

2. táblázat

**Szinkrotronos mérések eredménye tengeri és kontinentális aeroszolk nátrium- és nitrogénkomponenseire**

	Impaktor- lemez	TXRF		TXRF-NEXAFS	
		Nettó röntgenintenzitás (O = 1000)		Nitrogénkomponensek (összes N százalékában)	
		N	Na	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Ross-tenger	7	30,8	226,5	94	6
	6	4,8	955,0	90	10
	5	4,0	3037,5	45	55
Földközi-tenger	7	17,9	265,5	90	10
	6	12,6	425,7	90	10
	5	4,5	1620,3	10	90
Magyarországi háttér	7	80,9	41,0	100	0
	6	32,5	200,7	95	5
	5	3,5	711,4	15	85

A különböző méretfrakciók NEXAFS analízise a várokozásnak megfelelő eredményt adta, a 6. és 7. lemezen (0,5, illetve 0,25 µm) lényegesen nagyobb volt az ammónium aránya a nagyobb méretfrakciókhoz képest.

A fent leírt roncsolásmentes módszer olyan földrajzi területen vett mintából is lehetővé teszi az aeroszolk frakcionált nitrogénanalízisét, ahol az aeroszolk koncentráció nagyon alacsony (pl. sarkvidékek), vagy igen nagy időfelbontású levegőkémiai információra van szükségünk. Ipari és lakott területektől több ezer km távolságban azonban más aeroszolkkeletkezési mechanizmusok miatt a nitrogénkomponensek aránya jelentősen eltérhet a kontinentális típustól. Olasz kutatók segítségével hozzájutunk az antarktiszi Ross-tenger partjától néhány km-re May-impaktort vett aeroszolkmintákhoz. A városi és ipari csóvaktól nagy távolságra, az óceánok és tengerek felett a tengervízből tipikus (Na,Mg)Cl és más halogenid-típusú részecskék keletkeznek. A részecskék jellemző átmérője 1–2 µm közötti. Ez a méretfrakció a kontinentstől távol mindössze 55%-ban tartalmaz nitrátot, míg a Földközi-tenger mentén ezen részecskEFRakcióban, mely a legtöbb nátriumot is tartalmazza, a nitrogénkomponensek 90%-a nitrát (2. táblázat). Ennek magyarázata a következő: az

ipari területeken, ahol a nitrogén-oxidok (gázok) koncentrációja nagyságrendekkel magasabb, mint a háttérben, az ott áthaladó tengeri eredetű légtömegekben az alkáli-halogenid sók egy része nitráttá átalakul. Ázsiai aeroszolkban néhány részecske elemösszetétele alapján már feltételezték, hogy a halogén-nitrátok tengeri só átalakulásával keletkeztek [5], erre általános következtetést azonban csak az antarktiszi minták eredményeiből lehet levonni.

Összefoglalva megállapítható, hogy a TXRF-NEXAFS módszerrel a fosszilis tüzelésből, illetve közlekedésből származó aeroszolkban a nitrogénkomponensek aránya a gázméréshez hasonló időfelbontással meghatározható,

illetve sarkvidéki háttérterületeken, ahol az aeroszolk koncentráció nagyságrendekkel alacsonyabb, akár néhány perces mintavételből analízis végezhető. Megjegyezzük, hogy az alkalmazott módszerrel számos más kis koncentrációban előforduló elem, illetve azok különböző mértékben ionizált állapotai kimutatása is lehetséges. Ezért a fenti módszerrel kapott eredmények fontos kiindulópontjai lehetnek környezetvédelmi elemzéseknek.

#### Irodalom

1. P. FABIAN: *Atmosphäre und Umwelt* – Auf. Berlin, Springer 1989
2. E. MÉSZÁROS, T. BARCZA, A. GELENCSE, J. HLAVAY, GY. KISS, Z. KRIVÁCSY, A. MOLNÁR, K. POLYÁK: *Size distributions of inorganic and organic species in the atmospheric aerosol in Hungary* – J. Aerosol Sci. 28/7(1997) 1163–1175
3. A. LASKIN, M.J. IEDEMA, J.P. COWIN: *Time-Resolved Aerosol Collector for CCSEM/EDX Single-Particle Analysis* – Aerosol Sci. Technol. 37 (2003) 246–260
4. C. STRELL, P. WOBASCHKE, P. KREGSAMER, G. PEPPONI, P. PIANETTA, S. PAHLKE, L. FABRY – Spectrochim. Acta Part B, 56(2001) 2085–2094
5. C.-U. RO, K.-Y. OH, H.-K. KIM, Y.-P. KIM, C.-B. LEE, K.-H. KIM, C.-H. KANG, J. OSÁN, J. DE HOOG, A. WOROBIEC, R. VAN GRIEKEN: *Single particle analysis of aerosols at Cheju Island, Korea, using low-Z electron probe X-ray microanalysis: a direct proof of nitrate formation from sea salts* – Environmental Science and Technology 35 (2001) 4487–4494

