

MEMBRÁNKONFORMÁCIÓ ÉS FEHÉRJE BEÉPÍTÉS

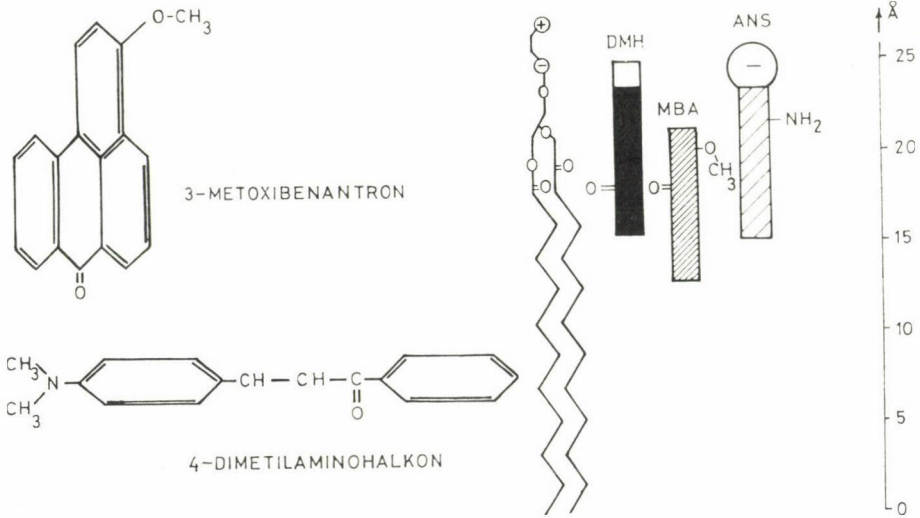
JÓNA ISTVÁN

Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma, Debrecen

A biológiai membránokban található fehérje természetű anyagok funkcionális sajátosságait erősen befolyásolja a membrán pillanatnyi struktúrája, konformációja; így a különböző membránok konformációs állapotainak, valamint ezek befolyásolásának komoly jelentősége van.

A fázisátmenetek vizsgálati módszerei túlnyomórészt bonyolult és költséges mérési eljárásokat igényelnek (differenciál-termál kalorimetria, röntgen-diffrakció . stb.), bár az utóbbi időben néhány relatíve egyszerű és gyors módszer is ismeretessé vált [1]. Mivel távolabbi célunk a lipid fehérje kölcsönhatások részletes vizsgálata, az alapstruktúra tanulmányozása elkerülhetetlen. Foszfátidilkolinból készített multilamelláris struktúrán a fent említett módszerekkel két fázisátmenet figyelhető meg 0 °C és 42 °C környékén, míg az ERDEI és mtsai által kidolgozott refraktometriás módszer még egy további fázisátmenet — 18—22 °C körül — kimutatására alkalmas. E két módszer nem mentes a különböző keresztteffektusoktól (oldószerhatás és az igen közeli rétegek egymás közötti kölcsönhatása), így egy könnyebben kezelhető jó felbontást adó másik módszert — fluoreszcens jelzőt — választottunk, és megfelelő tisztaságú lipidből készített kettős-réteg hólyagok fázisátmeneteit vizsgáltuk. E módszer további előnye, hogy a puffer kompozíció a membrán két oldalán tetszőlegesen — különbözően is — beállítható. Az itt leírt vizsgálatoknak első részére intézetünk és a II. sz. Moszkvai Állami Egyetem (Pirigova Institut) Biofizikai Tanszékének együttműködése keretében került sor. Fluoreszcens jelzőként a metilbenzantront és a dimetilaminohalkont használtuk. Mindkét vegyületre jellemző, hogy vízben praktikusán oldhatatlanok, kvantumhatásfokok pedig erősen függ — a környező molekulák által meghatározott — térszerkezettől; az emissziós spektrum alakja, valamint a maximális fluoreszcenciaintenzitás hullámhossza függ a festék molekula mikrokörnyezetének dielektromos állandójától. Feltételezésünk szerint a molekulák a kettős réteg síkjára merőlegesen orientálódnak a liposzóma falában, és adhéziós típusú kölcsönhatásba lépnek a lecitin molekulákkal. A hipotetikus térszerkezet sematikusan az 1. ábrán látható. A tojás lecitinből készített homogén liposzóma frakcióhoz adott (alkoholos oldatban) dimetilaminohalkon (DMH) fluoreszcencia intenzitásának függése a hőmérséklettől több fázisátmenet jelenlétére utal.

