

TRANSPORT-ADENOZINTRIFOSZFATÁZ MODELLEK

SOMOGYI JÁNOS*

Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Kísérleti Kutató Laboratórium

Az elmúlt 20 év alatt számos próbálkozás történt az aktív Na^+ transzportra vonatkozó elméletek összefoglalására egy-egy elfogadható modell formájában. Annak ellenére, hogy az ezen a területen végzett munka óriási, s ismereteink bővülése igen jelentős, mégis mai ismeretanyagunk még mindig nem elegendő egy pontos molekuláris mechanizmust magában foglaló modell kialakítására. A modellek elkészítésére két út kínálkozott. Vagy elsősorban az aktív iontranszport vizsgálata kapcsán nyert eredményeket igyekeztek összhangba hozni az elképzelt modell működésével, vagy pedig a membrán kötött transzport ATPáz működésének megismert részleteire fektették a fő súlyt a modell elkészítésében. Az első típusú modellek jól egyeznek a kinetikai és stöchiometriás mérések eredményeivel, de a carrier természetéről keveset tartalmaznak, a második elképzelés szerint készült modellek a molekuláris mechanizmusra összpontosulnak, s aránylag kevés kinetikai paramétert tartalmaznak. A két típus közötti eltérések elsősorban a még nem pontosan ismert részletekkel kapcsolatosak.

Az alább ismertetésre kerülő modellek alig foglalkoznak a nátrium pumpa kinetikai jellemzőivel, inkább a Na^+ és K^+ transzport molekuláris mechanizmusát próbálják ismertetni, és elsősorban a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ aktiválható ATPáz működésével kapcsolatos ismereteinket tükrözik.

Az aktív iontranszport és a transzport ATPáz beható, sok részletet feltáró vizsgálata alapján ma már nehezen lenne vitatható az a megállapításunk, hogy a „Na-pumpa” a transzport ATPáz révén működik. Az 1. ábra nem az elképzelt modellekre vonatkozik, hanem kizárólag azokat az alap összefüggéseket tünteti fel, melyeket egy ilyen modell megszerkesztésénél figyelembe kell vennünk. A legfontosabb ismérvek a következők: Miközben $3\text{Na}^+ + 2\text{K}^+$ -ra cserélődik ki a membránon keresztül, 1 ATP bomlik le ADP-re és anorganikus foszfátra. A $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ kicserélődés kizárólag az intracelluláris ATP energiájának segítségével történik, s a keletkező ADP és anorganikus P

* Jelenlegi munkahely: Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. Kémiai-Biokémiai Intézet.

szintén intracellulárisan marad. A $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ aktív transzport egy lipoprotein membránon keresztül történik, s egyaránt függ mind az intracelluláris, mind az extracelluláris monovalens kation-koncentrációktól.

Egy pontos modell megszerkesztését elsősorban az a körülmény akadályozza, hogy bár elég kimerítően ismerjük az iontranszport törvényszerűségeit, továbbá igen sok és részletes adattal rendelkezünk a transzport ATPáz működéséről, semmit vagy rendkívül keveset tudunk arról a struktúráról, ahol a transzport rendszer működik. Nemcsak az ATPáz magában foglaló membránstruktúráról tudunk keveset, de ismereteink annak eldöntésére sem elegendők, hogy a Na^+ ill. K^+ számára azonos, vagy különböző kötőhelyekkel rendelkezik-e a transzport rendszer. Amennyiben a kötőhelyek azonosak, fel kell tételeznünk, hogy ezeknek a kötőhelyeknek az affinitása változik Na^+ ill. K^+ iránt a transzport folyamán. A ciklikus affinitásváltozást pedig a membránban lokalizált transzport rendszer konformációjának ciklikus változásával magyarázhatjuk. Az elmúlt évek folyamán számosan bizonyították, hogy a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktiválható ATPáz rendszer konformációja változik az enzimszisztéma működése folyamán.

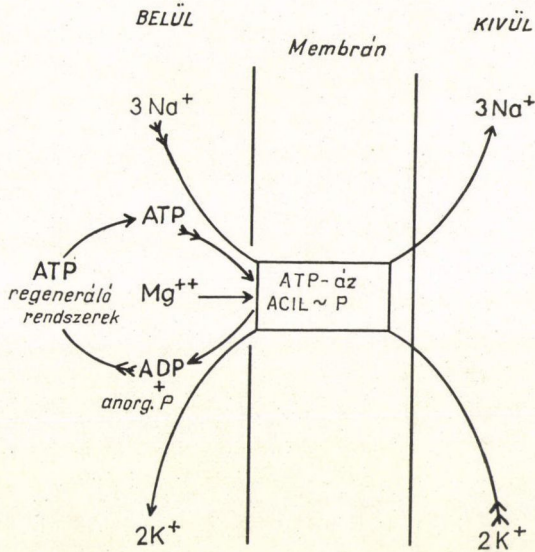
Mielőtt az enzimikus transzportmodelleket részleteiben is tárgyalnánk, szükségesnek látszik, hogy röviden összefoglaljuk a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktiválható ATPáz reakciómechanizmusára vonatkozó ismereteinket, annál is inkább, mivel transzport ATPáz modellek alapját éppen ez a mechanizmus képezi.

A pillanatnyilag leginkább elfogadható ATPáz reakciómechanizmus elsősorban ALBERS, illetve POST munkacsoportjainak vizsgálatai alapján készíthető el. Az általuk javasolt mechanizmust, kiegészítve az ATP kötődésének feltüntetésével, a 2. ábrán láthatjuk. Elképzelésünk szerint az enzim első lépésben megkötöti a ATP-t, majd megfelelő Mg^{++} koncentráció mellett kialakult E_1 konformáció Na^+ jelenlétében egy nagyenergiájú $\text{E}_1 \sim \text{P}$ -t képez. Ez irreverzibilisen átalakulva egy másik konformációjú E_2 -P-vé, K^+ jelenlétében defoszforilált enzimmé és anorganikus foszfáttá bomlik el. A keletkezett E_2 reverzibilisen képes visszaalakulni E_1 -gyé. Az E_1 katalizálja az $\text{ATP} - \text{ADP}$ kicserélődési reakciót, míg az E_2 ún. K^+ -dependens neutrális foszfátaként is képes működni. Szívglükozidok jelenlétében az E_2 -ből alakul ki egy valószínűleg az előzőktől eltérő konformációjú E' -strofantin komplex, mely az ATP terminális foszfátját nem, de anorganikus foszfátot képes kovalens kötéssel megkötni, és vízzel ezt a kötést elhidrolizálni. A transzport ATPáz működésének részleteivel jelenleg nem foglalkozunk, ezzel kapcsolatosan utalnék egy korábbi membrán munkaértekezlet magyar nyelvű anyagára (SOMOGYI, 1968).

