

SZERKEZETI ÁTALAKULÁSOK LIPIDMEMBRÁNOKBAN

GYÖRGYI SÁNDOR

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Budapest

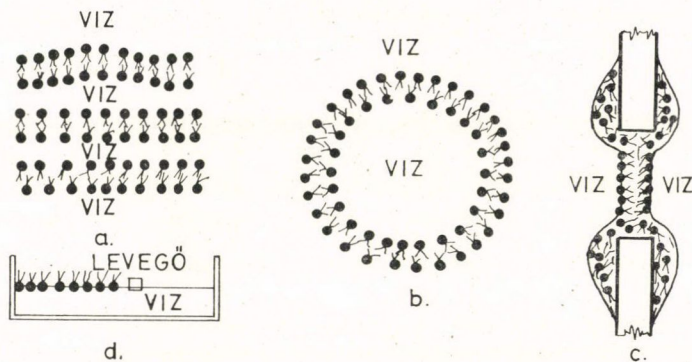
A biológiai membránok működésében, a transzportfolyamatok szabályozásában meghatározó szerepet játszó mechanizmusok közül ezúttal a *lipidrétegben* végbemenő *szerkezeti változásokat* emeljük ki és jelentőségüket, első-sorban hazai eredmények ismertetésével szemléltetjük. A kérdés gyakorlati jelentőségét aláhúzza az a tény, hogy olyan tulajdonságok, mint a membrántranszport, a gyógyszerhatás, az ingerület terjedése, vagy éppen a hidegtűrés befolyásolható a membrán-lipidek strukturális állapotával.

1. A „fluid mozaik” szerkezetű membránból most tehát a folyadék-kristály tulajdonságot mutató, dinamikus szerkezetű lipidrétegre szűkítjük tárgyalásunkat. Ennek legtöbb tulajdonsága jól tanulmányozható az ún. *modellmembránok* segítségével és — ami ugyancsak fontos — a kapott eredmények nemcsak elvileg, de sok vonatkozásban gyakorlati szempontból is érdekesek.

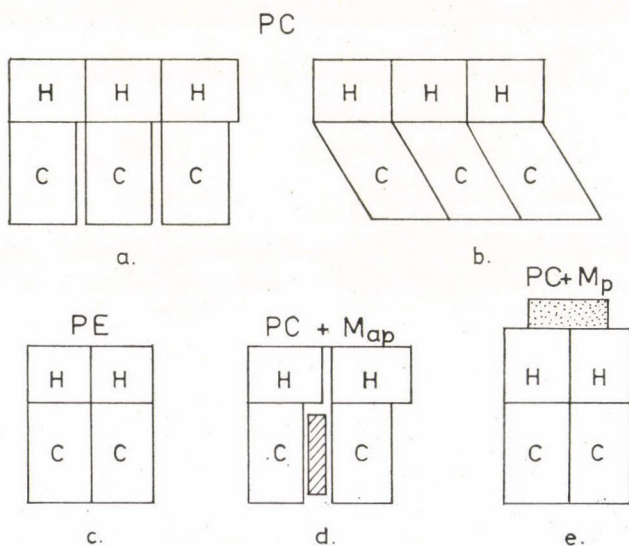
Ha sejtmembránokból kivont lipideket vízzel, elektrolittal hozzuk össze, akkor a lipid/víz aránytól, ill. a kezelés módjától függően különböző elrendeződések jöhetnek létre (NAGLE és SCOTT, 1978) (1. 1. ábra). Az amfipatikus karakterű, poláris fejcsoportot és apoláris szénhidrogén láncot tartalmazó foszfolipid molekulák alkothatnak ún. *multilamelláris rendszert* (1a. ábra), egyszeres, vagy többszörös kettősréteggel körülvett *vezikulákat* (ún. liposzómákat (1b.)), amelyek különösen transzport vizsgálatra előnyösen használhatók. Előállíthatók *sík bimolekuláris* rétegek is kb. 1–2 mm átmérőjű nyíláson (1c.). Külön típust jelent a monomolekuláris film (1d.), amely mint fél kettősréteg, ugyancsak alkalmas egy sor membrán-tulajdonság vizsgálatára.

