

MESTERSÉGES MEMBRÁNOK KATION PERMEABILITÁSA

SZŐGYI MÁRIA

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, Budapest

A membránok kémiai összetételével, szerkezetével kapcsolatos ismereteket figyelembe véve készítenek mesterséges membránokat, amelyek alkalmasak biológiai megfelelőjük modellezésére. A lipideknek fontos szerepük van a membrán felépítésében, barrierként való működésében, ezért leggyakrabban ezeket alkalmazzák modell membrán előállítására. A biológiai membránok és bimolekuláris lipid membránok legfontosabb mechanikai, termodinamikai és elektromos tulajdonságai nagyon hasonlóak. Ismert összetételű mesterséges membránok ezért alkalmasak transzport folyamatok, permeabilitási viszonyok, ionszelektivitás, lipid—protein kölcsönhatás, elektromos tulajdonságok, továbbá biológiailag aktív anyagok hatásának molekuláris szintű tanulmányozására. A leggyakrabban a következő típusú bimolekuláris lipid membránokat alkalmazzák: sík- vagy filmmembrán, buborékmembrán, liposzóma.

A következőkben liposzóma rendszeren végzett vizsgálatokról adok áttekintést, különös tekintettel arra, miként befolyásolja a lipid membrán kationokra vonatkozó permeabilitását a kémiai struktúra, a felületi töltés, az összetétel, valamint a fehérjék és különböző drogok módosító hatása.

Liposzóma előállítás, strukturális jellemzők. Kis mennyiségű oldószermentes lipidet vizes fázisban duzzasztanak, majd mechanikai úton vagy ultrahang besugárzással diszpergálják. (BANGHAM és mtsai 1965a, BANGHAM 1968.) Így igen kis méretű (~ 100 Å), többnyire bimolekuláris lipidréteggel határolt víz, ill. sóoldatot tartalmazó zárt vezikulákat (hólyagocskákat) kapnak vizes közegben szuszpendálva. A lipid olyan ketts rétegű mezomorf fázist, úgy nevezett folyékony kristályt alkot, amelyben a poláros csoportok a vizes fázis felé fordulva síkbeli ionrácsot képeznek. A liposzóma struktúrája, geometriája a két alkotórész (lipid, vizes fázis) relatív koncentrációjától, a lipid összetételétől, a vizes fázis sókoncentrációjától, a hőmérséklettől függ. Elméleti megfontolások és elektronmikroszkópos mérések alapján (CHAPMAN 1968, BANGHAM 1972) megállapították, hogy a lipid rétegek 20—25 Å távol vannak egymástól. A vezikula belső része és a külső összefüggő vizes fázis között csatornák vannak. A lipid rétegekben pórusok alakulhatnak ki (~ 8 Å átmérő), amelyek belső felülete pozitív töltésű.

PAPAHADJOPOULOS, MILLER (1967) elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján részletesen leírták a különböző összetételű hidratált foszfolipidek morfológiai tulajdonságát.

A liposzómák permeabilitás tulajdonságai sok vonatkozásban hasonlóak a biológiai határfelületekéhez, így hasznos modellrendszert jelentenek a membrán lipid komponenseinek elektrolitokra és nem elektrolitokra vonatkozó permeabilitás adatainak meghatározására. A diffúziós viszonyok tanulmányozásánál a következő tényezőket kell figyelembe venni: a vezikulák méretét, a rétegek közötti térközt, a liposzóma struktúráját, a lipidrétegek számát, a rétegek integritását, a fix és kompenzálatlan töltéssel rendelkező csoportok számát (PAPAHADJOPOULOS, WATKINS 1967). A hidratált foszfolipidek ionos csoportjainak természete a liposzóma permeabilitása, ionszelektivitása szempontjából fontos kérdés.

BANGHAM és mtsai (1965a, 1965b, 1968) foszfatidkolinból készített membránon végzett vizsgálatok alapján megállapították, hogy a membrán szelektíve permeabilis, anionokra jóval áteresztőbb, mint kationokra. HAEST és kutatócsoportja (1972) *Staph. aureus*-ból izolált lipideket használt liposzóma előállítására, és azt találta, hogy a lizilfoszfatidglicerolból készített pozitív töltésű membrán kevésbé permeabilis ^{86}Rb -ra, mint a negatív foszfatidglicerol. ^{86}Rb transzport vizsgálata során más szerzők (DE GIER és mtsai 1970) megállapították, hogy a lipid parafin szénláncainak telítetlenségével nő a permeabilitás.

Különböző foszfolipidek permeabilitás tulajdonságairól ad áttekintést PAPAHADJOPOULOS és WATKINS (1967) közleménye.