A 2. ábrán kontrollként feltüntettük a fényszórás, ill. a dimetilformamidban oldott DMH fluoreszcenciájának hőmérsékletfüggését is. Szintetikus lecitinből készült liposzóma preparátumokon ellenőriztük a fluoreszcenciaintenzitás és a fázisátmenetek kapcsolatát, és azt találtuk, hogy dipalmitoillecitin, dimirisztoillecitin, disztearillecitin esetén az irodalomban ismert fázisátmeneti



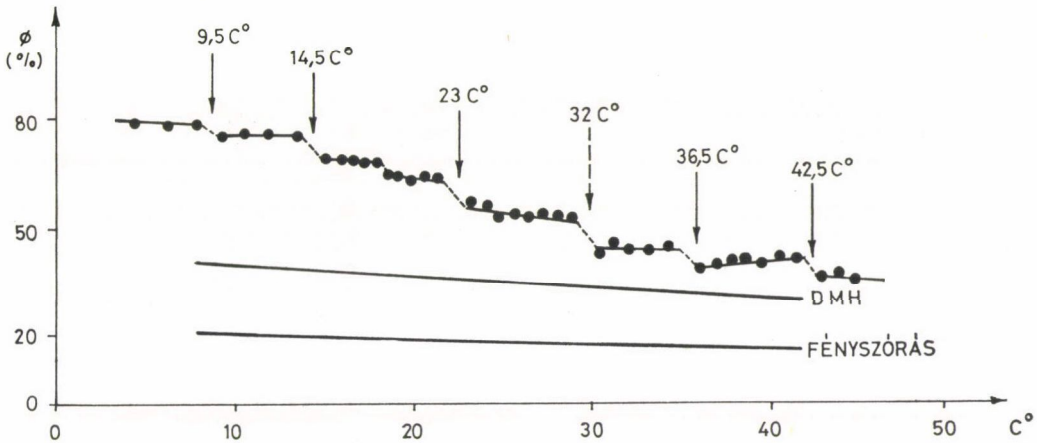
1. ábra. A membrán konformációs állapotának vizsgálatára használt festékek szerkezeti képlete, és membránban elfoglalt helyzetének vázlatos képe

hőmérsékletek és az általunk mérték megegyeznek. Ezt, valamint a hipotetikus térszerkezetet figyelembe véve igen valószínű, hogy a fluoreszcenciaintenzitás ugrásszerű változásai a BLM fázisátmeneteivel kapcsolatosak. Az ábrán feltüntettük az átmeneti hőmérsékleteket is. E mérések 100 mM NaCl, 10 mM trisz-HCl pufferben ($\text{pH} = 7,0$) történtek. A kapott fázisátmeneti hőmérsékletek jól egyeznek az NMR spektroszkóppal meghatározott értékekkel.

Klórtetraciklin-(CTC)-EDTA rendszerben meghatároztuk a membrán kalcium permeabilitásának hőmérsékletfüggését; azt találtuk, hogy $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt a Ca^{2+} egyáltalán nem (azaz a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra vonatkozó értéknél legalább 10^4 -szer lassabban) penetrál, $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tól $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig terjedő tartományban pedig igen lassan és a hőmérséklettől független sebességgel. $36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál hirtelen erősen megnő a permeabilitás és a magasabb hőmérséklet felé hőmérsékletfüggése diffúziós (exponenciális) jellegű. Ez az eredmény megegyezik a fenti NMR-mérések eredményével és legvalószínűbb magyarázata, hogy a CTC- Ca^{2+} komplex a membránban — konformációs okok miatt — $36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ fölött jól oldódik, és így mintegy „carriere” a CTC a Ca-nak. A $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ — $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -s tartományban pedig a membrán hidrokarbon régiójába való belépés limitál, ami magyarázza az

alacsony permeabilitási értékeket és ennek hőmérsékletfüggését. Ezen adatok megerősíteni látszanak, hogy a DMH-val és MBA-val mért fázisátmenetek valódi membránszerkezeti változásokkal kapcsolatosak.