1.1 A lipid—víz rendszerek szerkezete — fázisállapota — adott körülmények (hőmérséklet, koncentráció, pH stb.) között is függ a lipidmolekulák típusától, és adalékanyagokkal megváltoztatható. A 2. ábra NAGLE (1976), ill. McINTOSCH (1980) alapján azt szemlélteti, hogy mivel foszfatidilkolin (PC) esetén (ez a membránok egyik fő és ezért legtöbbet vizsgált, foszfolipid komponense) a fejcsoport térigénye nagyobb, mint a szénhidrogén láncok keresztmetszete (a), a láncok közötti van der Waals erők érvényesülése szempontjából energetikailag kedvezőbb, ha a láncok megdőlnék (b). Foszfatidiletanolamin (PE) esetén a kisebb fejcsoport átmérő miatt erre a dőlésre nincs szükség

(c). Az ábra egyúttal azt is szemlélteti (d. és e.), hogy a membrán apoláris fázisába bevitt apoláris (M_{ap}), vagy a fejszoportokkal kölcsönható poláris (M_p) *módosító anyagok hatására* megváltozhat a fázisállapot. Mindkét típusú kölcsönhatás felléphet a membránműködést befolyásoló anyagok hatásának kiala-



1. ábra. Példák a lipid-víz rendszerekre: a) multilamelláris rendszer, b) vezikula, c) sík bi-molekuláris membrán (BLM), d) monomolekuláris réteg (NAGLE és SCOTT 1978)

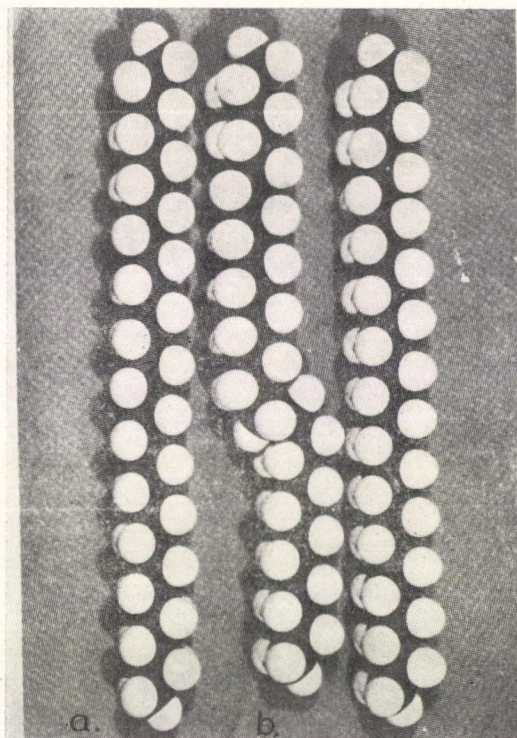


2. ábra. Módosítatlan és módosított lipidrétegek szerkezetének vázlatja: PC: foszfatidilkolin, PE: foszfatidil-etanolamin, M_{ap} (apoláris), M_p (poláris) módosítóanyagok elhelyezkedése és hatása a membrán szerkezetére (McINTOSH 1980)

kulása során. A lipid kettősréteg ezen *intermolekuláris rendjének* megzavarása a membránfunkció jelentős megváltozását vonja maga után.

1.2 A szerkezeti változások másik, funkcionális szempontból hasonlóan fontos típusát jelentik az ún. *intramolekuláris* konformációváltozások, a transz-

gauche átmenetek. A fázisátalakulási hőmérséklet alatt a szénhidrogén láncok kinyújtott állapotban ún. all transz konfigurációban találhatók (3.a. ábra). Energiafelvétellel egy vagy több kötés $\pm 120^\circ$ -os elfordulással gauche állapotba kerülhet (ehhez ~ 2 kJ/mól energia szükséges) és a láncban egy, vagy több törés jön létre (3.b. ábra). Egy gauche állapot, különösen a fejhez közelebb, nagyon megnövelné a molekula helyigényét, ezért a 2. ill. 4 gauche-t tartal-