A Skou modell

A SKOU (1964, 1965) szerkesztette modell abból az alapelvből indul ki, hogy fiziológiai körülmények között a membrán és az abban működő transzportrendszer az extra- és intracelluláris oldalon egyaránt érintkezik a transz-

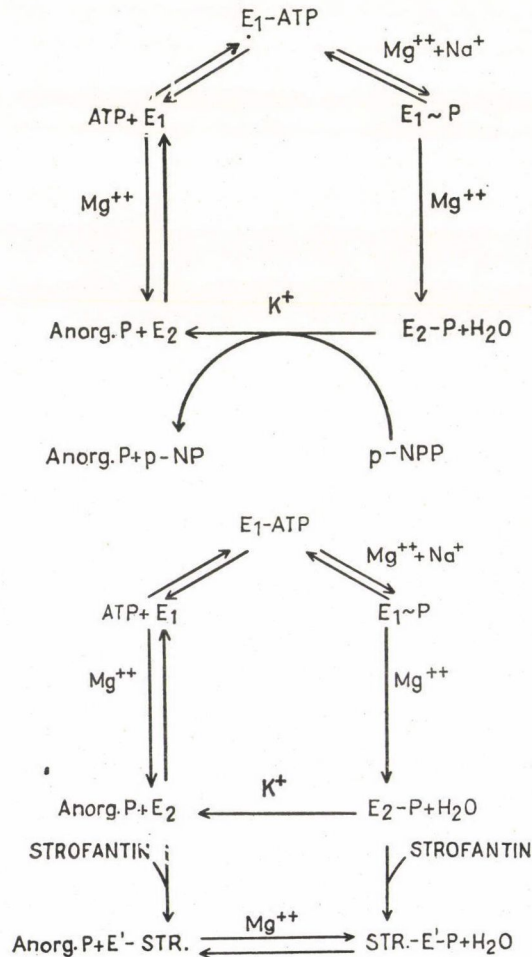
portálendő monovalens kationokkal, méghozzá kötőhelyei (o és i) különböző affinitása miatt a két oldalon nem ugyanazon monovalens kationnal. Skou elképzelését a 3. ábrán láthatjuk. Amikor az enzimszisztéma inaktív állapotban van, a membrán külső oldalán levő o kötőhelyet Na^+ foglalja el, mely az előző ciklus során a membrán belső oldalán levő i kötőhelyről került az o kötőhelyre. Az i kötőhelyet ebben az állapotban a K_0^+ foglalja el, mely viszont a membrán



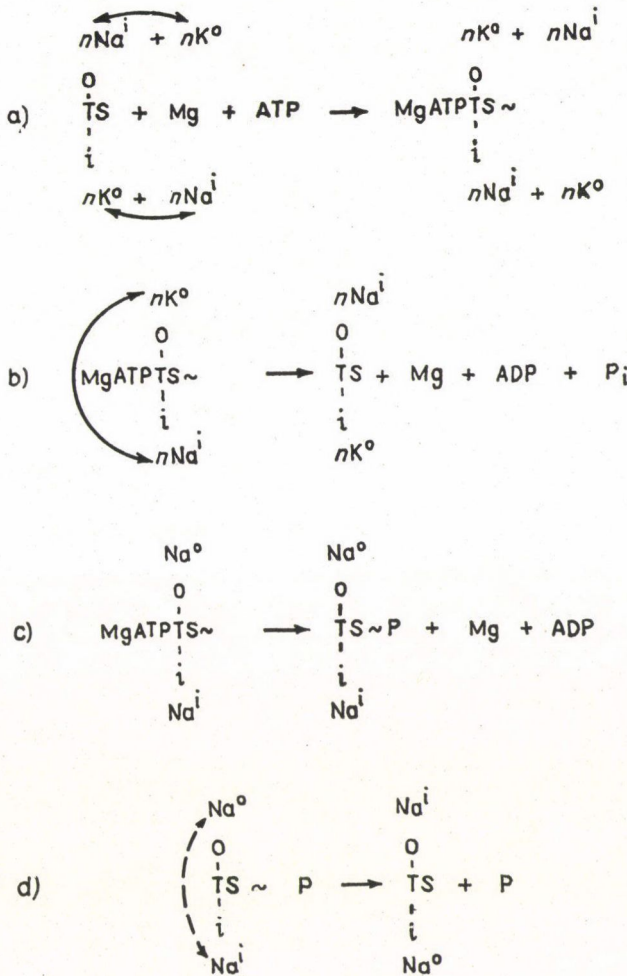
1. ábra. A $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktiválható ATPáz mint az aktív iontranszport carrierje

külső oldaláról került az előző ciklusban a belső oldalon levő kötőhelyre. A modellben szereplő n az egy ciklus alatt transzportálandó Na^+ , illetve K^+ ionok száma. Amikor az enzimszisztéma ATP-t köt meg, ez a folyamat — Skou szerint — aktiválja a transzportrendszert, melynek eredményeként az o kötőhely affinitása megváltozik, s a Na^+ helyére K^+ kapcsolódik, ezzel egyidőben az i kötőhely affinitása is megváltozik, és a K^+ az intracelluláris oldalra és a Na^+ a belső kötőhelyről az extracelluláris oldal felé mozog, az ATP elhasad ADP-re és anorganikus foszfátra, s ezáltal az enzim visszakerül az eredeti inaktív állapotába. Egy új molekula ATP-vel a ciklus újból a már ismertetett módon indul el (3. ábra. a, b egyenlet). Extracelluláris K^+ hiányában, csak Na^+ jelenlétében Skou szerint az i és az o kötőhelyet egyaránt Na^+ foglalja el. Ha a rendszerhez ATP kapcsolódik, foszforilált intermedier, Mg^{++} és ADP keletkezik. Miközben a foszforilált intermedier elhasad inaktív enzimre és anorganikus foszfátra, a membrán két oldalán a két kötőhelyhez kapcsolódott nátriumok kicserélődnek, de ilyenkor sem az intra-, sem az extracelluláris monovalens kationkoncentrációk nem változnak: nyilvánvalóan ez az „affizio-

lógias” ciklus eredménytelen (3. ábra. c, d egyenlet). A SKOU modell szerint tehát az enzimrendszer kötőhelyeinek affinitása ATP hatására megváltozik a monovalens kationok iránt, de arról nem tájékoztat, hogy az ATP hogyan módosítja a kötőhelyek affinitását, vagy, hogy milyen mechanizmussal cserélődnek ki a kationok az extracelluláris és intracelluláris oldal között. SKOU elképzelése szerint az a körülmény, hogy az intracelluláris ATP hatással lehet az extracellulárisan elhelyezkedő K^+ kötőhelyre, azzal hozható összefüggésbe, hogy az ATP képes megváltoztatni az enzimrendszer belső oldalán az elektronok eloszlását. SKOU szerint a kationkötő helyek olyan anionos csoportok lehetnek, melyek sztérikus konformációjának, vagy pedig — ahogy azt EISEN-



2. ábra. A Na^+ és K^+ -aktiválható ATPáz működése
 E_1 és E_2 : a transzport ATPáz kétféle alakkonformációja
 $E'-STR$: a transzport ATPáz konformációja, amikor strofantint köt meg

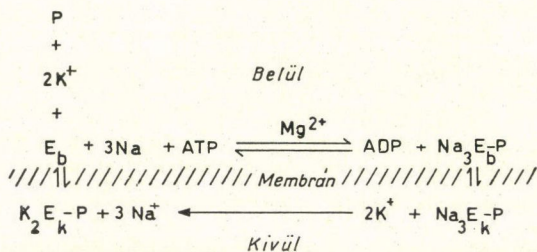


3. ábra. A Skou-féle nátrium pumpa modell [Skou (1965) nyomán]
 TS = a transzportrendszer (ATPáz) o: a külső, i: a belső oldala
 Na^i , Na^o = az intra- és extracelluláris nátrium
 K^o = az extracelluláris kálium

MAN (1961) is elképzei — erőtereinek megváltozása eredményezi a kationok iránti affinitás megváltozását is. Az utóbbi feltételezés szerint az anionos csoportok kis erőtere nagyobb affinitást biztosítana a K^+ -hoz, mint a Na^+ iránt, ellenben ha ugyanazon csoportok erőtere nő, ez nagyobb affinitásúvá tenné ugyanazt a csoportot Na^+ -hoz, mint K^+ iránt.