## NEMKETTŐSRÉTEG-LIPIDEK KETTŐSRÉTEG-SZERKEZETŰ MEMBRÁNOKBAN

– Egy enigmatikus kérdés vizsgálata kisszögű röntgenszórás-mérésekkel

Garab Győző

MTA Szegedi Biológiai Központ

### Biológiai membránok – kettősréteg-szerkezet

A biológiai membránok kettősréteg-szerkezetű lipid-membránból és a membránba ágyazott, illetve a membránnal asszociált fehérjékből állnak. A lipid kettősréteg egy nagy plaszticitású kétdimenziós mátrix, amely alkal-

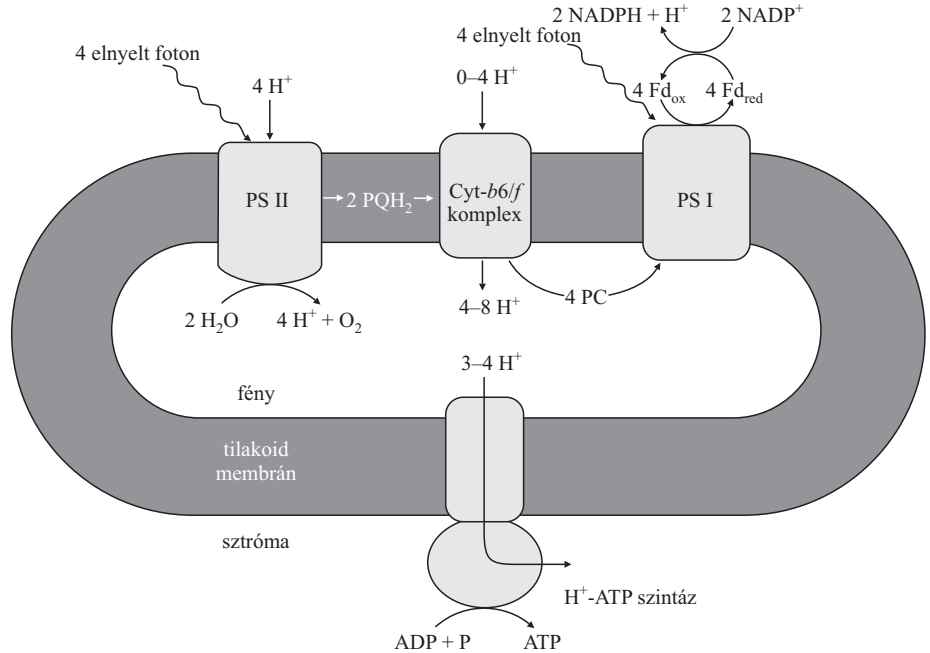
mas arra, hogy két, egymástól elválasztott térrészt hozzon létre. Ezzel a kompartmentalizációval tudja a membrán megvédeni az élő sejtet az élettelen környezettől, ezzel képez a sejtben belül nagyfokú autonómiával rendelkező organellumokat. Ezzel hoz létre az organellumokon belül is zárt membránvezikulumokat, melyek külső és belső ol-

dala között jelentős koncentráció- és potenciálkülönbségek léphetnek fel. A membrán ezen funkciói betöltéséhez elengedhetetlen a lipid kettősréteg azon sajátja, hogy a kettősréteg legtöbb ionra és molekulára impermeábilis, illetve hogy rendkívül jó elektromos szigetelő, továbbá magas elektromos terek megtartására is képes [1].

