

# Hogyan épül fel a sejtmembrán?



**Farkas Borbála**

ELTE Apáczai Csere János Gyakorló Gimnázium, Budapest

**Kiss Laura**

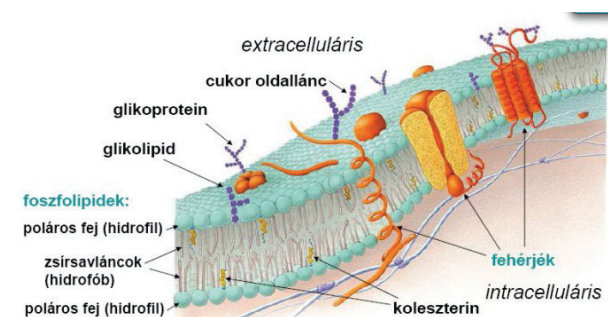
Kecskeméti Katona József Gimnázium, Kecskemét

**Szabó Katalin**

Eötvös József Gimnázium, Budapest

## Célkitűzés

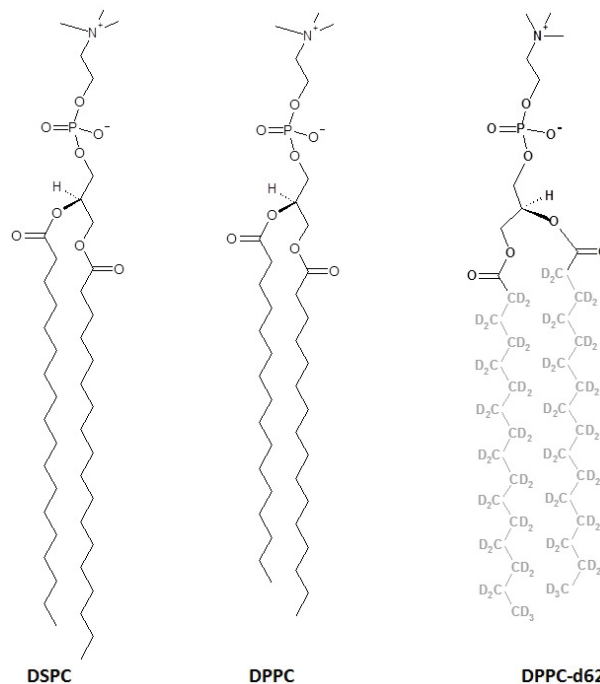
A kutatótábor egy hete során lehetőségünk nyílt arra, hogy közelebbről megismerjük, a biológiai szempontból legjelentősebb határfelületet, a sejtmembránt. A sejt az élővilág legkisebb egysége. Számos feladatot kell ellátnia, ezért fontos, hogy valami biztosítsa a különböző anyagok áramlását a sejt belseje, vagyis a citoplazma és a sejt külső környezete, az extracelluláris tér között. Ezen anyagáramlás zavartalan lebonyolításában van szerepe a sejtmembránnak.



1. ábra A sejtmembrán felépítése

A sejtmembrán alapját a kettős foszfatidréteg képezi, melyhez kapcsolódhatnak szénhidrátok (oligoszacharidok), valamint találhatunk fehérjéket a felületén (perifériás fehérje), a foszfolipid rétegek között (integráns fehérje), vagy akár át is érhetik a membránt, csatornáként működve. Ezek a fehérjék és szénhidrátok teszik egyedivé a sejtmembránt. Fontos beépülő vegyület a koleszterin, mely biztosítja

a megfelelő merevségét. A legfontosabb molekulacsoport mégis a foszfolipidek, hiszen ők alkotják a membrán alapját. A foszfolipidek glicerinnel két zsírsavval és egy foszforsavval képzett észterei. Amfipatikusak, tehát kettős oldódási tulajdonságuk van. Az apoláris (hidrofób) szénláncok egymás felé fordulnak, míg a poláris (hidrofil) feji részük a két vizes fázis felé (citoplazma, extracelluláris tér) esik, kialakítva ezzel a biológiai membránokat. Ennek ismeretében, továbbgondolva, a foszfolipideknek jelentős szerepe van a gyógyszerkutatásban.