Mind az anionos csoportok sztérikus konformációját, mind a negatív töltések erőtereit befolyásolhatja a töltés szomszédságában levő elektronok sűrűsége. Az elektronok bizonyos eloszlása egy makromolekulán ebből kifolyólag olyan negatív töltést hozhat létre, melynek nagyobb az affinitása

Na⁺-hoz, mint a K⁺-hoz, ugyanazon pillanatban egy másik negatív töltésnek éppen ellenkezőleg, nagyobb lehet az affinitása K⁺-hoz, mint Na⁺ iránt. Ha a makromolekula elektroneloszlási rendszere megváltozik, ez azt eredményezheti, hogy a negatív töltések affinitása megfordul, azaz a korábbi Na⁺ kötőhely affinitása lecsökken Na⁺ iránt, és nő K⁺ iránt, és fordítva, a korábbi K⁺ kötőhely affinitása Na⁺-hoz nagyobb lesz. Ha ezek a kötőhelyek közel-



4. ábra. A Post-és mtsai-féle nátrium pumpa modell

[Post és mtsai (1965) nyomán]

E_b és E_k = az enzimszisztemnek a membrán külső és belső oldalával érintkezni képes helyei

E - P = foszforilált intermedier

esnek egymáshoz, elképzelhető, hogy a Na⁺ és a K⁺ a két kötőhely között kicserélődik, miközben azok affinitása megváltozik. Ha elfogadjuk ezt az elképzelést, akkor az ATP szerepe a Na⁺/K⁺ kicserélődésében abban lenne, hogy megváltoztatná a makromolekula (azaz a transzportrendszer) kationkötő csoportjainak az erőterét, vagyis a sztérikus konfigurációját. Pillanatnyilag nem rendelkezünk azonban közvetlen bizonyítékokkal arra, hogy az elektronelrendeződés változik-e a transzportciklus folyamán, tehát ez az elképzelés egyelőre mint a lehetséges magyarázatok egyikeként kerülhet csak szóba.

Foszforilált intermediert feltételező transzport ATPáz modellek

Az első transzport ATPáz modellt ALBERS és mtsai 1963-ban készítették. Elképzelésük szerint a membránban levő speciális pórus intracelluláris végén a carrier foszforilációja, az extracelluláris végén pedig defoszforilációja következik be. A foszfát intermedier pedig eközben a pórus belső végétől a külsőig transzportálódna Na⁺ ionokkal együtt. A megoldatlan ebben a modellben az volt, hogy az extracellulárisá vált anorganikus foszfát, valamint a K⁺ hogyan képes visszajutni a membrán belső oldalára. POST és mtsai (1965) elképzelése a (már ismerttetett) Shaw modellnek (cit. GLYNN, 1956) a saját kísérleteik alapján történő kiegészítésén alapul, szintén a foszforilált intermedier szerepére helyezve a fő súlyt. A 4. ábrán láthatjuk, hogy a modell külön Na⁺-carrier-t és külön K⁺-carrier-t tartalmaz. A Na⁺-carrier 3Na⁺-val

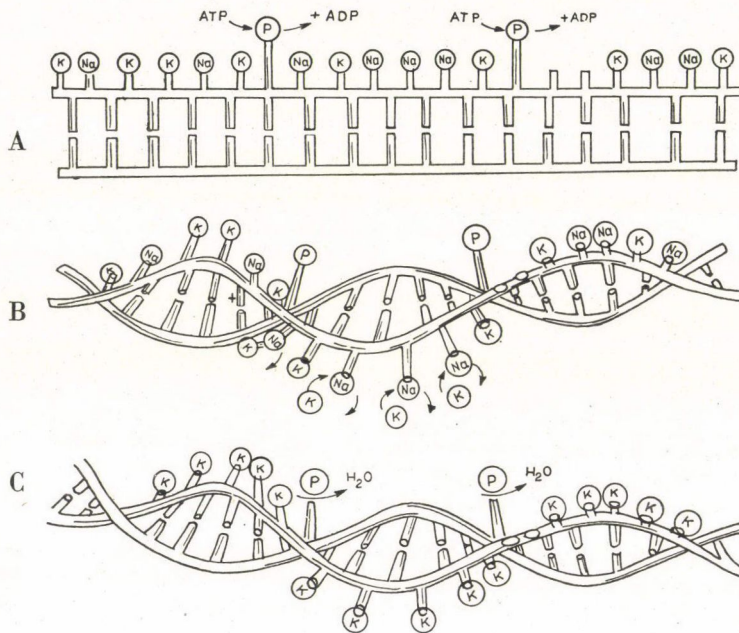
Mg^{++} jelenlétében ATP-vel reagálva egy kötött Na^+ -t is tartalmazó foszforilált intermediert képez, mely átlépve a membrán külső oldalára, a $3Na^+$ -t $2K^+$ -ra cseréli le. A K^+ -carrier a membrán külső oldaláról visszajutva a belső oldalra, defoszforilálódik, s közben lehasad róla az anorganikus foszfát és természetesen a $2K^+$ -t is leadja. Ez a modell sem ad tehát választ arra, hogy miért cserélődik ki a Na^+ és K^+ a carrierekén, és végeredményben az is megoldatlan kérdésnek számít, hogy miért halad át a membránon egyrészt a Na^+ -carrier az intracelluláris oldalról az extracellulárisra, s ott átalakulva K^+ -carrieré, miért jut ismét vissza a membrán belső felszínére.

Az Opit—Charnock modell

A transzport ATPáz modellekben lényeges haladást jelentett OPIT és CHARNOCK 1965-ben közölt modellje. Az elképzelés Davson—Danielli-féle két fehérjeréteg között egy lipid réteg szerkezetű klasszikus membrán modellből indul ki. Eszerint a membrán nyugalmi helyzetben a belső oldalán olyan anionos helyeket tartalmaz, melyek egyaránt képesek Na^+ és K^+ ionpárok megkötésére. Ha az intracelluláris Na^+ egy kritikus koncentrációt ér el, ez egyúttal azt is jelenti, hogy aránylag sok Na^+ fog a kationkötő helyekre kötődni. A transzportciklus beindulása tehát egy feed-back szabályozás eredménye lenne. Ha kellő mennyiségű Na^+ ionpár alakul ki, ez a makromolekula felületén az elektron sűrűség új eloszlását eredményezi. OPIT és CHARNOCK modelljük kialakításában felhasználják a LING (1965)-féle „fixed-charge” modell elméletet is, feltételezve, hogy a rövid távolságú egymásrahatások a döntő jelentőségűek, s ezek hozzák létre többek között a Na^+ és K^+ ionpárok hatásai közötti különbségeket is. A kationok induktív hatása összegeződhet, és ennek következménye lenne, hogy a fix anionos helyek nagy részét Na^+ tudja elfoglalni. Mivel a fehérjék felületén szintén vannak orientált kationos csoportok, ezek is képezhetnek ezeken a helyeken ionpárokat anionokkal. A fehérje és az anionok közötti kölcsönhatás szintén befolyásolni fogja azoknak a töltéseknek az indukcióját, melyeket a kation-anionos helyek ionpárjai hoznak létre. A Na^+ ionpár képződés révén létrehozott elektronsűrűség átrendeződés az aktív helyek szomszédságában azt eredményezi, hogy az enzimszubsztrátkötő centruma sokkal aktívabban képes reagálni az ATP-vel, és ezáltal foszforilált intermediert tud keletkezni (5. ábra A rész).