A kettősréteg fizikai sajátosságai különösen fontosak az energiaátalakító membránok esetén, amelyek működésének kulcsfontosságú lépése, az úgynevezett energizált állapot, egy elektrokémiai potenciálgradiens felépülése. (Az energiaátalakító membránok körébe tartoznak a fotoszintetikus, a mitokondriális, illetve légzést végző és a (bakterio)rodopszint tartalmazó membránok.) Az energizált állapot kialakulása zárt membránvezikulákban, például a fotoszintetikus membránokban, így a kloroplasztisz tilakoid membránjai esetén is – a fényindukált töltésváltásnak és az azt követő „vektoriális” redox reakcióknak köszönhetően – mintegy  $10^5 \text{ V cm}^{-1}$  elektromos tér ( $\Delta\psi$ ) és a 2–3 pH értéknyi protongradiens ( $\Delta pH$ ) felépülését jelenti a belső és a külső vizes fázis között (1. ábra). Az így kialakuló protonmotoros erő, azaz a protonokra vonatkoztatott elektrokémiai potenciálgradiens,  $\Delta\mu_{H^+} = \Delta\psi - (RT/F)\Delta pH$ , az ATP szintézisben hasznosul [2]. (A jó elektromos szigetelés és az impermeabilitás nem energiaátalakító membránok működésében is fontos, bár talán kevésbé evidens.)

## Kettősréteg- és nemkettősréteg-lipidek mint membránalkotók

A biológiai membránok fizikai tulajdonságai szempontjából különösen fontos az a tény, hogy a lipidek – az úgynevezett nemkettősréteg-lipidek kivételével – kettősrétegképzésre hajlamosak: vizes közegben már mintegy  $10^{-11} \text{ M}$  koncentrációnál tökéletes kettősréteg-szerkezetet képesek alkotni. Ezzel szemben az úgynevezett nemkettősréteg- (vagy nem lamellaképző) lipidek hasonló körülmények között és általában a fiziológiailag érdekes viszonyok mellett (pH, ionerősség, hőmérséklet stb.) kettősréteg-struktúra felvételére nem képesek, attól lényegesen eltérő szerkezeteket alkotnak [1, 3]. Mindezek alapján joggal tételezhetnénk fel, hogy a biológiai membránokban, de legalábbis az energiaátalakító membránokban nem lamellaképző lipidek nem, vagy csak igen alacsony koncentrációban fordulnak elő. Ezzel szemben az igazság az, hogy ezek valamennyi biológiai membránban jelen vannak, és – minden várakozásra rációvalva – legnagyobb mennyiségben éppenséggel



1. ábra. A kloroplasztisz tilakoid membránjának sematikus ábrája. A kettősréteg-szerkezetű membránban ágyazott proteinkomplex-komponensek végzik a fényelnyelést, a gerjesztési energia továbbítását a reakciócentrumokba, ahol az elsődleges töltésváltás történik; az ezt követő töltézállító (redox) folyamatok vezetnek el a primér termékekhez, az  $O_2$  és a (redukáló erőt a szervesanyag-produkcióhoz biztosító)  $NADPH_2$ -höz, valamint a vezikulum úgynevezett energizált állapotához ( $\mu_{H^+}$ ), amely az ATP szintézis során hasznosul.

az energiaátalakító membránokban találhatóak. Ezekben az egymástól lipid- és fehérje-összetételben, pontos funkcióikban és morfológiailag is eltérő energiaátalakító membránokban közös, hogy a teljes lipidmennyiség mintegy fele hordozza ezt a (biológiai membránok szempontjából) különleges, nem lamellaképző, fizikai sajátsgot. Ezzel a membrán teljes lipidmennyisége erősen nemlamelláris hajlamúvá válik. Jóllehet egyes nem lamellaképző lipidek számos, speciális funkciót elláthatnak (pl. szerepet vállalhatnak a membránfúzióban, egyes fehérjék mikrokozmetének biztosításában stb. [4]), semmi nem indokolja, hogy a membrán lipidtartalmának mintegy fele nemkettősréteg-lipid legyen, hiszen igaz az is, hogy ugyanezek a membránok nemlamelláris szerkezetet számottevő méretekben nem alakítanak ki, és ha mégis, akkor is csak tranzien módon [4, 5]. Ez a kérdés ezért az energiaátalakító membránok és általában biológiai membránok szerveződésének és funkciójának fontos, máig megoldatlan kérdése.