A fehérjebepépítési kísérleteket az MTA Szegedi Biológiai Központjának Biofizikai Intézetében, a dr. Karvaly Béla által vezetett munkacsoport



2. ábra. A 4-dimetilaminohalkon festéssel a fluoreszcencia-intenzitás függése a hőmérséklettől. A görbe jól látható „törései” különböző jellegű szerkezeti módosulásokra utalnak

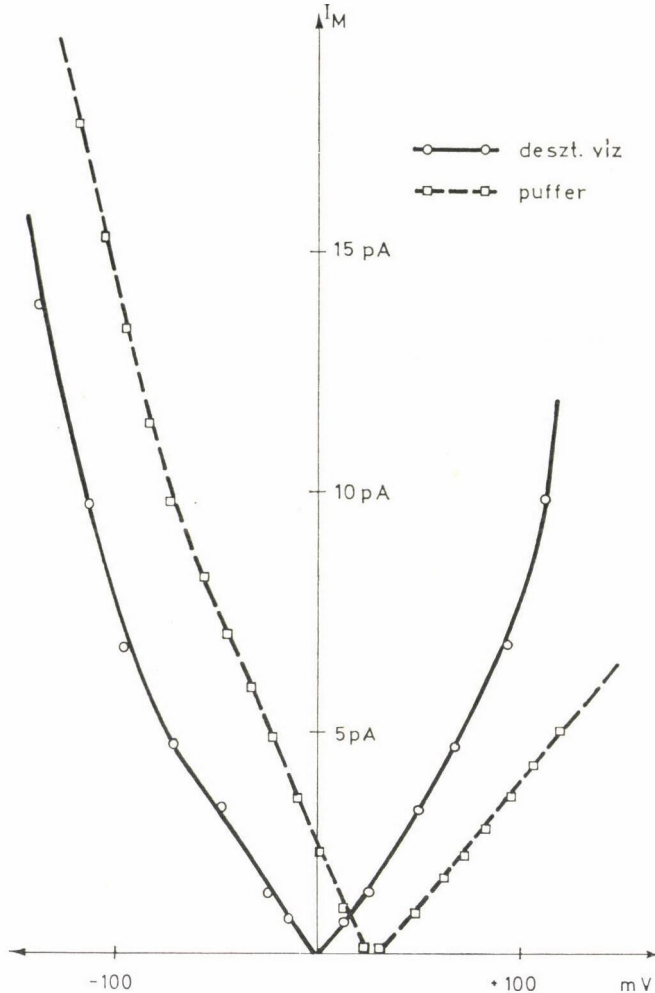
segítségével végeztük. Méréseinkhez — technikai okokból — lecitin-koleszterin 2 : 1 arányú membránokat használtunk, és a mérések közben a puffer hőmérséklete 23 ± 2 °C volt. A kétoldali pufferösszetétel aszimmetrikus:

I	II
7,6 mM szacharóz	25 mM szacharóz
5 mM MgCl ₂	0,15 mM MgCl ₂
1 mM K-EGTA	0,1 mM K-EGTA
40,8 mM K-glutamát	0,8 mM K-glutamát
10 mM hisztidin	1 mM hisztidin
0,1 mM CaCl ₂	0,01 mM CaCl ₂
	40 mM KCl
(+ 5 mM ATP)	(+1,26 mg hisztidin/mg protein)

A megadott polaritások a II. kompartmentnek az I.-re vonatkoztatott polaritását jelentik. Minden alkalommal először meghatároztuk az adott BLM áram-feszültség karakterisztikáját deszt. vízben, majd a két oldalon beállítottuk a fenti ionkoncentrációkat (ugyanaz a membrán!), és ismét meghatároztuk e karakterisztikákat (3. ábra).