A foszforiláció azonban egy újabb indukciós hatás, és a fehérje polarizálható lánc mentén egy újabb elektronsűrűség eloszlást hoz létre. Ez a fehérjelánc begömbülését vagy deformációját, és a fix anionos helyek adszorpciós energiájának a változását eredményezi. Az enzimszubsztrátkötő centruma deformációját a modell szerint a fixált anionos helyek egy részének rotációját vonná maga után, azaz, ezek a részek, amelyek eddig az intracelluláris oldal felé tekintettek, most kifordulnának az extracelluláris oldalra. A foszforilált helyek

azonban rögzülve változatlanul a membrán belső oldala felé tekintenek (5. ábra B rész). OPIT és CHARNOCK szerint a membrán belső oldalán levő enzimplánc hosszának 5%-os növekedése elegendő lehet ilyen rotációs változásokra a lipíd rétegen keresztül. Mivel az adszorpciós energia is megváltozik az enzimszisztéma foszforilációja következtében, a K^+ affinitása megnő az anionos kötőhelyekhez, minek következtében a Na^+ ezeken a helyeken kicserélődik K^+ -ra. Ez azonban azt eredményezi, hogy az eredetileg intracelluláris Na^+ cserélődik ki az extracelluláris K^+ -ra. Az az új körülmény azonban, hogy az



5. ábra. Az Opit-és Charnock-féle $Na^+ + K^+$ -ATPáz modell
[OPIT és CHARNOCK (1965) nyomán]

anionos helyek jelentékeny részét K^+ foglalja el, ismételten az elektronsűrűség új eloszlását eredményezi, melynek az lesz a következménye, hogy az enzim aktív centrumában a foszforilált fehérje oldallánc sokkal reakcióképesebbé válik, s vízzel reagálva, anorganikus foszfát keletkezik. A foszfát intracelluláris marad. A foszforilált intermedier hidrolízise viszont megszünteti azt az erőt, amely a fehérjeláncot megcsavarodott állapotban tartotta, s az extracelluláris oldalra tekintő részek ismét visszajutnak eredeti állapotukba az anionos helyeiken K^+ -t tartalmazva. A sejten belül viszont a K^+ -k egy része ismételten kicserélődik Na^+ -ra, s a ciklus előlről indulhat (5. ábra. C rész).

Az OPIT—CHARNOCK modellhez nagyon hasonlít sok vonatkozásban MÜLLER (1967) elképzelése. MÜLLER abból a megfigyelésből indult ki, hogy a

polianion dextraszulfát, illetve polivinilszulfát viszkozitása attól függ, hogy Na^+ vagy K^+ van jelen ellenionként. Feltételezése szerint egy polianion, pl. mukopoliszaharida kapcsolódhat a foszforilációs helyhez. Foszforilált állapotban az ATPáz rendszer nagyobb lesz, és ez szükségszerűen a polianion lánc kontrakcióját vonja maga után, melynek következtében a lánc szelektivitása K^+ iránt növekszik. A foszforilációt követő defoszforilációkor az ATPáz rendszer megkisebbedne, a polianion lánc kiterjedne, azaz visszatérne eredeti állapotába, amikor is megváltozna ionszelektivitása, és affinitása ismét Na^+ -hoz lenne nagyobb. MÜLLER véleménye szerint a különböző gátlószerek, pl. a strofantin, nem magát az ATPáz-t, hanem a polianion láncot befolyásolná. Mind az OPIT—CHARNOCK, mind a MÜLLER modell nem számol azonban azzal a ténnyel, hogy a sejtmembránnak csak igen kis részét foglalja el az ATPáz. GLYNN (1957) számítása szerint kb. 1000 ilyen hely van a vörösvértest membránban, mely azt jelenti, hogy két szomszédos ATPáz hely közötti távolság kb. 3600 Å. További problémát jelent, hogy egy mukopoliszaharid lánc létezése a membránon belül csaknem kizárható.

A Jardetzky-féle allosztérikus modell

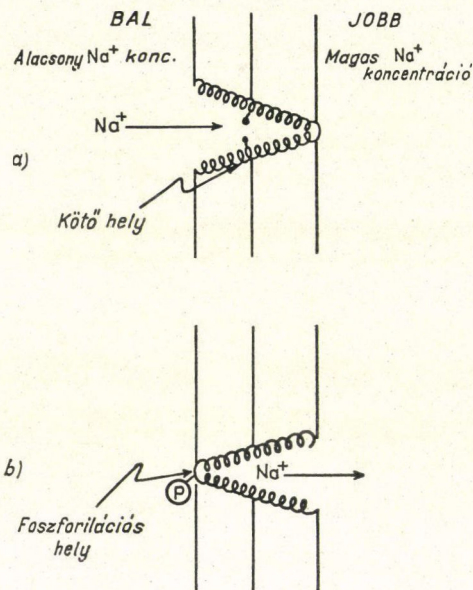
JARDETZKY (1966) szerint egy polimer molekulának, hogy pumpaként tudjon működni, csupán három strukturális feltételnek kell megfelelnie, melyek a következők:

a) Egy olyan „rét” vagy „üreg” (pórust) kell tartalmaznia a molekula belsejében, mely elegendő nagy ahhoz, hogy befogadhasson egy kisebb molekulát.

b) Két különböző konformáció felvételére kell, hogy képes legyen: az egyik konformáció esetén a molekuláris „üreg” a membrán egyik oldala felé, a másik konformációban a membrán másik oldala felé nyitott.

c) Olyan kötőhelyeket kell tartalmaznia a molekuláris résben vagy üregben a transzportálandó anyagok számára, amelyek affinitása a molekula két konformációjában különböző a transzportálandó anyagok iránt. A két flexibilis polipeptid láncból álló modellnek a két különböző konfigurációnak megfelelő energia elektromos, kémiai, fotokémiai vagy más úton biztosítható, ezek közül a leginkább érdeklődésre számot tartó a kémiai energiával működő pumpa mechanizmusa. A 6. ábrán a pumpa két alternatív konfigurációja látható, ha a modell Na iont transzportál. Az „A” formává történő allosztérikus átrendeződése az egyik fehérjelánc foszforilációjának segítségével történik. A modell szerint az egyik konfiguráció foszforilált, a másik pedig defoszforilált állapotban stabilis. Az „A” formában a Na^+ kötő helynek nagy az affinitása Na^+ -hoz, míg a „B” formában kicsi. A modell a következőképpen működne: Az „A” konformációban a kötőhely Na^+ ionokat adszorbeál a baloldali kompartmentből, ahol egyébként a Na^+ koncentráció relatíve alacsony. Ennek következtében a membrán adott helye foszforilálódik, és ez a polipeptid lánc

allosztérikus átrendezését vonja maga után: a membrán nyitott oldala bezárulna, s az ellentétes oldala pedig kinyílna. Ezzel párhuzamosan azonban a kötőhely Na^+ iránti affinitása lecsökken. Mivel a molekuláris üreg igen kicsiny, a Na^+ koncentrációja itt meghaladja a jobboldali kompartment Na^+ koncentrációját, létrehozva egy ilyen gradienst, mely szükséges a membránon keresztüli kifelé irányuló diffúzióhoz. A defoszforiláció akár a Na^+ kidiffundálása, akár az azt követő K^+ beáramlás miatt létrejöhet, és a ciklus előről kezdődhet.