Az ezen a területen folyó (a kérdéskör általános jelentőségéhez képest talán nem is túl intenzív, de a probléma enigmatikus voltához képest mégis jelentős erővel folyó) kutatások több rész kérdés megválaszolására irányulnak. Ezek közül itt két probléma vázlatos ismertetésére vállalkozom: i) hogyan épülnek be ezek a molekulák kettősréteg-membránokba, és ii) milyen univerzális szerkezeti/funkcionális szerepet töltenek/tölthetnek be ezek a kémiailag különböző molekulák különböző biomembránokban? Az első kérdésre kloroplasztisz-tilakoid-membránból izolált rendszeren kísérletekkel, köztük szinkrotronsugárzást használó kisszögű röntgenszórás- (SAXS-) mérésekkel, kerestük a választ, és fotoszintetikus membránokon elsőként sikerült bizonyítani, hogy ezek a lipidek proteinek aggregációja révén „kényszeríthetők” a kettősréteg-szerke-

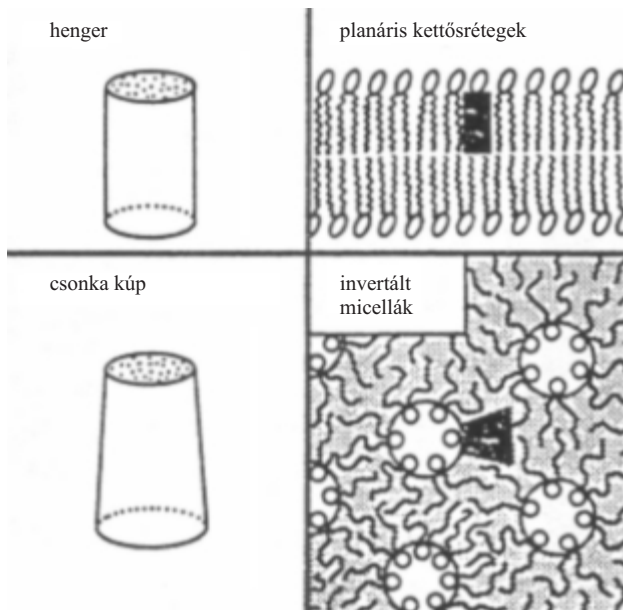
zet felvételére [6]. Ezek a vizsgálati eredmények vezettek el bennünket ahhoz a magyarázathoz, ami szerint a nem-kettősréteg-lipidek nagy koncentrációban való jelenlétével állítja be és szabályozza a membrán a magas proteinkoncentrációját, illetve tartja közel állandó szinten a protein:lipid arányát [7]. Hipotézist állítottunk fel továbbá arra, hogy a lipidek nem lamellaképző hajlama miként kölcsönözhet, korábban nem ismert módon, szerkezeti flexibilitást a biológiai membránoknak.

## Nemlamelláris szerkezetek

A nemkettősréteg-lipidek – ellentétben a jó közelítéssel henger alakú lamellaképző lipidekkel – leginkább csonka kúp alakkal közelíthetők. Ennek oka lehet például az, hogy a fejcsoport viszonylag kicsiny átmérőjű a zsírsavlánc „lábakhoz” képest. Ez jól érzékeltethető a kloroplasztiszok két fő lipidkomponense, az MGDG (monogalaktozil-diacilglicerid), és a DGDG (digalaktozil-diacilglicerid) példájával, amelyek kémiai szerkezetüket illetően csak a fejcsoport méretében (mono, illetve di) térnek el egymástól; ez a két galaktolipid összességében mintegy 80%-át (50%+30%) teszi ki a tilakoid-membránok lipid-tartalmának. Az eltérő molekuláris geometria miatt tehát míg a DGDG kettősréteget képez, hasonló körülmények között az MGDG úgynevezett invertált hexagonális,  $H_{II}$  szerkezetet vesz fel. Ezt a szerkezetet mutatja be a 2. ábra. (Részletesebb tárgyalásra lásd pl. [3]).