2. ábra Foszfolipidek



**3. ábra** Foszfolipidek kloroform oldatban

Például a háromdimenziós formájukban (vezikula, liposzóma) el lehet juttatni hatóanyagokat a szervezet károsítása nélkül rákos sejtekhez, hogy ott helyileg fejtsék ki hatásukat (1. ábra).

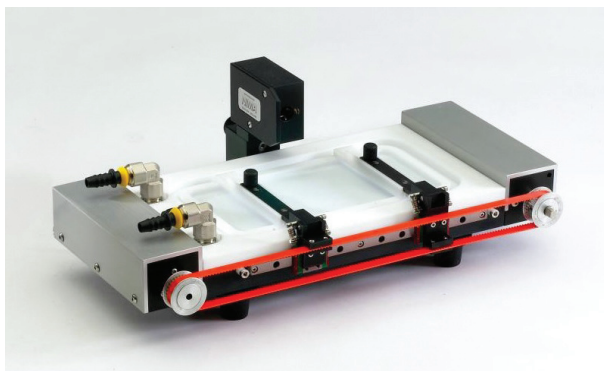
Mi a kutatásunk során kétdimenziós modelleket készítettünk: mono- és kettősrétegeket, majd ezeket vizsgáltuk különböző módszerekkel. A rétegek készítése során 3 féle foszfolipidet alkalmaztunk: DSPC (disztearil-fosfo-kolin), DPPC (dipalmitoil-fosfo-kolin) és DPPC-d62 (dipalmitoil-fosfo-kolin alkil láncában deutériummal helyettesítve) (2., 3. ábra).

#### Kísérleteink

Az említett foszfolipidek felhasználásával vízfelszíni monorétegeket, illetve szilárd hordozós mono- és kettősrétegeket készítettünk. A vízfelszíni monorétegekről összegfrekvenciakeltési színeképeket vettünk fel, és izotermákkal jellemeztük azokat. A szilárd hordozós monorétegek és kettősrétegek vizsgálatához infravörös mikroszkópiát, illetve összegfrekvenciakeltési spektroszkópiát alkalmaztunk.

#### Langmuir filmmérleg

A legtöbbet használt eszköz a kutatótábor ideje

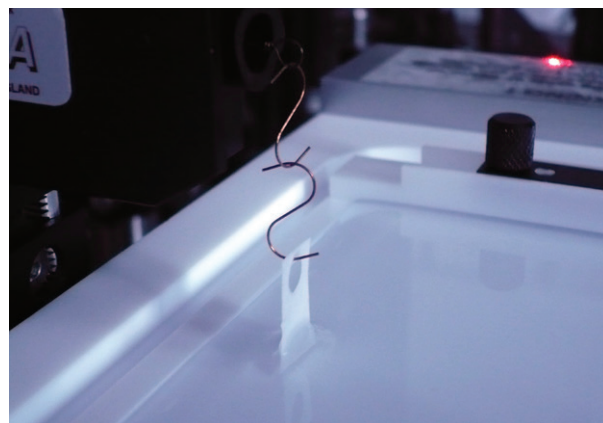


**4. ábra** Langmuir filmmérleg

alatt a Langmuir filmmérleg volt, ugyanis ezzel készítettük el a foszfolipid rétegeket és vettünk fel róluk izotermákat (4. ábra). A filmmérleg fő egysége a teflonkád, amit kétszer desztillált vízzel kell feltölteni. A két gát feladata a víz felszínén lévő lipid réteg egyenletes összenyomása, az erőmérő segítségével pedig az oldalnyomás mértük. Az erőmérőre akasztott Wilhelmy-lemez által mérhető az oldalnyomás, ami nem más, mint a szabad vízfelszín és a vízfelületre felvitt foszfolipid felületi feszültségének különbsége (5. ábra). A megfelelő foszfolipideket kloroformban ( $\text{CHCl}_3$ ) oldva, híg oldat formájában cseppentettük mikrofecskendővel a vízfelszínre.

#### Izotermák

A Langmuir filmmérleggel ún. izoterma görbéket vettünk fel, amely az oldalnyomást az egy Cmolekulára jutó terület függvényében ábrázolja.