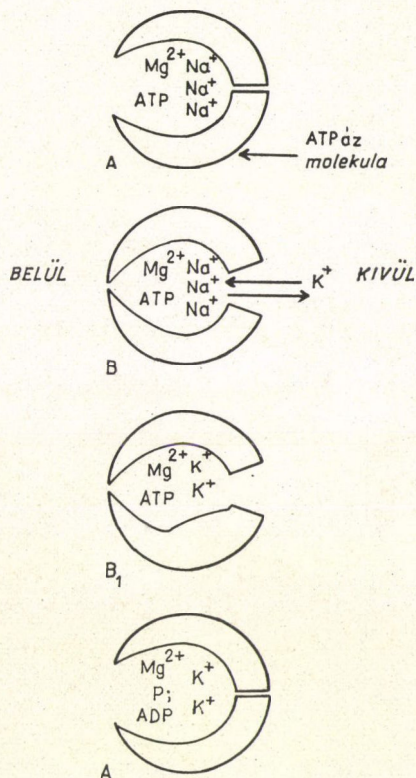
6. ábra. A Jardetzky-féle allosztérikus pumpa modell
[JARDETZKY (1966) nyomán]

A két lánc relatív helyzetében már 2–3 Å eltolódás meghatározhatja, hogy a molekuláris üreg egyik vagy másik irányban van nyitva. Ekkora eltérés egyébként reálisan elképzelhető, hiszen MUIRHEAD és PERUTZ (1963) szerint pl. a redukált és oxidált hemoglobin láncok relatív helyzete között 1–7 Å különbség van. Ha feltételezzük, hogy a Na^+ pumpa, mely három kötőhelyet tartalmaz a Na^+ ionok számára, kb. 10^3 nagyságrendű Na^+ iránti affinitási konstanssal rendelkezik az „A” konfigurációban és a „B” konfigurációban az affinitási konstans 0 nagyságrendben mozog, továbbá, ha a molekuláris üreg térfogatát kb. 1000 \AA^3 -nak tételezzük fel, akkor a pumpa 1 mM koncentrációjú oldatból képes 3 M koncentrációjú oldatba Na^+ ionokat transzportálni.

JARDETZKY ezt a vázlatosan ismertetett modelljét olyan általánosan használható pumpa modellnek tartja, amely többféle speciális pumpa működését képes modellezni. Ez a modell az eddig ismertekkel ellentétben nem igényli a kötőhelyek áthelyezését vagy rotációját az egyik oldalról a másikra.

A Lowe modell

A LOWE (1968) modell sok tekintetben nagyon hasonlít JARDETZKY (1966) elképzeléséhez, anélkül azonban, hogy allostérikus történéseknek



7. ábra. A Lowe féle nátrium-kálium pumpa modell (LOWE (1968) nyomán)

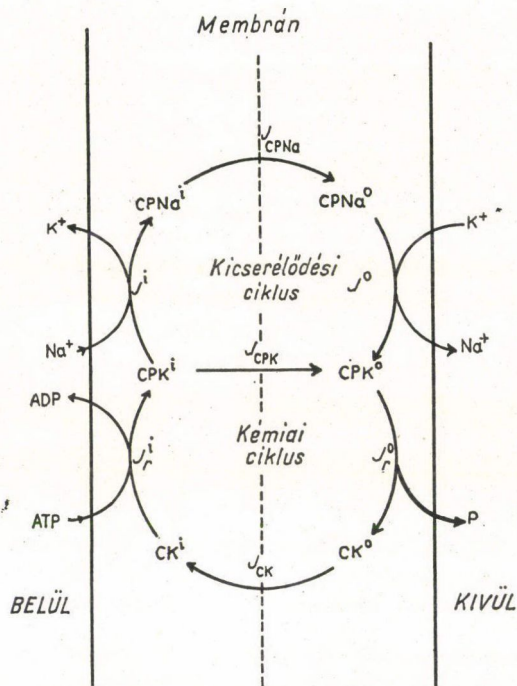
különösebb szerepet tulajdonítana. A modell a 7. ábrán látható, és főbb jellemzői a következők:

a) Az ATPáz molekula egyaránt kapcsolatban áll mind az extracelluláris, mind az intracelluláris oldallal, tehát a membrán teljes szélességét elfoglalja.

b) Az ATPáz szubsztrátja — a modell értelmében — egy olyan komplex, amely ATP + Mg⁺⁺ + 3Na⁺-ből áll.

c) Az ATP—Mg⁺⁺—3Na⁺ komplex kötődésének következtében az enzimszisztéma az „A” konformációból „B”-vé alakul át. A „B” konformációban a Na⁺ kicserélődhet a külső médium kationjával, azonban izolálva van a belső médiumtól.

d) A kötött ATP hidrolízise csak abban az esetben következik be, ha a $3\text{Na}^+ 2\text{K}^+$ -ra cserélődik ki. A hidrolízist elősegíthetné egyes pozitívan töltött aminosav láncok közel kerülése a szubsztrátkötő helyhez, melyet eddig a 3Na^+ ion sikeresen megakadályozott. A hidrolízissel egyidőben visszaalakul az „A” konformáció, a reakciótermékek és a 2K^+ a belső médiumba diffundálhatnak.



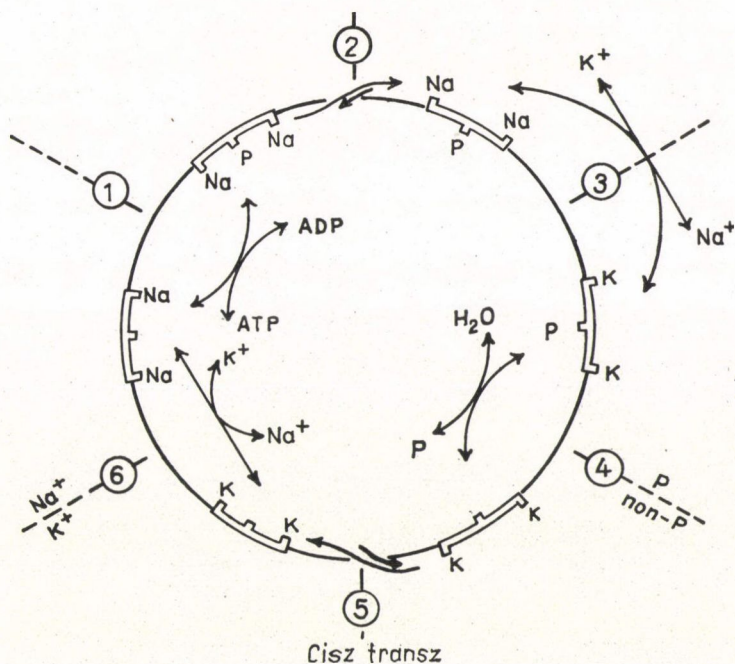
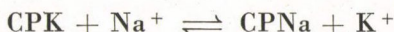
8. ábra. A Katchalsky- és Spangler-féle carrier modell
[KATCHALSKY és SPANGLER (1968) nyomán]
(A modell pontos működésének leírását l. KATCHALSKY és SPANGLER (1968) közleményében)

A modell működésének tehát nem elengedhetetlen része a foszforilált intermedier keletkezése, LOWE inkább SKOU (1965) már ismertetett véleménye felé hajlik, hogy a foszforilált intermedier csak bizonyos mesterséges körülmények között keletkezik. Lényeges továbbá az eddig tárgyalt modellekkel szemben, hogy a Na^+ és az ATP kötődése az enzim megfelelő kötőhelyeihez kölcsönös függésben van egymással.

