (1967).
 CATTELL, K. J., LINDOP, C. R., KNIGHT, I. G., BEECHEY, R. B.: *Biochem. J.* **125**, 169—177 (1971).
 CATTERALL, W. A., COTY, W. A., PEDERSON, P. L.: *J. Biol. Chem.* **248**, 7427—7431 (1973).
 CATTERALL, W. A., PEDERSON, P. L.: *J. Biol. Chem.* **246**, 4987—4994 (1971).
 CATTERALL, W. A., PEDERSON, P. L.: *J. Biol. Chem.* **247**, 7969—7976 (1972).
 CHANG, T. M., PENEFSKY, H. S.: *J. Biol. Chem.* **248**, 2746—2754 (1973).
 DATTA, A., PENEFSKY, H. S.: *J. Biol. Chem.* **245**, 1537—1544 (1970).
 E. EBNER: Abstracts 9th FEBS Meeting, Budapest p. 272 (1974).
 FESSENDEN, J. M., RACKER, E.: *J. Biol. Chem.* **241**, 2483—2489 (1966).
 FESSENDEN-RADEN, J. M.: *J. Biol. Chem.* **244**, 6662—6667 (1969).
 FONÓ, A., SZENDE, L., MEZEL, I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 511—517 (1966).
 HEMKER, H. C.: *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 311—323 (1963).
 HILBORN, D. A., HAMMES, G. G.: *Biochemistry* **12**, 983—990 (1973).
 HINKLE, P. C., PENEFSKY, H. S., RACKER, E.: *J. Biol. Chem.* **242**, 1788—1792 (1967).
 HORSTMAN, L. L., RACKER, E.: *J. Biol. Chem.* **245**, 1336—1344 (1970).
 KAGAWA, Y.: *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 297—338 (1972).
 KAGAWA, Y., RACKER, E.: *J. Biol. Chem.* **241**, 2467—2474 (1966).
 KIELLEY, W. W., BRONK, J. R.: *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 448—449 (1957).

- KLINGENBERG, M., PFAFF, E.: *Biochem. Soc. Symp.* **27**, 105—123 (1968).
- KNOWLES, A. F., PENEFSKY, H. S.: *J. Biol. Chem.* **247**, 6617—6623 (1972).
- KNOWLES, A. F., PENEFSKY, H. S.: *J. Biol. Chem.* **247**, 6624—6630 (1972).
- LAMBETH, D. O., LARDY, H. A.: *Eur. J. Biochem.* **22**, 355—363 (1971).
- LARDY, H. A., CONNELLY, J. L., JOHNSON, D.: *Biochemistry* **3**, 1961—1968 (1964).
- LARDY, H. A., ELVEHJEM, C. A.: *Ann. Rev. Biochem.* **14**, 1—30 (1945).
- LARDY, H. A., FERGUSON, S. M.: *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 991—1034 (1969).
- LARDY, H. A., WELLMAN, H.: *J. Biol. Chem.* **201**, 357—370 (1953).
- LEE, C. P., ERNSTER, L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 523—529 (1965).
- MACLENNAN, D. H.: *Current Topics in Membranes and Transport* (Bronner, F. and Kleinzeller, A., eds.), vol. **1**, p. 177—232, Acad. Press, New York (1970).
- MACLENNAN, D. H., ASAI, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 441—447 (1968).
- MACLENNAN, D. H., TZAGOLOFF, A.: *Biochemistry* **7**, 1603—1610 (1968).
- MACLENNAN, D. H., SMOLY, J. M., TZAGOLOFF, A.: *J. Biol. Chem.* **243**, 1589—1597 (1968).
- MCCARTY, R. E., PITTMAN, P. R., TSUCHIYA, Y.: *J. Biol. Chem.* **247**, 3048—3051 (1972).
- NELSON, N., NELSON, H., RACKER, E.: *J. Biol. Chem.* **247**, 6506—6510 (1972).
- NELSON, N., NELSON, H., RACKER, E.: *J. Biol. Chem.* **247**, 7657—7662 (1972).
