

# MIKROORGANIZMUSOK SZÉNHIDRÁTTRANSPORTJA

## II. BAKTÉRIUMOK

DEÁK TIBOR és NOVÁK ERVIN KÁROLY

Kertészeti Egyetem, Mikrobiológiai Tanszéki Csoport, Budapest és  
Országos Közegészségügyi Intézet, Mykológiai Osztály, Budapest

### 1. Bevezetés

Talán nem túlzás azt állítani, hogy a baktériumok transzportfolyamatainak kutatása, más sejttípusokkal összevetve, napjainkig a legtöbb eredményre vezetett; a sejtek membrántranszport-folyamatainak ez az a területe, amelyről eddig a legtöbb ismerettel rendelkezünk. Ezért e terület áttekintése érdeklődésre tarthat számot minden kolléga részéről, aki valamilyen vonatkozásban transzportjelenségekkel foglalkozik.

A baktériumtranszport problémája azonban, minden eddigi eredmény ellenére is, közel sem tisztázott. Látni fogjuk, milyen nagy hézagok vannak még ismereteinkben, mennyi még nem tisztázott kérdés merült fel, milyen ellentmondások vannak az eddigi eredmények között is. A világszerte hatalmas arányokban folyó kutatás azonban szinte napról napra újabb részleteket tár fel e területen, a kép gyorsan és állandóan változik, nyomon követése alig lehetséges. A referáló meg sem kísérli az évenkénti, akár ezernyi közlemény összefoglalását, és a továbbiakban jórészt az utóbbi két év nagyobb összefoglaló munkáira támaszkodik. Azonban ezek száma is több mint egy tucat, még erről a viszonylag jól körülhatárolható területről is; ezek bőségesen tartalmaznak hivatkozást az eredeti közleményekre (1, 6, 8, 12, 14, 17, 21, 22, 27, 28, 33, 34, 36).

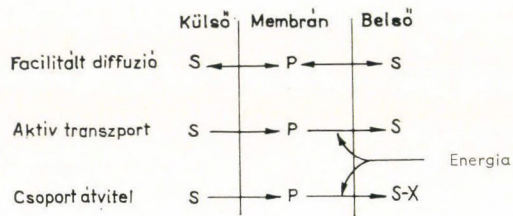
A fentiek és természetesen saját, még szűkebb érdeklődési-kutatási területünk az, ami arra készítetett, hogy a baktériumok transzportjelenségei köréből is csak egy részt ragadjunk ki: a cukrok transzportjának területét. Úgy véljük azonban, hogy ez a terület kellően reprezentálja a baktériumtranszport egészét, hiszen alkalmat ad mind a különböző, a baktériumokból eddig megismert transzport-típusnak a vizsgálatára, mind pedig azoknak a speciális kutatási módszereknek az áttekintésére, amelyeknek oly sok eredmény köszönhető. E módszereket egy-egy példával illusztráljuk a későbbiekben.

A baktériumtranszport vizsgálatára alkalmazott módszerek három fő csoportba sorolhatók. Mint a transzportjelenségek kutatásánál általában, a baktériumoknál is, a kinetikai vizsgálatok, modellek jelentették az első megközelítést és szolgáltatták a közvetett bizonyítékot a membránban lokalizált,

hipotétikus karrierek működésére (1, 17). Azonban már az első időszakban megkezdődött és máig fokozódó mértékben folyik a genetikai technika alkalmazása a baktériumtranszport vizsgálatára (15, 21). Ezek a genetikai módszerek, lényegében a mutánsok előállítása és vizsgálata eredményezték a döntő áttörést a fronton, és szolgáltatott olyan eredményeket, amelyekkel a baktériumtranszport ismerete megelőzött minden más sejttípust. A módszerek harmadik csoportja, a különböző biokémiai technikák, az előzőekkel összekapcsolva, eredményezték, hogy ma már fogalmat alkothatunk a baktériumtranszport molekuláris alapjairól is (7, 8, 12, 33).

## 2. A transzport módjai és elnevezésük

Tekintsük át röviden, milyen transzport-típusokkal találkozunk a baktériumoknál, és ezzel kapcsolatban meg kell említenünk néhány terminológiai, ill. szemantikus problémát is. A baktériumoknál háromféle transzport-típusról szokás beszélni (1. ábra).



1. ábra. Transzport rendszerek. Az oldott anyag nagy vagy kis koncentrációját a membrán két oldalához viszonyítva nagy-, ill. kisbetűk jelzik.

A facilitált diffúzió közismert fogalom. Olyan transzportot értünk alatta, melyben mobil karrier vesz részt, következképp sztereospecifikus és telítődési kinetikájú, mozgatóereje pedig a membrán két oldalán mutatkozó elektrokémiai vagy koncentrációkülönbség (gradiens), következképp csak kiegyenlítődésegig folyik, ekvilibriumnál (steady state-nél) a transzportált anyag koncentrációja a membrán két oldalán egyenlő.

Az aktív transzport alapvető jellemzői azonosak a facilitált diffúzióval, azzal a lényeges eltéréssel, hogy a transzport a gradienssel szemben (uphill) is végbemegy, ehhez anyagcsere-energia szükséges. Az aktív transzport energia-kapcsolata az egyik legproblematisabb terület, amelyet később részletezünk.

A harmadik transzport-típus, a csoport átvitel (group translocation) különleges jelenség, és más sejttípusokra vonatkozó minden korábbi elképzelés ellenére is, ma még csak a baktériumoknál bizonyított egyértelműen. Lényege, hogy a transzportált anyag a folyamat során megváltozott, átalakult formában kerül a membrán másik oldalára. Az anyag kémiai átalakulása tehát

együtt jár a membránon való átjutással. Gyakran alkalmazzák e folyamatra a vektoriális transzlokáció kifejezést is. Aktív transzport-e a csoportátvitel? Abban az értelemben igen, hogy az anyagsere-energiától függ, abban az értelemben azonban nem, hogy gradienssel szemben, uphill történne, hiszen nem az eredeti anyag, hanem egy származéka akkumulálódik a sejtben.

Az aktív transzport értelmezésével kapcsolatos problémák miatt törekvések történtek újabb, általános terminológia bevezetésére. STEIN (36) három kategóriát használ: passzív diffúzió, facilitált diffúzió és aktív transzport. Utóbbinak két típusa lehet az energiaközvetítés módja szerint: *a*) elsődleges aktív transzport az, amelyben valamilyen energiatermelő reakció közvetlenül kapcsolódik egyetlen anyag uphill transzportjához; *b*) másodlagos aktív transzport az, amelyben az egyik anyag uphill mozgásához az energia közvetve, egy másik anyag transzportjából létrejött gradienstől származik.

MITCHELL (23) némileg más értelemben használja a primary és secondary translocation fogalmát. Szerinte elsődleges átvitel az, amely közvetlenül kapcsolódik valamilyen biokémiai reakcióhoz. Két típusa lehet: *a*) group translocation-nál maga a szubsztrát változik meg, *b*) enzyme linked solute translocation-nak nevezi azt, amelynél maga a szubsztrát nem változik meg, de átvitele egy biokémiai reakció következménye. Példaként az állati sejtek Na, K-ATPázát említi. A másodlagos átvitel vagy nincs, vagy csak közvetve van kémiai reakcióhoz kötve. Három típusa lehet: *a*) uniport, amelynél csak egyetlen szubsztrát ekvilibriumig történő mozgásáról van szó; ez megfelel a facilitált diffúciónak. *b*) symport, amelynél az egyik szubsztrát ekvilibrlódása egy másik szubsztrát ugyanolyan irányú mozgásához kötődik, és az egyik gradiens menti átvitele a másikat, ugyanazzal a karrierrel, akár uphill is mozgathatja. Végül *c*) antiport esetében az egyik szubsztrát mozgása egy másiknak az ellentétes irányú mozgásához kötődik, ez megint eredményezhet uphill átjutást is. A symport megfelel a cotransportnak, az antiport pedig a countertransportnak.

Kissé eltértünk eredeti tárgyunktól, mindennek az említése csak azért volt szükséges, mert az irodalomban hol ezzel, hol azzal a kifejezéssel találkozunk, és olykor valóban nehéz eldönteni, a részletek alapos vizsgálata nélkül, hogy miről is van szó. Különösen, ha olyan mindennapos, de mégis semmitmondó terminusszal találkozunk, mint pl. „koncentratív transport”, amelynél csak azt lehet tudni, hogy akkumuláció van, de a mechanizmusáról semmit.

