

TRANSPORT-KINETIKAI MODELLEK II.

SUGÁR ISTVÁN

SOTE Biofizikai Intézet, Budapest

Mottó: Hogy egy modell rossz, az eldönthető,
de ha jó, akkor még nem biztos, hogy igaz.

A biofizikai modellezés lépései

a) *Tekintjük* az adott rendszert, összegyűjtjük a rá vonatkozó biokémiai és fizikai tapasztalatokat és ennek alapján megfogalmazzuk a fizikai és kémiai folyamatok kölcsönhatásának és egymásutánjának rendjét.

b) *Elhanyagolások* (nem matematikai jellegűek) ismeretbeli hiányosságok miatt, vizsgálataink irányultsága miatt.

c) *Megalkotunk* egy modellt, amely lehetőleg olyan mennyiségekkel dolgozik, amelyek mérése a rendszeren végzett kísérletek folyamán megtörténik, ezenkívül konkrét fizikai jelentéssel bíró paramétereket használ.

d) *Kiválasztjuk* a fizika megfelelő diszciplínáját, vagy diszciplínáit a leíráshoz. Makroszkopikus biofizikai rendszerek leírásánál a következő diszciplínák alkalmazására lehet szükség:

Egyensúlytól való eltérés	A tárgyalás mélysége	Fenomenologikus szint	Molekuláris szint
Egyensúly		Termosztatika	Statisztikus mechanika
Egyensúlyhoz közeli rendszerek		Termodinamika (gyakran lineáris termodinamika)	Sztohasztikus folyamatok elmélete
Egyensúlytól távoli rendszerek		Termodinamika (nemlineáris termodinamika) (Lásd: Schubert András előadását)	

e) A matematikai kiértékelés megkönnyítése végett gyakran tesznek *matematikai elhanyagolásokat*. Ezek érvénye kétséges, ha a keresett paraméterekre vonatkozóan nagyságrendi elképzeléseink sincsenek.

f) A modell *illesztése* a kísérleti eredményekhez = a paraméterek számítógépes meghatározása (matematikailag: szélsőértékszámítás).

g) *Diszkusszió*, a modell korlátai, a továbbfejlesztés lehetőségei, a kapott eredmények összehasonlítása más munkák eredményeivel.

Plazmamembránok iontranszport modellje

Az előző fejezet lépéseit követve példaként alkossunk meg egy olyan modellt, mely a plazmamembránok aktív és passzív alkáli iontranszportjának egyszerű és kvantitatív tárgyalását adja.

a) Az aktív transzportra vonatkozó biokémiai eredmények jó összefoglalásának az OPIT, CHARNOCK (1965) és STONE (1968) modellt tekintettük. (Lásd: Somogyi János előadását.) A passzív transzport mechanizmus elképzeléséhez TRÄUBLE (1971) adott jó ötletet, aki feltételezte, hogy a membrán lipidrétegében termodinamikai okok miatt defektek, ún. kinkek alakulnak ki, amelyek a transzportálandó anyaggal töltődhetnek és hőmozgásuk révén transzportálódhatnak az extra- vagy intracelluláris térbe.

b) Kísérleteink során az alkáli ionok izotópjainak transzportját vizsgáltuk a plazmából a sejtbe. Ezért figyelmen kívül hagyva a sokfajta átvivőhelyet, mi csak az alkáli ionok átvitelére alkalmas lyukakat tekintettük. Ezen lyukak kialakulásukat tekintve azonos típusúak, ahogy azt az alkáli ionok kompetitív gátlására vonatkozó kísérletek igazolják. Modellünkben az alkáli ionokon kívül jelenlevő anyagok transzportjával nem foglalkozunk. Mivel kísérleti eredményeink az anyagtranszportra jellemzők, ezért, ha nem szükséges, akkor más mennyiségek pl.: impulzus, entrópia stb. transzportját nem írjuk fel.