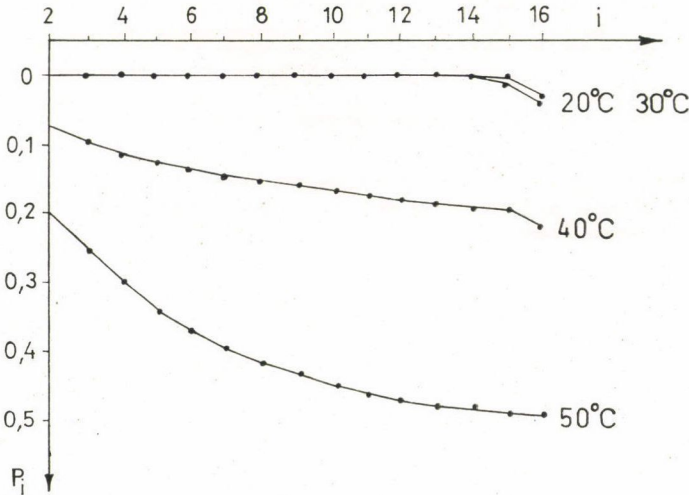


3. ábra. Foszfolipidek apoláris szénhidrogén láncainak két lehetséges konformációs állapota: a) nyújtott (all transz), b) megtört (gauche)

mazó ún. 2g, ill. 4g állapot a valószínűbb, ami két, ill. három oldalról zárt hibahelyet (*kinket*) eredményezhet. Könnyen belátható, hogy a gauche szám, azaz a kink koncentráció növekedésével a membrán átjárhatósága is megnő, s a permeabilitás növekedés számos transzportfolyamat sebességének megemelkedését vonja maga után.

2. Az inter- vagy intramolekuláris szerkezetváltozások *kvantitatív leírása* és ennek révén a funkcióban létrejött módosulások értelmezése különösen összetett, többkomponensű rendszereknél meglehetősen bonyolult feladat, egykomponensű modellrendszerek esetén azonban könnyebben megoldható. Egy ilyen *statisztikus mechanikai modellt* dolgozott ki intézetünkben SUGÁR — a

nematikus folyadékkristályok elméletéből kiindulva — a foszfolipid kettős-rétegben külső elektromos tér, ill. hőmérsékletváltozás hatására lejátszódó szerkezeti átalakulások molekuláris szintű értelmezésére (SUGÁR 1979, SUGÁR, GYÖRGYI 1980). A modellben a membrán energiáját leíró Hamilton-függvény felírása során az irodalomban található modellekben szereplő tagok (fejcsoportok és szénhidrogén láncok közötti vonzó és taszító kölcsönhatási energia, valamint az intramolekuláris konformációs energia — a gauche állapotok energiája —) mellett az intramolekuláris deformációt (rugalmassági energiát),



4. ábra. A gauche állapot valószínűsége dipalmitoil-foszfátidilkolin (DPPC) szénhidrogén láncának különböző szénatomjánál 20, 40 és 50°C-on. Az i a fejcsoporttól számított sorrendet jelzi

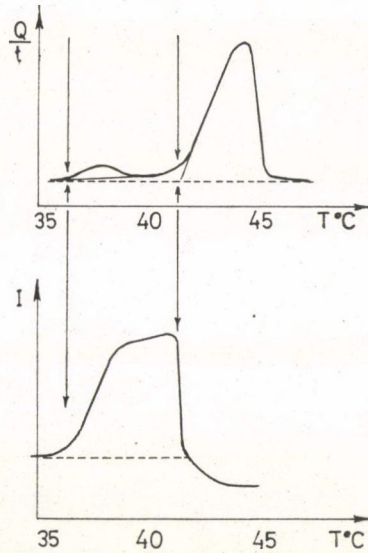
ill. az elektrosztatikus tér—membrán kölcsönhatást is figyelembe vette. Ennek alapján kimutatta, hogy a külső elektromos tér elektromechanikai nyomása révén kiválthatja a membrán struktúra megváltozását, a membrán permeabilitás elektromos tér hatására bekövetkező megnövekedését.

A modell alapján *kiszámítható* volt a transz-gauche átmenetek száma különböző hőmérsékleteken és eredményül a kísérleti adatokkal (YELLIN és LEVIN 1977) megegyező értékeket kaptunk. Meghatároztuk a gauche képződés valószínűségét a láncok különböző mélységeiben (4. ábra). Az eredmények szerint pl. a dipalmitoil-foszfátidilkolin (DPPC) fázisátalakulási hőmérséklete alatt főleg all transz állapotok találhatóak, legfeljebb a lánc végén jöhet létre egy-egy gauche állapot, a fázisátalakulási hőmérséklet közelében (35–40 °C-on) átlagosan 1 gauche/lánc, felette 4–5 gauche/lánc érték adódik.

