

# A BLM KONFORMÁCIÓS VÁLTOZÁSAI ÉS EZEK HATÁSA AZ ÁRAM-FESZÜLTSG KARAKTERISZTIKA ALAKULÁSÁRA

SUGÁR ISTVÁN

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, Budapest

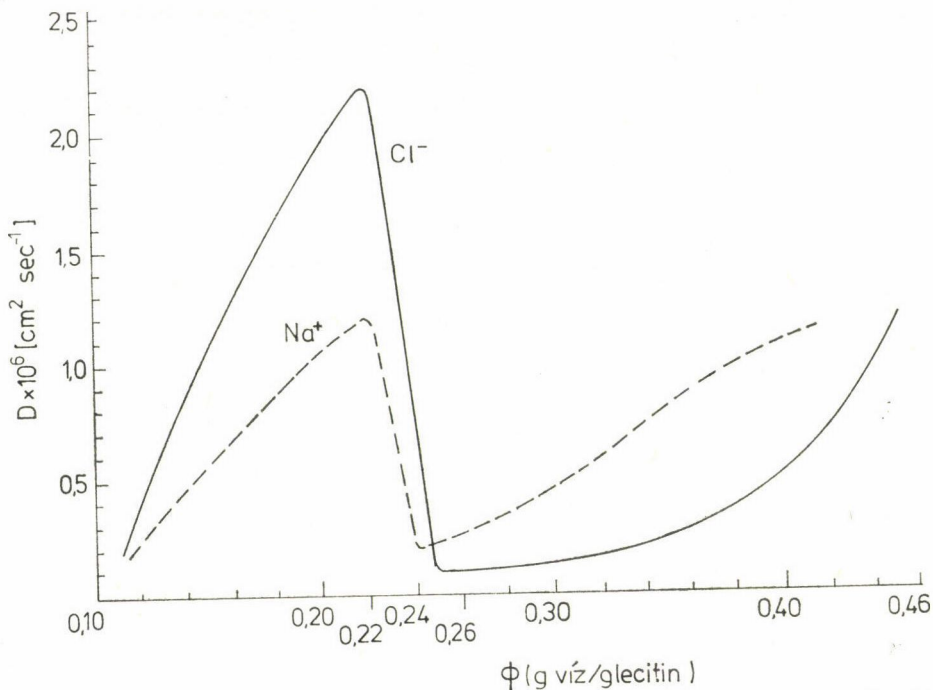
## Bevezetés

A BLM ionvezetésével foglalkozó munkák elsősorban az elektromos tér ioneloszlásra gyakorolt hatását emelik ki, míg az átvivőhelyek számát térfüggetlennek tekintik (LÄUGER és NEUMCKE 1973). A térnek membránra gyakorolt elektromechanikus hatásával a membrán stabilitásvizsgálatánál találkozhatunk (COSTER és ZIMMERMANN 1975), melyben a membránt mint homogén rugalmas kontinuumot tekintik. A nemlineáris áram-feszültség karakterisztika magyarázatára WALZ és mtsai (1969) három lehetséges mechanizmust vettek figyelembe: a membránba való ion injekciót, a potenciális energia-profil torzulását és a Wien-effektust.

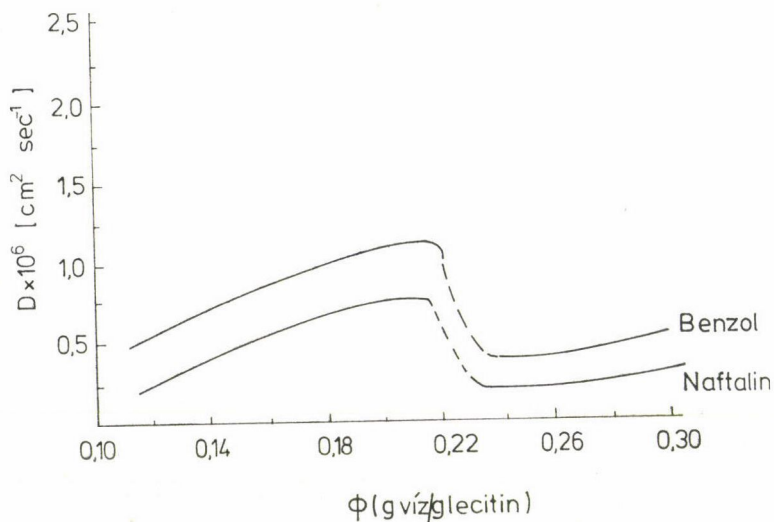
Munkánkban az elektromos tér membránszerkezetre gyakorolt közvetlen és közvetett hatását hangsúlyozzuk és lényegesnek tartjuk ennek szerepét a BLM iontranszportjában, a nemlineáris karakterisztika kialakításában és a membrán stabilitásában. Nevezetesen feltételezzük, hogy az elektromos tér hatására az átvivőhelyek száma megváltozik. Kvalitatív modellünket az irodalomból ismert kísérletek két típusára is alkalmazzuk.