Lipid	Ion	Diffúziós sebesség mequiv/mól/óra	Aktivációs energia kcal/mól
Foszfatidkolin	^{42}K	0,4–0,5	15
	^{36}Cl	2,5–2,7	4
Fosztafidszerin	^{42}K	2–4	15–18
Foszfatidinozit	^{42}K	4,5	18
Foszfatidsav	^{42}K	16	15

A kálium lassú diffúziója és a nagy aktiválási energia arra utal, hogy a transzport zárt, magas energiájú barrieren megy végbe.

Különböző összetételű liposzóma rendszeren vizsgálták a felületi töltés hatását az ionok diffúziós sebességére.

Az összehasonlíthatóság érdekében a kálium mellett a klórra vonatkozó értékeket is feltüntették. Az előző táblázatban látható, hogy a foszfatidkolinból készült liposzómák Cl^-/K^+ diffúziós sebességi hányadosa ~ 50 , anion tulajdonságú anyag (sztearinsav) jelenlétében ~ 2 -re csökkent, kation (sztea-

Lipid	Ion	Diffúziós sebesség mequiv/mól/óra	Aktivációs energia kcal/mól
Foszfátidkolin + Sztearinsav (9 : 1)	⁴² K	4–8	15
	³⁶ Cl	15	5
Foszfátidkolin + Sztearilamin (9 : 1)	⁴² K	0,6	—
	³⁶ Cl	68	—
Foszfátidkolin + Koleszterin (1 : 1)	⁴² K	0,9	—
	³⁶ Cl	1,9	—

rilamin) hatására ez az érték ~110-re növekedett. Koleszterin hozzáadásával jelentősen csökkent a Cl⁻ diffúzió, amely inkább a szénhidrogén résszel való kölcsönhatással magyarázható, mint a felületi töltésváltozással.

A fenti adatokból látható, hogy a pozitív, ill. negatív töltésű csoportok befolyásolják az ionok diffúzióját, de nem tekinthetők egyedüli meghatározó tényezőkként. Danielli kimutatta, hogy a permanens dipólok elrendeződése sokkal jelentősebb lehet az ionok előtt álló energiabARRIER tekintetében, mint a formális töltés. A foszfolipidek permanens dipóljai pozitív pólusukkal a szénhidrogén rész felé fordulnak, így várhatóan az anion transzportnak kedveznek. Negatív töltésű molekula a szénhidrogén—víz fázishatáron csökkenti az orientált dipólok hatását, így elősegíti a kationok mozgását.

Jelentős különbséget találtak a K⁺ és Na⁺ diffúziós sebessége között foszfátidszerinből, ill. foszfátidglicerolból készített liposzóma rendszerben (PAPAHADJOPOULOS 1971). Vizsgálták, hogy miként befolyásolja a két ion közötti megkülönböztetést a pH, a koleszterin és a protein. Az eredményeket a következő táblázat mutatja:

Lipid	pH	Diffúziós sebesség		$\frac{K^+}{Na^+}$
		Na ⁺	K ⁺	
Foszfátidszerin	7,4	0,092	0,466	5,1
Foszfátidszerin	4,5	0,065	0,467	7,2
Foszfátidszerin + koleszterin (1 : 1)	7,4	0,015	0,045	3,0
15% foszfátidszerin 85% lecitin	7,4	0,107	0,260	2,4
Foszfátidglicerol	7,4	1,29	7,03	5,4
Foszfátidszerin	7,4	0,072	0,642	8,9
	kint 4,5			
Foszfátidszerin	7,4	1,55	1,93	1,2
	kint 3,5			

A pH hatás vizsgálatánál különösen érdekes az a kísérlet, amelyben a környezet pH értékét 4,5-re csökkentették, ekkor a K^+ diffúziós sebessége növekedett, ha pH kívül 3,5 volt, a diffúziós sebesség mindkét ionnál nőtt és szinte eltűnt a különbség közöttük. Ha koleszterint adtak a foszfátidyszerinhez, csökkent a Na^+ és K^+ diffúziós sebessége, valamint a kettő közötti különbség. Más szerzők (DEMEL és mtsai 1972) lecitinhez adott koleszterin hatására azt tapasztalták, hogy a Rb^+ penetrációja csökkent. CHAPMAN (1971) vizsgálatai szerint a koleszterin—foszfolipid kölcsönhatás során megváltozik a lipid szénhidrogén láncainak rendezettsége. NMR (CHAPMAN és mtsai 1966, OLDFIELD és mtsai 1971) és ESR spektroszkópiai vizsgálatok (HUBBEL és mtsai 1971, HSIA és mtsai 1970) alapján kimutatták, hogy a koleszterin gátolja a folyadékkristály fázisban a szénhidrogénláncok mozgását.

