

ALKÁLI IONOK TRANSPORTJÁNAK VIZSGÁLATA BIMOLEKULÁRIS LIPID MEMBRÁNOKON

BLASKÓ KATALIN és ERDEI LÁSZLÓ

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Budapest és MTA Szegedi Biológiai
Kutató Intézet Biofizikai Intézete, Szeged

A biológiai membránok alkáli kation transportjában az ionok erős szelektivitást mutatnak, ami az eltérő membrán-ion kölcsönhatás következménye. Különböző biológiai objektumokon végzett transport vizsgálatok során más-más ionsorrendet figyeltek meg. Így pl.: a tintahal óriás axon „Na csatornájában” a Na^+ helyettesítés sorrendje: $\text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ (CHANDLER és MEVES 1965). Hasonló sorrendet kaptak az élesztő RNA kationkötő sorrendjére (BARBER és NOBLE 1966), de a kation transportrendszer relatív sorrendje már $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ (ARMSTRONG és ROTHSTEIN 1967). Általában ez a sorrend található meg a legtöbb aktívan transportáló, ingerelhető sejt membránjánál. Ugyanakkor valinomicint tartalmazó mesterséges membránok esetén (LEV és BUZINSKY 1967, MÜLLER és RUDIN 1967) $\text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ volt a sorrend. Ezt az ionsorrendet tapasztaltuk mi is patkányvörösvérsejtek aktív transportjánál (GYÖRGYI, BLASKÓ 1974).

A komplex biológiai membránok vizsgálata rendkívül bonyolult. Igen sok paraméter együttes vizsgálata és figyelembe vétele szükséges a membrán-ion kölcsönhatást jellemző kvantitatív értékek meghatározásához. Felmerült az igény, hogy egyszerűbb, könnyebben kezelhető modellrendszereken dolgozzunk. Az elmúlt években egyre szélesebb körben terjed el a biológiai membránok strukturális vázának, a bimolekuláris lipidrétegnek mint modellnek az alkalmazása.

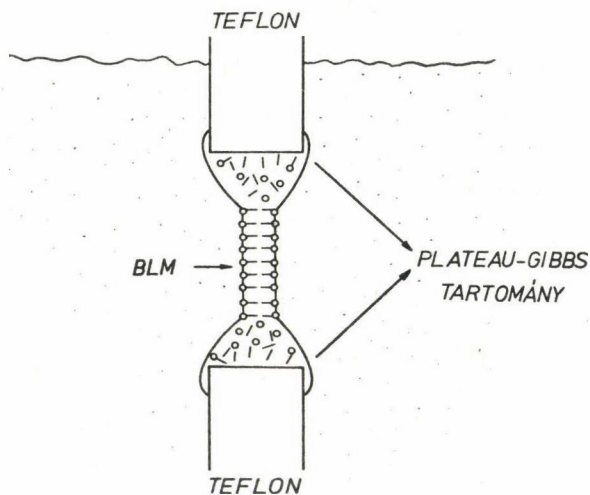
A bimolekuláris lipidmodellek alkalmasak a lipidrétegen keresztüli transportfolyamatok tanulmányozására. Ezen modellek a biomembránok lipidvázának analógjai, de lehetőség van pl. a membrán felületi töltésének változtatására, fehérjék beépítésére s a valódi membrán tulajdonságainak fokozatos megközelítésére, s így arra is, hogy a folyamatokat az elemi lépésektől kiindulva egyre komplexebb körülmények között vizsgálhassuk.

A napjainkban alkalmazott bimolekuláris membrán modellek a liposzóma rendszer, gömb- és síkmembránok.

Jelen vizsgálatunkban azt tanulmányoztuk, hogy hogyan befolyásolja az alkáli ion környezet a bimolekuláris lipid membrán elektromos paraméte-

reit. Az elektromos mérésekhez a síkmembrán tekinthető a legalkalmasabb modellmembránnak.