A kísérletek első típusát az ún. felületi diffúziós mérések képviselik (RIGAUD et al. 1972, 1973, LANGE és GARY-BOBO 1973). A szerzők lecitin és víz meghatározott arányú keverékét vékony üvegsőbe töltötték. A csőben koaxiális rétegek spontán alakultak ki. Egy-egy vízből kialakult hengert lecitinből álló hengerek határoltak, és ez többször ismétlődött. A rendszer kialakulása után az üvegső végére radioaktív hidrophil vagy hidrofób anyagot helyeztek, amely az üvegső mentén vagy a vizes fázisban vagy a lipid-fázisban diffundált. Meghatározott idő múlva feldarabolták az üvegsövet, megmérték a darabok aktivitását, és ebből következtettek a hidrophil, ill. a hidrofób anyag diffúziós állandójára (1., 2. ábra).

A kísérleti rendszeren végzett röntgendiffrakciós mérések szerint az egyes vízrétegek vastagsága a víz—lecitin arány csökkenésével csökkent és abban a tartományban, ahol a diffúziós állandó drasztikusan megváltozott, a vízrétegek már olyan vékonyak voltak, hogy a lecitin poláris fejei mechanikus kényszer miatt elhajoltak.



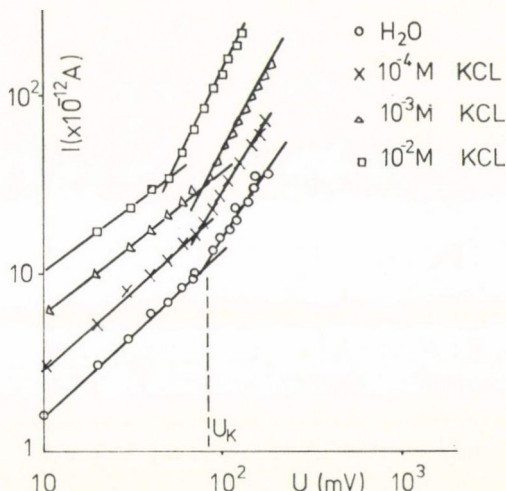
1. ábra. A lecitin-víz lamelláris szerkezet víz fázisában diffundáló NaCl diffúziós állandója különböző lecitin-víz arány esetén



2. ábra. A lecitin-víz lamelláris szerkezet lipid fázisában diffundáló benzol és naftalin diffúziós állandója különböző lecitin-víz arány esetén

A kísérletek másik típusát a lecitin—koleszterol 2 : 1 mol arányú keverékéből készült BLM-en végzett elektromos mérések szolgáltatják (BLASKÓ, ERDEI 1976). Fürdető oldatként alkáliionok kloridjait használták. Vizsgálták a BLM áram-feszültség karakterisztikák koncentráció—, hőmérséklet függését és a BLM elektromechanikai stabilitását (3., 4., 5. ábra).

A BLM áram-feszültség karakterisztikák értelmezéséhez meg kell ismerkednünk azokkal a tényezőkkel, amelyek a BLM ellenállását meghatározzák.



3. ábra. Lecitin-koleszterol 2 : 1 mol arányú keverékéből készült BLM áramfeszültség karakterisztikája kétszer logaritmusos léptékben, különböző KCl koncentrációk mellett szobahőmérsékleten felvéve

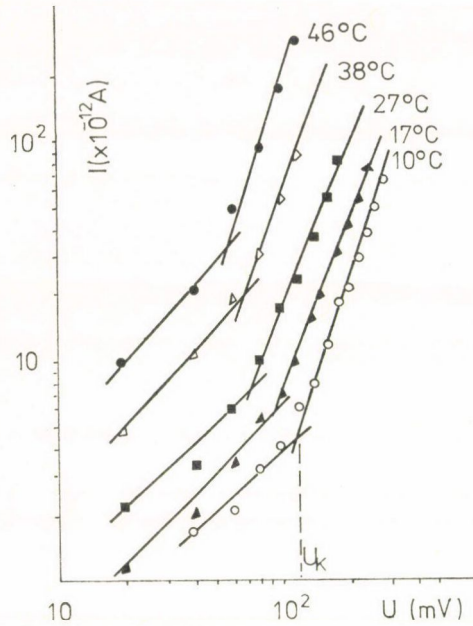
### A BLM ellenállását meghatározó tényezők

Az anorganikus ionok BLM-en való átjutása főleg a felületi potenciálgát által korlátozott, ahogy ezt DANIELLI (1941) feltételezte, és ANDREOLI és TOSTESON (1971) kísérletileg is bebizonyította.

