



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Fizikai Kémia Tanszék

Urbán Edit

Salmonella minnesota R595

lipopoliszacharid hatása modellmembrán rendszerekre

Ph.D. értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Bóta Attila (egyetemi docens)

BME Fizikai Kémia Tanszék

Konzulens: Dr. Kocsis Béla (egyetemi docens)

Pécsi Tudományegyetem, Orvosi

Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet

2006

1. Célkitűzés

A Gram-negatív baktériumok sejtfelszínén található endotoxinok (más néven lipopoliszacharidok (LPS)) emberi szervezetre gyakorolt káros hatása már régóta ismert. Az endotoxinok lipid-A összetevője a molekula legállandóbb szerkezetű része, kórokozó képességének végső oka. Az endotoxinok csak akkor fejtik ki hatásukat, ha elszabadulnak a baktérium felszínéről. Ez akkor következhet be, ha a baktérium elpusztul vagy szaporodásba kezd. Egy Gram-negatív baktérium a gazdaszervezet valamelyik szövetébe vagy a vérkeringésbe kerülve endotoxint szabadít fel, ami kölcsönhatásba kerül a gazdaszervezet sejtjeivel, ezáltal életveszélyes sokkot, akár halált is okozhat.

E toxikus molekulák a szervezetben bonyolult hatásmechanizmuson keresztül specifikus módon aktiválják az immunrendszert vagy nem specifikus módon a sejtek membránjával kölcsönhatásba lépve, majd abba beépülve fejtik ki káros hatásukat. Tehát a membránban okozott szerkezeti változások ismerete elengedhetetlen, a fiziológiai folyamatokat is érintő, összetett hatások pontos megismeréséhez.

Munkám során a *Salmonella minnesota R595* lipopoliszacharid közvetlen membránt károsító hatását a

különböző foszfolipid összetételű, humán és bakteriális membránok összetételét megközelítő liposzómákon, mint modellmembrán rendszereken vizsgáltam. (A mellékelt ábrán a liposzóma szerkezete látható.) Ezt az LPS molekulát azért választottam, mivel biológiai mintából történő előállítása jól reprodukálható. Valamint a Salmonella törzsből kivont LPS-t nemzetközi standardként alkalmazzák, ezért molekuláris felépítése és az ebből adódó tulajdonságai jól ismertek.



Ábra: Egy idealizált liposzóma centroszimmetrikus szerkezete (felső ábra) és elektronmikroszkópos felvétele (alsó ábra)

Az élő sejtek membránjának foszfolipid összetétele igen változatos képet mutat. A sejtek - eddig ismeretlen módon - képesek szabályozni a membránjukban jelenlévő kettősréteget képző és nem kettősréteget képző lipidek arányát. Ennek komoly fiziológiai jelentősége van, mivel a biológiai membránban a nem kettősréteget képző lipidek lokálisan felhalmozódva szerkezetileg metastabil doméneket hozhatnak

létre. Ezek a „metastabil hibahelyek” a felelősek a specifikus transzport mechanizmusok, valamint a fúziós folyamatok ellátásáért.

A célkitűzésem az volt, hogy egy jól karakterizált lipopoliszacharidot különböző modellmembrán rendszerekhez adva megvizsgáljam, hogy ezen összetett kémiai karakterű molekula az eltérő lipid összetételű rendszerekben miként fejti ki hatását.

Humán sejtek membránját dipalmitoil-foszfatidil-kolinból (DPPC) felépülő liposzómákkal modelleztem. Bakteriális membránként három különböző összetételű liposzóma rendszert vizsgáltam. Mindhárom rendszer 80 mól % dipalmitoil-foszfatidil-etanolamint (DPPE) és 20 mól % „kettősréteg” (dipalmitoil-foszfatidil-glicerol (DPPG)) illetve „nem kettősréteg” lipidet (dipalmitoil-foszfatidsav (DPPA), valamint dipalmitoil-glicerol (DPG)) tartalmaz. Tehát a kettősrétegű modellrendszerbe adagolt nem kettősréteget képző lipidek a valós rendszerekre jellemző sajátsággal rendelkeznek.