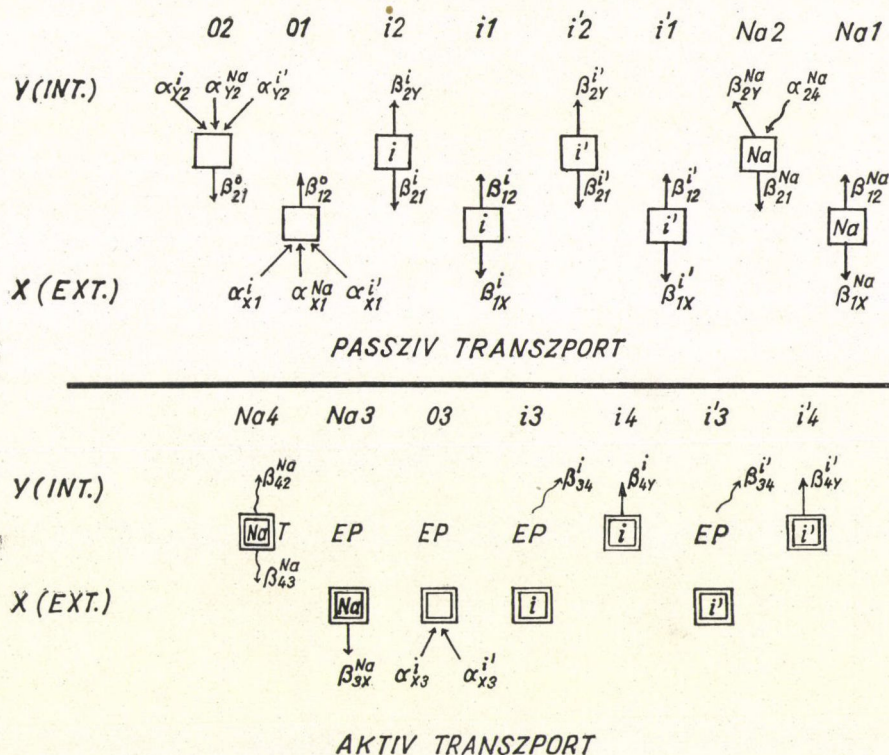
c) Álljon a membrán B db független és azonos egységből (minden egyes egység egy átvivőhely az alkáli ionok szállítására a sejt extracelluláris és intracelluláris terei közt). Minden egység véges sok diszkrét állapotban egzisztálhat. Az állapotok első- vagy másodrendű reakcióval alakulhatnak egymásba. Az 1. ábra mutatja sematikusan egy egység lehetséges állapotait.

Egy átvivőhely állapotát megszabja:

a) *helye*; vagyis, hogy a membrán intracelluláris (Y) vagy extracelluláris (X) oldalán van-e.

b) *betöltöttsége*; vagyis, hogy van-e, s ha van, milyen típusú ion foglal helyet a lyukban. Ha van benn ion, akkor $[i]$, ha az ion izotópja, akkor $[i']$ jelölést alkalmaztunk. Az i bármely alkáli iont jelentheti a Na-ot kivéve, azt ugyanis $[Na]$ -val jelöltük. (A Na az aktív transzportban megkülönböztetett jelentőséggel bír!)

c) *környezete*. Környezetváltozást jelent, ha az alapállapothoz képest a membrán lyuk környezetében levő része magasabb energiájú állapotba kerül. Az átvivőhely dinamikus jellemzői ekkor megváltoznak. Ilyenkor a lyukat kettős négyzettel $\square\square$ jelöltük. Az átvivőhely egyes állapotainak kétindexes jelölése az 1. ábrán az illető állapot felett van feltüntetve. Az első index a



1. ábra. Az aktív és passzív transzport egységes modellje

betöltöttség milyenségére, a második a lyuk helyzete, illetve környezetétől függő különböző állapotokra utal. Modellünkben pl. az üres lyuk különböző állapotban lehet hely szerint (01, 02) és környezet szerint (03). Jelentse pl. n_{03} a 03-as egységek számát a membránban egy adott t időpontban. Mivel a membrán két hőrezervoárt választ el egymástól, ezért n_{ix} jelölje az i típusú ionok számát az extracelluláris oldalon, és n_{iy} az intracelluláris oldalon. A β_{ij}^k sebességi állandók jellemzők a k típusú ionnal töltött lyuk i -ből j állapotba kerülésének a sebességére:

$$\beta_{ij}^k \sim e^{-\frac{\Delta E_{ij}^k}{kT}},$$

ahol ΔE_{ij}^k az átmeneti energia, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet. Az α_{ij}^k mennyiségek koncentrációval arányosak és

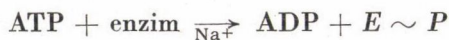
$$\alpha_{ij}^k = \beta_{ij}^k \cdot n_{ki}, \quad \beta_{ij}^k \sim \frac{1}{V_i} e^{-\frac{\Delta E_{ij}^k}{kT}}, \quad \alpha_{24}^{\text{Na}} = \beta_{24}^{\text{Na}} \cdot n_{\text{ATP Y}}$$

kifejezéssel adhatók meg (abszorpciós mennyiségek). A nyilak valamely ion vagy ionnal töltött lyuk helyváltztatásának irányát adják meg. A hullámos nyilak molekulák membránhoz való kötődését (abszorpcióját), illetve arról leválását (deszorpcióját) mutatják. Ezek a folyamatok az átvivőhely környezetének megváltozásával járnak.