Sajnos, legalábbis a baktériumok esetében, hasonló konfúzió uralkodik a transzport rendszer membrán-komponensének elnevezését illetően is. Az első, klasszikus közleményekben (2) bevezetett „permeáz” nevet, magát a fogalmat is, számosan támadják, helyette porter, transporter és más kifejezéseket ajánlanak, hogy elkerüljék a permeázhoz asszociált enzimes aktivitást, minthogy e membránkomponens, ha fehérje is, nem szükségszerűen enzim, bár katalitikus aktivitása, vagyis a transzport meggyorsítása a passzív diffúzióhoz

képezt nyilvánvaló. A permeáz nevet azonban széltében-hosszában ma is használják, úgyhogy végképp nem lehet tudni, vajon az egész transzport-rendszert jelenti-e, vagy annak csak azt a részét, amely sztereospecifikus és a szubsztráttal komplexet képez. A zavart csak fokozza, hogy utóbbi esetben feltételeznek egy további komponenst is, ami vagy az energiát közvetíti a komplexhez, vagy maga, aktivált formában, átveszi a szubsztrátot a permeáz-tól. E komponens az egyik modellben a transporter, a másikban a karrier. A leghomályosabb probléma pedig az, hogy a baktérium-membránból izolált különböző proteineket, amelyekről szó lesz, ma még aligha lehet a permeázzal, transporterrel vagy karrierrel azonosítani.

### 3. A baktériumok cukortranszportjának áttekintése

Hogy a részletekben el ne vesszünk, az áttekintést nem az eddig vizsgált különböző baktériumfajok, ill. különböző szénhidrátok szerint végezzük, hanem a transzport típusa szerint. Csak a két legjobban ismert, vagy inkább legrészletesebben vizsgált területre szorítkozunk, nevezetesen a foszfortranszferáz rendszerre, mint a group translocation példájára, valamint a béta-galaktozid permeáz rendszerre, mint a facilitált diffúzióra épülő aktív transzport példájára.

E tárgyalásmód az általánosítás veszélyét rejtheti magában. Ezt elkerülendő, annyit meg kell jegyeznünk, hogy a több ezer baktériumfajból, amelyek igen széles anyagcsere-spektrumot képviselnek — több egészen különlegeset is, utalva pl. a kemoautotrófiára —, csak mintegy 10—15 fajról van valamennyire részletesebb ismeretünk. Köztük van természetesen az *Escherichia coli*, amelyről viszont annál többet tudunk. Ugyancsak jól ismert az *E. coli*-hoz hasonló, Gram-negatív *Salmonella typhimurium*, valamint a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* cukortranszportja. Szórványosabb adatok vonatkoznak néhány más fajra, mint az *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, a többi, eddig csak alkalmanként vizsgált néhány faj említése aligha szükséges.

A vizsgált szénhidrátok spektruma a glükózzal, galaktózzal és egyéb hexózokkal kezdve, felöleli a diszacharidokat (laktóz, melibióz, maltóz), pentózokat, cukoralkoholokat, cukorfoszfátokat, aminocukrokat és számos olyan cukorszármazékot, analógot, amelyek nem is természetes szubsztrátok, de amelyek vizsgálata lényeges megállapításokhoz segítette a kutatókat.

Az általánosítás annál is kevésbé lehetséges, mivel az már a viszonylag kis fajspektrumot tekintve is világos, hogy nemcsak különböző nemzetségek, hanem egy nemzetségen belüli fajok is eltérő transzportmódokat képviselnek. Pl. a *Staph. aureus* valószínűleg minden cukrot csoportátvitellel transzportál, a *Ps. aeruginosa*-nál csak facilitált diffúziót írtak le, az *E. coli*-nál és a *S. typhi-*

*murium*-nál viszont mindhárom típus: facilitált diffúzió, aktív transzport és csoportátvitel is megtalálható. Továbbá, ugyanazt a cukrot más fajok különbözőként transzportálhatják, pl. a laktózt a *Staph. aureus* csoportátvitellel, az *E. coli* aktív transzporttal, egyes *E. coli* mutánsok viszont facilitált diffúzióval. Még további variáció, hogy ugyanazt a cukrot, ugyanabban a szervezetben, több transzport-rendszer is transzportálhat, pl. a galaktóz transzportjára *E. coli*-ban eddig négy külön rendszert azonosítottak (28, 32, 33).

#### 4. A béta-galaktozid permeáz rendszer

Hogy valamelyest a kronologikus sorrendet is kövessük, elsőként az *E. coli* béta-galaktozid transzportját tekintjük át. Ennek és általában a baktériumtranszport problematikájának megközelítéséhez természetesen fiziológiai megfigyelések vezettek, mint a diauxiás növekedés, az enzimindukció és represszió, valamint a kriptikusság jelenségei (15). E vizsgálatok már a negyvenes évektől az *E. coli* laktóz, általában béta-galaktozid felhasználása köré csoportosultak, és már akkor nagy jelentőséget nyert a mutánsok alkalmazása.

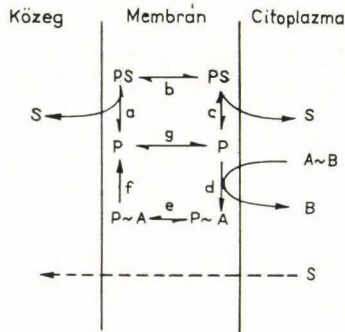
A specifikus transzport rendszerek feltételezésének közvetlen előzménye a kriptikus mutánsok felfedezése és vizsgálata volt. A kriptikusság jelensége, mint ismeretes, az, hogy egy intakt sejt nem képes bizonyos szubsztrát, pl. egy adott cukor felhasználására, jöllehet a sejthomogenizátum tartalmazza a bontáshoz szükséges enzimeket. Következésképp az adott cukor nem juthatott be a sejtbe, arra a membrán impermeabilis volt. Különösen izgalmas problémát jelentett a szelektív kriptikusság jelensége: pl. egy *E. coli* mutáns nem növekedett laktózon, arra kriptikus volt, de glükózt, maltózt és más cukrokat felhasznált. Következésképp, ha a kriptikusság a membrán impermeabilitásának tulajdonítható, akkor azok a cukrok, amelyek felhasználnak, csak specifikus felvételi rendszerrel juthatnak át rajta. A szelektív kriptikusság különösen érdekes példája volt az a mutáns, amelyik maltózon növekedett, de glükózon nem, jöllehet a maltóz felhasználás glükózzá való hidrolízisen át történik, és a sejtek tartalmaztak hexokinázt is. Következésképp a mutáns deficiens volt a specifikus glükóz felvételben.

Ezek a vizsgálatok, amelyben vezető szerepet a Pasteur Institute munkatársai játszottak (2, 3, 13, 31), vezettek végül is, az ötvenes évek elején, az indukálható béta-galaktozid transzport rendszer elkülönítéséhez a hidrolizáló béta-galaktozidáz enzimtől, és COHEN és MONOD ma már klasszikus közleményében (2), 1957-ben nyert bevezetést a permeáz rendszer fogalma.

A béta-galaktozid permeáz rendszer vizsgálatában nagyszámú kutató működött közre és vesz részt ma is. A kísérletek részleteitől tekintsünk el és foglaljuk össze a mai helyzetet, jórészt KEPES újabb reviewja alapján (14). A metodikai részletekről csak annyit, hogy a genetikailag jól jellemzett mután-

sok mellett nagy jelentősége volt a nem metabolizálódó béta-galaktozid analógok, mint pl. az o-nitrofenil-béta-galaktozid, tiometil-béta-galaktozid stb. alkalmazásának.

A számos modell közül, amelyet a béta-galaktozid transzport értelmezésére kidolgoztak, álljon itt az egyik legáltalánosabb, amely egyes részleteket ugyan elhagy, de ezért egyszerűen áttekinthető (2. ábra). Lényegében a jól



2. ábra. A  $\beta$ -galaktozid transzport kinetikus modellje. KEPES (14) szerint. P, permeáz vagy karrier; A ~ B, hipotétikus energia donor; P ~ A, a permeáz energizált formája; S, szubsztrát; szaggatott vonal, különböző nem specifikus exit folyamatok

ismert karrier-mediált transzport modelltől van szó, éppen csak a szubsztráttal reverzibilis komplexet képező, sztereospecifikus membránkomponenst itt nem karriernek, hanem permeáznak nevezik. Ez az indukálható permeáz-protein genetikailag jól jellemzett, a lac operon y cisztronjának terméke. A permeáz deficiens,  $y^-$  mutánsok kriptikusak.

A mai felfogás szerint a béta-galaktozid transzport normál esetben, tehát anyagcserét folytató, genetikailag komplett (wild-típusú) sejtekben, olyan aktív transzport, ami energiakapcsolás révén a facilitált diffúzióra épül. Anyagcseregátlószer (pl. azid, DNP) jelenlétében a szubsztrát facilitált diffúzióval jut be, ekvilibrlódik, kimutatható a counterflow és az exchange diffusion jelensége, az előzetesen akkumulált szubsztrát (pl. a nem metabolizálódó tiometil-béta-galaktozid) pedig gyors efflux-szal kiürül a sejtől. A permeáz anyagcsere-kapcsolata tehát fakultatív, vannak olyan mutánsok, amelyek energiakapcsolása deficiens, ezek egyáltalán nem akkumulálnak béta-galaktozidokat, de facilitált diffúzióval továbbra is felveszik. Ha azonban az energiakapcsolat megvan és a metabolizmus nem gátolt, akkor a transzport aktív és a szubsztrát akkumulálódik, az akkumuláció mértéke a szubsztráttól és a körülményektől függően változik, 1 : 2000 is lehet.