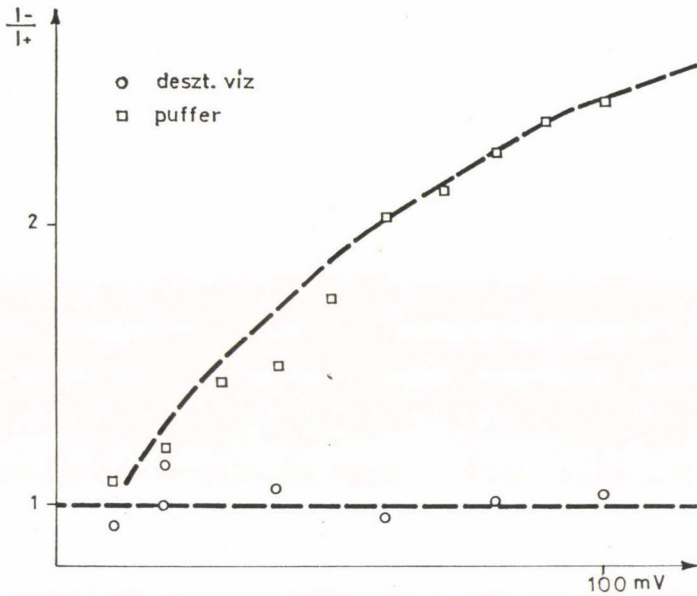
Az ábrából jól látható, hogy a karakterisztika jellege megváltozott és aszimmetrikussá vált. Meglepő, hogy a mérési hibán belül a pozitív feszültség alkalmazása esetén mérhető vezetőképesség — az adott puffer-rendszer mel-

lett — nem függ a feszültségtől, a mérési tartományban. A 4. ábrán a kétoldali áramhányadosokat tüntettük fel a membránfeszültség függvényében. A pufferrendszer erős „egyenirányító” jelleget kölcsönöz a membránnak a glutamátionok jelenléte miatt. Az 5. ábrán a membrán ellenállásának a rajta átfolyó

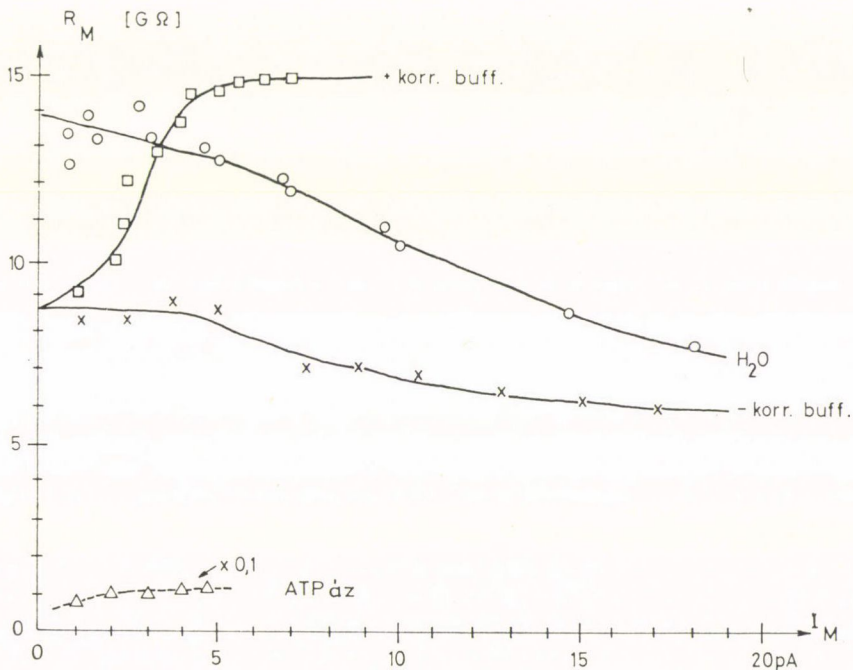


3. ábra. A BLM áram-feszültség görbéi ugyanazon membránon mérve desztillált vízben és „sejtszerű” aszimmetrikus pufferben