Katchalsky-és Spangler-féle Na^+ pumpa modell

KATCHALSKY és SPANGLER (1968) modellje (8. ábra) két kapcsolt cikusból áll. Az egyik egy kémiai, a másik pedig egy kicserélődési ciklus. A kémiai

ciklusban a carrier először foszforilálódik, majd defoszforilálódik. A foszforilált carrier (CP) feltételezhetően Na^+ ionokra szelektív, míg a defoszforilált carrier szelektivitása K^+ iránt nagy. Éppen ezért a kicserélődési reakció a modell szerint a következőképpen alakul:



9. ábra. Az Albers és mtsai által ajánlott $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz modell
[ALBERS és mtsai (1968) nyomán]

Mivel a két ciklus kapcsolt, a kémiai ciklus képes a kicserélődési ciklus irányítására. A modell szerint az anorganikus foszfát extracellulárisan hasad lényeges továbbá, hogy a modell egy állandó carriermozgást tételez fel, a carrier tehát mobil. Ugyancsak fontos körülménynek látszik, hogy steady state állapotban a rendszer minden pontján a carrier mennyisége egyenlő. Így a rendszeren belüli carriermozgás sebessége megfelelő — itt nem részletezett — egyenletek felhasználásával kiszámítható. KATCHALSKY és SPANGLER elvégezve a szükséges számításokat, arra a következtetésre jutott, hogy a carrier másodpercenként 10-szer megy körbe a cikluson, mely érték összeegyeztethető a biopolimerek konfiguráció-változásának sebességével.

Albers-, Koval- és Siegel- féle ATPáz modell

A transzportmodellek közül az ALBERS és mtsai (1968) által javasolt elképzelés felel meg leginkább a rendelkezésre álló kísérleti adatoknak. A 9. ábrán egy kör jelképezi a membránt, amely 6 olyan helyet tartalmaz, amelyeken az ATP bontás illetve a Na^+ és K^+ kicserélődés lezajlik. A modell szerint az enzimrendszer „cisz” és „transz” módosulatban egyaránt megtalálható, illetve a két módosulat egymásba történő átalakulása képezi az aktív Na^+ és K^+ transzport alapját. A membrán adott helyén a cisz módosulatú enzim foszforilódik, melyet Na^+ aktivál (1. lépés). A foszforilált enzim gyorsan átalakul transz formává (2. lépés), ennek következtében a kation kötőhelyeken megkötött Na^+ ionok az intracelluláris oldalról az extracelluláris oldalra kerülnek, ahol a Na^+ ionok K^+ ionokra cserélődnek ki (3. lépés). K^+ jelenlétében a foszforilált enzim hidrolízise következik be (4. lépés). Mivel a defoszforilált enzim nem eléggé stabil, visszaalakul cisz formává (5. lépés). Végül a 6. reakciólépésben a kötött K^+ ismét Na^+ -ra cserélődik ki, s a ciklus kezdődhet előlről.

A globuláris membránstruktúrához kötött transzport ATPáz, mint az aktív Na/K transzport carrierje: aktív ionmozgás a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ aktiválható ATPáz konformáció változásainak segítségével

Ha az aktív iontranszportra vonatkozó összes adatot összevetjük a különböző transzportmodellekkel, arra a sajnálatos következtetésre kell jutnunk, hogy sem a kinetikai jellemzőkre, sem a molekuláris mechanizmusra összpontosított modellek nem tudták megoldani a Na^+ és K^+ aktív transzportjának minden homályos kérdését. Ennek okai között első helyen szerepel ismereteink elégtelensége, de ezek után rögtön következik, hogy egyes modellek szerkesztésében alapvető és többszörösen bizonyított megfigyelésekkel ellentétben semmivel alá nem támasztható feltételezések szerepelnek (pl. az ATP-ről lehasadó anorganikus foszfát extracellulárisává válik). Nyilvánvaló, hogy amennyiben egy mechanizmust kellő részletességgel sikerül feltárnunk, akkor nem a mechanizmus elképzelt modelljét, hanem a valóságos mechanizmust írjuk le. A modellekben tehát a megismert tényanyagon kívül igen fontos szerephez jut a képzelőerő is.

Az alábbiakban azoknak az adatoknak az összefoglalását találhatjuk, melyeket figyelembe kell, vagy lehet venni a transzport ATPáz működésre alapított Na/K pumpa modell megszerkesztésében. Az ismertetésre kerülő adatok lényegileg három főbb csoportra oszthatók:

- a) Több oldalról bizonyított tények.
- b) Kísérleti adatok alapján valószínűsíthető mechanizmusok.
- c) Nem bizonyított, de nem is cáfolt elképzelések.

Ezeknek az adatoknak és elképzeléseknek megfelelő csoportosítása alapján, felhasználva az ismertett transzportmodellek egyes elemeit, megkísérrelhető egy olyan transzportmodell elkészítése, mely egyrésztől konkrét adatszerezésében bizonyított, másrésztől pedig feltételezett részletei kiindulási munkahipotézisként jöhetnek szóba a további kutatások során. A főbb ismérvek a következők:

1. Az eddigi vizsgálatok megnyugtatóan bizonyították, hogy a sejtmembránok egy olyan ATPáz aktivitást tartalmaznak, melyhez Mg^{++} -ra van szükség, az aktivitás a jelenlevő Na^+ és K^+ koncentrációjától függ, szívglikozidokkal gátolható.

2. Általánosan elfogadott, hogy a transzport ATPáz, illetve az az enzimatis rendszer, amely nem intakt membránban $Na^+ + K^+$ aktiválható ATPázként működik, vagy önmaga a transzportrendszer, vagy szerves része a Na/K pumpa mechanizmusának.

3. Stöchiometriás mérések szerint miközben 1 ATP ADP-re és anorganikus foszfátra bomlik, $3Na^+ + 2K^+$ -ra cserélődik ki, az ADP és az anorganikus foszfát azonban intracellulárisan marad.

4. A transzportrendszer szubsztrát specifikus. Más trinukleotiddal az ATP nem helyettesíthető. Hasonlóképpen abszolút specificitást mutat a rendszer Na^+ szükséglete, Na^+ nem helyettesíthető más monovalens kationnal. Bár a K^+ helyettesíthető egyéb monovalens kationokkal, a legnagyobb affinitással a K^+ rendelkezik (a Tl^+ -t kivételével). A rendszer működéséhez kétértékű kation is szükséges. Ez a legtöbb szövetben kizárólag Mg^{++} lehet. Mn^{++} csak részben képes a Mg^{++} helyettesítésére. Ca^{++} minden esetben gátló hatású.