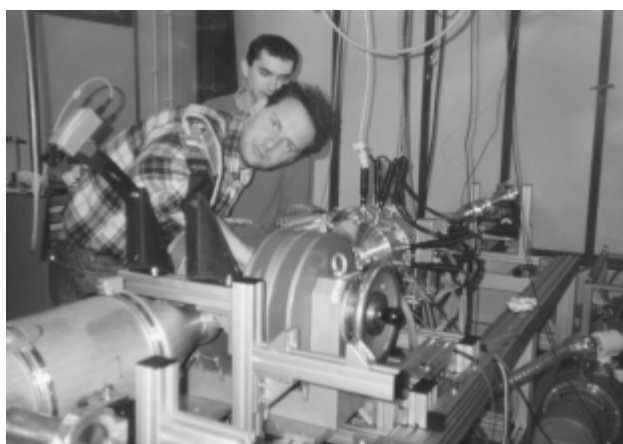
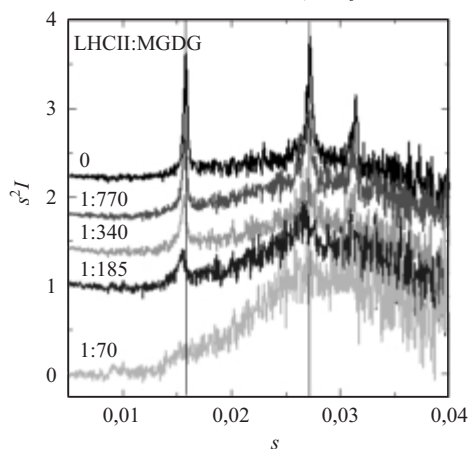
A lamelláris és a  $H_{II}$ -es szerkezet viszonylag könnyen azonosítható SAXS segítségével (sajnos ugyanez nem igaz a köbös struktúrákra). Ezen mérések előnye más – például elektronmikroszkópos – módszerekhez képest, hogy a minta lényegében minden különösebb preparatív előkészítés nélkül vizsgálható, így az esetleges műtermékek és esetleges preparációs fázisátmenetek elkerülhetők. Ezzel a módszerrel tehát a lipidek fizikai állapota – vagy annak jól meghatározott állapotai és ezek közötti szerkezeti átrendeződések – könnyen követhetők.

3. ábra. A kloroplasztisz-tilakoid-membrán fő lipidkomponensének, a nem lamellaképző lipid MGDG, kisszögű röntgenszórás-képe és annak módosulása a növények fő, fénybegyűjtő klorofill a/b „antenna” komplexének (LHCII) hozzáadásával. Érdekes megjegyezni, hogy ez a két komponens a bioszféra legnagyobb mennyiségben előforduló lipidje, illetve proteinkomplexe. Az LHCII:MGDG moláris arány 70-es értékénél mért szórásprofil már nagyon hasonlít a kloroplasztisz-tilakoid membránjain mérthez, amely lamelláris szerkezettel értelmezhető (balra). A Triestri Elettra Szinkrotron SAXS mérőállomása – a nyalábbra helyezett elektromágnes a tilakoid-membránok rendezésére szolgál. A felvételen a mérőállomás munkatársa, Heinz Amenitsch és munkatársam Jávorfői Tamás (háttérben) a mérés konfigurálása közben (jobbra).



2. ábra. A henger alakúnak tekinthető és ezért vizes közegben (illetve a fiziológiailag érdekes tartományokban) spontán kettősréteg- (lamelláris) szerkezetet felvevő és csonka kúp alakú, nem lamellaképző lipidek, amelyek invertált hexagonális (vagy köbös) szerkezetek felvételét preferálják.

Amint azt a 3. ábra mutatja, a tilakoid-membránokból izolált MGDG a  $H_{II}$ -es fázisra jellemző „ujjlenyomatot” adta. Ezt az LHCII, a kloroplasztisz fő, klorofill a/b fénybegyűjtő proteinkomplex komponensének hozzáadásával el lehetett nyomni, és a  $H_{II}$ -es fázist, az LHCII fokozatos hozzáadásával párhuzamosan, felváltotta egy a lamelláris fázis jelenlétével konzisztens szórás jel. Ezek az adatok – több más, spektroszkópiai és elektronmikroszkópos mérési eredménnyel együtt – arra engedtek következtetni, hogy a  $H_{II}$ -es fázist a lipideknek az LHCII rendezett makroaggregátumba való beépülése lebontja, illetve hogy az MGDG-t az LHCII aggregációja kényszeríti a kettősréteg-szerkezet felvételére. Vizsgálataink – elsősorban a SAXS és az LHCII:MGDG lamelláris aggregátumok ne-