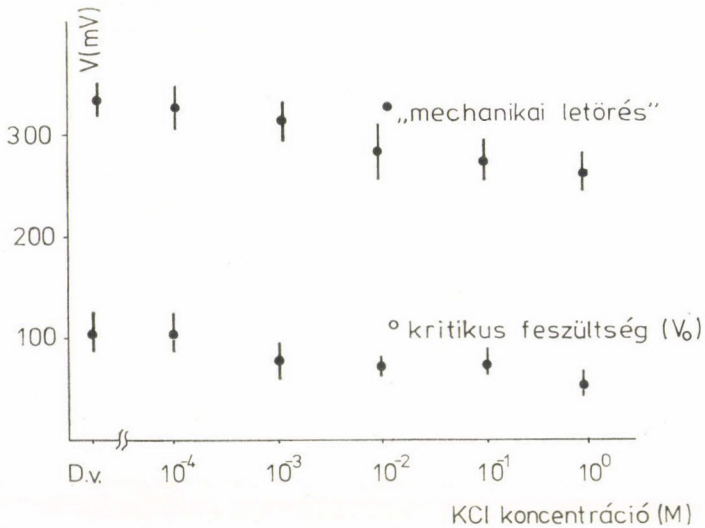
A felületi potenciálgát nagyságát elsősorban az *ion elektrosztatikus tér-energiájának* a vizes és lipid fázis közötti nagy különbsége határozza meg. Értéke egy vegyértékű ionokra kb. 1 eV, ami közelítően megegyezik az ion hidratációs-entalpiájával (WEI és WOO 1974). A BLM felületén elhelyezkedő *poláris fejek dipólrétege* is hozzájárul a felületi potenciál kialakításához. E rétegen való áthaladásakor a potenciál kb.  $2 \cdot 10^{-2}$  eV-ot ugrik (WEI és WOO 1974).

A BLM ellenállása attól is függ, hogy az ion milyen valószínűséggel talál *átvivőhelyet*, úgynevezett kinket, a membrán felületén. A kinket a membránban levő strukturális defektek, amelyek ionok és molekulák számára





4. ábra. Lecitin-koleszterol 2 : 1 mol arányú keverékéből készült BLM áramfeszültség karakterisztikája kétszer logaritmikus léptékben, különböző hőmérsékletek mellett 0,1 mol KCl-ra mérve



5. ábra. Lecitin-koleszterol 2 : 1 mol arányú keverékéből készült BLM kritikus feszültsége és kritikus stabilitási feszültsége különböző KCl koncentrációk esetén szobahőmérsékleten

átvivőhelyként szolgálnak (TRÄUBLE 1971). Keletkezésük a lipid szénhidrogén láncában levő C—C kötések  $\pm 120^\circ$ -os elfordulásával kapcsolatos (trans-gauche átmenet). Az átmenet aktiválási energiája  $2 \cdot 10^{-3}$  eV. Egy egyszerű kink kialakulásához ennek az energiának kétszerese,  $4 \cdot 10^{-3}$  eV szükséges (két trans-gauche átmenet) (VOLKENSTEIN 1963).

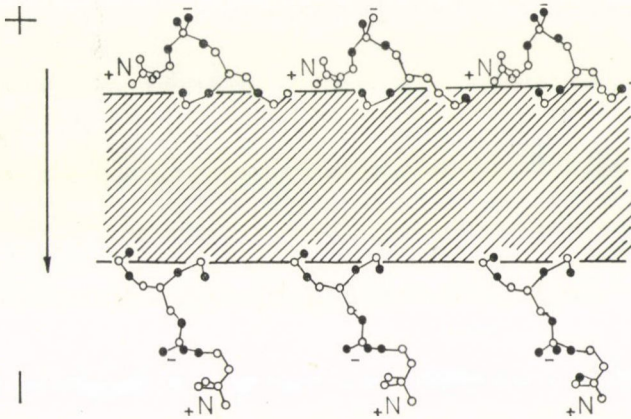
Az ionok BLM-en való átjutását a fenti szempontokon kívül még az is befolyásolja, hogy a poláris fejek között közvetlenül, vagy a vízmolekulák közbelépésével közvetve, H-híd kötések létesülnek (ALEXANDER 1968). Hogy az áram-feszültség karakterisztikák koncentrációfüggését kielégítően magyarázhatjuk, szükséges az ionok ezen kötésekre gyakorolt hatását figyelembe venni.