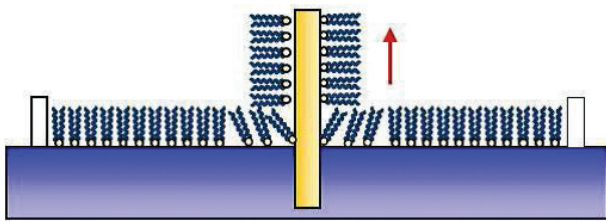


**5. ábra** Erőmérő és Wilhelmy-lemez

A gátak segítségével a lipid réteg felszínét csökkentettük, így az egy molekulára jutó terület is csökkent.

A különböző anyagok izoterma görbéi eltérőek, ezáltal alkalmasak a monorétegek jellemzésére. A vízfelszínre terített lipid réteg tulajdonképpen kétdimenziós. A lipid rétegnek különböző állapotai figyelhetők meg, amelyek analógiát mutatnak az általánosan ismert halmazállapotokkal.

Az izoterma görbe azon szakaszán, ahol legnagyobb az egy molekulára eső terület, a réteg gáz állapotúnak tekinthető, rendkívül nagy a rendezetlensége, és minimális az oldalnyomása. Ahogy csökken a rendelkezésükre álló terület, nő az oldalnyomás, és elkezd növekedni a molekulák rendezettsége is. A réteg folyadék állapotba kerül. A DPPC-nek érdekessége, hogy két folyadék fázisa is van, az alacsonyabb rendezettségű az expandált,

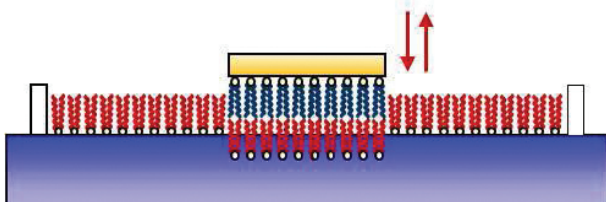


6. ábra Langmuir-Blodgett módszer

és a rendezettebb a kondenzált. Amikor ezek egymásba alakulnak, egy plató figyelhető meg az izotermán.

### Szilárd hordozós rétegek előállítása

Először foszfolipidet tettünk a vízfelszínre, amelyet a megfelelő oldalnyomáson tartottunk, majd egy kvarc prizmára vittünk fel úgy, hogy a hordozót lassan kiemeltük a foszfolipid rétegen át (6. ábra). Ezt az eljárást Langmuir-Blodgett módszernek nevezzük. A Langmuir-Blodgett eljárással szilárd hordozós monoréteget tudunk készíteni. Kettősréteg előállításakor egy második monoréteget vittünk fel az előbbi hordozós monorétegre. Ehhez a Langmuir-Schaefer eljárást alkalmaztuk. Egy másik fajta foszfolipidből egy újabb réteget tettünk a vízfelszínre, és ehhez lassan, felülről vízszintesen közelítve hozzáértettük a monoréteggel előzőleg bevont prizmát. A két foszfolipid réteg érintkezésekor alakult ki a szilárd hordozós kettősréteg (7. ábra).

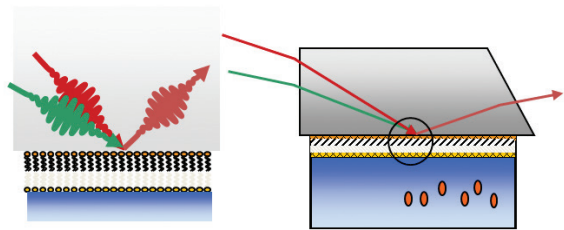


7. ábra Langmuir-Schaefer módszer

### Összegfrekvencia-keltési színeképek

Méréseink során egy másik eszköz is nagy segítségünkre volt. Az összegfrekvencia-keltési spektrométer (röviden SFG) működési elve a következő: két sugárnyaláb hoz létre, az egyik egy szabad szemmel is látható, zöld nyaláb, mely fix hullámhosszú, a másik egy hangolható, infravörös nyaláb. E két sugarat úgy irányítottuk, hogy a minta meghatározott pontján találkozzanak, és így a két sugárnyaláb frekvenciájának összegével megegyező