A modell érdekessége, hogy az energiakapcsolás a membrán belső felületénél történik, és ez a permeáz úgy változtatja meg, hogy annak affinitása csökken, tehát a szubsztrát a sejtben akkumulálódik. Amikor a permeáz a membrán külső felszínéhez kerül, az aktivált forma ismét átalakul nagyobb

affinitásúvá és újabb szubsztrát molekulát köt meg. Azt, hogy az aktivált permeáz affinitása csökken, igazolják a kinetikus mérések, amelyek szerint metabolizáló sejteknél az efflux  $k_M$ -je 25-ször kisebb, mint az influxé, de uncoupler jelenlétében a két folyamat  $k_M$ -je azonos. Az energiakapcsolás tehát csak az akkumulációhoz szükséges, a transzport maga anélkül is folyik.

Ez a modell jórészt konzisztens a kísérleti eredményekkel, amelyek közt némi ellentmondás csak az exit folyamatra vonatkozóan van. Ezt a modellt különböző variánsai igyekeznek értelmezni, amelyeket itt nem tárgyalunk (4, 13, 16, 40).

Napjainkban a béta-galaktozid transzport fő problémája az, hogy honnan származik az energia és hogyan kapcsolódik a transzport rendszerhez. Erre a kérdésre később visszatérünk (l. 9. pont).

Jelentős fejleménye volt a béta-galaktozid transzport kutatásának, amikor 1965-ben KENNEDYnek és munkatársainak sikerült a membránból egy olyan frakciót izolálni, amely azonosítható volt a béta-galaktozid permeázzal (4, 12). Sikerüket egy szellemes, kettős izotóp-jelölési eljárásnak köszönhetik, amelyet érdemes röviden vázolni. N-etilmaleimid (NEM), mint általános proteinalkiláló ágens, blokkolja a béta-galaktozid transzportot, de ezt a gátlást tiodigalaktoziddal (TDG) ki lehet védeni. Ennek alapján KENNEDYék indukált és nem indukált *E. coli* sejtek minden fehérjéjét jelzetlen NEM-mel reagáltatták, TDG jelenlétében, hogy a transzport-proteint védjék. Ezután a NEM-et és a TDG-t eltávolítva, az indukált sejtekhez  $^{14}\text{C}$  NEM-et, a nem indukáltakhoz  $^3\text{H}$  NEM-et adtak. A transzport-protein így tartalmazhat  $^{14}\text{C}$ -t, de  $^3\text{H}$ -t nem, míg a többi proteinben mindkét izotópnak egyformán kell megjelennie. A két szuszpenziót összekeverték, homogenizálták és fracionálták. A membránpreparátumból detergensekkel egy olyan protein-frakciót tudtak elkülöníteni, mely, mint várták, nagyobb  $^{14}\text{C} : ^3\text{H}$  arányt mutatott, mint az egyéb fehérjefrakciók. Ezt a proteint a későbbiekben sikerült teljesen megtisztítani és jellemezni; molsúlya 30 000 körüli. A protein affinitása TDG-ra hasonló volt az intakt sejtek transzport rendszerének  $k_M$ -jéhez. Transzport negatív mutánsokból és indukátlan sejtekből ez a protein teljesen hiányzik. A membránhoz való erős kapcsolódása miatt M-proteinnek nevezték el, és ezt az M-proteint ma egyértelműen a galaktozid-permeázzal azonosítják (12). Jóllehet az nyilvánvaló, hogy az M-protein a transzport rendszer része, a dolog szépséghibája, hogy az alkalmazott N-etilmaleimides jelölési technika miatt az izolált protein éppen a béta-galaktozid transzport rendszer természetes szubsztrátjaira, köztük a laktózra, inaktív.

## 5. Egyéb permeáz rendszerek

A hatvanas évek közepéig több más szénhidrát-permeáz rendszert írtak le baktériumokból (I. táblázat). *E. coli*-ből az eredeti laktóz transzport rendszer mellett, amelyet tiometilgalaktozid I rendszernek is neveznek, egy másik,

## I. táblázat

*Escherichia coli* K12 törzsek egyes cukor permeázainak inducer (I) és a szubsztrát (S) specifikitása (Hatásosság relatív egységekben)

Cukor	Galaktóz permeáz*		Metilgalaktózid permeáz		Metiltiogalaktózid permeáz I		Metiltiogalaktózid permeáz II	
	I	S	I	S	I	S	I	S
D-Galaktóz	100	100	2	?	+	?	18	?
Metilgalaktózid	32	1	10	100	—	3	0	84
Metiltiogalaktózid	27	0	13	4	+	20	0	100
Laktóz	—	0	—	3	—	100	—	3
o-Nitrofenilgalaktózid	—	0	—	0	—	—	0	0
D-Fukóz	60	0	100	12	?	3	0	0
Melibióz	85	—	18	—	+	—	100	—

\* D-arabinóz, L-arabinóz, L-galaktóz és maltóz is indukálja

tiometilgalaktózid II rendszert is elkülönítettek, amelynek elsődleges inducere a melibióz. Egy további, ún. béta-metil-galaktózid transzport rendszert galaktóz és D-fukóz indukál, ez a permeáz ezeken kívül glükózt is transzportál. A galaktóz, bár mindhárom eddig említett transzport rendszer szubsztrátja, egy további, specifikus galaktóz permeázzal is transzportálódik. Ugyancsak *E. coli*-ből több más, indukálható, aktív permeáz rendszert írtak le, így a maltózra, arabinózra, ribózra, glükuronsav észterekre, sőt, hexózfoszfátokra. Mindezekkel szemben egy konstitutív transzport rendszer is ismertté vált. Ez az alfa-glükózid permeáz rendszer, amely glükózt, alfa-metilglükózidot, mannózt, 2-dezoxiglükózt és több más glükózszármazékot transzportál. Emellett azonban egy másik, konstitutív, de szűkebb specifikitású glükóz permeáz rendszert is valószínűsítettek. Meg kell jegyeznünk, hogy mindezeket a permeáz rendszereket nem egyetlen és ugyanazon törzsből írták le, hanem a leggyakrabban vizsgált K12 törzs mellett több más törzs is szerepelt a vizsgálatokban. Mégis, egy adott törzsnél is több és egymást átfedő specifikitású szénhidrát transzport rendszer vált ismertté, hasonlóan az aminosav permeáz rendszerekhez (14, 15, 17, 27, 28).

Azonkívül azonban, hogy ezeket a permeáz rendszereket különböző szubsztrát és inducer specifikitásuk alapján el lehetett különíteni, köztük, a transzport mechanizmusában, vajmi kevés hasonlóság mutatkozott, talán a legfontosabb az volt, hogy DNP és más inhibitorok valamennyinél gátolták az akkumulációt. Különösen kivált a sorból a glükóz, ill. alfa-glükózid transzport rendszer. A kép még zavarosabbá vált, ha az *E. coli* különböző törzseivel kapott, többé-kevésbé hasonló eredményeket más fajok transzport jellemzőivel vetették össze. Leginkább még a *S. typhimurium* és az *A. aerogenes* bizonyult némiképp az *E. coli*-hoz hasonlóknak, de a *Str. faecalis* már másként, a *Staph. aureus* pedig homlokegyenest ellenkezőként viselkedett.

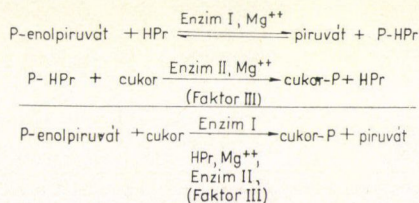


Ebben az időben azonban az *E. coli* béta-galaktozid permeáz rendszer kimerítő elemzésére alapozott permeáz-hipotézis annyira dominált, hogy igyekeztek azt a baktériumok transzportjára általánosítani. (Érdeemes megjegyezni, hogy hasonló helyzet állt elő élesztőgombáknál is, a *Saccharomyces cerevisiae* transzport jellemzőinek általánosításával.) Minden ellentmondás ellenére az nyilvánvaló volt, hogy a baktériumok aktív szénhidrát transzport rendszere nem azonos egyik, akkor már jól jellemzett és ismert sejtípus cukortranszport rendszerével sem: a vörösvértesteknél a cukrok transzportja facilitált diffúzióval történik, számos más szöveti sejtípusnál pedig az aktív cukortranszport a Na-pumpával kapcsolódik (17, 35, 36).

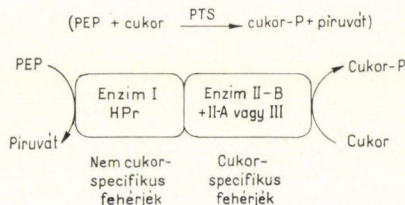
### 6. A foszfortranszferáz rendszer

A baktériumok cukortranszportjáról alkotott képet alapjaiban változtatta meg a foszfortranszferáz rendszer felfedezése és a cukortranszportban való szerepének kimutatása. E felfedezés KUNDIG, ROSEMAN és munkatársaik nevéhez fűződik, erről szóló első közleményük 1964-ből való (18). A további kronológiai ismertetés helyett legyen szabad itt ismét mai ismereteink alapján összefoglalni a foszfortranszferáz rendszer mibenlétét és működését (9, 28, 33, 34).