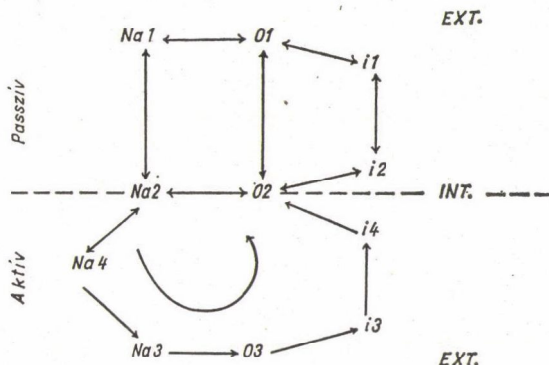
Vegyük sorra az állapotokat, s így a modell működésének fizikai és biokémiai mechanizmusát jobban megértjük.

Az intracelluláris oldali üres lyuk (02) az alkáli ionok Y oldali koncentrációjától és β_{y2}^i -től függően különböző valószínűséggel töltődhet valamilyen ionnal (i2) vagy β_{21}^{Na} sebességi állandóval (01) állapotba ugorhat. (01) állapotban most az extracelluláris oldali ionkoncentrációktól függően töltődhet valamilyen ionnal (i1) vagy visszaugorhat β_{12}^{Na} -val (02)-be. Ha mondjuk kialakul az (i1) (i'1) vagy (Na1) állapot, akkor megfelelő β_{12} sebességi állandóval megtörténhet a töltött lyuk átugrása az intracelluláris oldalra vagy β_{1x} -szel az ion kilépése az X oldalra. Hasonlóképp érvényesek az (i2) (i'2) és (Na2) állapotok megváltozásaira is. Az eddig felsorolt állapotok, melyek megváltozása vagy az X illetve Y oldali ionkoncentrációktól, vagy a membránbeli fázishatárokon kialakuló hibák (lyukak) vándorlásával kapcsolatosak, az alkáli ionok passzív transzportját írják le. Ha csak ezen állapotok összessége jelentené rendszerünket, akkor az eredően downhill transzportot valósítana meg, ameddig a rendszer az egyensúlyt elérné ($\mu_{xi} = \mu_{yi} = \mu_i$, ahol a μ -k az i típusú ion megfelelő térrészbeli elektrokémiai potenciálját jelölik).

A többi állapot az *aktív transzporttal* kapcsolatos. Úgy képzeljük, hogy minden egyes átvivőhely közelében van K^+ , Na^+ aktiválható ATP-áz enzimrendszer. Az (Na2) állapot egy lehetséges megváltozása α_{24}^{Na} sebességi állandóval jelenti az aktív transzport beindulásának lehetőségét. Ugyanis, ha az intracelluláris oldalon Na^+ kötődik a membránhoz, vagyis kialakul (Na2) állapot, akkor a közeli ATP-áz enzimrendszer aktivált állapotba jut és ilyenkor, ha az aktív hely közelébe kerül ATP (amely δt idő alatt $\alpha_{24}^{\text{Na}} \cdot n_{\text{Na2}} \cdot \delta t$ valószínűséggel következik be), úgy kialakult az (Na4) állapot. (Megjegyzem, hogy a sejt még in vitro is elég sokáig fenntartja az ATP koncentráció fiziológiai szintjét, ezért számításainkban α_{24}^{Na} -t konstansnak tekintjük.) Az (Na4) állapot megváltozására két mód van. Vagy végbemegy β_{43}^{Na} -val az

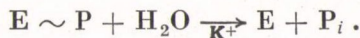


reakció, mely során felszabaduló energia irányított változáshoz vezet, vagyis a Na^+ -mal töltött aktivált környezetű lyuk a reakció eredményeként a membrán extracelluláris oldalára kerül (Na3 állapot). A reakció lejátszódása az ADP ledisszociálását Y-ba és az $\text{E} \sim \text{P}$ komplex kialakulását jelenti a membrán intracelluláris oldalán. Vagy β_{42}^{Na} -vel eltávolodik az ATP-áz enzimtől és a reakció nem játszódik le, visszaalakul az (Na2) állapot. Az (Na3) állapottól