Az elméleti megfontolások és számítások alapján a lipidmembránok hőmérséklet indukálta fázisátalakulására az eddigiektől eltérő értelmezést adtunk, amit az jellemez, hogy fázisátalakuláskor az intramolekuláris és inter-

molekuláris rend együttes csökkenése jön létre és az ilyenkor tapasztalt permeabilitás növekedésnek kb. 50%-a kinkképződésre vezethető vissza, míg a második 50% az intersticiálisan átjutott molekulákból, ionokból adódik.

3. A módosítatlan, vagy különböző anyagokkal módosított lipidmembránok szerkezeti átalakulásának kvantitatív jellemzésére legtöbbször az átalakulási hőmérsékletet és entalpiát használják. Míg ez utóbbi mérésére a mikro-

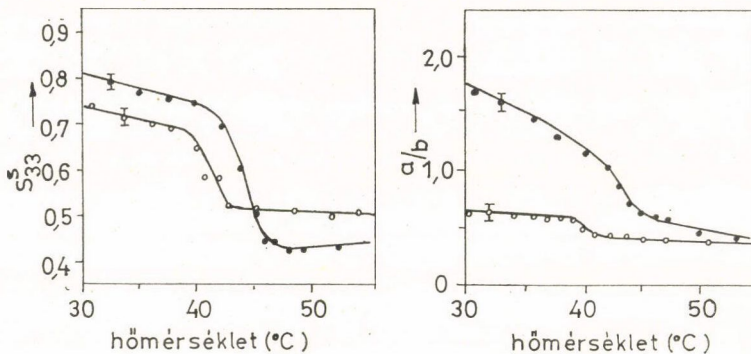


5. ábra. DPPC-víz rendszer elő- és fő-fázisátalakulását jelző differenciál szkening kalorimetriás (felső görbe), ill. termo-depolarizációs analízissel kapott görbe. Alul: a különböző hőmérsékleti intervallumokhoz tartozó szerkezetek vázlata

kalorimetriás módszerek használhatók, az átalakulási hőmérséklet meghatározására minden olyan eljárás alkalmazható, amelynek segítségével az intra- vagy intermolekuláris rendben beálló változás detektálható (optikai, mágneses rezonancia spektroszkópia, diffrakciós módszerek).

3.1. Az 5. ábra felső részén a dipalmitoil-foszfátidilkolin (DPPC) immár klasszikusnak számító differenciál szkening kalorimetriás (DSC) görbéje látható, amelyen a nagyobb maximum a fő (v. Chapman-féle) fázisátalakulást mutatja, az előtte levő kisebb maximum pedig egy kb. 36 °C-nál kezdődő fázisátalakulást jelez. Ez utóbbi az ún. *pretransition* vagy elő-fázisátalakulás. Az ábra alján levő sematikus rajzok szemléltetik az egyes fázisállapotokhoz tartozó szerkezeteket.

Az ábra közepén ugyanezen DPPC/víz rendszer termodepolarizációs analízissel (TDA) felvett fázisátalakulási görbéje látható. Az eddig csak termotrop rendszereknél használt módszert — a lipidrétegek folyadék-kristályos tulajdonságára, a liotrop és termotrop rendszerek hasonlóságára alapozva — SZABON (KFKI) alkalmazta először foszfolipid modellrendszereink vizsgálatára (SZABON 1979). Lényege, hogy szerkezetváltozás hatására ugrásszerűen megváltozik a mintán átjutott depolarizált fény intenzitása. Lényeges előnye a TDA módszernek, hogy a költségesebb DSC-vel is nehezen mérhető elő-fázisátalakulás szelektíven követhető vele. Mindkét módszert használjuk a vizsgált