A foszfortranszferáz rendszer a transzport group translocation típusa. Működésének lényege, hogy a cukrokat nemcsak transzportálja, hanem egyúttal a cukormetabolizmus első lépését, a foszforilációt is elvégzi. A folyamatban a foszfát-donor a foszfoenolpiruvát (PEP), amelyről a foszfát, legalább négyféle protein közvetítésével, a cukormolekula 6-os szénatomjára megy át (a fruktóz kivételével, amely C1 helyzetben foszforilálódik). (3. ábra) (4. ábra)



3. ábra. A foszfortranszferáz rendszer reakciósémája



4. ábra. Foszfát átvitel a foszfortranszferáz rendszerben

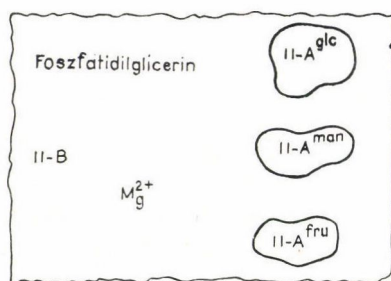
## II. táblázat

A foszotranszferáz rendszer néhány cukor-specifikus fehérjéje

Rendszer	Cukor	Fehérjék	
		Membránban	Oldhatók
II-A, II-B <i>E. coli</i> , konstitutív	Glükóz Fruktóz Mannóz	II-A <sup>glc</sup> , II-B II-A <sup>fru</sup> , II-B II-A <sup>man</sup> , II-B	
III, II-B a. <i>E. coli</i> , konstitutív b. <i>S. aureus</i> , induktív	Glükóz Laktóz	II-B <sup>glu</sup> . II-B <sup>lak</sup> .	III <sup>glu</sup> . III <sup>lak</sup> .

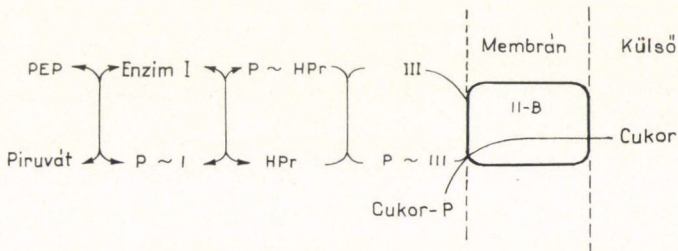
A reakciósorozat első részében két, konstitutív, nem cukor-specifikus protein vesz részt, jelzésük Enzim I és HPr. Az Enzim I katalizálja a foszfát átvitelét a PEP-ről a HPr-re. A HPr (heat stabile protein) elnevezése onnan származik, hogy első, még nem tiszta formája hőstabilnak tűnt. A ma már megtisztított fehérjéről kiderült, hogy 100 °C-on aktivitását veszti, kiderült azonban az is, hogy az átvett foszfát csoport a fehérje egy hisztidinjéhez kötődik, így, véletlenül, a HPr jelzés mégis értelmes. Mind az Enzim I, mind a HPr oldható fehérjék.

Az eredetileg Enzim II-vel jelzett fehérje komplexet ma már több frakcióra bontották (II. táblázat). A foszfát csoportnak a HPr-ről a cukorra való átadásában és egyúttal a cukor transzportjában legalább két komponens vesz részt, amelyek közül legalább az egyik membrán-kötött. Az Enzim II komplex cukorspecifikus, lehet konstitutív vagy induktív. A membránt oldószerekkel és detergenssekkel kezelve a komplex IIA és IIB frakciókra különíthető, utóbbi erősebben membrán-kötött. A IIA-t sikerült további három, cukorspecifikus proteinre bontani *E. coli*-nál. A foszfátátvitelhez és transzportozhoz mindkét, A és B frakció szükséges, továbbá  $Mg^{2+}$  és foszfatidilglicerin is (5. ábra). Egyes esetekben a membránban csak IIB protein található, de akkor ehhez egy másik, oldható, cukorspecifikus protein tartozik, amelyet Faktor III-mal jeleznek. A membrán-kötött IIA és az oldható Faktor III funkcionálisan azonosak. *E. coli*-ban a két konstitutív glükóz-foszotranszferáz rendszer meg-

5. ábra. Az *E. coli* konstitutív Enzim II komplexének sematikus szerkezete

felel a korábban leírt két permeáz rendszernek. A *Staph. aureus* foszfortranszferáz rendszere a laktózt is foszforilálja, az itt szereplő Faktor III-ról mutatták eddig ki, hogy foszforilálódik. Valószínűleg a HPr-rel analóg foszfát-karrier, de molsúlya annak valamivel több mint háromszorosa, viszont három szubunitra disszociálható és egyszerre három HPr-ről vesz át foszfát csoportokat.

A teljes reakciósorozatot a 6. ábrában foglaljuk össze. Ez minden eddig vizsgált esetben igazolt a HPr-proteinig. Még nem ismeretes azonban, hogy a *Staph. aureus* laktóz Faktor III proteinjén kívül más cukrok specifikus Faktor III vagy Enzim IIA proteinjei is foszforilálódnak-e?

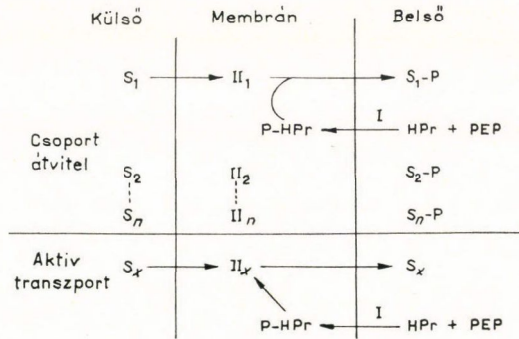


6. ábra. A foszfortranszferáz rendszer összefoglaló sémája

A foszfortranszferáz rendszert eddig kimutatták az *E. coli*-ból, a *S. typhimurium*-ból, *Staph. aureus*-ból, *A. aerogenes*-ből, *B. subtilis*-ből és *Lactobacillus*-ból. A transzportált cukrok spektruma nagyon hasonló a Gram-negatív bélbaktériumoknál, de ezektől jelentősen különbözik a *Staph. aureus*, amely, úgy tűnik, minden cukrot, köztük a laktózt is foszforilációval transzportál. Az *E. coli*-nál és rokonfajoknál a foszfortranszferáz rendszer szerepel a glükóz, fruktóz, mannóz, alfa-metilglükózid, hexózaminok, mannit, szorbit és egyéb cukoralkoholok felvételénél. Nem foszforilálódnak és aktív permeáz rendszerrel transzportálódnak viszont a diszaharidok, pentózok, hexózfoszfátok. A galaktóz, a körülményektől függően, mindkét módon transzportálódhat, míg a glicerin csak facilitált diffúzióval jut a sejtekbe. A foszfortranszferáz rendszer valószínűleg nem működik a *Ps. aeruginosa*-ban, amely csak facilitált diffúziót mutat, a *Str. faecalis*-nál pedig csak a glükóztranszportban igazolták részvételét (34).

A foszfortranszferáz rendszernek a cukortranszportban való szerepét a különböző hiánymutánsok egyértelműen igazolták. Olyan mutánsok, amelyek defektívek valamelyik cukorspecifikus Enzim II komponensben, nem tudják hasznosítani a vonatkozó egyetlen cukrot. Azok a mutánsok, amelyekben viszont az Enzim I vagy HPr hiányzik, egyáltalán nem hasznosítják a cukrok széles skáláját (7. ábra).