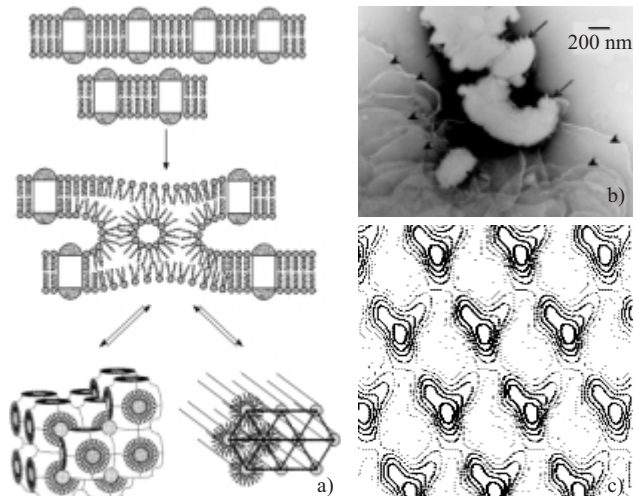


gatív festésű elektronmikroszkópiai mérések – azt is feltárták, hogy ebben a mesterséges membránban a lamelláris szerkezeten belüli magas proteinkoncentráció, illetve a proteinek szabályos, szoros elrendeződése kizárja a H<sub>II</sub>-es fázis jelenlétét [6]. SAXS segítségével ugyanis mérhető a H<sub>II</sub> szerkezet mérete, míg az elektronmikroszkópos felvételek részletes analízise kijelöli a periodikus szerkezetben lipidek számára rendelkezésre álló térrészt. Valószínűleg ugyanilyen alapon kizárható a H<sub>II</sub> fázis tilakoid-membránba ágyazódása is, illetve ennek a fázisnak az előfordulása más, hasonlóan magas proteinkoncentrációjú, energiaátalakító membránokban. Ezekben a membránokban ugyanis szintén magas a proteinkoncentráció, és – amint azt például a gránumos tilakoidok esetére ismert [7, 8] munkák mutatják – a proteinek „sűrű”, hosszú távon rendezett struktúrákat alkotnak.

## A nemkettősréteg-lipidek szabályozó szerepe

Az LHCII:MGDG lamellák képződését továbbgondolva arra is választ kaptunk, mi lehet a nem lamellaképző lipideknek az az általános sajátja, amely előnyös a biológiai funkció szempontjából. A válaszuk az, hogy – kissé paradox módon – szegregációs képességük teszi őket értékesekké. Bár ezek a lipidek is beépülhetnek a kettősrétegbe, pontosabban: az ilyen lipideket tartalmazó elegy is kényszeríthető kettősréteg felvételére, de ez erősen korlátozott, és amikor a lipidek „fölös” mennyiségben vannak jelen, nagyon könnyen szegregálódnak a membránból. Ezzel tehát a lipidek – nemlamelláris hajlamuknak köszönhetően – meg tudják akadályozni azt, hogy a membrán „kihíguljon” [9]. A kettősréteg, azaz lamellaképző lipidek erre nyilvánvalóan nem képesek, hiszen ezek proteinek távollétében is stabilis kettősréteget alkotnak. Ugyanakkor ismert, de legalábbis feltételezhető, hogy a membránokban nagyon fontosak a kooperatív kölcsönhatások. Bár erről ma még viszonylag keveset tudunk, ezek nélkül például az energiaátalakítás hatékonysága valószínűleg nem lenne biztosítható [10]. Így tehát a nem lamellaképző lipidek szegregációs képességük révén egy önszabályozó mechanizmus kulcsfontosságú elemei. Irodalmi adatok elemzése azt is megmutatta, hogy – ahogy a magyarázat alapján várjuk – szoros összefüggés van különböző biológiai membránok nemkettősréteg-lipidkoncentrációja és proteintartalma között. Ez tehát azt jelenti, hogy a kettősréteg-szerkezetű membrán lipid:protein aránya nemkettősréteg-lipidekkel állítható be és azzal szabályozható [9].