A foszfátidyszerin és foszfatidglicerol vizsgálata azért különösen érdekes, mert részt vesznek a legtöbb biológiai membrán felépítésében. A foszfátidyszerin a teljes foszfolipid 10–20%-át alkotja. Számos mikroorganizmusban, mitochondriumban a foszfátidyszerint foszfatidglicerol helyettesíti. A lipidek aktív nátrium, kálium transzportra gyakorolt hatásának vizsgálatokor megállapították, hogy a foszfátidyszerin a leghatásosabb a $Na^+ + K^+ - ATPáz$ aktiválásában (TOSTESON 1969, WHEELER, WHITTAM 1970, TOWLE, COPENHAVER 1970). Az 1974. augusztus 25–30. között Budapesten megrendezett FEBS kongresszuson több előadásban foglalkoztak a lipidek és a $Na^+ + K^+ - ATPáz$ közötti kapcsolattal. Roelofsen, van Deenen, valamint Wheeler és Walker vizsgálatai szerint a lipid felületi töltése befolyásolja az enzim aktivitást. A foszfolipidek közül csak a foszfátidyszerint és foszfatidglicerolt találták hatásosnak az $ATPáz$ reaktiválásában. Van Deenen a lipid—protein kölcsönhatás elemzésekor kimutatta, hogy a vörösvértest-membrán belső oldalán elhelyezkedő foszfátidyszerin $ATPáz$ aktív centrummal rendelkezik.

A következőkben néhány példán keresztül *fehérjék lipid membránok kation permeabilitására gyakorolt hatását* ismertetem. Ha oldható proteineket, mint pl. lizozimet, citokrómot adtak foszfolipid vezikulákhoz, jelentős növekedést tapasztaltak az ionokra vonatkozó permeabilitásban (KIMELBERG és PAPAHDJOPOULOS 1971a, 1971b). Hasonló eredményeket kaptak, ha spektrint, ill. albumint adtak besugárzott foszfátidyszerinből készült liposzóma-hoz (JULIANO és mtsai 1971). A ^{22}Na diffúziós sebessége spektrin hatására 20%-kal, albumin esetén 75%-kal nőtt. Ez a változás csak savas pH tartományban volt észlelhető. A protein lipidhez való kötődését az ionerősség és a liposzóma töltése befolyásolta. A proteinek megnövelték a foszfátidyszerin monolayer felületi feszültségét. Az eredmények a protein—lipid közötti elektrosztatikus kölcsönhatásra és konformációs változásra utalnak. A protein a foszfolipid kettős-rétegbe penetrál, amely jelentős permeabilitás változást eredményez (SWEET 1970a, 1970b, SESSA 1969). CALISSANO és mtsai (1972) haemoglobint adtak

foszfátidszerinből és foszfátidkolinból készített liposzómához. Azt tapasztalták, hogy ^{86}Rb diffúziója 90–100-szorosra növekedett.

A fentiek alapján látható, hogy a membránokban a lipid–protein kölcsönhatás a permeabilitás egyik jelentős meghatározó tényezője.

Különböző drogok hatása lipid membránok alkáli kation permeabilitására.
A mesterséges membránok lehetővé teszik a biológiailag aktív anyagok hatásának molekuláris szintű tanulmányozását. BANGHAM és mtsai (1965c) szteroidok (kortizon, dietilstilbösztrol stb.) hatását vizsgálták foszfolipidek kation permeabilitására. Azt tapasztalták, hogy a Na^+ és K^+ kiszivárgás e szerek hatására csökkent. Anesztetikumok jelenlétében (kloroform, dietiléter stb.) viszont megnövekedett K^+ permeabilitást mutattak ki (JOHNSON, BANGHAM 1969). Megállapították, hogy a kation számára a permeabilitási barrieret a lipid–víz fázishatár jelenti, amely nagyon rendezett struktúra. Az anesztetikumok megnövelik a lipid molekulák szabad mozgási lehetőségét, rendezetlenséget hoznak létre a fázishatáron.

A molekuláris biológia jelenlegi kutatási szintjén még kevés esetben tisztázott a kémiai szerkezet és a biológiai hatás közötti összefüggés. Az antibiotikumok ionofor csoportjánál a biológiai hatás a vegyületek kationmegkötő képességével jellemezhető. A kationkötőképesség és a különböző alkáli kationok közötti szelektivitás pedig a molekula szerkezetével magyarázható (GRELL és mtsai 1970). Az ionoforok természetes és mesterséges membránokra gyakorolt hatása az ionok apoláris fázisban való oldódásával függ össze, mivel ezek lipidoldékony komplexet képeznek az antibiotikumokkal. HENDERSON és mtsai (1969), PRESSMAN és mtsai (1967, 1968), valamint STARK és BENZ (1971) mesterséges membránokkal végzett kísérleteikben antibiotikumok (valinomycin, monaktin, enniatin, gramicidin, nigericin stb.) hatását vizsgálták alkáli kationok transzportjára. Valamennyi antibiotikum növelte a foszfolipid membránok kationokra vonatkozó permeabilitását. A szelektivitás sorrendje valinomycin, monaktin, enniatin, gramicidin esetén: $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$, a nigericinnél: $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$.