áramtól való függése látható. Deszt. víz esetén a vezetőképességet alapvetően a membrán permeabilitása korlátozza, azaz szabja meg, és ez irányfüggetlen. Pufferben a negatív irányú ellenállás lefutásában azonos a deszt. vízével, de mintegy 40%-kal magasabb permeabilitási állandó mellett. A pozitív irányú ellenállás áramfüggése az előbbiekkal teljesen ellentétes és a reális membráno-

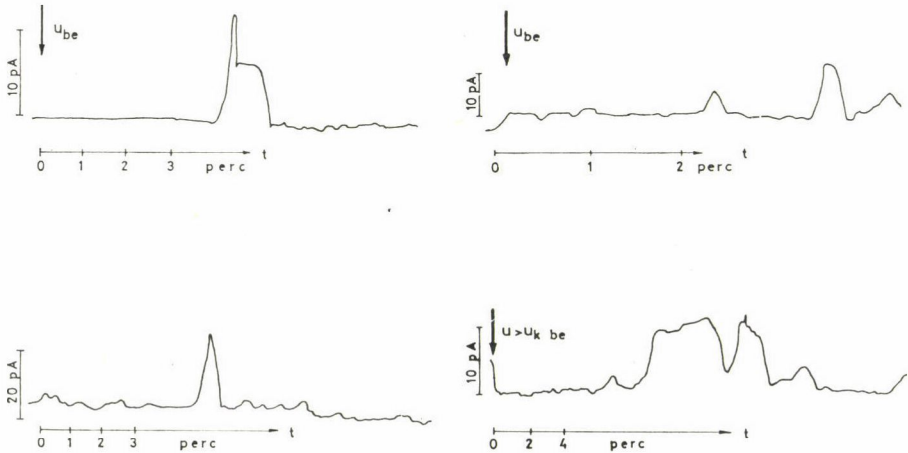


4. ábra. Az aszimmetrikus pufferrendszer által okozott áramaszimmetria függése a membránfeszültségtől



5. ábra. A membrán ellenállása a rajta átfolyó áram függvényében, desztillált víz és az aszimmetrikus pufferrendszer esetén. Jól megfigyelhető a kétoldali kettős diódaszerű aszimmetria

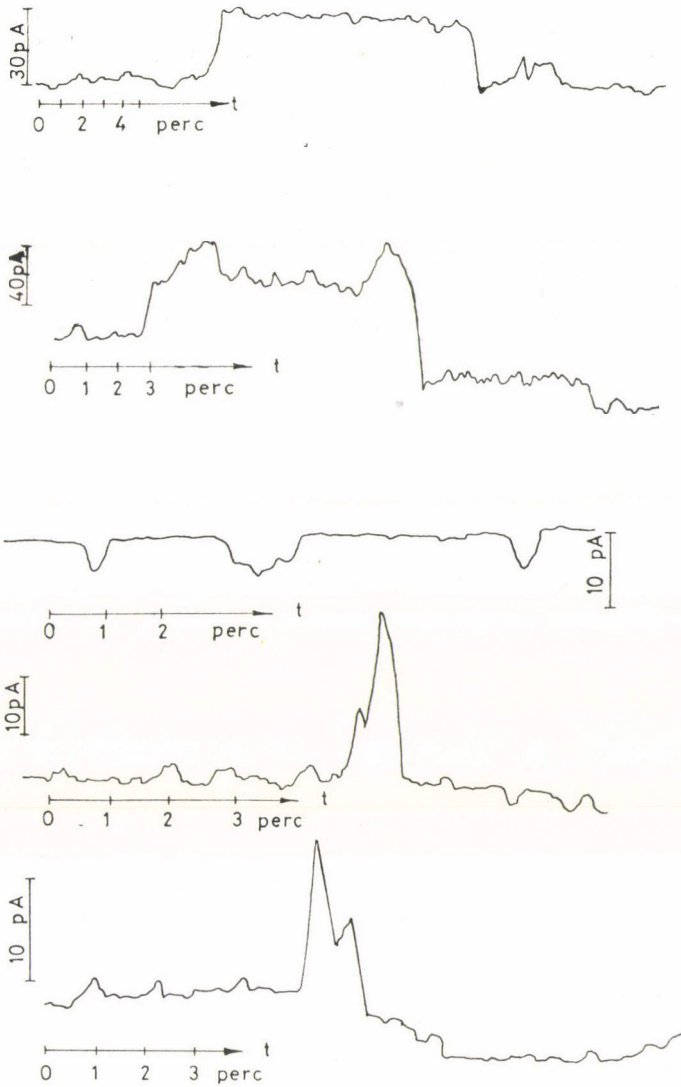
kéra emlékeztet. A függés egy pozitív ion, — melynek mozgását a membrán permeabilitás korlátozza — és egy negatív ion — töltéstranszport limitált — egyidejű mozgásával magyarázható, figyelembe véve, hogy a II. oldalon túlnyomórészt nem penetráló anionok vannak jelen. Az ábrán feltüntettük még a fehérjebeépítést követően mérhető pozitív polaritáshoz tartozó függvényt is,