A membrán-potenciálprofil kialakításában a jelenlevő *ionok elektromos tere* is szerepet játszik (SANFELD 1968), valamint a *külső tér*.

#### *A BLM-ek áram feszültség karakterisztikájának változó meredekségéről*

A poláris fejek feszültségmentes esetben statisztikus átlagban a membrán felületére merőlegesen, az oldat felé mutatnak (Phillips et al. 1972).

Növekvő, a membránfelületre merőleges irányú elektromos tér hatására a membrán egyik oldalán a poláris fejek iránya változatlan, míg a másik



6. ábra. A BLM-re kapcsolt elektrosztatikus tér az elektromos dipól természetű poláris fejeket elhajlítja

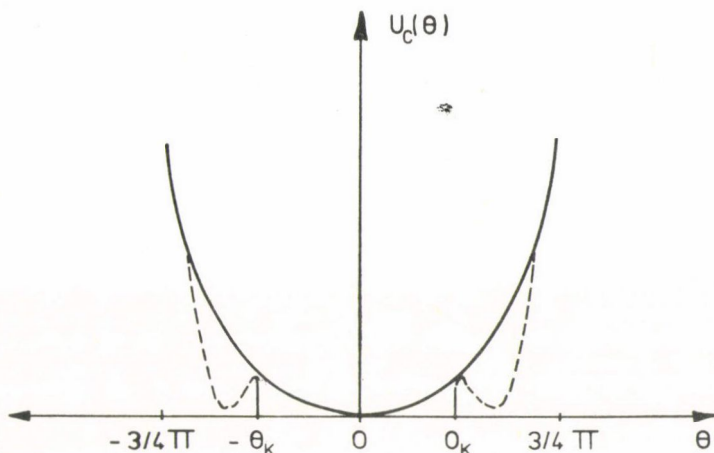
oldalán a fejek egyre inkább elhajlanak (6. ábra). TRÄUBLE (1972) szerint abban az esetben, ha a lipid fázisban kink van, a megfelelő poláris fejek elhajlott állapotban tartózkodnak. *Megfordítva, azt mondhatjuk, hogy egy bizonyos szögnél erősebben elhajlott poláris fejek mögött megnő a kinkképződés valószínűsége.* Ezt a feltételezést sugallják a Bevezetésben leírt felületi diffúziós



mérések is. Az 1. és 2. ábrát összehasonlítva láthatjuk, hogy ahol a víz—lecitin arány már olyan kicsi, hogy a poláris fejek csak elhajlott állapotban lehetnek, ott nemcsak a vízrétegben áramló NaCl, hanem ugyanakkor a lipidrétegben áramló benzol diffúziós állandója is ugrásszerűen megnő. Feltevésünk szerint a diffúziós méréseknél a poláris fejek elhajlása következtében felszaporodott kinkek megnövelik a benzol diffúziós állandóját a lipidben. A poláris fejek elhajlítása itt szterikus okokra vezethető vissza, míg a BLM-ek esetében az elektromos tér hatására hajlanak el. A fenti elképzelésünket reprezentáló kvalitatív képet mutatjuk be a 7. ábrán, ahol egy poláris fej konfigurációs potenciáját ábrázoltuk a két lehetséges, a tisztán transz- és l gauche-átmenetet tartalmazó állapotban. Egy kiszemelt poláris fej elhajlásához térmentes esetben munkát kell végezni a térenergiaváltozás miatt, a kötőszög megváltoztatása érdekében valamint, a szomszédos poláris fejek stabilizáló hatásával szemben.