Ezek a kísérletek azonban néhány meglepő eredményt hoztak, és több, alapvető kérdést vetettek fel. Pl. a *S. typhimurium* egy mutánsa, amely



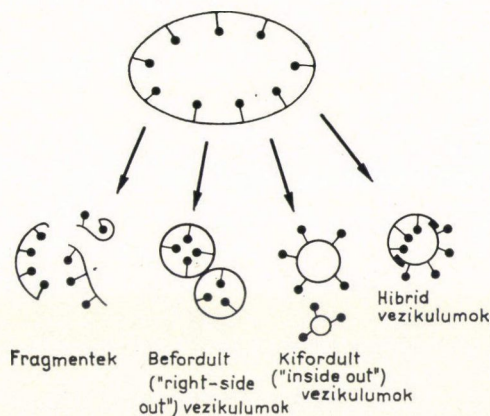
7. ábra. A foszfortranszferáz rendszer különböző működése a cukortranszportban.  $S_1, S_2, S_n$  és  $S_x$  különböző cukrok. Az ezeknek megfelelő cukorspecifikus protein párok (Faktor III + II-B vagy II-A + II-B) jelzése  $II_1, II_2, II_n$  és  $II_x$

Enzim I és HPr deficiens volt, egyáltalán nem vette fel az alfa-metilglükózidot, de ha a galaktóz specifikus Enzim II komponenst indukálták, a béta-metilgalaktozid facilitált diffúzióval ekvibrálódott. Az Enzim II komplex foszforiláció nélkül is transzlokál? Egyáltalán, a foszforiláció együttjár a transzlokációval és ahhoz nélkülözhetetlen? Ha igen, a foszfát-donor a szubsztrátot közvetlenül foszforilálja vagy a transzport protein közvetítésével? Még meglepőbb eredmény volt, hogy *E. coli* HPr és Enzim I mutánsai nem tudták felhasználni a laktózt, glicerint és több más olyan szubsztrátot, amelyek pedig nem is a foszfortranszferáz rendszerrel transzportálódnak. A foszfortranszferáz és a permeáz rendszerek közt tehát kapcsolat van? Az aktív transzporthoz szükséges energia talán a foszfortranszferáz rendszerből származik? Vagy a permeáz rendszer valamelyik komponense azonos az Enzim II komplex egy tagjával?

Az ilyen és hasonló felmerülő kérdésekre ma még csak részben adhatunk választ. A helyzet tisztázásához a baktérium transzport vizsgálatának két további megközelítési módja járult hozzá: az ozmotikus sokkolás módszere és a membrán vezikulumok preparálása, bár az ezekkel az eljárásokkal nyert eredmények újabb kérdéseket is felvetettek.

## 7. Membrán vezikulumok vizsgálata

Az állati sejtek tanulmányozásánál már korábban felhasznált membrán vezikulum (pl. erythrocyta ghosts) technikát KABACK és munkatársai alkalmazták baktérium sejtekre (11) (8. ábra). A sejtfalat penicillin kezelés után vagy lizozimmal eltávolítva a képződött szferoplasztokat lizálták, a membránpreparátum jórészt  $0,1-1,5 \mu$  átmérőjű, ozmotikusan aktív vezikulumokká záródott össze. A preparálás során a sejtprotein mintegy 85%-a elveszik, ezért



8. ábra. Membrán vezikulumok képződése és orientációja. A nyeles ATPáz partikulumok a membrán citoplazma oldalát jelzik

a vezikulumok metabolizmusa rendkívül redukált, pl. oxidatív foszforilációra és ATP szintézisre képtelenek, ez azonban a transzport vizsgálatához előnyös, mert számos zavaró anyagcsere-hatás kiküszöbölődik. Lényeges viszont, hogy energiaforrás hozzáadásával a vezikulumok oxidálnak és a vezikulumon belül szubsztrát akkumulációt lehet elérni. Transzport szempontjából tehát a vezikulumok jórészt megtartják az intakt sejtek legfőbb jellemzőit, pl. a transzport specificitását. Ha mutánsból készítették a vezikulumot, akkor az ugyanúgy transzport deficiensnek bizonyult, mint az intakt sejt. Természetesen a vezikulumok nem azonosak az intakt sejtekkel és ezért az ilyen vizsgálatokkal nyert megállapításokat csak bizonyos fenntartásokkal lehet interpretálni (8, 9).

A vezikulumok vizsgálata mindenesetre további bizonyítékot szolgáltatott a foszfortranszferáz rendszernek a cukortranszportban játszott szerepére. Pl. a felvett glükóz a vezikulum lumenében kizárólag foszforilált formában volt található. Ha a vezikulumokat előzetesen  $^{14}\text{C}$  glükózzal kezelték, majd externálisan  $^3\text{H}$  glükózt adtak, a keletkezett internális glükóz-6-foszfát kizárólag  $^3\text{H}$  jelzett volt, a  $^{14}\text{C}$  glükóz nem foszforilálódott. A transzlokációt csak PEP stimulálta, mintegy 25-féle vizsgált energiaforrás közül semmi más, így ATP, ADP sem volt hatásos. Enzim I és HPr deficiens mutánsokból preparált vezikulumok transzportját e proteinek hozzáadása visszaállította (8, 9). Ezek az eredmények magukért beszélnek.

Az előbbi kérdések közül tehát eldönthető az, hogy — legalábbis bizonyos szubsztrátoknál — a transzport valóban group translocation mechanizmussal történik: a transzlokáció a foszforilációval együtt jár. A foszfortranszferáz rendszer vektoriális foszforilációt végez. Továbbra sem világos azonban az, hogy meg lehet-e különböztetni a foszfortranszferáz rendszeren belül cukor-specifikus foszforiláló komponenst és vele szorosan kapcsolt, de nem, vagy nem annyira specifikus transzlokáló komponenst. Csak a *Staphylococcus*-nál

tudjuk, hogy a HPr a Faktor III-at foszforilálja, ez a cukor közvetlen foszfát donorja. Ez a foszforiláció és a transzlokáció az Enzim IIB-hez kötődve történik. *E. coli*-nál viszont nem ismert, bár valószínű, hogy az Enzim IIA cukorspecifikus frakciók foszforilálódnak-e? Ha az Enzim IIB frakció, amely a membrán-összfehérje 10%-át teszi ki, valóban homogén, úgy mindhárom eddig elkülönített IIA protein ugyanazt a IIB komponenst használja. Ez esetben a foszforiláció cukorspecifikus, de a transzlokáció nem. Ez viszont nehezen lenne összeegyeztethető azzal, hogy a IIB proteint a karrierrel vagy permeázzal azonosítsuk. A IIA protein pedig nem lehet a karrier, mert a vele funkcionálisan azonos Faktor III nem membrán-kötött. Ezt a problémát tovább tárgyalni ma még merő szemantizmus lenne, egyébként is, az bizonyos, hogy egyik frakció sem elegendő egyedül a vektoriális foszforilációhoz, hanem csak kettő együtt (IIA + IIB vagy Faktor III + IIB). Az mégsem kizárható, hogy a IIB protein foszforiláció nélkül is transzlokálhat, de csak facilitált diffúzióval.

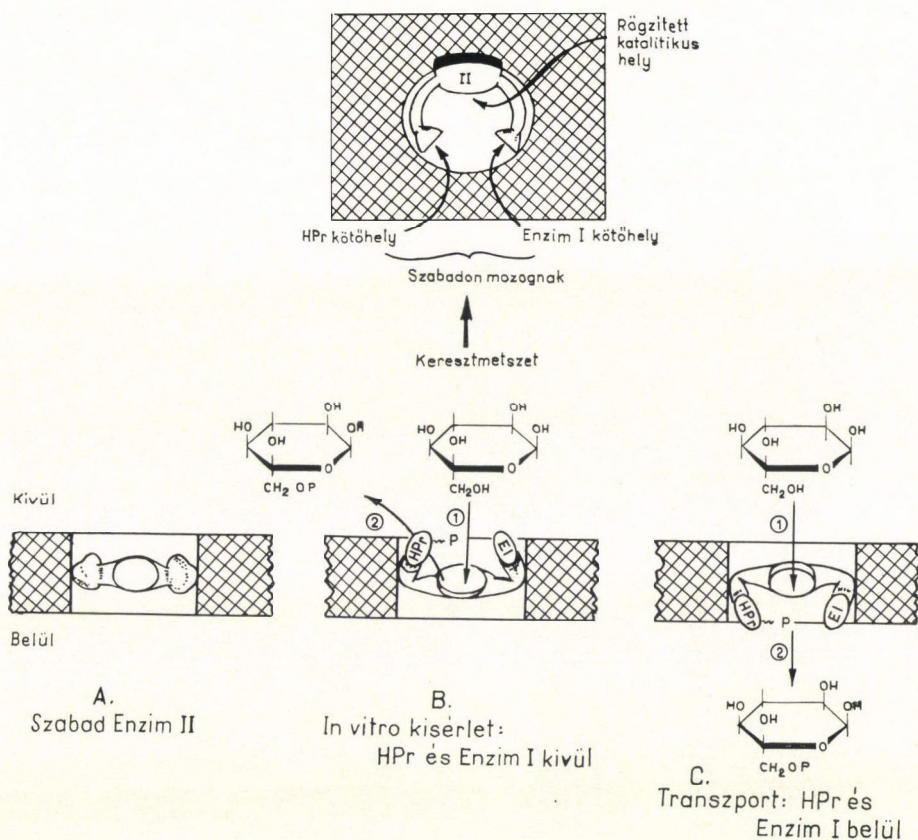
A foszfortranszferáz rendszerről eddig szerzett ismeretek alapján KABACK érdekes modellt állított fel a vektoriális transzlokáció szemléltetésére (8) (9. ábra). Ebben a modellben az Enzim II komplex szerepel, eltekintve annak további frakcióitól, mégpedig úgy, mint egy patkó alakú struktúra, amely a membránnak egy póruszerű területén helyezkedik el. Az Enzim II komplex katalitikus helye a patkó hajlatában van, ami a pórus falához kapcsolódik, míg a patkó szárai szabadon mozognak a membrán síkjára merőlegesen. Az egyik szár végén az Enzim I, a másikon a HPr kötődik. Ha ezek az Enzim II-höz kapcsolódnak, akkor az egész struktúra síkja a membránhoz viszonyítva befelé fordul. Ebben a konformációban, ha kívülről cukor kötődik a katalitikus helyhez, akkor az foszforilálódik és mint foszforilált származék kerül a membránon belülré.