Lipopoliszacharid hatására a modellmembrán rendszerekben olyan változások következnek be, melyek az összetett reális membránok változásaira is visszavezethetők. Így a megcélzott vizsgálatok az LPS molekula közvetlen

membránt károsító hatásának fiziko-kémiai oldalról történő megértését segítik.

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A tiszta liposzóma, illetve az endotoxint is tartalmazó rendszerek tanulmányozását, azok különböző jellemzőit feltáró és összehasonlító vizsgálati módszerekkel végeztem el.

A *differentiál pásztaó kalorigetria*s (DSC) módszerek a fázisátmenetek entalpiaváltozásának és hőmérsékletének mérésére használhatóak.

A *kisszögű röntgen diffrakció*s vizsgálatok a rétegszerkezet paramétereinek meghatározására szolgálnak, valamint a kiépülő 3-dimenziós struktúra azonosítását is lehetővé teszik. A nagyszögű szórás tartományban felvett diffrakció képből a molekulák kettősrétegben való elhelyezkedése állapítható meg.

A *fagyasztaórt* minták elektronmikroszkópos felvétele szemléletes képet ad a kialakult szerkezetéről (1. ábra). Emellett az az előnye is megvan, hogy egyidejűleg mind a makro-, mind a mikrostruktúrák megfigyelését is lehetővé teszi.

3. Új tudományos eredmények (Ph.D. tézispontok)

1. A *Salmonella minnesota* R595 mutáns baktérium törzsből előállított lipopoliszacharid (LPS) a hidratált DPPC(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidilkolin)/víz modellmembrán rendszerbe beépítve kis koncentrációban (ez a koncentráció határ közelítőleg 1/10 LPS/DPPC molarányig tart) a liposzómák jellemző szabályos rétegszerkezetét megbontja, és a tiszta DPPC/víz rendszert jellemző, gél és hullámos gél fázisok közötti előátmenetet megszünteti, míg a hullámos gél és folyadék-kristályos fázisok közötti előátmenetet, az ún. láncolvadást csak kis mértékben perturbálja. Az LPS nagy koncentrációjánál (1/1 LPS/DPPC) összetett szerkezeti formák alakulnak ki; az LPS alapján indukált köbös és a foszfolipid molekulák által preferált lamelláris fázisok keveréke. Nagy LPS koncentrációnál a rendszer termostrop sajátságai lényegesen megváltoznak: az alacsony (26°C, a tiszta rendszer gél állapotának megfelelő) és a magas (45°C, a tiszta rendszer folyadék-kristályos állapotának megfelelő) hőmérsékleti állapotok entalpiakülönbsége végtelenen lecsökken, a fázisátmenet gyenge elsőrendű folyamattá válik és ezzel

párhuzamosan a két karakterisztikus hőmérsékleten kialakult szerkezetek hasonlóvá válnak.

2. Megállapítottam, hogy az LPS a hidratált DPPE(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfatidiletanolamin)-DPPG(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfatidilglicerol)/víz rendszerben 4/1 DPPE/DPPG mólarány mellett fáziszeeparációt okoz. A szeeparációs jelenség 1/10 LPS/lipid(DPPE-DPPG) mólarányban kifejezett koncentrációhatárig lép fel. A fáziszeeparáció során két különböző összetételű és szerkezetű domén alakul ki, melyek fázisátalakulása elkülönül, azok jellemző hőmérséklete maximálisan 5°C-al különbözik. Az alacsonyabb fázisátmeneti hőmérsékletű domének DPPE-ben szegényebbek és lamelláris szerkezettel bírnak, még a magasabb fázisátmeneti hőmérsékletet mutató domének DPPE/DPPG aránya magasabb, mint 4/1 és abban köbös szerkezet alakul ki.

3. Az LPS 1/1 LPS/DPPE-DPPG mólarányú jelenléte a rendszer egészére kiterjedő köbös szerkezetet indukál. A köbös szerkezet kialakulását a molekulák geometriai alakjával magyarázom. A pakolódást elsősorban az LPS molekulák kónikus alakja határozza meg, ami a DPPE,

DPPG kettősréteg lipidek hatását elnyomja. A két konkuráló hatás következménye, hogy a köbös fázis formája nem kifejezett, és ezért tércsoportja nem azonosítható.