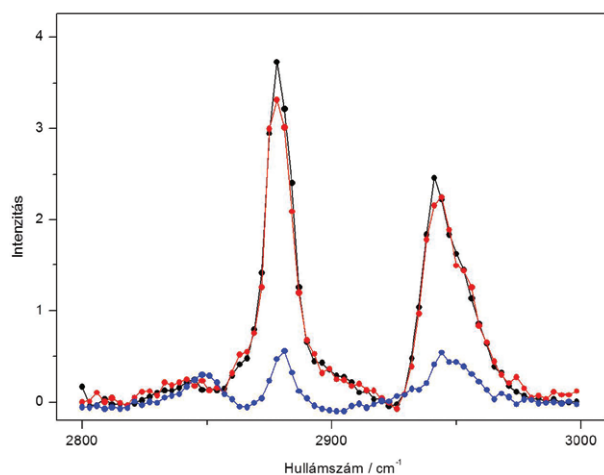
frekvenciájú sugár hagyta el a mintát (8. ábra). Ezt a nyalábot detektáltuk, ez alapján készült a színekép. A színekép ott lesz intenzív, ahol az infravörös sugár frekvenciája ugyanakkora, mint egy funkciós csoport rezgési frekvenciája. Így itt a molekulán belüli rezgéseket vizsgálhatjuk, és a kirajzolt színekép alapján meghatározhatjuk a foszfolipideket alkotó, különböző rezgési frekvenciával rendelkező molekularészleteket. Emellett a színeképek összehasonlításával a molekulák rendezettségére is tudunk következtetni.



8. ábra Összegfrekvencia-keltési-spektrométer működési elve

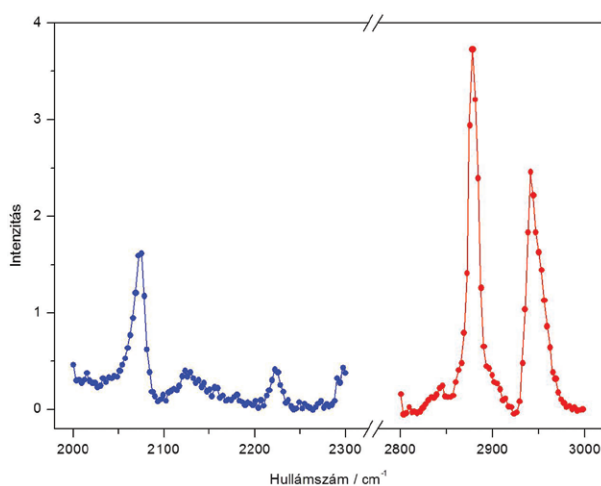
### SFG színeképek különböző oldalnyomásokon

A méréseket úgy végeztük, hogy az előzőekben már megismert módszerrel a Langmuir filmmérleg felszínén DPPC monoréteget készítettünk, és a két sugárnyalábot úgy irányítottuk, hogy a filmrétegen találkozzanak. Több színeképet vettünk fel különböző oldalnyomásokon (30 mN/m, 20 mN/m, illetve 10 mN/m értékeknél), melynek eredményét a 9. ábra mutatja. Ahogy látható,



9. ábra Különböző oldalnyomásokon felvett összegfrekvencia-keltési színeképek DPPC monorétegről (fekete: 30 mN/m, piros: 20 mN/m, kék: 10 mN/m)

nagyobb oldalnyomásnál a rezgések intenzitása is nagyobb. Ez abból adódik, hogy az oldalnyomás növekedésével nagyobb az egy adott felületre jutó molekulák száma, így több molekula van a sugarak által megvilágított területen, ami növeli az intenzitást. Ami még látható az ábrán, hogy a legkisebb mért oldalnyomásnál a színekép intenzitása jóval kisebb, mint várhatnánk, ez azzal magyarázható, hogy a molekulák már annyira távol kerültek egymástól, hogy a rendezettségük megváltozott, kondenzált folyadékállapotból expandált folyadékállapotba kerültek, ezáltal jóval kisebb jelet adva. A színeképek által kirajzolt csúcsok hullámszámának ismeretében meghatározhatjuk a DPPC-ben szereplő különböző molekulacsoportok rezgéseit, melyet be is jelöltünk az ábrán.