Ez a modell számos kísérleti adattal összeegyeztethető és rendkívül szemléletes, mégis, csak egyike azoknak, amelyeket el lehet képzelni. Mások, pl. ROSEMAN (33) olyan modellt javasolnak, amelyben az Enzim II konformációs változása kapcsolódik a transzlokációs lépéshez. Mai ismereteink alapján annyi mindenesetre bizonyos, hogy az ilyen és hasonló elképzelések, amelyek tehát a karrier-protein molekula szerkezeti-konformációs változásain alapulnak, sokkal valószínűbbek, mint olyan karriert feltételezni, amely szabadon diffundál a membrán homogén lipidfázisában.

### 8. Ozmotikus sokkolás és a kötő-proteinek

A karrier-protein problémája szorosan kapcsolódik a másik, említett vizsgálati technika, az ozmotikus sokkolás módszerével megismert, ún. kötő-proteinek szerepének értelmezéséhez is.

HEPPEL és munkatársai írták le ezt a módszert (25, 26). Lényege, hogy fiatal, exponenciális fázisú sejteket hipertónikus szaharóz oldatba helyeznek,



9. ábra. Izolált baktérium membrán preparátumok vektoriális (= transzport) és nem vektoriális glükóz-foszforilációjának mechanizmusa. Sematikus modell KABACK (8) szerint

EDTA és Triszpuffer jelenlétében. Rövid inkubáció után a centrifugált sejtüledéket híg  $MgCl_2$  oldatban szuszpendálják. Újabb centrifugálás után a felülúszó, az ún. sokk-folyadék, számos kismolekulájú vegyületet és különböző fehérjéket tartalmaz. Az összes sejtfehérje mintegy 3,5%-a szabadul fel az ozmotikus sokkolással. A lényeges az, hogy a felszabaduló fehérjék közül elkülöníthetők olyanok, amelyek specifikusan megkötnek bizonyos transzport szubsztrátokat (III. táblázat). E fehérjék közül nem egyet már megtisztítottak és kristályosítottak is (7, 29). Transzportban való szerepüket a következő megfigyelések jelzik:

1. Ozmotikus sokkolással a transzport aktivitás csökken vagy megszűnik;
2. A felszabadult protein kötő aktivitásának, ill. az intakt sejtek transzportjának kinetikus konstansai hasonlóak. Pl. galaktóz kötő proteinnél a disszociációs konstans ill. a galaktóz transzport látszólagos  $k_M$ -je egyaránt  $10^{-6}$  M nagyságrendű;
3. Transzport deficiens mutánsokból nem nyerhető kötő protein, viszont:

## III. táblázat

Különböző mikroorganizmusokból ozmotikus sokkolással felszabaduló kötő-proteinek

Megkötött anyag	Kötő-protein a mikroorganizmusban
Aminósavak	
Leucin, izoleucin, valin	<i>Escherichia coli</i> K12
Leucin	<i>Escherichia coli</i> W3092
Fenilalanin	<i>Commons sp.</i>
Arginin	<i>Escherichia coli</i> W
Triptofán, tirozin, fenilalanin	<i>Neurospora crassa</i>
Szervetlen ionok	
Szulfát	<i>Salmonella typhimurium</i>
Foszfát	<i>Escherichia coli</i> AB3311
Cukrok	
Glükóz	<i>Escherichia coli</i>
Galaktóz	<i>Escherichia coli</i> W3092
Arabinóz	<i>Escherichia coli</i> B/r

4. Reverzán sejtekben a transzport aktivitás mellett megjelenik a kötő protein is.

Ezek az adatok azonban csak indirekt bizonyítékul szolgálnak a kötő proteinek transzportban betöltött szerepére. Közvetlen bizonyíték lenne, ha a sokkolt sejtekhez, amelyek transzport aktivitásukat elvesztették, kötő proteint adva, a transzportot vissza lehetne állítani. Az ilyen irányú kísérletek azonban csak részleges sikerrel jártak és ma még nem egyértelműen meggyőzőek, főleg azért, mert sokkolással a felszabaduló egyéb vegyületek közt gl. a savoldható nukleotid-pool is elveszik, ami, legalább részben, a sejt energiaraktárát képviseli és hiánya egyedül is felelős lehet az energiafüggő aktív transzport csökkenéséért (28).

A kötő-proteinek szerepének értelmezésében további probléma, hogy ezeket eddig csak Gram-negatív szervezetekből izolálták. Ha ezek a transzport rendszer részei, miért nem találhatók Gram-pozitív baktériumokban is? Ha mégis lennének bennük, miért kötődnek erősebben, vagy megfordítva, miért disszociálnak a Gram-negatívokból olyan könnyen a viszonylag enyhe sokk-eljárással?

Úgy tűnik, hogy a kötő-proteinek nem magának a membránnak, hanem a komplex, többretegű sejtburroknak a részei, és az ún. periplazmatikus térben helyezkednek el. De még a Gram-negatívoknál is csak egyes transzport rendszereknél találták meg őket, pl. a béta-galaktozid transzportnál nem.

A mai hipotézisek szerint a kötő proteinek a transzport rendszer receptor részei, amelyek szerepe az lehet, hogy a szubsztrátot a Gram-negatív szervezetek komplex sejt falán átjuttatják a membránban lokalizált valódi transzport



rendszerhez. Egyes vélemények szerint azonban a kötő-proteinek a transzport integránsabb részei és a membránon való transzlokációban is szerepük lehet. Ebben a vonatkozásban figyelemre méltó adat, hogy a galaktóz-kötő proteinek két konformációs formáját állapították meg, nagyobb és kisebb affinitással, a szubsztrát kötődése pedig konformációs változást okozott (9, 28, 29).

### 9. Az aktív transzport energiakapcsolata

A sokkolási technikával felszabadul a foszfortranszferáz rendszer HPr komponense is, ez a protein azonban nem köt cukrot. Az ilyen sokkolt sejteknél éppúgy mint a HPr deficiens mutánsoknál azonban nemcsak a foszfortranszferáz rendszer szubsztrátjainak, hanem a béta-galaktózidoknak a transzportja is csökken, HPr hozzáadásával viszont visszaállítható (19, 20). Korábban már felvetettük a kérdést: a két transzport rendszer között valamilyen kapcsolat van? A foszfortranszferáz rendszerből származna az energia az aktív transzportoz is?

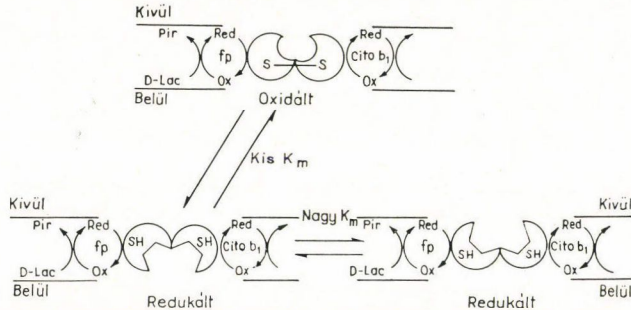
Az első kérdésre, úgy tűnik, a válasz igen, azonban a kapcsolat csak közvetett. ROSEMAN szerint ez a közvetett kapcsolat genetikai alapon, az enzim, ill. transzport rendszer szintézisének regulációjánál képzelhető el. Igazolták ugyanis, hogy az Enzim I és HPr mutánsok hiperszenzitívekké váltak represszióra és ezért képtelenek a béta-galaktózidok transzportjához szükséges proteinek indukálni. Az indukció és represszió mechanizmusában a ciklikus AMP mellett fontos szerepet tulajdonítanak a foszfortranszferáz transzport rendszernek is. E kérdés részleteit illetően itt csak a megfelelő közleményekre utalunk (33, 34).

A mai felfogás szerint, e közvetett kapcsolattól eltekintve, a foszfortranszferáz és az aktív permeáz rendszer két, alapjaiban különböző transzport mechanizmust képvisel. Ez utóbbi aktív transzportoz az energia nem a PEP-foszfortranszferáz rendszerből származik. Ezt igazolja, hogy uncouplerek gátolják a béta-galaktózid transzportot, míg pl. az alfa-metilglükózid felvételt nem, sőt, serkentetik is. Továbbá, a béta-galaktózid transzportot közvetlenül a légzéshez lehet kötni HPr negatív mutánsok membrán vezikulumainál is.

Emlékeztetünk arra, hogy e vezikulumok oxidatív foszforilációval járó ATP szintézisre képtelenek. Továbbá, az uncouplerek transzport-gátló hatása anaerob körülmények közt is érvényesül. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az aktív transzport közvetlen energia donora ATP sem lehet. Mi tehát e mechanizmus energia kapcsolata?