4. A hidratált DPPE-DPPA(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfatidsav)/víz (4/1 DPPE/DPPA mólarányú) rendszerben az LPS megjelenése a tiszta lipid rendszer gél fázisának hőmérséklettartományában köbös fázist indukál. Az LPS lipidre vonatkoztatott 1/10 mólaránya a köbös fázis lokális, míg az 1/1 mólaránya a rendszer egészére kiterjedő megjelenését okozza. A köbös fázis egyértelműen a Q²²⁴-es tércsoporttal azonosítható. A köbös fázis pregnáns megjelenését az LPS és a kísérő DPPA nem-kettősréteg lipidek hasonló, kónikus alakja magyarázza.

5. A hidratált 8/2 DPPE/DPG(1,2-dipalmitoil-sn-glicerol) mólarányú keveréke sajátos fázisátmeneti tulajdonságot mutat; gél állapotból a láncolvadási folyamaton keresztül köbös és inverz hexagonális struktúrák keverékévé alakul. A különös fázisátmeneti sajátosságot a lipidmolekulák láncolvadásánál fellépő, hengeres formából a kónikus formává való alakváltozásával magyarázom.

6. Gél fázisban az LPS relatíve kis koncentrációja (1/100 LPS/lipid(DPPE-DPG)) a hidratált DPPE-DPG/víz rendszerben szerkezetjavító hatást okoz, ami abban nyilvánul meg, hogy az alaprendszer rétegszerkezete szabályosabb formát ölt. Az LPS szerkezetformáló hatása csak annak magasabb koncentrációjánál jelentkezik; 1/10 LPS/lipid mólaránynál a rétegszerkezet leépülését okozza, az 1/1-es mólaránynál az LPS által indukált köbös fázis jelenik meg. A fázisátmeneti hőmérséklet felett is az LPS csak nagyobb mólarányban alakítja át az alaprendszer szerkezetét. Az LPS koncentrációjának függvényében az alaprendszer összetett köbös-hexagonális fázisösszetételét megváltoztatja, először a köbös fázis tűnik el, majd a hexagonális fázis alakul át összetett amorf szerkezeti formába.

7. A DPPE alapú bakteriális modellmembránok a láncolvadási hőmérséklete fölött, nagy LPS mólaránynál (1/1 LPS/lipid) a kísérő lipidek fajtájától (DPPG, DPPA, DPG) függetlenül egységesen összetett, amorf szerkezetet okoz. A hasonló szerkezeti kép kialakulásának oka a domináns LPS molekula karaktere. Az összetett struktúrákban gyengén korrelált réteges és köbös formák vannak jelen. A szerkezet

amorf jellege az alkotó molekulák megnövekedett mobilitásának következménye.

4. Közlemények

1. Urbán E., Bóta A., Kocsis B.: Effect of *Salmonella minnesota* R595 LPS on the dipalmitoylphosphatidylethanolamine(DPPE)-dipalmitoylglycerol (DPG)-water model membrane system, Chem. Phys. Lipids (in press,2006).
2. Urbán E., Bóta A., Kocsis B.: Non-bilayer formation in the DPPE-DPPG vesicle system induced by deep rough mutant of *Salmonella minnesota* R595 lipopolysaccharide, J. of Colloids & Surfaces B 48 (2006) 106-111.
3. Urbán E., Bóta A., Kocsis B., Lohner K.: Distortion of the lamellar arrangement of phospholipids by deep rough mutant lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* (R595), J. Therm. Anal. Cal. 82 (2005) 463-469.
4. Urbán E., Bóta A., Klumpp E., Csiszár Á.: Vesicle system for mimicking of effects of toxic 2,4-dichlorophenol on cell-membranes, J. of Colloids & Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 230 (2004) 201-206.
5. Urbán E., Bóta A.: DPPE (dipalmitoil-foszfátidil-etanolamin)/víz alapú liposzómák előállítása és szerkezetének tanulmányozása, Olaj Szappan Kozmetika 52. évf. (2003) I.: 6-10.