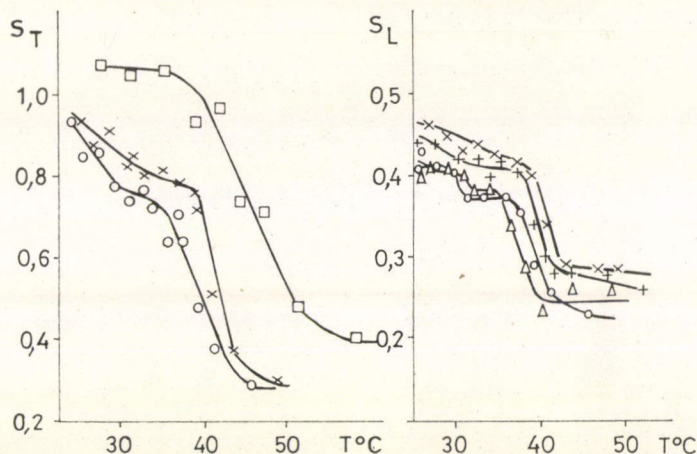
6. ábra. Az ESR transz (S_{33}^s) rendparaméter és a rotációs diffúziós sebességgel arányos jellemző (a/b) hőmérsékletfüggése módosítatlan (o), ill. hexadekanollal módosított (.) DPPC membrán esetén (HORVÁTH és mtsai 1980)

rendszereink termodinamikai paramétereinek meghatározására, a membránműködést módosító anyagok hatásának jellemzésére.

3.2. A lipidmembránokban végbemenő szerkezeti átalakulások vizsgálati lehetőségeit két további példával illusztráljuk. HORVÁTH (SZBK Biofizikai Intézete) módosítatlan és módosított DPPC membránok ESR vizsgálata során kimutatta (l. 6. ábra), hogy mind az intramolekuláris rendet jellemző S_{33}^s (transz) rendparaméter, mind pedig a rotációs diffúziós sebességgel arányos a/b adat érzékenyen változik a DPPC fázisátalakulásakor (~ 42 °C-on), valamint, hogy az apoláris karakterű hexadecanol (0,5 mól %) eltolja (magnöveli) a fázisátalakulási hőmérsékletet, miközben mindkét rendparaméter hőmérsékletfüggése változik (HORVÁTH és mtsai 1980). A zsírsavláncok közé beilleszkedő alkoholmolekulák növelik a van der Waals kölcsönhatást, árnyékolják a fejsoportok taszító hatását (l. 2. ábra), s így növelik T_m értékét.

3.3. Hasonlóan érzékeny módszer a fázisátalakulások követésére a lézer-Raman spektroszkópia. A spektrális adatok alapján számolt, az intra- és intermolekuláris strukturális állapotot jellemző transz (S_T) és laterális (S_L) rendparaméterek hőmérsékletfüggését mérve a fázisátalakulás, ill. módosító anya-

gok hatása kimutatható. A 7. ábrán LOSCHILOVA (SZBK Biofizikai Intézet) eredményei láthatók, aki KARVALY Bélával együtt kimutatta, hogy többek között, a Ca^{++} jelentősen módosítja a DPPC/víz rendszerek esetében mért Raman transz rendparamétert (S_T) és kisebb mértékben ugyan, de a laterális (S_L) is (LOSCHILOVA és KARVALY 1978, LOSCHILOVA 1980). Jól látható, hogy nagyobb Ca^{++} koncentrációnál (X: 100 mM, \square : 1 M, +: 10 mM) nő az átalakulási hőmérséklet, ugyanakkor eltűnik az elő-fázisátalakulás. A Ca^{++} stabilizáló hatásával kapcsolatban is a 2. ábrára hivatkozunk.



7. ábra. Ca^{++} hatása DPPC-víz rendszer Raman transz (S_T) és laterális (S_L) rendparaméterére a fázisátalakulási hőmérséklet környezetében (\circ : kontroll, \triangle : 1 mM, +: 10 mM, \times : 100 mM, \square : 1 M Ca^{++} koncentráció esetén) (LOSCHILOVA 1980)

3.4. A lipidmembránokban adalékanyagokkal kiváltott szerkezeti átalakulás és az ennek eredményeképpen a membránműködésben (transzportban) létrejövő változás közötti kapcsolatot jól szemléltetik azok az eredmények, amelyeket intézetünkben Szőgyi Mária, Szabon Jánossal és Cserhádi Tiborral együttműködésben kapott. Kísérleteikben egy nemionos felületaktív anyag, a nonilfenil-etilénoxid különböző nagyságú hidrofil részt, de azonos hidrofób láncot tartalmazó származékainak hatását vizsgálták DPPC liposzóma fázisátalakulási paramétereire és ^{42}K permeabilitására. Megállapították, hogy a gyógyszerformulálásban is használt, amfipatikus karakterű vegyület hatására csökken az átalakulási entalpia és az átalakulási hőmérséklet — azaz lazult a szerkezet. A permeabilitási adatok az I. táblázatban láthatók. A jobboldalon az egyik vegyületnek a kontrollhoz képest mintegy 8-szoros permeabilitást eredményező hatása (20 °C-on), míg a baloldalon a homológ sor különböző számú poláris csoportot tartalmazó tagjainak ($n = 4, 6, 9, 13, 30$) permeabilitás növelő hatása látható 42 °C-on, azaz a fázisátalakulás hőmérsékletén. A változás itt