A BLM két vizes fázis közé helyezett lipidkeverék cseppecskéből alakul ki (1. ábra) (MÜLLER és mtsai 1962). A lipid molekulák hidrofíl csoportjának vízhez való nagy affinitása következtében egy lamelláris folyadékkristály fázis lesz termodinamikailag a legkedvezőbb állapot. Ebben a lamelláris rétegben a poláris csoportok kifelé fordulva a vizes fázissal érintkeznek, abban



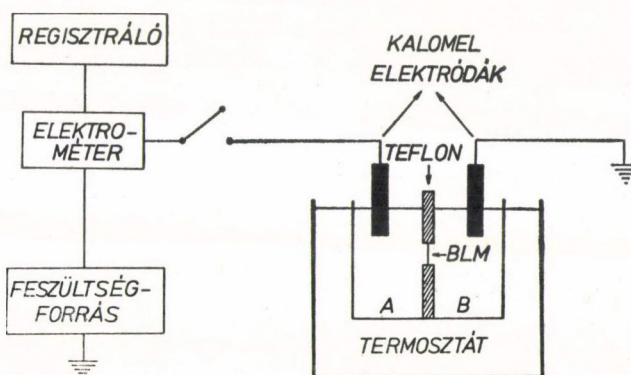
1. ábra. A síkmembrán sematikus rajza

mintegy oldódnak, míg az apoláris zsírsavláncok egymásfelé fordulva gyakorlatilag vízmentes, összefüggő részt alkotnak. Termodinamikai számítások szerint a bimolekuláris réteg jelenti a legstabilabb állapotot két vizes fázis között. A lyukra felcseppentett lipidoldatból először egy 2–8000 Å vastag membrán keletkezik, amely fehér fényel megvilágítva interferencia színeket mutat, majd a membrán spontán levékonyodik és a film bimolekuláris, kb. 100 Å vastagságú lesz és interferencia színeket nem mutat. A bimolekuláris réteg területe a lyuknak mintegy 2/3 része, a többi az ún. Plateau–Gibbs-szegély attól eltérő struktúrájú és tulajdonságú. A bimolekuláris réteg szerkezete megfelel a Danielli–Davson-féle membránmodell lipidvázának. Számos szerző vizsgálata szerint a biológiai membránok és a BLM legfontosabb mechanikai, termodinamikai és elektromos jellemzői közel állnak egymáshoz (HANAI és mtsai 1964, SINGLETON és mtsai 1965, LÄUGER és mtsai 1967, FINKELSTEIN és CASS 1968).

Dolgozatunkban az alkáli kationoknak a bimolekuláris lipid membránok néhány elektromos tulajdonságára gyakorolt hatását vizsgáltuk abból a célból, hogy az egyes ionok transzport mechanizmusára adatokat kapjunk.

Metodika

Membránformáló oldatként tojássárgájából kivont lecitin és koleszterin 2 : 1 molarányú elegyét használtuk *n*-decánban oldva. A membránt egy teflon kupa 1,5 mm átmérőjű kör alakú nyílásán alakítottuk ki. A vizes közeg a membrán mindkét oldalán azonos koncentrációjú alkáli klorid oldat volt. A koncentrációt 10^{-4} –1 M tartományban változtattuk. Minden mérési sort egy membránon végeztünk, szobahőmérsékleten. A mérési elrendezés sémáját a 2. ábra mutatja. Az áram–feszültség karakterisztika méréshez kalomel elektródokat és nagy bemenőellenállású elektrométert használtunk.