2. ábra. Az aktív és passzív transzport folyamatábrája

kezdvé a változások nagy valószínűséggel csak egyféle módon zajlanak le. Ebben az irányultságban jut kifejezésre a membrán alapállapot felé való törekvése. Elvileg megvan ugyan a lehetőség az ellenirányú folyamatok lezajlására, azonban ezek valószínűségét elhanyagolhatóan kicsinek tekintettük. A $\text{Na}^+ \beta_{3x}^{\text{Na}}$ -el kilép X-be. Kialakul (O3). A megváltozott (aktivált) környezetű üres lyuk szelektíven fogadja be az alkáli ionokat. A Na^+ -ot közel $0 \cdot \delta t$ valószínűséggel, míg a többi alkáli ion $\alpha_{x3}^i n_{03} \delta t$ valószínűséggel. Az utóbbi folyamat bekövetkezésekor kialakul (i3) állapot. Most, hogy az ATP-áz környezetébe került K^+ vagy azt helyettesíteni képes Cs^+ , Rb^+ vagy Li^+ , végbemehet a defoszforiláció:



A reakció β_{34}^i sebességi állandóval zajlik le és irányított változást hoz létre. A lyuk környezetében a membrán alacsonyabb energiájú állapotba jut. Ebben az állapotban a lyuk átkerül a membrán intracelluláris oldalára (i4). Ha pedig β_{4y}^i -vel kilép az ion Y-ba akkor visszaáll az alapállapot a lyuk környezetére nézve (O2).

Az utóbb felsorolt állapotváltozások uphill transzportot eredményeznek.

A modell felhasználja HILL és KEDEM (1966) eredményét, miszerint aktív transzport létrejön, ha a kémiai reakció hatására a membrán felületére merőlegesen, irányított változás történik. Míg az 1. ábra inkább a rendszer

egységeinek lehetséges állapotait szimbolizálta, a folyamatábra (2. ábra) az állapotok kapcsolatát, a rendszer dinamikáját tünteti fel.

A gráf csúcsai az állapotokat jelentik, az őket összekötő élek azokat a folyamatokat, amelyek átvisznek egyik állapotból a másikba. Megfordítható folyamat esetén $\leftrightarrow$, nagy valószínűséggel egy irányba végbemenő folyamatot $\rightarrow$ -al jelöltünk. A folyamatábrán jól elkülönül a szimmetrikus, passzív transzporttal kapcsolatos rész az aszimmetrikus, aktív transzporttal kapcsolatos résztől, vagy más szemszögből a passzív transzport növeli, az aktív csökkenti a rendszer entrópiáját. Morfológiai szempontból az aszimmetria az ATP-áz Na^+ , ill. K^+ aktiváló helyeinek intra-, ill. extracelluláris oldali elhelyezkedésében jelentkezik.

d) e) A modell megfogalmazása már önmaga kínálja, hogy a valószínűségi vagy sztohasztikus elméletet alkalmazzuk a kvantitatív leíráshoz. Szerencsére ez az elmélet egyensúlytól távoli rendszerekre is alkalmazható, az élő rendszerek pedig egyensúlytól eltérő steady state-ban tartózkodnak. A rendszer matematikai leírására itt nem térek ki részletesen, csak a végeredményt közlöm. (Részletes leírás a Magyar Fizikai Folyóiratban megjelenés alatt.)

Az i izotóppal töltött állapotok számának időbeli változását a következő állandóegyütthatós lineáris elsőrendű differenciálegyenlet-rendszer írja le:

$$\begin{aligned}\frac{d\langle n_{i'x} \rangle}{dt} &= -(\beta_{x1}^{i'} \langle n_{01} \rangle + \beta_{x3}^{i'} \langle n_{03} \rangle) \langle n_{i'x} \rangle + \beta_{1x}^{i'} \langle n_{i'1} \rangle, \\ \frac{d\langle n_{i'1} \rangle}{dt} &= -(\beta_{12}^{i'} + \beta_{1x}^{i'}) \langle n_{i'1} \rangle + \beta_{x1}^{i'} \langle n_{i'x} \rangle \langle n_{01} \rangle + \beta_{21}^{i'} \langle n_{i'2} \rangle, \\ \frac{d\langle n_{i'2} \rangle}{dt} &= -(\beta_{21}^{i'} + \beta_{2y}^{i'}) \langle n_{i'2} \rangle + \beta_{y2}^{i'} \langle n_{i'y} \rangle \langle n_{02} \rangle + \beta_{12}^{i'} \langle n_{i'1} \rangle, \\ \frac{d\langle n_{i'3} \rangle}{dt} &= -\beta_{34}^{i'} \langle n_{i'3} \rangle + \beta_{x3}^{i'} \langle n_{i'x} \rangle \langle n_{03} \rangle, \\ \frac{d\langle n_{i'4} \rangle}{dt} &= -\beta_{4y}^{i'} \langle n_{i'4} \rangle + \beta_{34}^{i'} \langle n_{i'3} \rangle,\end{aligned}$$