A membrán vezikulumok oxidációjának vizsgálata alapján KABACK érdekes hipotézist állított fel (10) (10. ábra). A vezikulumok béta-galaktózid transzportját (egyúttal számos aminosavét is) a preparátumok által oxidált vegyületek erősen stimulálták. Az endogén oxigénfogyasztást NADH, laktát,

szukcinát (e sorrendben) és néhány más vegyület is serkentette, olyan lehetséges energiaforrások viszont, mint PEP, ATP hatástalanok voltak, vagy éppen gátolták az oxigénfogyasztást. Az előbbiekből közül a transzportot leghatásosabban a laktát fokozta, NADH csak gyengén hatott. Laktát adására a felvétel kezdeti sebessége hússzorosra, a steady state koncentráció tízszeresre növekedett, az akkumuláció mértéke 1 : 25 volt. Permeáz deficiens ( $\gamma^-$ ) mutánsnál felvétel alig volt, a laktát nem stimulált, viszont Enzim I mutánsnál gyors akkumuláció történt laktát adására.



10. ábra. A transzport kapcsolódása a D-tejsav dehidrogenázhoz. KABACK és BARNES (10) szerint. D-Lac, D-tejsav; Pir, piroszőlősav; fp, flavoprotein; Cito  $b_1$ , citokrom  $b_1$ ; Ox, oxidált; Red, redukált. Kívül és belül, a membrán külső és belső oldala. Az fp és Cito  $b_1$  közötti kettős félgömb jelzi a karriert; gömbölyű kivágás, nagy affinitású kötőhely; szögletes kivágás, kis affinitású kötőhely. A citokrom lánc  $b_1$  utáni része nincs feltüntetve

KABACK elképzelése szerint (10. ábra) a transzport közvetlenül kapcsolódik az elektrontranszport láncához, a karrier, egy szulfhidril protein, a lánc egy része lenne, és a citokromokhoz hasonló reverzibilis oxidáció-redukció menne át. A karrier oxidált állapotában a diszulfid-híd olyan konformációt ad a karriernek, amely nagy affinitású a szubsztrátra, a membrán külső oldalán. Redukciónál, a szulfhidril konformáció transzlokálja a szubsztrátot, egyúttal a karrier affinitása csökken, így a szubsztrát ledisszociál és a membránon belül akkumulálódik. A redukált formát a citokrom  $b_1$  újra oxidálja, amint az elektronok a láncban tovább folynak. További feltételezés, hogy a karrier kis affinitású, redukált formája valamiféle oszcillációs vagy vibrációs mozgással működik facilitált diffúzióként. Ez a feltételezés magyarázná, hogy az előzőleg akkumulált galaktozidok gyors effluxot mutatnak anaerobioziszban vagy KCN hatására.

Ez az elképzelés nagy figyelmet keltett, és ahhoz képest, hogy csak mintegy másfél éve látott napvilágot, máris alapos kritikát mondhat magának (6, 34). A kétségek többirányúak, csak néhányat említünk itt.

1. Először magának a membrán vezikulumoknak a topológiája kérdéses. Normálisan zárt vezikulumoknál (right side out) a vizsgált energiaforrások egy része, így a PEP, NADH vagy ATP, azért nem hatásosak, mert nem juthatnak a membrán belső felszínéhez.

2. Jóllehet a laktát, szukcinát a megfelelő dehidrogenázokkal kapcsolódhatnak az elektron transzport láncához, hogy történik ez más, a transzportot szintén serkentő vegyületekkel (pl. glicerofoszfát, formiát)?

3. A modell szerint a transzport-karrier a citokrom  $b_1$  előtt lenne. Újabban kimutatták, hogy aszkorbinsav és fenzin metoszulfát kétszer olyan erős stimulátora a transzportnak, mint a laktát. Ha ez a mesterséges elektron donor rendszer úgy hat, mint a mitokondriumoknál, akkor a citokrom  $b_1$  után kapcsolódik a láncba, tehát a karrier helye kérdésessé válik.

4. A modell legnagyobb hiányossága, hogy nem ad magyarázatot az aktív transzport erős gátlására uncouplerekkel. Minthogy ezek a légzést nem gátolják, csak szétválasztják a transzporttól, az elektron karrierek ciklikus redox átalakulásai egyedül nem magyarázhatják a transzport energia kapcsolatát.

5. Végül egy a priori ellenvetés, hogy galaktozidok aktív transzportja anaerob viszonyok közt is végbemegy, amikor csak glikolitikus energianyerés folyik. Ép sejteknél a tiometilglükózid akkumulációt uncouplerek anaerobiosziban is gátolták.

Mindezek alapos ellenvetések. Végül is csak az tekinthető bizonyosnak, hogy az aktív transzport légzéshez kötődhet, bár nem feltétlenül, és ha mégis, akkor ez nem direkt kapcsolat (mint a KABACK modellben), hanem indirekt.

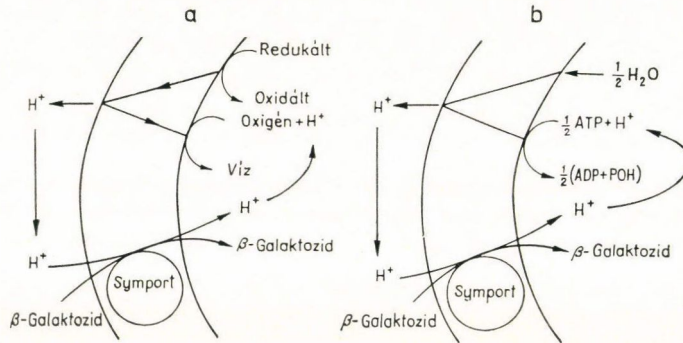
Milyen alternatív elképzelés lehetséges ezek után? Az egyetlen általános lehetőség annak feltételezése, hogy az aktív transzporthoz szükséges energia közvetve, elektrokémiai vagy potenciálgradiensből származik, amelyet aerob körülmények közt az elektrontranszport, anaerob körülmények közt a glikolitikus ATP hidrolízise hoz létre és tart fenn. A fő kérdés, hogy hogyan, továbbá, hogy ez az elsődleges gradiens hogyan kapcsolódik össze a különböző molekulák cotranszportjával vagy countertranszportjával? Az analógia a mitokondriális oxidatív foszforilációval kézenfekvő, de minthogy az energiaközvetítés és átalakítás módja ott sem ismert, csupán a különböző, kémiai, konformációs vagy kemiozotikus hipotézisek között válogathatunk, célszerűbb inkább azt áttekintenünk, hogy van-e egyáltalán valami alap e kérdés vizsgálatára baktériumok membrántranszportjánál.

Állati sejteknél a Na, K-ATPáz általi Na leadás és K felvétel szolgáltatja az elsődleges ion-gradienst. Ilyen rendszer azonban baktériumoknál nem működik. A baktérium membrán természetesen tartalmaz ATPáz, amely  $Mg^{2+}$  vagy  $Ca^{2+}$  dependens, de sem Na vagy K ionra, sem pedig oubainra nem szenzitív. Ez az ATPáz a mitokondrium vagy kloroplaszt membrán ATPázával analóg, és ahhoz mind strukturálisan, mind funkcióban nagyon hasonló (6).

Ha Na, K transzport ATPáz nem is működik baktériumoknál, néhány esetben leírtak olyan transzport rendszert, amely Na vagy K dependens. A legérdekesebb ezek közül az az újabb adat, ami szerint a TMG II néven leírt melibióz permeáz rendszert *S. typhimurium*-nál a Na stimulálja, megfor-

dítva pedig a cukor transzportja a Na felvételét fokozza (37). Bár a Na — cukor cotransport ez esetben valószínű, azonban nem arról van szó, hogy a Na gradiens lenne a cukortranszport energiaforrása. Érdeemes megjegyezni, hogy a melibióz transzport Na függését csak különleges kísérleti körülmények között, Na mentes táptalajokat, műanyag edényzetet használva lehetett demonstrálni.

A baktériumok K akkumulációja is általános jelenség, azonban semmilyen kísérleti adat nem jelzi a K-gradiens szerepét más molekula transzportjában (6).