2. ábra. Mérési elrendezés az áram–feszültség jelleggörbék méréséhez

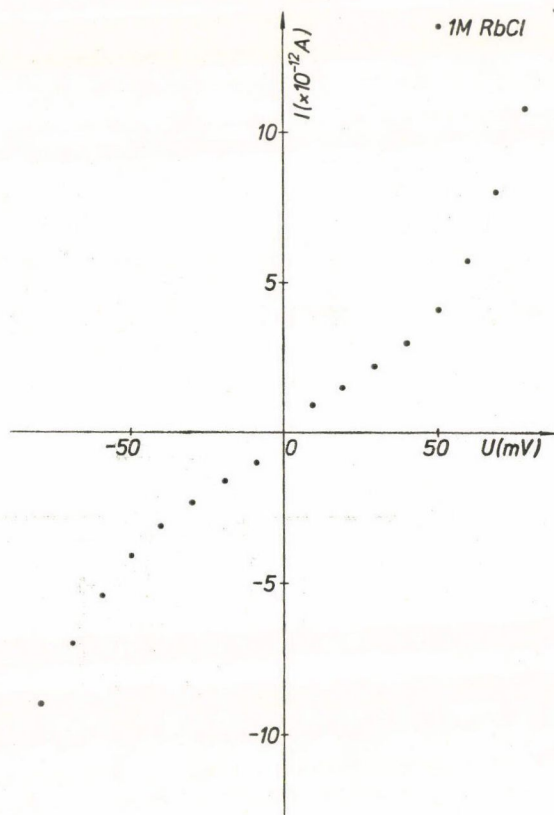
Kísérleti eredmények és megbeszélés

A jelleggörbéket szimmetrikus ionos környezetben kialakított membránon mértük, 100–200 mV negatív és pozitív feszültségtartományban, ami a membránban 10^5 V/cm térerősséget jelentett. A görbék szimmetrikus lefutást mutattak és kvalitatíve minden ionfajtánál és koncentrációnál azonosak voltak. A 3. ábra egy tipikus jelleggörbét mutat 1 M RbCl oldat alkalmazása esetén.

A jelleggörbe kezdeti szakasza (az ionkoncentrációtól függően 50–80 mV-ig) ohmikus, az áramerősség lineárisan nő a feszültséggel, majd egy nagyobb meredekségű szakaszba megy át és 200–300 mV-os feszültségnél dielektromos letörés következik, a membrán elszakad.

A görbe második szakaszának linearizálása révén felvilágosítást kaphatunk a töltéshordozók generálódásának mechanizmusára. A következő ábrák mérési adatainkat mutatják féllogaritmikus koordinátarendszerben ábrázolva (4a, b, c, d ábra).

A Na^+ , K^+ , Rb^+ , ill. Cs^+ -ra kapott eredményeink gyakorlatilag azonosak. A görbéken a feszültség függvényében az áramerősség logaritmusát