A példaként említett irodalmi hivatkozások azt mutatják, hogy a liposzóma, mint modellrendszer, sokféle vizsgálat elvégzésére, molekuláris kölcsönhatások tanulmányozására alkalmas, elősegíti a biológiai membránok megismerését, működésüknek megértését.

IRODALOM

- BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M., WATKINS, J. C.: J. Mol. Biol. **13**, 238 (1965a).
 BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M., MILLER, N.: Nature **208**, 1295 (1965b).
 BANGHAM, A. D.: Membrane Models with Phospholipids in: Progress in Biophysics and Molecular Biology. Vol. **18**, 31 (1968).
 BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M., WEISSMANN, G.: J. Mol. Biol. **13**, 253 (1965c).
 BANGHAM, A. D., COHEN, E., HILL, M., JOHNSON, S., SINGER, M.: Model Membranes and an

- Occasional Antibiotics in: *Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Membrane*. E. Munoz, F. Garcia, Ferrandiz D. Vazquez. *Els. Sci. Pub. Comp. Amsterdam* 694 (1972).
- CALISSANO, P., ALEMA, S., RUSCA, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 1009 (1972).
- CHAPMAN, D., PENKETT, S. A.: *Nature* **211**, 1304 (1966).
- CHAPMAN, D.: *Biological Membranes* Acad. Press. London, New York 277 (1968).
- CHAPMAN, D.: *Liquid Crystalline Properties of Phospholipids and Biological Membranes* Faraday Symposium 5 London (1971).
- DEMEL, R. A., BRUCKDORFER, K. R., VAN DEENEN, L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 321 (1972).
- DE GIER, J., HAEST, C. W. M., MANDERSLOOT, J. G., VAN DEENEN, L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 373 (1970).
- GRELL, E., FUNCK, TH., EGGERS, F.: *Dinamic Properties and Membrane Activity of Ion Specific Antibiotics*. Max-Planck-Institut for Biophys. Chemistry Goettingen Germany (1970).
- HAEST, C. W. M., DE GIER, J., OP DEN KAMP, J. A., BARTELS, P., VAN DEENEN L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 720 (1972).
- HENDERSON, P. J. F., MC GIVAN, J. D., CHAPPEL, J. B.: *Biochem. J.* **111**, 521 (1969).
- Hsia, J. C., SCHNEIDER, H. C., SMITH, J. C. P.: *Chem. Phys. Lipids* **4**, 238 (1970).
- HUBBEL, W. L., MC CONNELL, H. M.: *J. Amer. Chem. Soc.* **93**, 314 (1971).
- JOHNSON, S. M., BANGHAM, A. D.: *Biochim. Biophys. Acta* **193**, 92 (1969).
- JULIANO, R. L., KIMELBERG, H. K., PAPAHAJDOPOULOS, D.: *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 894 (1971).
- KIMELBERG, H. K., PAPAHAJDOPOULOS, D.: *J. Biol. Chem.* **246**, 1142 (1971a).
- KIMELBERG, H. K., PAPAHAJDOPOULOS, D.: *Biochim. Biophys. Acta* **233**, 805 (1971b).
- PAPAHAJDOPOULOS, D., MILLER, N.: *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 624 (1967).
- PAPAHAJDOPOULOS, D., WATKINS, J. C.: *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 639 (1967).
- PAPAHAJDOPOULOS, D.: *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 254 (1971).
- PRESSMAN, B. C., HARRIS, E. J., JAGGER, W. S., JOHNSON, J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1949 (1967).
- PRESSMAN, B. C., HAYNES, D. H.: *Fed. Proc.* **27**, 1283 (1968).
- SESSA, G., FREER, T. H., COLACICCO, G., WEISSMAN, G.: *J. Biol. Chem.* **244**, 3575 (1969).
- STARK, G., BENZ, A.: *J. Membrane Biol.*, **5**, 133 (1971).
- SWEET, G., ZULL, J. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun* **41**, 135 (1970).
- SWEET, G., ZULL, J. E.: *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 253 (1970).
- TOSTESON, D. C.: *The Molecular Basis of Membrane Function* Prentice Hall. New York 259. (1969).
- TOWLE, D. W., COPENHAVER, J. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **203**, 124 (1970).
- WHEELER, K. P., WHITTAM, R.: *J. Physiol.* **207**, 303 (1970).