5. A transzport ATPáz egy komplex lipoprotein rendszernek fogható fel; a lipid komponens eltávolítása az enzimrendszer inaktíválódását okozza, az inaktív enzim aktivitása a hozzáadott foszfolipidekkel helyreállítható. Nagyon valószínű, hogy a transzport ATPáz foszfátidilszerint tartalmaz. Az enzimrendszer foszfolipid komponensének pontos szerepe, azaz, hogy strukturális vagy/és funkcionális jelentősége van-e, még nem tisztázott.

6. Számos kinetikai mérés, valamint egyéb adat valószínűsíti, hogy az ATP hidrolízise legalább két lépésben történik: egy Na^+ aktiválható enzimfoszforilációt egy K^+ dependens defoszforiláció követ. Semmi közvetlen bizonyítékunk nincsen ennek a mechanizmusnak a cáfolatára.

7. A foszforilált intermedier nagy valószínűséggel acilfoszfát, amelyről feltételezhető, hogy kötött glutamil-gamma-foszfáttal azonos*. Nincs kizárva

* BASTIDE és mtsai 1973-ban kimutatták, hogy a foszfát nem a glutaminsav, hanem az aszparaginsav peptid kötésben részt nem vevő karboxilcsoportjához kapcsolódik, s az aktív centrum aminosav sorrendje a következő: $-(S_{\text{ep}}^{\text{hr}})-\text{Asp}(\text{P})-\text{Lys}$. F. BASTIDE, G. MEISSNER, S. FLEISCHER and R. L. POST: Similarity of the Active Site of Phosphorylation of the Adenosine Triphosphatase for Transport of Sodium and Potassium Ions in Kidney to That for Transport of Calcium Ions in the Sarcoplasmic Reticulum of Muscle, *J. Biol. Chem.* **248**, 8385–8391 (1973).

azonban az sem, hogy a foszfát nem kizárólag karboxil csoporthoz, hanem a szomszédos aminosavak valamelyikének reaktív oldalláncához is kapcsolódik.

8. A rendelkezésre álló adatok arra mutatnak, hogy a foszforilált enzim-intermedier két formában található ($E_1 \sim P$ és $E_2 - P$). Az $E_1 \sim P$ képes ADP-vel reagálva ATP-t szintetizálni, de képtelen vízzel reagálni. Az $E_2 - P$ kizárólag vízzel tud reakcióba lépni K^+ jelenlétében, amikor defoszforilált enzim és anorganikus foszfát keletkezik. Valószínűleg a kétféle foszforilált enzim közötti különbséget a kétféle fehérje-konformáció hozza létre. Az $E_1 \sim P \rightarrow E_2 - P$ átalakuláshoz Mg^{++} -ra van szükség, az átalakulást komplexképző szerek, továbbá N-etilmaleimid gátolhatja.

9. Feltételezhető, hogy a transzport ATPáz külön Na^+ és külön K^+ kötőhellyel rendelkezik. A Na^+ kötőhelynek 6–8-szor nagyobb az affinitása Na^+ -hoz, mint K^+ -hoz, a K^+ kötőhely affinitása K^+ -hoz majd két nagyságrenddel nagyobb mint Na^+ -hoz. A különböző $Na^+ : K^+$ arányoknál mért ATPáz aktivitás nagysága elsősorban attól függ, hogy a két típusú kötőhelyet milyen monovalens kationok foglalják el. Az ATPáz aktivitás akkor maximális, ha az 1. kötőhelyhez Na^+ , a 2. kötőhelyhez K^+ kapcsolódik. Feltételezhető, hogy ezek a kötőhelyek dikarbonsav oldalláncok. A kötések természete nem ismeretes, az ionos kötések inkább valószínűek, mint a kovalens kötések. Nem tudjuk, hogy a Na^+ és K^+ kötőhelyek a membrán ellentétes, vagy azonos oldalain helyezkednek-e el. Az első esetben, amikor a Na^+ kötőhely az intracelluláris oldal felé fordul, akkor a K^+ az extracelluláris oldara tekint és fordítva. A második esetben a kétféle kötőhely együtt mozogna.

10. Valószínűsíthető, hogy ugyanaz a Na^+ és K^+ transzportálódik, amely aktiválja az ATPáz, azaz a transzport ATPáz monovalens kation kötőhelyei és a transzportrendszer carrier helyei azonosak.

11. A monovalens kationok képesek kötődni az enzimrendszerhez önmagukban is. A monovalens kationok affinitását a rendszerhez azonban az ATP jelenléte alapvetően befolyásolja. Feltételezhető, hogy az ATP bontás egyes lépései közben a monovalens kation kötőhelyek affinitása a Na^+ és K^+ iránt megváltozik.

12. Nem rendelkezünk olyan bizonyítékokkal, mely cáfolná azt a feltevést, hogy a transzport ATPáz a membrán teljes szélességét elfoglalja. Ez viszont csak akkor képzelhető el, amennyiben a membrán legalább azon helyeit, ahol a transzport ATPáz lokalizálva van, globuláris szerkezetűnek fogadjuk el. Lehetséges, hogy az enzimrendszer több alegységből épül fel.

13. Fiziológiás pH viszonyok mellett, miközben az ATP-ből ADP és anorganikus foszfát keletkezik, egy további H^+ is ledisszociál. Valószínűsíthető, hogy ez az a H^+ , mely a 3 : 2 arányú N^+/K^+ kicserélődés során fenntartja az eredeti pozitív töltéseloszlást a membrán két oldala között.

14. Feltételezhető, hogy a transzport ATPáz működésében a posztulált acilfoszfátot képező karboxil csoporttal szomszédos amino- és SH-csoportok is valami módon részt vesznek az ATP bontással kapcsolatos mechanizmusban.

15. Számos közvetlen és közvetett bizonyítékunk van azzal kapcsolatban, hogy az enzimszisztéma konformációja megváltozik a transzportálandó Na^+ és K^+ ionok, valamint ATP hatására. Feltételezzük, hogy az enzimszisztéma konformáció változása következtében a monovalens kation kötőhelyek körüli elektroneloszlás is megváltozik. A télerősség változása megváltoztathatja a kation kötőhelyek affinitását a Na^+ és K^+ iránt.

16. A transzportszisztéma konformáció-változása egy, a foszforilált csoportoknál fixált aktív centrum rotációjával (OPIT—CHARNOCK modell), illetve egy molekuláris „rés” „bejáratának” ciklikus változásával (JARDEZKY, LOWE) egyaránt összefüggésbe hozható.

17. Valószínű, hogy a Na^+ és K^+ kicserélődési ciklus és az ezt irányító kémiai ciklus (ATPáz) nem kapcsolt mechanizmusok, hanem egymástól elválaszthatatlan ugyanazon rendszer.