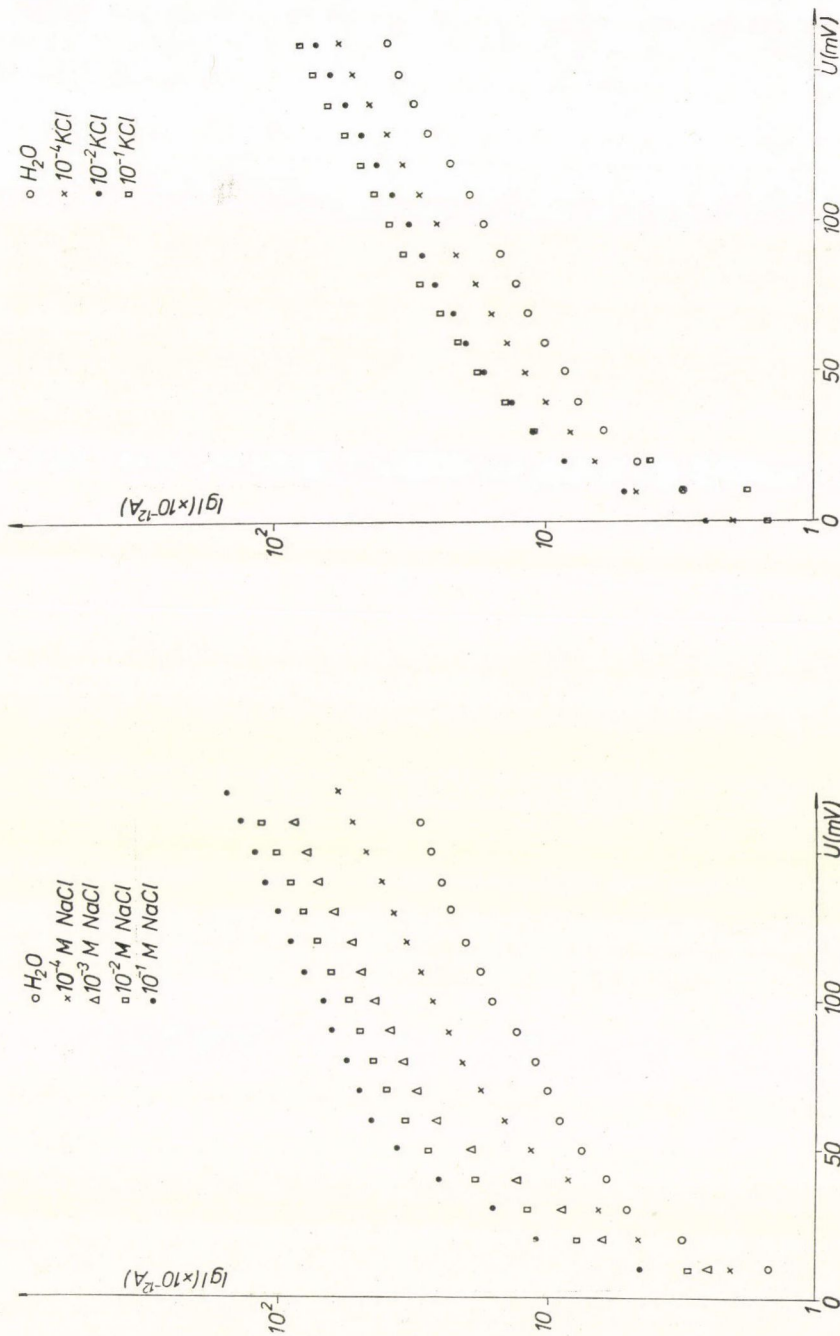
3. ábra. Áram—feszültség jelleggörbe lineáris ábrázolásban

ábrázolva látható, hogy a karakterisztika második szakasza exponenciális. Az áramerősség értékek a vizes oldat ionkoncentrációjától függően párhuzamosan tolódnak el, de a görbék meredeksége a különböző ionok esetén is gyakorlatilag azonos. Ilyen alakú karakterisztika görbék (Tafel-görbék) jellemzőek a határfelületen lejátszódó elektródreakciókra.

A különböző ionokra kapott azonos jellegű görbék arra utalnak, hogy ezen ionok transzportmechanizmusa alapvetően nem különbözik. A továbbiakban az ismétlések elkerülése miatt csak a K^+ -ra kapott eredményeinket tárgyaljuk.

Ha az áram logaritmusát a feszültség logaritmusának függvényében ábrázoljuk, két egymást metsző, különböző meredekségű (kb. 1 és 3) egyenest kapunk (5. ábra). A metszésponthoz tartozó kritikus feszültség értéke jellemző a vizesoldat ionkoncentrációjára.