A *térenergia változás* csak a hidrofíli és hidrofób közeg határán jelentős, ahol a dielektromos állandó ugrásszerűen megváltozik. A membrán dielektromos állandója  $\epsilon_m = 2$ , a membrán-felület közelében levő erősen strukturált víz dielektromos állandója  $\epsilon \sim 5-10$ -nek vehető. Az ionok térenergiájának a határfelület közvetlen közelében való alakulásáról Van LAMSWEERDE-GALLEZ és MEESEN (1975) adnak pontos képet. A *kötőszög megváltoztatása* első közelítésben az egyensúlyi helyzettől való szögeltérés négyzetével arányos munkát jelent. Attól függően, hogy van-e transz-gauche átmenet az illető szénhidrogén láncban máshol található ez az egyensúlyi helyzet. Az egy kinket tartalmazó szénhidrogén lánc energiája 1 kcal/mól-lal nagyobb mint a transz állapotú szénhidrogén láncé (VOLKENSTEIN 1963).

A lecitin-koleszterol 2 : 1 mól arányú keverékből készült BLM-eknél a poláris fejek közvetett kölcsönhatása — vízmolekulák H-kötéssel kapcsolódnak a szomszédos poláris fejekhez — dominál. Ugyanis a koleszterol molekulák homogén eloszlását feltételezve a lecitin poláris fejek távolabb kerülnek egymástól, mint tiszta lecitin esetén. Tekintettel a H-hidak nagy hajlékonyságára (POPLE 1951) a poláris fejek mozgása következtében a H-hidak nem szakadnak fel, csak a kötés szög változik. A *H-hidak elhajlásával kapcsolatos energia* közelítőleg a membrán normálistól való szögeltérés négyzetével arányos, figyelembe véve, hogy a szomszédos poláris fejek első közelítésben azonosan hajlanak el. A három hatás összegeként kapjuk a 7. ábrán feltüntetett eredő  $U_c(\theta)$  konfigurációs potenciálokat. Az ábrából az alábbiakat olvashatjuk le: a két potenciálgörbe  $\theta_k$ -ig azonos lefutású, de  $\theta_k$ -nél nagyobb  $\theta$  esetén a szaggatott (gauche átmenet van jelen) görbe energetikailag kedvezőbb. Ebből következik, hogy egy bizonyos feszültség fölött — amikor a poláris fejek a kritikus szöget átlélik — az átvivő helyek száma nőni kezd. *Ezzel magyarázhatjuk a karakterisztika hirtelen, egyre jobban emelkedő szakaszát* (3., 4. ábra).



7. ábra. Egy poláris fej konfigurációs energiája zérus külső elektrosztatikus tér esetén:  $U_c(\theta)$ , ahol  $\theta$  a membrán normálisától való elhajlás szöge. A kihúzott görbe esetén: a poláris fejhez tartozó szénhidrogén láncban minden szénatom transz helyzetű. A szaggatott görbe esetén: a szénatomok valamelyike gauche helyzetű

#### A BLM-ek elektromechanikai stabilitása

A kísérletek tanúsága szerint a BLM-ek 200—300 mV között elvesztik mechanikai stabilitásukat és szétpattannak. Ez a jelenség is magyarázható a poláris fejek mozgása és a kinkek képződési valószínűsége közti kapcsolat alapján. Egy poláris fej mögötti lipid-fázisban több transz-gauche átmenet is lehet egymás után. Ha ezt a tényt figyelembe vesszük, akkor a konfigurációs potenciálgörbének több völgyet kell tartalmaznia és több a kritikus szög is (8. ábra).

A feszültséget tovább növelve nő annak a valószínűsége, hogy egymással egy vonalban a membrán felületére merőlegesen gauche átmenetek sora jelenik meg. Ezeken a helyeken erősen csökken a *membrán mechanikai stabilitása*, több helyen a csökkenés olyan mértékűt érhet el, hogy a hidrofil oldat a defektek során behatolva teljes hosszában áttöri a membránt, és az szétpattan.

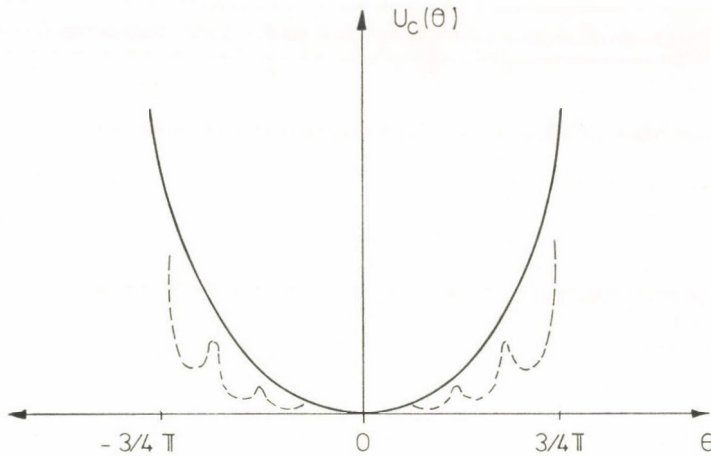
#### A BLM áram-feszültség karakterisztikájának függése az ionkoncentrációtól