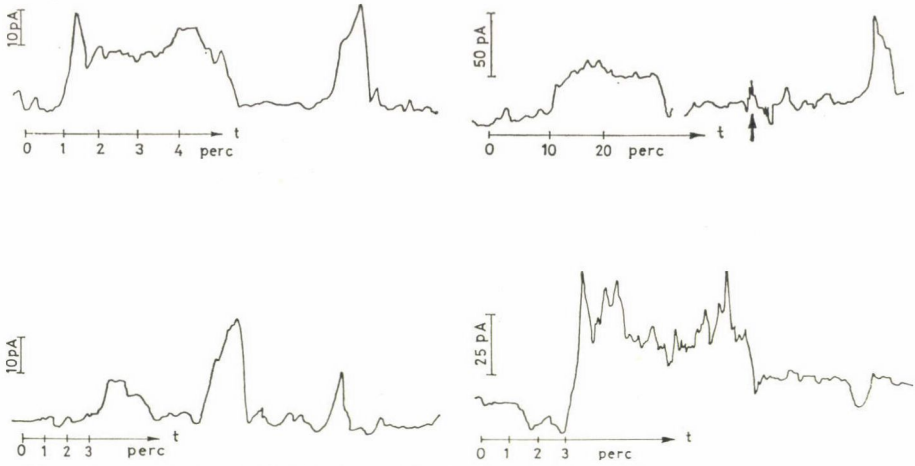
6/a. ábra. A membránon folyó áram az idő függvényében ATPáz beépülését követően „nyitóirányban”

mely tendenciájában is eltér az azonos polaritású fehérje nélküli függvénytől. A fehérjét tartalmazó membrán karakterisztikája az ellentétes polarításra nem meghatározott. Szinkron kapacitás mérések szerint a fehérje hozzáadását követő 1. spontán, hirtelen vezetőképesség változás után mérhető membránkapacitás az azt megelőző érték 2,1—3,5-szerese, így — mivel a membránvastagság ilyen arányú csökkenése, ill. ilyen arányú membránfelület-növekedés nem valószínű — ezt a fehérjebeépülés jelének tekintettük. Ezt követően mértük a membrán vezetőképességét az idő függvényében. A pozitív polaritású feszültség alkalmazása mellett a vezetőképesség időben állandó. Ellenkező irányú feszültség esetén 0-ról növekvő irányban kb. —28 mV-os küszöbfeszültség elérésekor egy áramugrás következik be és ezt követően konstans feszültség mellett a vezetőképesség időben „instabillá” válik (6. ábra), áramlöketek jelentkeznek, ill. ugrásszerűen megváltozik a vezetőképesség. Ez több lépésben, sokszor háromszoros értékére is emelkedhet a kezdeti értékhez viszonyítva. Ezen instabilitás reverzibilis jellegű, nevezetesen magasabb vezetőképességű állapotból spontán billenéseken keresztül az alacsonyabb vezetőképességű irányba is azonos jelleggel történnek az ugrások.