I. táblázat

DPPC liposzóma ^{42}K kiáramlását jellemző permeabilitási állandók (p) különböző (n) számú etilénoxid csoportot tartalmazó nonil-fenil-eliténoxid vegyületek esetében

	42 °C	20 °C
P_k	$= 5,2 \cdot 10^{-10}$ cm/s	$0,5 \cdot 10^{-10}$ cm/s
P_{n-4}	$= 5,3 \cdot 10^{-10}$ cm/s	
P_{n-6}	$= 9,0 \cdot 10^{-10}$ cm/s	$4,1 \cdot 10^{-10}$ cm/s
P_{n-9}	$= 12,0 \cdot 10^{-10}$ cm/s	
P_{n-13}	$= 8,2 \cdot 10^{-10}$ cm/s	
P_{n-30}	$= 6,0 \cdot 10^{-10}$ cm/s	

is szembetűnő, valamint az is, hogy a hatás nem lineáris függvénye a poláris csoportok számának, hanem a közepes értékeknél ($n = 6, 9$) a legnagyobb. Hasonló jellegű nonlinearitás tapasztalható a vegyületek lipofilitásában és biológiai hatékonyságában is, s mindez korrelációban van a DSC-vel mért termodinamikai paraméterek változásával.

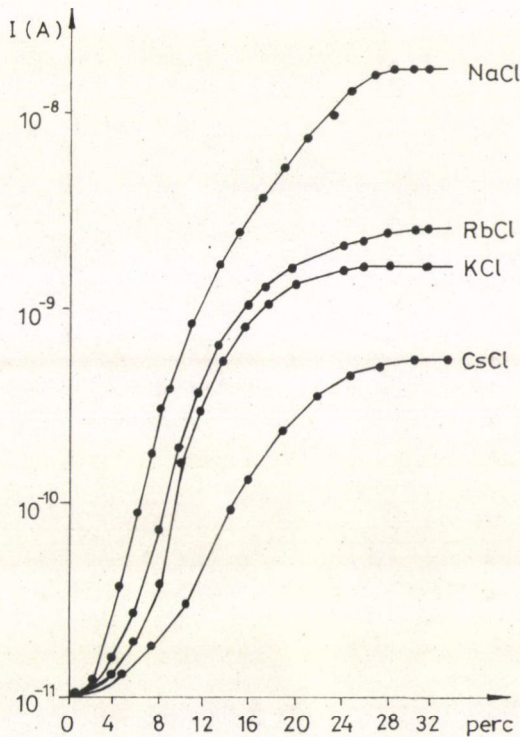
A módszer egyébként jól alkalmazható membránra ható vegyületek hatáserősségének kvantitatív jellemzésére és összehasonlítására — általában a szerkezet-hatás vizsgálatokban. Hasonló jellegű vizsgálatokkal mutatott ki intézetünkben SZŐGYI, TARJÁN és TAMÁS (1980) szoros korrelációt négy különböző antibiotikum baktericid hatása és membránokon kiváltott permeabilitás növelő hatás között.