11. ábra.  $\beta$ -galaktozidok akkumulációja  $H^+$ -symport mechanizmussal *E. coli*-ban. MITCHELL (24) szerint. a, transzport, ha a proton áramlás a légzésnek, b, ha az ATP hidrolízisnek a következménye

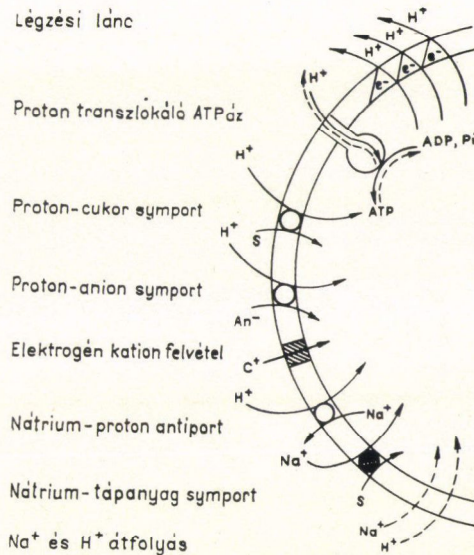
Nagyobb a valószínűsége a proton gradiens szerepének. Erre jelenleg a következő, részben indirekt bizonyítékok vannak (6, 30, 38, 39):

1. *Str. faecalis*-nál az aktív cukortranszport uncouplerek általi gátlása együtt jár a protonok kiáramlásával;
2. *E. coli* laktóz transzportjánál igazolt a protonok stöchiometrikus influxa, itt tehát proton—cukor cotranszport működhet;
3. A protonok leadásában a membrán ATPáz szerepel és része lehet a proton-pumpának.

Ezeket az adatokat MITCHELL, a kemiozmotikus hipotézis megalkotója, elegendőnek találta ahhoz, hogy — a mitokondriumok analógiájára — feltételezze, hogy a baktériumok aktív transzportjához az energia proton gradiens révén kapcsolódik (24). A protonokat aerob körülmények között a légzési lánc, anaerob körülmények között a membrán ATPáz pumpálja ki, a létrejövő elektromos és pH gradiens szolgáltatja azt a proton mozgató erőt, amihez symport vagy antiport útján más ionok és molekulák transzportja összekapcsolódik (11., 12. ábra).

Erre az elképzelésre ugyanaz vonatkozik, mint a kemiozmotikus hipotézis egészére: jelenlegi ismereteink még nem elegendőek sem elfogadásához,

sem elvetéséhez. A kísérleti eredmények interpretálhatók annak feltételezésével, hogy az energia elsődlegesen a membrán elektrokémiai gradienseből származik és ennek valószínűségét újabban egyre kedvezőbben ítélik meg, jóllehet a döntő bizonyítékok — éppúgy mint a mitokondriumoknál — még hiányoznak (6, 34).



12. ábra. Transzport és metabolizmus kapcsolódása protonok és  $\text{Na}^+$  cirkulációjával. Proton cirkuláció MITCHELL (24) szerint, a modell HAROLD (6) után

### 10. Összefoglalás

A baktériumok szénhidrát transzportja többféle mechanizmussal történhet. Az egyik ilyen mechanizmus a group translocation, amelynél a cukor vektorialis foszforilációját a PEP-foszfozotranszferáz rendszer végzi. Ez a folyamat egyúttal a cukormetabolizmus első lépése is. Egyes fajokban, mint a *Staph. aureus*-ban valószínűleg minden cukor transzportja így történik, más fajokban, mint pl. *E. coli*, *S. typhimurium*, egyes cukrok felvétele group translocation-nal történik, másoké aktív transzporttal. A *Str. faecalis*-nál viszont minden cukor transzportja aktív, a glükóz kivételével, amelyet a foszfozotranszferáz rendszer transzportál. A *Ps. aeruginosa*-nál pedig csak facilitált diffúzió ismert.

A cukrok aktív transzportjának energia kapcsolatát ma még homály fedi. A PEP-foszfozotranszferáz rendszer energiaközvetítő szerepe, valamint az ATP közvetlen részvétele kizárható. A membrán vezikulumok aktív transzportjának erős stimulálása légzési szubsztrátok és elektron donorok által, továbbá az uncouplerek erős transzportgátló hatása, még anaerob körülmények között

is, valamint több más adat arra utal, hogy a membránban felépülő elektro-kémiai gradiens lehet az aktív transzport energiakapcsolatának alapja. Azonban e kapcsolat megvalósulási formája (nagy energiájú intermedier, membrán-protein konformációs változása, ion- vagy protongradienshez kapcsolt másodlagos transzport?) még nem ismert.

A transzport molekuláris bázisáról egyre több adat gyűlik össze. A transzportfolyamat első lépésében, a szubsztrát megkötésében, a már nagy számban izolált kötő proteinek vehetnek részt. A folyamat további lépései, a szubsztrát transzlokációja és leadása a membrán másik oldalán, magában a membránban lokalizált proteinek konformációs változásaival függhet össze. Ilyen proteineknek tekinthetők a foszfortranszferáz rendszer Enzim II komplex komponensei és a béta-galaktozid aktív transzport M-proteinje.

A baktériumok membrán transzport folyamatainak további felderítésében egyes speciális vizsgálati módszerek és különösen a genetika alkalmazása döntő szerepet játszhat. Ugyanakkor más membrán-folyamatokkal, főleg a mitokondriumokkal vont analógia jelentősen hozzájárulhat a baktérium transzport értelmezéséhez is.

#### IRODALOM

1. CHRISTENSEN, H. N.: *Advan. Enzymol.* **32**, 1 (1969).
2. COHEN, G. N., J. MONOD: *Bacteriol. Rev.* **21**, 169 (1957).
3. COHEN, G. N., N. V. RICKENBERG.: *Ann. Inst. Pasteur* **91**, 693 (1956).
4. FOX, C. F., E. P. KENNEDY: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **54**, 891 (1965).
5. HAROLD, F. M., J. R. BAARDA: *J. Bacteriol.* **96**, 2025 (1968).
6. HAROLD, F. M.: *Bacteriol. Rev.* **36**, 172 (1972).
7. HEPPEL, L.: *J. Gen. Physiol.* **54**, 95s (1969).
8. KABACK, H. R.: *Curr. Top. Membr. Transport* **1**, 35 (1970).
9. KABACK, H. R.: *Ann. Rev. Biochem.* **39**, 561 (1970).
10. KABACK, H. R., E. M. BARNES: *J. Biol. Chem.* **246**, 5523 (1971).
11. KABACK, H. R., E. R. STADTMAN: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**, 920 (1966).
12. KENNEDY, E. P.: *in: J. R. Beckwith, D. Zipser (ed.) The lactose operon. Cold Spring Harbor, New York* p. 49 (1970).
13. KEPES, A.: *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 70 (1960).
14. KEPES, A.: *J. Membr. Biol.* **4**, 87 (1971).
15. KEPES, A., G. N. COHEN: *in: I. C. Gunsalus, R. Y. Stainer (ed.) The bacteria. vol. 4* p. 179. Acad. Press, New York (1962).
16. KOCH, A. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 177 (1964).
17. KOTYK, A., K. JANACEK: *Cell membrane transport. Plenum Press, New York* (1970).
18. KUNDIG, W., S. GHOSH, S. ROSEMAN: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **52**, 1067 (1964).
19. KUNDIG, W., F. D. KUNDIG, B. E. ANDERSON: *J. Biol. Chem.* **241**, 3243 (1966).
20. KUNDIG, W., F. D. KUNDIG, B. E. ANDERSON, S. ROSEMAN: *Fed. Proc.* **24**, 658 (1965).
21. LIN, E. C. C.: *Ann. Rev. Genet.* **4**, 255 (1970).
22. LIN, E. C. C.: *Curr. Top. Membr. Transport* **3**, (1972).
23. MITCHELL, P.: *Advan. Enzymol.* **29**, 33 (1967).
24. MITCHELL, P.: *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **20**, 121 (1970).
25. NEU, H. C., L. A. HEPPEL: *J. Biol. Chem.* **239**, 3893 (1964).
26. NEU, H. C., L. A. HEPPEL: *J. Biol. Chem.* **240**, 3685 (1965).
27. OXENDER, D. L.: *in: L. E. Hokin (ed.) Metabolic pathways. vol. 6.* p. 133. Academic Press, New York (1972).
28. OXENDER, D. L.: *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 777 (1972).
29. PARDEE, A. B.: *Science* **162**, 632 (1968).
30. PAVLASOVA, E., F. M. HAROLD: *J. Bacteriol.* **98**, 198 (1969).

31. RICKENBERG, H. V., G. N. COHEN, G. BUTIN, J. MONOD: *Ann. Inst. Pasteur* **91**, 829 (1956).
32. ROMANO, A. H., S. J. EBERHARD, S. L. DINGLE, T. D. McDOWELL: *J. Bacteriol.* **104**, 808 (1970).
33. ROSEMAN, S.: *J. Gen. Physiol.* **54**, 138s (1969).
34. ROSEMAN, S.: in: L. E. Hokin (ed.) *Metabolic pathways*. vol. 6. p. 41. Academic Press, New York (1972).
35. SCHULTZ, S. G., CURRAN, P. F.: *Physiol. Rev.* **50**, 637 (1970).
36. STEIN, W. D.: *The movement of molecules across cell membranes*. Academic Press, New York (1967).
37. STOCK, J., S. ROSEMAN: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 132 (1971).
38. WEST, I. C.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **41**, 655 (1970).
39. WEST, I. C., P. MITCHELL: *Biochem. J.* **127**, 56P (1972).
40. WINKLER, H. H., T. H. WILSON: *J. Biol. Chem.* **241**, 2200 (1966).