A feszültség csökkenésekor az instabilitások változatlanul megmaradnak, a küszöbfeszültség alatt is egy meghatározott —10 mV feszültségig, amikor is



6/b. ábra. A membránon folyó áram idő-függésében néhány jellegzetes esete $U > U_k$ esetén



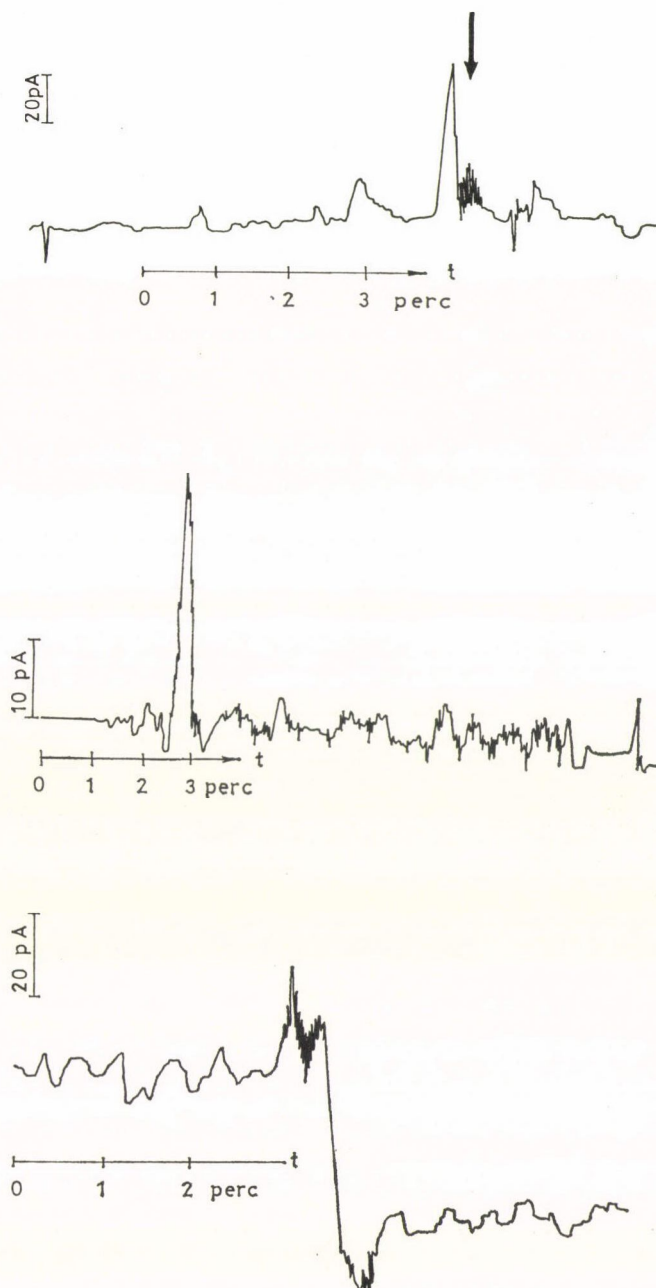
6/c. ábra. A membránon átfolyó áram idő-függése néhány jellegzetes esete $U > U_k$ esetén Ca^{2+} adását követően

hirtelen megnő az ellenállás (U_k), azaz a membrán „lezár”. Ismét emelve a feszültséget a „bekapcsolás” (U_k) az előző küszöb-be értéknél következik be, azaz a membránnak mintegy memóriája van (7. ábra). Ez a jelenség Ca^{2+} függő, Ca -adására — a fehérjével azonos oldalon — fokozódik. 5 mM PCMB-vel a folyamat nem gátolható. Ellenoldali ATP a feszültségugrások amplitúdóját fokozza. A fent említett „instabilitás” kifejezetten elektromos, a membrán élettartama a fehérjebeépítést követően sokszorosára nő és nő az ún. letörési feszültség értéke is.