**10. ábra** Ugyanazon az oldalnyomáson felvett DPPC-d62 (baloldali) és DPPC (jobboldali) monorétegek színeképek összehasonlítása

### Monorétegek SFG színeképek összehasonlítása

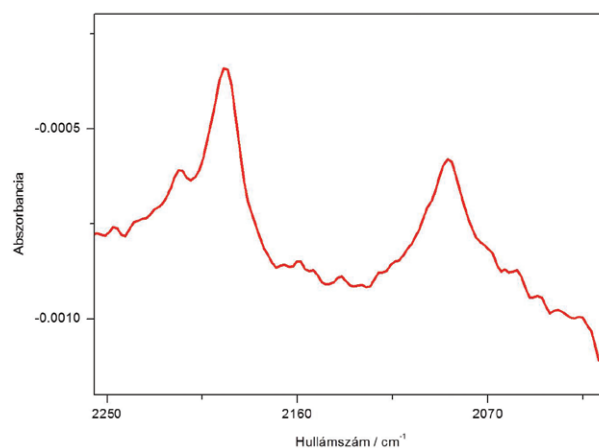
A következőkben két monoréteget készítettünk 30 mN/m oldalnyomás mellett, és felvettük ezek SFG színeképét: egy alkil láncban deutériummal helyettesített DPPC-d62 monoréteget és egy ugyanazon az oldalnyomáson felvett DPPC filmréteget. Amint a 10. ábra mutatja, nagyon különböző a színeképük, a legnagyobb különbség az, hogy a két monoréteg színeképében más-más helyen vannak a nyújtórezgések csúcsai. Ez a DPPC-d62 molekulájában lévő deutériumok hidrogéntől eltérő tömegéből adódik, hisz a deutérium a hidrogén azon stabil izotópja, mely tartalmaz egy neutron is, így tömege kétszer akkora, mint a hidrogéné. Ez okozza

azt, hogy a  $-CD_3$  nyújtórezgések alacsonyabb rezgési frekvencián detektálódnak, mint a  $-CH_3$  nyújtórezgések.

### Infravörös színeképek

Az infravörös spektroszkópia azon az elven működik, hogy a mintánkat infravörös sugárral átvilágítjuk, ebből a minta bizonyos frekvenciájú sugarat elnyel, ami azt eredményezi, hogy a mintában található atomokat nagyobb amplitúdójú molekulán belüli rezgésre készíti. Ennek a rezgésnek a frekvenciája megegyezik az elnyelt sugár frekvenciájával, és a színeképben ezen a frekvencián jelenik meg egy csúcs. A csúcsok alapján a mintában található funkciós csoportok beazonosíthatóak, hiszen az adott molekularezgések, vagyis a csúcsok a molekulára, illetve a benne lévő funkciós csoportokra jellemzőek.

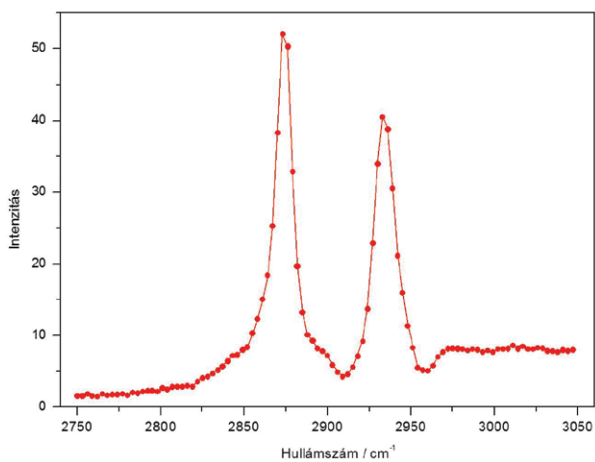
Mi a DPPC-d62 oldatunkból készítettünk monoréteget egy kalcium-fluorid lemezre (mint hordozóra) Langmuir-Blodgett eljárással. Ezt vizsgáltuk az IR-mikroszkóppal. A színeképen (11. ábra) szépen felismerhetők DPPC-d62-ben található metilén nyújtórezgések, így leellenőriztük a monoréteg felvitelének sikerességét.