- NELSON, N., RACKER, E.: *Biochemistry* **12**, 563—568 (1973).
- PACKER, L.: *Exp. Cell Res.* **15**, 551 (1958).
- PEDERSON, P. L., LEVINE, H., CINTRÓN, N.: *J. Biol. Chem.*, in the press.
- PENEFSKY, H. S., PULLMAN, M. E., DATTA, A., RACKER, E.: *J. Biol. Chem.* **232**, 3330—3336 (1960).
- PENEFSKY, H. S., WARNER, R. C.: *J. Biol. Chem.* **240**, 4694—4702 (1965).
- PULLMAN, M. E., MONROY, G. C.: *J. Biol. Chem.* **238**, 3762—3769 (1963).
- PULLMAN, M. E., PENEFSKY, H. S., DATTA, A., RACKER, E.: *J. Biol. Chem.* **232**, 3322—3329 (1960).
- RACKER, E.: *Mechanisms in Bioenergetics*, Acad. Press, New York (1965).
- RACKER, E.: *Membranes of Mitochondria and Chloroplasts* (Racker, E., ed.), p. 127—171, Van Nostrand Reinhold Company, New York (1970).
- RACKER, E., HORSTMAN, L. L.: *J. Biol. Chem.* **242**, 2547—2551 (1967).
- RYRIE, I., JACENDORF, A. T.: *J. Biol. Chem.* **247**, 4453—4459 (1972).
- M. SATRA and M. B. DE JERPHANION: *Abstracts 9th FEBS Meeting, Budapest* p. 272 (1974).
- SELWYN, M. J.: *Biochem. J.* **105**, 279—288 (1967).
- STOCKDALE, M., SELWYN, M. J.: *Eur. J. Biochem.* **21**, 416—423 (1971).
- SIEKEVITZ, P., LÖW, H., ERNSTER, L., LINDBERG, O.: *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 378—391 (1958).
- SENIOR, A. E.: *Biochemistry* **12**, 3622—3627 (1973).
- SENIOR, A. E.: *Biochim. Biophys. Acta* **301**, 249—277 (1973).
- SENIOR, A. E., BROOKS, J. C.: *Arch. Biochem. Biophys.* **140**, 257—266 (1970).
- SENIOR, A. E., BROOKS, J. C.: *FEBS Lett.* **17**, 327—329 (1971).
- SENIOR, A. E.: *J. Bioenerg.* **2**, 141—150 (1971).
- SLATER, E. C.: *Comp. Biochem.* **14**, 327—396 (1966).
- STEKHOVEN, F. S., WAITKUS, R. F., VAN MOERKERK, H. TH. B.: *Biochemistry* **11**, 1144—1150 (1972).
- SWANSON, M. A.: *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 85—91 (1956).
- TZAGOLOFF, A.: *J. Biol. Chem.* **244**, 5020—5026 (1969).
- TZAGOLOFF, A.: *J. Biol. Chem.* **246**, 3050—3056 (1971).
- TZAGOLOFF, A.: *Current Topics in Membranes and Transport* (Bronner, F. and Kleinzeller, A., eds.), vol. **2**, p. 157—205, Acad. Press, New York (1971).
- TZAGOLOFF, A., BYNGTON, K. H., MACLENNAN, D. H.: *J. Biol. Chem.* **243**, 2405—2412 (1968).
- TZAGOLOFF, A., MEACHER, P.: *J. Biol. Chem.* **246**, 7328—7336 (1971).
- TZAGOLOFF, A., MEACHER, P.: *J. Biol. Chem.* **247**, 594—603 (1972).
- TZAGOLOFF, A., RUBIN, M. S., SIERRA, M. F.: *Biochim. Biophys. Acta* **301**, 71—104 (1973).
- VAN DE STADT, R. J., KRAAIPOEL, R. J., VAN DAM, K.: *Biochim. Biophys. Acta* **267**, 25—36 (1972).
- WARSHAW, J. B., LAM, K. W., NAGY, B., SANADI, D. R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **123**, 385—396 (1968).