18. A transzport ATPáz különböző kísérleti körülmények között különböző kémiai reakciók katalizálására képes. A K^+ dependens foszfátáz aktivitás, az ADP—ATP kicserélődési reakció, ATP-ből történő P inkorporáció, valamint a strofantin jelenlétében mérhető anorganikus foszfátbeépülés a fehérjébe, valószínűleg ugyanazon enzimszisztémának a megnyilvánulásai, melyek valamelyik részreakció sebesség-limitáló tényezővé válásával, illetve a kétirányú reakcióknak a „fiziológiás” egyensúlyi helyzethez képest egy irányban történő eltolódásával hozhatók összefüggésbe.

19. Valószínű, hogy a koncentráció gradiensnek megfelelő irányba működtetett Na^+/K^+ kicserélődés a transzport ATPáz megfordított irányú működése következtében vezet ATP szintézishez. Feltételezhető, hogy az elektrokémiai gradiens irányába történő ionmozgások hozzájárulnak az ATPáz reakció szekvenciájában egyébként irreverzibilis átalakulásnak posztulált lépés reverzibilissé válását, a módot azonban még nem ismerjük.

20. Az aktív iontranszport tanulmányozása nemcsak a mechanizmus megismerése vonatkozásában lényeges, mivelhogy mind az aminosav, mind a cukortranszport függhet a Na^+ transzporttól. Az egyenlőtlen ioneloszlás biztosításán túlmenően tehát a Na^+ és K^+ transzport a sejt energetikai és szintetikus tevékenységével is a legszorosabb kapcsolatban áll.

21. Az aktív iontranszport enzimikus mechanizmusának, azaz a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ aktiválható ATPáz működésének megismerése egyéb mechanizmusok jobb megértését is elősegítheti. Valószínű, hogy az ATP-t felhasználó enzimikus mechanizmusok egy közös őst alapenzimből származnak. Számos Mg^{++} aktiválható, ATP-t felhasználó enzim egyúttal K^+ -dependens is. Bár szubsztrát-kötő specificitásuk különböző, az a mód, ahogy az ATP terminális foszfátjának kötési energiáját K^+ jelenlétében átviszik, közös lehet [LOWE (1968)]. Fel-

tételezhető, hogy nemcsak az enzimatis mechanizmus, hanem az ezt biztosító molekuláris szerkezet is azonos, vagy nagyon hasonló. Így a transzport ATPáz tanulmányozása felhasználható analógiák lehetőségét biztosítja más mechanizmusok, így többek között az oxidatív foszforiláció jobb megismeréséhez is.

22. Mind a felsorolt, mind a nem részletezett további adatok és feltételezések sem elegendők ma még, hogy minden kísérleti adatot és elméleti megfontolást magában foglaló és elfogadhatóan magyarázni tudó $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ transzportmodellt készítsünk.

Az utolsó pontban ismertetett megállapítás kissé borúlátó. Ma még nem tudunk a rendelkezésre álló adatok alapján egy kielégítő modellt megyszerkeszteni. Optimistának kell azonban lennünk, ha arra gondolunk, hogy a biológiai iontranszportról, annak molekuláris mechanizmusáról mennyivel többet tudunk ma, mint 20 évvel ezelőtt, amikor is egy ilyen jellegű összefoglalás záró gondolataként legfeljebb azt lehetett volna elmondani, hogy az aktív kationtranszport „aktív sejt munkával” történik. Még nincs 20 éve annak sem, hogy magyar biokémikusok bebizonyították, hogy az „az aktív sejt munka” az ATP szintézisével, illetve az ATP-nek többek között az aktív iontranszport energetikai szükségletének biztosítására való felhasználásával egyenlő.

PIRIE (1964) 1963-ban tartott Leeuwenhoek emlékelőadásában azt fejtegette, hogy „napjaink biokémiai kutatásának nem az az alapvető problémája, hogy egy kémiai reakció hogyan zajlik le, vagy hogy ez a kémiai reakció hogyan szabályozódik specifikusan, hanem az, hogy az egyik folyamatból származó energia hogyan „hajt” egy másik folyamatot”. Túlzás nélkül állíthatjuk, hogy az aktív $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ transzport az egyik legjobb példa erre az összefüggésre.

SKOU (1957) megfigyelése, hogy a membrán kötött ATPáz aktiválható $\text{Na} + \text{K}$ ionokkal és az a zseniális következtetése, hogy az ATPáz monovalens kationokkal történő aktiválása és aktív $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ transzport között igen szoros kapcsolat lehetséges, képezte a kiindulási alapot az ezen a területen megindult széles körű és eredményes vizsgálatokhoz. Alig másfél évtized alatt a biológiai iontranszport enzimatis működését nagy vonalakban sikerült tisztázni. Hangsúlyozni kell azonban, hogy mindaz, amit erről a kérdéstről ma tudunk, nagyrészt a kiindulási munkahipotézis még ma is szinte tökéletesnek látszó megfogalmazásának köszönhető.

IRODALOM

- ALBERS, R. W., S. FAHN és G. J. KOVAL: The role of sodium ions in the activation of electrophorus electric organ adenosine triphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **50**, 474–481 (1963).
- ALBERS, R. W., G. J. KOVAL és G. J. SIEGEL: Studies on the interaction of ouabain and other cardioactive steroids with sodium potassium-activated adenosine triphosphatase. *Mol. Pharmacol.* **4**, 324–336 (1968).

- EISENMAN, G.: On the elementary atomic origin of equilibrium ionic specificity membrane transport and metabolism 163—179 (1961). Szerk.: Kleinzeller A. és A. Kotyk, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha.
- GLYNN, I. M.: Sodium and potassium movements in human red cells. *J. Physiol.* **134**, 278—310 (1956).
- GLYNN, I. M.: The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. *J. Physiol.* **136**, 148—173 (1957).
- JARDETSKY, O.: Simple allosteric model for membrane pump. *Nature*, **211**, 969—970 (1966).
- KATCHALSKY, A. és R. SPANGLER: Dynamics of membrane processes. *Quart. Rev. Biophys.* **1**, 127—175 (1968).
- LING, G. N.: The membrane theory and other views for solute permeability, distribution and transport in living cells *Perspect. Biol. Med.* **9**, 87—105 (1965).
- LOWE: Enzyme mechanism for the active transport of sodium and potassium ions in animal cells. *Nature*, **219**, 934—936 (1968).
- MUIRHEAD, H. és M. F. PERUTZ: Structure of haemoglobin a three-dimensional fourier synthesis of reduced human haemoglobin at 5.5 Å resolution. *Nature*, **199**, 633—638 (1963).
- MÜLLER, H. E.: Ein Beitrag zum molekulären Modell einer Ionenpumpe *Pflügers Archiv. ges. Physiol.* **295**, 30—41 (1967).
- OPIT, L. és CHARNOCK, J. S.: A molecular model for a sodium pump. *Nature* **208**, 471—474 (1965).
- PIRIE, N. W.: The size of small organism (The Leeuwenhoek Lecture 1963) *Proc. Roy. Soc. B.* **160**, 149—166 (1964).
- SKOU, J. C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394—400 (1957).
- SKOU, J. C.: Enzymatic aspects of active linked transport of Na⁺ and K⁺ through the cell membrane. *Progr. in Biophys.* **14**, 133—166 (1964).
- SKOU, J. C.: Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. *Physiol. Rev.* **45**, 596—617 (1965).
- SOMOGYI J.: Az aktív iontranszport enzimikus mechanizmusa (transzport adenozintrifoszfátáé). *MTA Biol. Oszt. Közl.* **11**, 240—279 (1968).