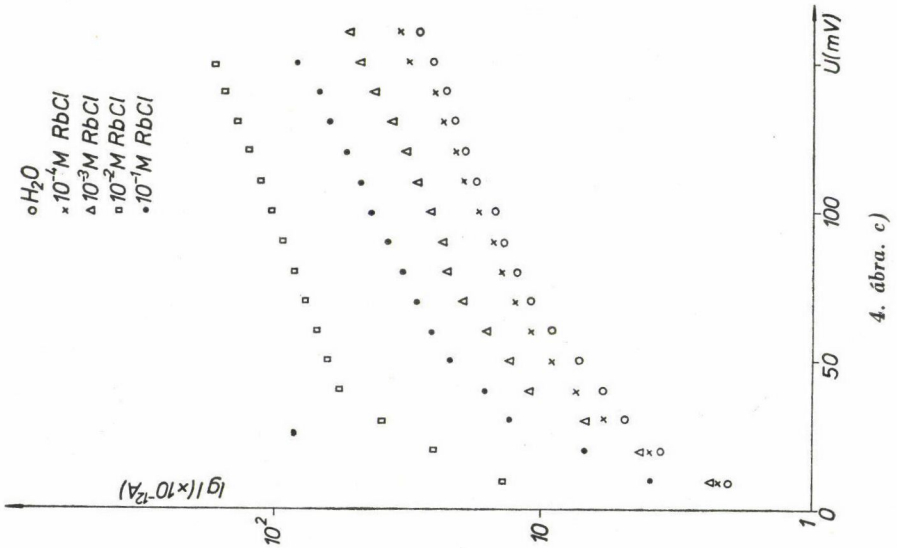
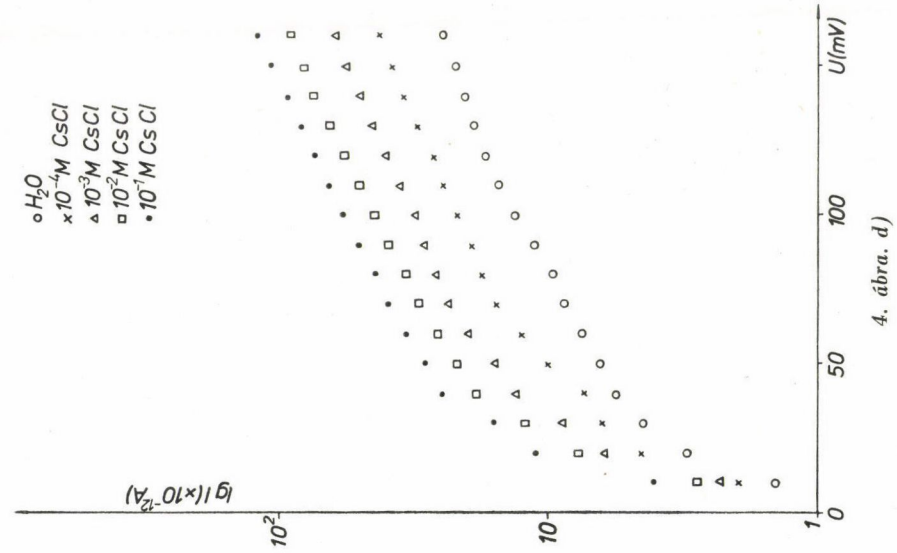
Analóg módon változik a kritikus feszültség értéke, ha a mérést adott koncentrációban, de különböző hőmérsékleten végezzük (6. ábra).

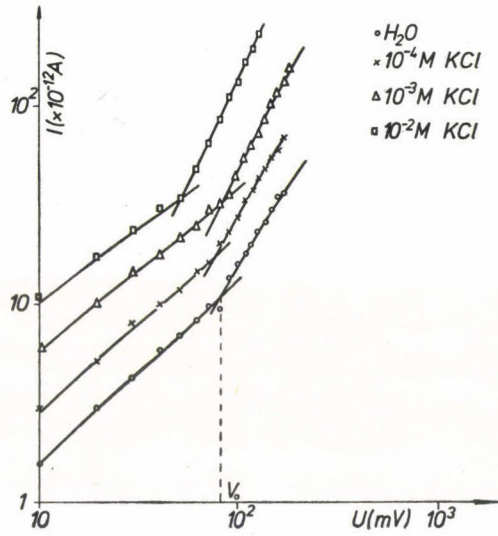


4. ábra. a)

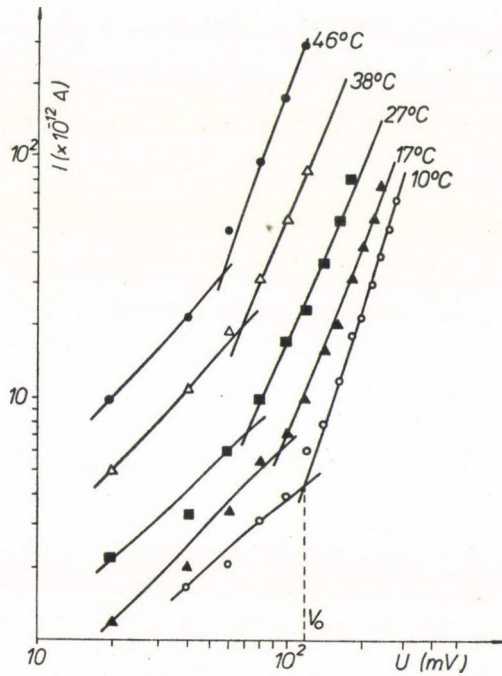
4. ábra. b)