Az ionnak az oldatból a lipid-fázisba való belépése kinetikai szempontból másodrendű folyamat. A belépés valószínűsége arányos egyrészt a felület közelében levő üres kinkek számával ( $n_k$ ), valamint a membrán felület közvetlen közelében levő oldat ionkoncentrációjával ( $c_i$ ).

Így a belépés valószínűsége ( $p_{bei} \cdot \delta t$ ):

$$p_{bei} \delta t = k_{bei} c_i \cdot n_k \cdot \delta t, \quad (1)$$





8. ábra. Egy poláris fej konfigurációs energiája zérus külső elektrosztatikus térerésén. A szaggatott görbe esetén a poláris fej mögötti szénhidrogén lánc egy kettő vagy három gauche helyzetű szénatomot tartalmaz

ahol  $\delta t$  egy kis időintervallumot jelöl, amelyen belül  $c_i$  és  $n_k$  megváltozása elhanyagolhatóan kicsi, míg  $k_{bei}$  a folyamat sebességi állandója. A 3. ábrán látható, hogy a koncentráció változása az áram-feszültség görbe jellegén nem változtat. A kritikus feszültségig közel lineáris a változás (kétszer logaritmusos ábrázolásban 1 a meredekség értéke), majd a kritikus feszültség után parabolikussá válik (kétszer logaritmusos ábrázolásban a meredekség értéke 2). *Az eddigiek alapján tehát magyarázatot találhatunk a fenti analitikus viselkedésre, mint a koncentrációtól független sajátosságra.*

A membrán vezetőképessége a belépési valószínűséggel arányos, mivel ez a membránon keresztül történő iontranszport sebességmeghatározó lépése. Ezért az  $i$  típusú ionra:

$$\frac{dI_i}{dU} \sim p_{bei} = k_{bei} c_i n_{k0}, \quad U \leq U_k, \quad (2)$$

ahol  $n_{k0}$  a felületi kinkek száma a *kritikus feszültség alatt* és  $I_i$  az áramerősség. Az  $n_k$  értéke a kritikus feszültségig független a feszültségtől, ezért a vezetőképességet csak  $c_i \cdot k_{bei}$  mennyiségnek feszültségtől való függése változtathatja meg. Ez a mennyiség csak gyengén függhet a feszültségtől, mivel a karakterisztika a kritikus feszültség alatti értékeknél közel lineáris (3. ábra).

Így a  $\frac{dI_i}{dU} \cong$  konstans, a kritikus feszültség alatt, és a  $I_i(0) = 0$  feltétel figyelembevételével (2)-t integrálva:

$$I_i \sim (k_{bei} c_i) U n_{k0}. \quad (3)$$



A *kritikus feszültség fölött*  $n_k$  monoton növekvő függvénye a feszültségnek, mivel egyre növekszik a kink-képződés valószínűsége.

Első közelítésben:  $n_k \sim (U)$ .

A  $k_{bei} c_i$  mennyiség feszültségfüggése pedig hasonlóan a  $U \leq U_k$  esethez, jelentéktelen az  $n_k$  változásához képest.

Így  $U \geq U_k$  esetén első közelítésben

$$\frac{dI_i}{dU} \sim (k_{bei} c_i) \cdot (U) \quad \text{adódik.} \quad (4)$$

A (4)-t  $U$  szerint integrálva és a töréspontra illesztve:

$$I_i \sim k_{bei} c_i \frac{U^2}{U_k}. \quad (5)$$

A folytonos illesztés feltételeként pedig kiadódott, hogy

$$n_k = n_{k0} U/U_k. \quad (6)$$

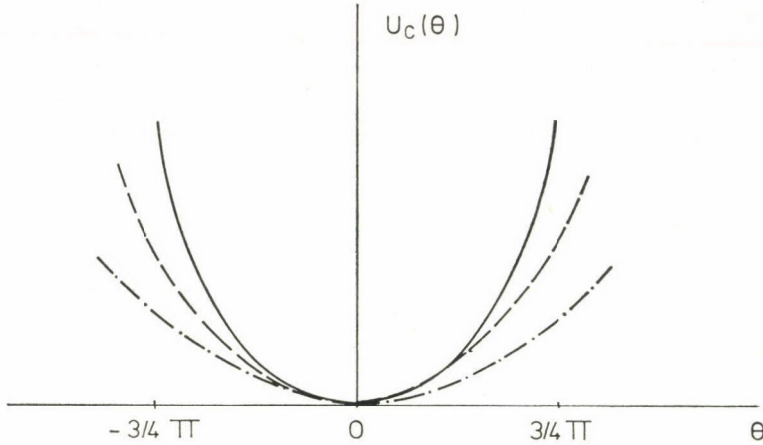
A (3) és (5) kifejezésekből jól látható, hogy a felületi ionkoncentráció növekedésével a membrán vezetőképessége megnövekedik, vagyis az áram-feszültség karakterisztikák meredekebbé válnak. Ha figyelembe vesszük még, hogy a felületi ionkoncentráció ( $c_i$ ) a bulk-fázis koncentrációjának szigorúan monoton növekvő függvénye, valamint, hogy a semleges ion asszociátumok (alkálisók) milyen arányban jutnak át az ionokhoz képest, akkor a 3. ábrán a karakterisztikák tengelymetszeteiről is várhatóan számot adhatunk.

Végül hogyan magyarázható a *kritikus feszültség csökkenése a koncentráció növekedésével?*

Az eddigiek alapján azt mondhatjuk, hogy növekvő koncentráció esetén a poláris fej könnyebben kerül olyan helyzetbe, amelyben már a kink képződés nagy valószínűségű, vagyis növekvő koncentrációknál a kinkmentes esethez tartozó konfigurációs potenciálgörbe lelapul. A jelenség annak tulajdonítható, hogy a membránfelületnél az ionok fellazítják a rendezett vízstruktúrát, és ez annál eredményesebb, minél több ion van ebben a rétegben (SZAMOJLOV 1957). Így a H-hidak hajlítása könnyebbé válik, tehát már kisebb külső tér is elhajlíthatja a poláris fejet a kritikus szögig (9. ábra).

#### *A BLM elektromechanikai stabilitásának koncentráció függéséről*

A BLM elektromechanikai stabilitása a kritikus feszültséghez hasonló módon változik az ionkoncentrációval. Növekvő ionkoncentráció esetén a membrán már kisebb feszültségeknél is elpattan (5. ábra). A jelenség magyarázata a fentiekhez hasonló. A poláris fejek könnyebben mozognak az ionok által fellazított vizes közegben és így kisebb feszültség is elegendő ahhoz, hogy a szénhidrogén láncban a gauche állapotok sora keletkezzék, csökkentve így a membrán stabilitását.



9. ábra. A BLM felületéhez közel az ionok hatására a rendezett víz struktúra lazul. A H-hidak stabilizáló hatása csökken. A poláris fejek könnyebben elhajlíthatók, a konfigurációs potenciál szögfüggése csökken

#### *A BLM áram-feszültség karakterisztikájának hőmérséklet függéséről*

Tekintsük ismét az (1) képletet. Míg a koncentrációfüggés tanulmányozásakor az ionok felületi koncentrációjának változása okozta a vezetőképesség változását, addig a hőmérséklet függésnél a felületi kincek számának hőmérséklettől való függése okozza a vezetőképesség változását.

Boltzmann-eloszlást feltételezve

$$n_k \sim e^{-\Delta E/kT},$$

ahol  $\Delta E$  az egy felületi kink kialakulásához szükséges energiát jelöli. A 4. ábrán látható, hogy a kritikus feszültség a hőmérséklet növekedésével csökken, ugyanis növekvő hőmérséklet hatására a poláris fejeket stabilizáló H-hidak nagyobb hányada szakad fel és így könnyebb a poláris fejeket elhajlítani. A kritikus szög ( $\theta_k$ ) kisebb feszültség alkalmazásával is elérhető.

#### *Az eredmények összefoglalása*

A dolgozatban magyarázatot adtunk a lecitin-koleszterol BLM áram-feszültség karakterisztikájának viselkedésére, nevezetesen kvalitatíve értelmeztük a karakterisztikák ionkoncentrációtól, valamint hőmérséklettől való függését; a rendszer kritikus feszültség alatti és feletti viselkedését mikroszkopikus szemlélettel magyaráztuk. Foglalkoztunk a BLM elektromechanikai stabilitásának mibenlétével és a stabilitás koncentrációfüggésével. A lamelláris lipid-víz fázisokon mért felületi diffúziós eredményeket részben ugyancsak értelmeztük. Az értelmezéshez minden esetben feltételeztük, hogy a poláris fejek orientációja és a lipidfázisbeli kincek keletkezési valószínűsége között



kapcsolat áll fenn. A dolgozatban szereplő kvalitatív részek előrevetik egy egzaktabb, a termodinamika és a statisztikus mechanika alapján egységes formalizmussal kezelhető modell lehetőségét.