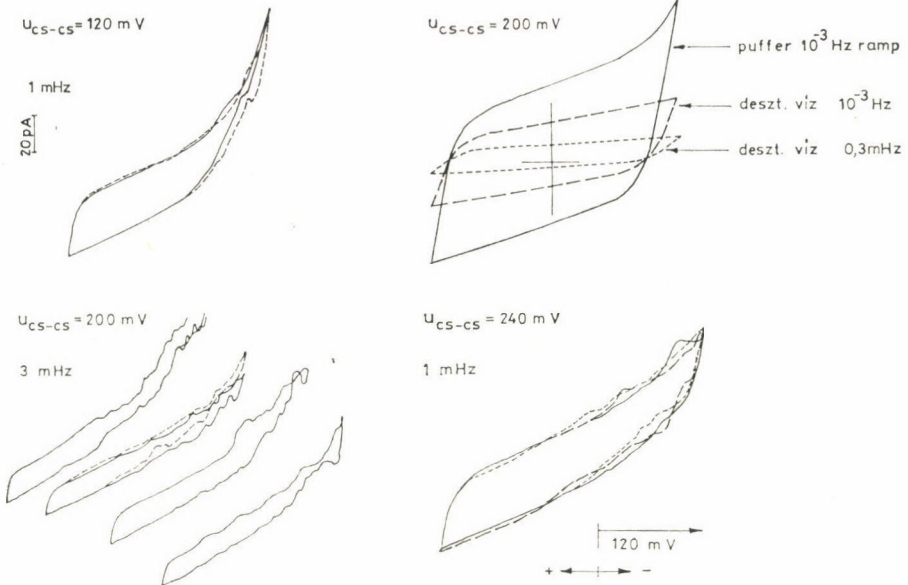
A fent leírt Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP-át követően kolinszteráz beépítését is megkíséreltük ez azonban feltehetően a túl erős lipid-fehérje kölcsönhatás miatt nem volt eredményes (a beépülés indikálását követően néhány másodperccel a membrán minden esetben elszakadt).

Összefüggést nem találtunk a külső vízfázishoz adott fehérjemennyiség és a kapcsolási szintek között, ui. ez utóbbi minden vagy semmi alapon és mindenkor ugyanazon — a mérési hibán belül — értéknél jelentkezett.

Megállapítható, hogy az aktív fehérjék beépítése sikerrel kecsgetető része a BLM vizsgáló módszereinek és hogy a beépítés körülményeit a fehérje számára „megszokott” körülmények (lipid-, ion-környezet) óvatos egyszerűsítésével lehetséges biztosítani. Így a mérési technika további finomításával lehetőség nyílik egyes fehérjéknek és az általuk a membránon keresztül megvalósított iontranszport jelenségeinek szeparált tanulmányozására. Feltehetően lehetőség nyílik továbbá az aktív transzportjelenségekhez kapcsolt elektromos folyamatok mérésére is.



6/d. ábra. Spontán oszcillációs jelenségek kialakulása Ca^{2+} + ATP adását követően



7. ábra. BLM rámpajellel fölvert áram-feszültség karakterisztikája desztillált víz és aszimmetrikus pufferrendszer esetén (jobbra fenn), és fehérjebeépítést követően különböző feszültségek és frekvenciák esetén

IRODALOM

1. ERDEI, L., CSORBA, I., THUYEN, H. X.: *Lipids* **10**, 115 (1975).
2. В. У. Сорокогой, Г. Е. Додрецов, В. А. Петров, А. Н. Никитина. Ю. А. Владимиров Докл. Акад. Наук СССР. Биохимия **206**, 500 (1972).
3. Г. Е. Додрецов, У. Т. Хоримонков, В. Е. Лицев, Ю. А. Владимиров Биофизика **XX**, 581 (1975).
4. LAUGER, P., LESSLAUER, W., MARTI, E., RICHTER, J.: *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 20 (1967).
5. MICHAELIS, B., CHAPLAIN, R. A.: *Kybernetik* **12**, 119 (1973).