3.5. A lipidmembránban létrehozott szerkezetváltozások vizsgálatának és a kölcsönhatás értelmezésének az előzőekhez hasonlóan alkalmas modell-rendszere a sík bimolekuláris lipidmembrán (BLM) is. A BLM elektromos paramétereiből (áram-feszültség karakterisztika, vezetőképesség) értékes kvalitatív és kvantitatív információk nyerhetők. A 8. ábrán — (intézetünkben BLASKÓ mérései HORVÁTH kezdeményezésére) egy új antibiotikum, a primycin hatását szemléltetjük foszfatidilszerinből készült BLM vezetőképességére különböző alkáliionok jelenlétében (BLASKÓ és mtsai 1979). A görbék egyrészt szemléltetik a permeabilitást növelő hatás szelektív voltát, másrészt az időfüggés jellegéből, valamint a parallel vörösvérsejteken is elvégzett egyéb vizsgálatok eredményeiből arra lehet következtetni, hogy az amfipatikus karakterű molekula először elektrosztatikus kölcsönhatás révén kötődik a BLM-hez és csak bizonyos idő után jut be a hidrofób részével a szénhidrogén láncok közé. Az ábrán látható vezetőképesség növekedést főleg ez utóbbi lépés okozza, de a fejcsoportokkal való kölcsönhatás is jelentős, amit az is bizonyít, hogy a permeabilitás növelésével egyidőben a primycin fokozza a membrán mechanikai stabilitását (kb. hasonló mechanizmus szerint, mint a Ca^{++}).

3.6. Végül még egy gyakorlati jelentőségű példa. Szegedi kutatók összefüggést találtak többek között egyes búzafajok hidegtűrése és a növényi sejt-

membrán lipidrétégének termodinamikai sajátosságai között, ill. a rizs hidegtűrőképessége és a gyökérsejtek alkáliion transzportja között (VIGH és mtsai 1979, ERDEI és ZSOLDOS 1977).

4. Az előzőekben rövid áttekintést adtunk a membrán-biofizikai kutatások egyik fontos területéről, amely szerte a világon, így hazánkban is, az utóbbi időben indult rohamos fejlődésnek. A bemutatott példák jelzik a kutatás



8. ábra. Primycin hatása foszfatidilszerinből készült BLM vezetőképességére különböző alkáliionok jelenlétében. A görbék a 40 mV-nál mért áramerősség értékeket mutatják a primycin hozzáadásától számított idő függvényében

jelenlegi helyzetét és a további vizsgálatok irányát, egyúttal azt is szemléltetik, hogy az általunk alkalmazott módszerek alkalmasak egyrészt a lipidmembránra gyakorolt hatás és közvetve a biológiai hatékonyság kvantitatív jellemzésére, másrészt a hatásmechanizmus felderítésére. Meg kell mondani azonban, hogy az ismertetett kutatások gyakorlati jelentőségének felismerése mindezidáig elsősorban a membrán transzporttal foglalkozó kutatók részéről merült fel. Kívánatos volna, ha ez a törekvés a gyakorlati szakemberek kifejezettebb igényével találkozna.

IRODALOM

- BLASKÓ, K., S. GYÖRGYI, I. HORVÁTH: *J. Antibiotics* **32**, 408–413 (1979).
ERDEI, L., F. ZSOLDOS: *Physiol. Plant.* **41**, 99–104 (1977).
HORVÁTH, L. I., J. CIRÁK, L. VIGH: *Chem. Phys. Lipids.* **27**, 237–250 (1980).
LOSCHILOVA, E., B. KARVALY: *Biochim. Biophys. Acta* **514**, 274–285 (1978).
LOSCHILOVA, E.: *Liquid Crystals, Research and Applications. Proc. III. Liquid Crystal Conference, Akadémiai Kiadó, Budapest (1980).* megjelenés alatt.
MCINTOSH, T. J.: *Biophys. J.* **29**, 237–246 (1980).
NAGLE, J. F.: *J. Membrane Biol.* **27**, 233–239 (1976).
NAGLE, J. F., H. L. SCOTT: *Physics Today*, Febr., 38–46 (1978).
SUGÁR, I. P.: *Biochim. Biophys. Acta* **556**, 72–85 (1979).
SUGÁR, I. P., S. GYÖRGYI: *Liquid Crystals, Research and Applications. Proc. III. Liquid Crystal Conference, Akadémiai Kiadó, Budapest (1980).* megjelenés alatt.
SZABON, J.: *Liquid Crystals, Research and Applications. Proc. III. Liquid Crystal Conference, Akadémiai Kiadó, Budapest (1980)* megjelenés alatt.
SZŐGYI, M., I. TARJÁN, Gy. TAMÁS: *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **15**, 57–63 (1980).
VIGH, L., I. HORVÁTH, L. I. HORVÁTH, D. DUDITS, T. FARKAS: *FEBS Letters* **107**, 291–294 (1979).
YELLIN, N., LEVIN, I. W.: *Biochem.* **16**, 642–647 (1977).