és a következő algebrai egyenlet, mely a folyamat során az izotóp mennyiségének megmaradását adja:

$$\langle n_{i'x}(0) \rangle = \langle n_{i'x}(t) \rangle + \langle n_{i'y}(t) \rangle + \sum_{j=1}^4 \langle n_{i'j}(t) \rangle,$$

ahol $\langle n_{ij} \rangle$ az ij állapotok számának sokaság átlaga. Ezek az egyenletek fennállnak, ha a kísérletet a következő módon végezzük el: az izotópot bevisszük az extracelluláris térbe, de ugyanakkor ugyanannyi inaktív iont is kivonunk onnan.

Ilyen esetben:

$$\frac{d \langle n_{01} \rangle}{dt} = \frac{d \langle n_{02} \rangle}{dt} = \frac{d \langle n_{03} \rangle}{dt} = 0$$

A matematikai elhanyagolások közül megemlítem, hogy a fenti izotópmegmaradási tétel a fizikai bomlás miatt legfeljebb csak közelítően igaz. Esetünkben a $T_{1/2} \gg$ a vizsgálat időtartama, tehát az elhanyagolás jogosult. Közelítésnek tekinthető a B számú anion átvivőhely feltételezése is. Igazán $\langle B \rangle$, a lyukak számának átlaga, állandó, adott T hőmérsékleten.

További eltérést jelent a pontos számolástól, hogy feltételeztük $\langle n_{i'x} \cdot n_{01} \rangle$, $\langle n_{i'x} \rangle \langle n_{01} \rangle$ kifejezések egyenlőségét. Ez valóban teljesül, ha $n_{i'x}$ és n_{01} valószínűségi változók függetlenek, de erről szó sincs. Itt tehát feltételezésünket nem tudjuk megokolni fizikailag, viszont matematikai szempontból nagyon hasznosnak bizonyul, mert lényegesen kevesebb és lineáris differenciálegyenlet-rendszert kell megoldanunk.

f) A mérésekből $\langle n_{i'x}(t) \rangle / \langle n_{i'x}(0) \rangle$ ismert, és ezen függvény, valamint a d) pontban ismertetett differenciálegyenlet-rendszer ismeretében meg kell mondanunk az állandó együtthatók értékét. Az eljárást paraméterillesztésnek nevezik. Analóg számítógépet használva a differenciálegyenleteket kellett beprogramozni. A számítógépen az ismeretlen paramétereket beállítottuk egy-egy tetszőleges értékre. A kijött eredményt összehasonlítottuk a kísérleti eredményekkel. Ezután megpróbáltuk úgy változtatni a paraméterek értékeit, hogy a kísérlet, illetve az elmélet produkálta eredmények közeledjenek egymáshoz. Az eljárást a mérési hibán belüli kielégítő egyezésig folytattuk. A végül beállított paramétereket pedig a membránra jellemző állandóknak tekinthetjük.

Sajnos a viszonylag nagy hibával rendelkező kísérleti eredményekhez való illesztéskor a kapott paramétersorozat egyértelműsége kérdéses és a paraméterek hibája igen nagy lehet. A kérdésben előrehaladást jelentene egy megfelelő, digitális gépre írt program, mivel akkor a gép maga végezné a szukcesszív megközelítést, amely így lényegesen gyorsabb és egzaktabb összehasonlításra adna módot.

IRODALOM

- HILL, L. T., KEDEM, O.: J. Theoret. Biol., **10**, 399 (1966).
 OPIT, L., CHARNOCK, J. S.: Nature, **208**, 471 (1965).
 STONE, A. J.: Biochim. Biophys. Acta, **150**, 578 (1968).
 TRÄUBLE, H.: J. Membrane Biol. **4**, 193 (1971).