Mindezek alapján az is erősen valószínűsíthető, hogy – amint arra az MGDG:LHCII rendszer viselkedése is utalt – a membrán, illetve annak lamelláris lipidfázisa és a „kívül rekedt”, vagy bármi más módon „feleslegessé” vált lipid-mennyiség dinamikus egyensúlyt alakít ki egymással (4. ábra). Feltételezhető ugyanis, hogy a szegregált lipidek a kettősréteg-szerkezetű membrán közelségében maradnak és/vagy azzal szorosan asszociálódnak. Ezzel ki- és belépésük a biológiai funkciónak megfelelően „hangolható”. Ez a membránok flexibilitásának és szerkezeti dinamikájuknak egy korábban nem ismert fontos eleme lehet [9]. Ennek a hipotézisnek az ellenőrzése/finomítása további



4. ábra. Rendezett aggregátumokat tartalmazó membrán sematikus képe (a): amennyiben a membránban (pl. belső szerkezeti átrendeződést követően) szabad lipidfelületek alakulnak ki, ezek szegregálódhatnak és nemlamelláris, köbös vagy invertált hexagonális szerkezeteket hoznak létre; a folyamat megfordítható, azaz protein hozzáadásával ezeket a lipideket a membrán felveheti (a). Ez utóbbi folyamat érzékelhető az elektronmikroszkópos felvételen, amely a H<sub>II</sub> fázisú lipidek (L) membránba (M) épülését mutatja (b). Az MGDG:LHCII kettősréteg-szerkezetű mesterséges membránban a proteinek jól meghatározott (bár szerkezetileg flexibilis) membránban vannak beágyazva. Az ábra a szerkezet Fourier-térképét mutatja (az ábrázolt terület hozzávetőlegesen 20 × 20 nm nagyságú) (c).

vizsgálatok tárgya, melyben a szerkezetvizsgálat szinkrotronoknál elérhető hatékony és gyors SAXS-mérések és – itt nem tárgyalt – más, szintén szinkrotronsugárzást használó módszerei (pl. lipid-monolayerek reflektivitásmérései, multilayerek szórás tulajdonságai, periodikus proteinszerkezetek dinamikus sajátosságai, röntgen-mikroszkópia), kiegészítve más biokémiai és biofizikai technikákkal jelentős segítséget adhatnak.

## Irodalom:

1. E. SACKMANN: *Biological membranes architecture and function* – Handbook of Biological Physics Vol. I: Structure and Dynamics of Membranes (eds.: R. Lipowsky, E. Sackmann) Elsevier, Amsterdam (1995) 1
2. D.G. NICHOLSON, S.J. FERGUSON: *Bioenergetics 2* – Academic Press, London, 1992
3. J.M. SEDDON, R.H. TEMPLER: *Polymorphism of lipid-water systems* – Handbook of Biological Physics Vol. I: Structure and Dynamics of Membranes (eds.: R. Lipowsky, E. Sackmann) Elsevier, Amsterdam (1995) 97
4. R.M. EPAND: *Lipid polymorphism and protein-lipid interactions* – Biochim. Biophys. Acta 1376 (1998) 353
5. W.P. WILLIAMS: *The physical properties of thylakoid membrane lipids and their relation to photosynthesis* – Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics (eds.: P.-A. Siegenthaler, N. Murata) Kluwer Academic Publishers (1998) 103
6. I. SIMIDJIEV, S.S. STOYLOVA, H. AMENITSCH, T. JÁVORFI, L. MUSTÁRDY, P. LAGNER, A. HOLZENBURG, G. GARAB: *Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins in vitro* – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 1473
7. A.V. RUBAN, M. WENTWORTH, A.E. YAKUSHEVSKA, J. ANDERSSON, P.J. LEE, W. KEEGSTRÁ, J.P. DEKKER, E.J. BOEKEMA, S. JANSSON, P. HORTON: *Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization* – Nature 421 (2003) 648
8. L. MUSTÁRDY, G. GARAB: *Granum revisited. A three-dimensional model – where things fall into place* – Trends Plant Sci. 8 (2003) 117
9. G. GARAB, K. LOHNER, P. LAGNER, T. FARKAS: *Self-regulation of the lipid content of membranes by non-bilayer lipids* – Trends Plant Sci. 5 (2000) 489
10. J. LAVERGNE, P. JOLIOT: *Restricted diffusion in photosynthetic membranes* – Trends Biochem. Sci. 16 (1991) 129