4. ábra. Áram—feszültség-jelleggörbék: a) NaCl, b) KCl, c) RbCl, d) CsCl különböző koncentrációjú oldatai esetén, féllogaritmikus ábrázolásban

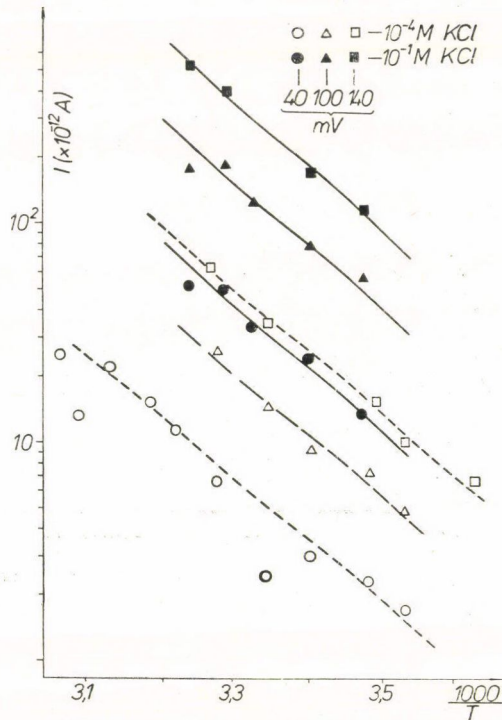




5. ábra. Áram—feszültség jelleggörbe kétszer logaritmikus ábrázolásban, különböző koncentrációjú KCl oldat mellett. V_0 = a görbe töréspontjához tartozó ún. kritikus feszültség érték



6. ábra. Áram—feszültség jelleggörbék 0,1 M-os KCl koncentráció mellett, különböző hőmérsékleteken

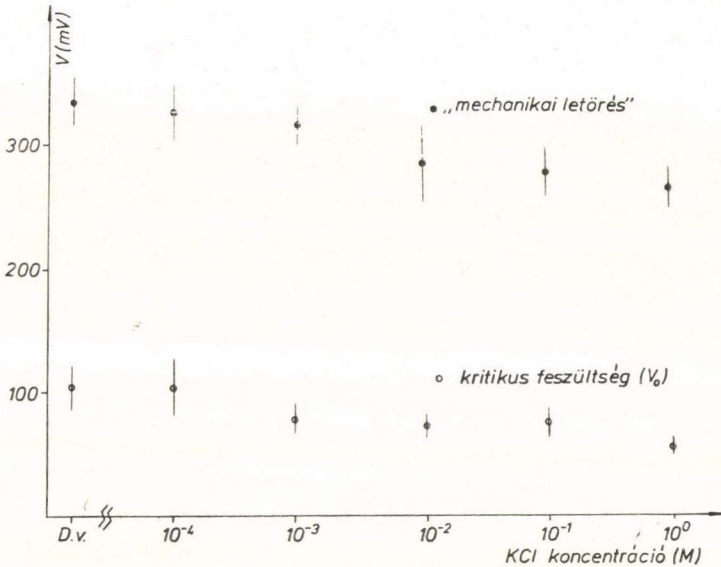


7. ábra. A membrán vezetőképességének változása a hőmérséklet függvényében különböző ionkoncentráció és különböző alkalmazott feszültségértékek mellett