Az általános tárgyalás alapján feleletet várhatunk arra vonatkozóan, hogy a felülethez közeli ionkoncentráció ( $c_i$ ) és a bulk-fázisbeli ionkoncentráció között milyen függvénykapcsolat áll fenn, s így becsülni tudjuk például a karakterisztikák koncentrációfüggésénél a tengelymetszet értékeket. Feleletet kaphatunk továbbá arra, hogy mi indokolja a  $k_{bei} \cdot c_i$  mennyiség gyenge feszültségfüggését.

Véleményünk szerint a poláris fejek konfigurációs energiájának szögfüggésére erős megszorítást jelent a felületi kinkek száma és a membránra adott feszültség közötti kapcsolat:

$$n_k = n_{k0} U/U_k .$$

A BLM-ek általunk értelmezett vezetési tulajdonságain túlmenően a poláris fejek mozgásának lényeges szerep tulajdonítható a biológiai membránok áramfeszültség karakterisztikájának értelmezésénél is (Van LAMSWERDE-GALLEZ, MEESEN 1975). Elképzelésünkben a membrán felületén lezajló változások lényeges hatással vannak a membrán belső szerkezetének alakulására és e folyamatokban a poláris fejek kapcsoló elemként működnek. Véleményünk szerint a biológiai membránok vonatkozásában ez a környezet újszerű reguláló hatását jelentheti a sejt életében.

#### IRODALOM

- ALEXANDER, A. E.: Surface Phenomena in Chem. and Biol., ed. Danielli, J. F. Pergamon Press New York p. 18 (1958).
- ANDREOLI, T. E., TOSTESON, D. C.: J. gen. Physiol. **57**, 526 (1971).
- BLASKÓ K., ERDEI L., DONCHEVA J., KARVALY B.: Biol. Oszk. Közl. in press (1979).
- COSTER, H. G. L., ZIMMERMANN, V.: Membr. Biol. **22**, 73 (1975).
- DANIELLI, J. F.: Trans. Farad. Soc. **37**, 121 (1941).
- Van LAMSWERDE-GALLEZ, D., MEESEN, A.: J. Membr. Biol. **23**, 103 (1975).
- LANGE, Y., GARY-BOBO, C. M.: Nature New. Biol. **246**, 150 (1974).
- LÄUGER, P., NEUMCKE, B.: Membranes Vol. 2. ed Eisenman, G. New York p. 2—56 (1973).
- PHILLIPS, M. C., FINER, E. G., HAUSER, H.: Biochim. Biophys. Acta **290**, 397 (1972).
- POPLE, J. A.: Proc. Roy. Soc. A. **205**, 163 (1951).
- RIGAUD, J. L., GARY-BOBO, C. M., LANGE, Y.: Biochem. Biophys. Acta **266**, 72 (1972).
- RIGAUD, J. L., LANGE, Y., GARY-BOBO, C. M., SANSON, A., PIAK, M.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **50**, 59 (1973).
- RITSON, D. M., HASTED, J. B.: J. Chem. Phys. **16**, 11 (1948).
- SANFELD, A.: Introduction to the thermodynamics of charged and polarized layers. ed. Prigogine, I. A Wiley-Interscience Publication John Wiley and Sons, Ltd. London, New York, Sydney, Toronto (1968).
- SZAMOJLOV, O. J.: Disc. Farad. Soc. **24**, 141 (1957).
- TRÄUBLE, H.: J. Membr. Biol. **4**, 193 (1971).
- TRÄUBLE, H.: Phase Transition in Lipid: Biomembranes 3. Passive permeability of cell membrane. ed. Kreuzev, F. Slegler, J. F. Plenum Press New York—London p. 197 (1972).
- VOLKENSTEIN, M. V.: Configurational States of Polymer Chains. Acad. Press, New York—London (1963).
- WALZ, D., BAMBERG, E., LÄUGER, P.: Biophys. J. **9**, 1150 (1969).
- WEI, L. Y., WOO, B. Y.: Bull. of Math. Biol. **36**, 229—247 (1974).