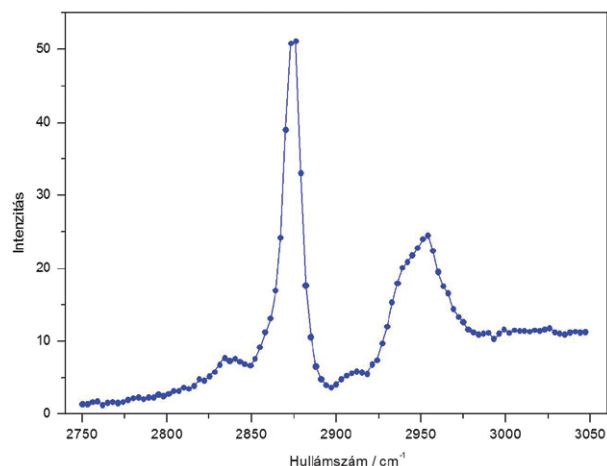
**11. ábra** DPPC-d62 monoréteg infravörös-mikroszkóppal felvett színeképe

### Szilárd hordozós kettősrétegek színeképek összehasonlítása

Kétféle kettősréteget készítettünk, mindkettőhöz DPPC-d62 oldatot és DSPC oldatot használtunk. Az



**12.a. ábra** Szilárdhordozós kettősréteg SFG-színképe (a hordozóhoz közel a DPPC-d62 réteg van)



**12.b. ábra** Szilárdhordozós kettősréteg SFG-színképe (a hordozóhoz közel a DSPC réteg van)

első kettősréteg készítésekor a szilárd hordozóra először Langmuir-Blodgett eljárással DPPC-d62 monoréteget vittünk fel, utána Langmuir-Schaefer eljárással felvittük erre a DSPC monoréteget. A második kettősréteg elkészítésekor ugyanígy jártunk el, csak először a DSPC monoréteget vittük fel a hordozóra.

Ezeket az elkészített kettősrétegeket összefrekvenciakeltési-spektroszkópiával vizsgáltuk meg, a 12. ábrán láthatóak a színképeik. A színképeket a 2800-3000 $\text{cm}^{-1}$  tartományban vettük fel, ezen a tartományon a DSPC nyújtórezgései látszódnak, a DPPC-d62-ben lévő nyújtórezgések nem, hiszen ezek az 11. ábrán látható módon alacsonyabb hullámszámú tartományban észlelhetőek. Az első esetben (12.a ábra) tehát a hordozótól távol eső réteget vizsgáltuk, a második esetben (12.b ábra) pedig a hordozóhoz közel eső réteget. Ennek következtében a két különböző kettősrétegben detektált DSPC molekuláknak más az orientációja, ami meg is látszik a két – egyébként eléggé hasonló – színkép különbségein.

### Összefoglalás, köszönet

A tábor során sikeresen vizsgáltunk DSPC-, DPPC-, illetve DPPC-d62-ből készített sejtmembrán modelleket. Langmuir-mérleg segítségével monorétegeket állítottunk elő, melyeknek felvettük az izotermáit, illetve megvizsgáltuk őket összefrekvenciakeltési-spektrométerrel és infravörös mikroszkóppal is, majd készítettünk kettősrétegeket is, melyeknek összehasonlítottuk az összefrekvencia-keltési színképeit. Közelebbről megismertük ezt az igen érdekes határterületet, bepillantást nyerhettünk a felületkémia tudományába, illetve megismerhettünk különböző érdekes mérőműszereket, mindezt egy nagyon kellemes társaságban eltöltött hét alatt. Ezt a csodálatos élményt Keszthelyi Tamás és Mihályi Judith fáradságot nem ismerő munkájának köszönhetjük, akik az egész hét során támogattak és segítettek nekünk. Külön köszönjük Lendvayné Győrik Gabriellának, hogy lebonyolította a délutáni programokat és megszervezte a tábort. Illetve köszönjük mindazoknak, akik nélkül nem jöhetett volna létre ez a fantasztikus tábor.