A kritikus feszültség értéke tehát a koncentráció növekedés, ill. a hőmérséklet emelkedésével alacsonyabb értékek felé tolódik el. Felvetődik a kérdés, hogy a görbék két szakasza azonos vagy különböző sebesség meghatározó folyamatoktól ered-e. Ennek eldöntése érdekében megmértük a membrán vezetőképességét a hőmérséklet és a koncentráció függvényében és Arrhenius-féle ábrázolásból (7. ábra) kiszámítottuk a kritikus feszültség alatti kb. 1-es meredekségű szakasz és a kritikus feszültség fölötti kb. 3-as meredekségű szakasz aktiválási energiáját. Az ábrán a vezetőképesség értékeit ábrázoltuk két koncentrációnál három alkalmazott térerősség esetén. A görbék párhuzamos lefutásából (azonos meredekség) is jól látható, hogy az aktiválási energia megegyező értékű, K^+ -ra kb. 7 kcal/mol értéknek adódott. A megegyező aktiválási energiaértékek tehát arra engednek következtetni, hogy a görbe egész tartományában a vezetés azonos mechanizmussal jellemezhető.

Az aktivációs energia értéke független volt a fürdőoldat koncentrációjától, az alkalmazott térerősségtől, amiből azt a következtetést lehet levonni, hogy annak ellenére, hogy az $I-V$ karakterisztika töréspontot mutat, nem lehet más vezetési mechanizmust feltételezni. A V_0 töréspont megjelenése

feltehetően a membrán szerkezetében a nagy térerő következtében beálló finom orientációs változással magyarázható. A membrán-alkotó lipidmolekulák nagy elektromos térerő indukálta konformációs változásainak lehetőségeivel már az előző közleményben (ERDEI 1974) foglalkoztunk.



8. ábra. A jelleggörbék töréspontjához, illetve a mechanikai letöréshez tartozó feszültségértékek változása az ionkoncentráció függvényében

Mint azt már a 6. ábrán láttuk, a kritikus feszültség (V_0) értéke növekvő ionkoncentrációval, illetve a hőmérséklet-emelkedéssel csökken. Érdekes rámutatni, hogy ezzel analóg módon változnak a membrán mechanikai letöréséhez tartozó feszültség értékek is (8. ábra). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a membrán elektromos letörését nem értelmezhetjük csupán a dielektrikumok „lavina típusú” letörési mechanizmusával, hanem a folyamatban az ún. termikus letörésnek és a határfelületen lejátszódó jelenségeknek is jelentős szerepük van (ERDEI 1974).

Eredményeink szerint a módosíthatlan lecitin-koleszterin bimolekuláris lipid membrán nem mutat szelektivitást az alkáli kationok iránt. A jelleggörbék alakjából úgy tűnik, hogy a vezetésben a határfelületen lejátszódó elektrokémiai reakciókhoz hasonló mechanizmus játszik szerepet. A töltéshordozók természetének tisztázására radioizotópos vizsgálatok szükségesek.

IRODALOM

1. ARMSTRONG, W., MC. D. ROTHSTEIN, A.: *J. Gen. Physik.* **50**, 967—88 (1967).
2. BARBER, R., NOBLE, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 205—206 (1966).
3. CHANDLER, W. K., MEVES, H.: *J. Physiol. (London)* **180**, 788—820 (1965).
4. ERDEI L.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **19** (1976).
5. FINKELSTEIN, A., CASS, A.: *J. Gen. Physiol.* **52**, 145 (1968).
6. GYÖRCYI, S., BLASKÓ, K.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 97—105 (1974).
7. HANAI, A. T., HAYDON, D. A., TAYLOR, J.: *Colloid* **195**, 42 (1964).
8. LEV, A. A., BUZINSKY, E. P.: *Citologija* **9**, 102—6 (1967).
9. LÄUGER, P., LESSLAUER, V., MARTI, E., RICHTER, J.: *BBA* **135**, 20 (1967).
10. MUELLER, P., RUDIN, O. D., TIEN, H. T., WESCOTT, W. C.: *Nature* **194**, 979 (1962).
11. MUELLER, P., RUDIN, D. O.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 398—404 (1967).
12. SINGLETON, W. S., GRAY, M. S., BRAON, M. L., WHITE, J. L.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **42**, 53—56 (1965).