



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

Antibiotikumok hatása biomimetikus modellmembránokra

Tézisfüzet

OSZLÁNCZI ÁGNES

TÉMAVEZETŐ:
DR. BÓTA ATTILA

KONZULENSEK:
DR. KOCSIS BÉLA

ÉS

DR. ERWIN KLUMPP

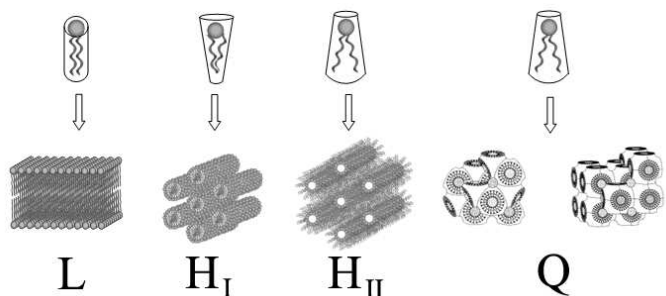
FIZIKAI KÉMIA ÉS ANYAGTUDOMÁNYI TANSZÉK
BUDAPEST
2009

1. Bevezetés és célkitűzések

Minden élő sejtet citoplazma membrán határol, melynek alapvázát a közel gömbháj alakú lipid kettősréteg adja. A membránok alapvető tulajdonságait, stabilitását és működését a membránokat alkotó lipid, fehérje és szénhidrát molekulák és a közöttük lévő kölcsönhatások határozzák meg.

A Gram-negatív baktériumok külső borítása a belső citoplazma membránból, a sejtfalból, és egy különleges struktúrából, a külső membránból áll. A belső és a külső membrán is lipid kettősréteg, de mind kémiai összetételükben, mind pedig szerepükben eltérnek egymástól. A külső membrán lipid összetétele aszimmetrikus, külső rétegében a lipid komponensek közül csak a lipid-A molekula található meg. A külső membrán fehérje összetétele egyszerűbb, mint a belső membráné. A külső membrán külső lipid rétegében helyezkednek el a hőstabil, sejthez kötött, hatásuk miatt endotoxinként is ismert lipopoliszacharid molekulák.

Az összetett biológiai membránok fiziko-kémiai tulajdonságainak megismerésében alapvető szerepet játszanak a lipid/víz alapú modellmembrán rendszerek. A lipid/víz rendszerek keveredési tulajdonságait és az oldatban spontán kialakuló formák jellegét döntően a lipid molekulák alakja és azok fejcsoportjának természete határozza meg (1. ábra).

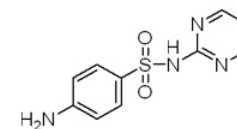


1. ábra: Lipid polimorfizmus: kettősréteg és nem kettősréteg lipidek által kialakított szerkezeti formák.

Bár a membránok elválasztó szerepét csak a lipidek réteges szerkezetű formája képes biztosítani, számos bizonyíték mutat arra, hogy a kettősréteg lipidek mellett, nem kettősréteg lipidek is jelen vannak. A membrán rendszerek lipid összetétele a réteges és a nem réteges szerkezet közötti fázisátmenet tartományába esik, mellyel finoman szabályozható membránmechanizmusok jönnek létre.

Különböző idegen molekulák a finom működési mechanizmusokat megzavarhatják, és toxikus hatást válthatnak ki az élő szervezetekben. Munkánk során néhány gyakorlati szempontból jelentős antimikrobiális anyag hatását vizsgáltuk, és mivel a biológiai membránok lipid összetétele nagy eltéréseket mutat, az idegen molekulák hatásait a lipid összetétel függvényében igyekeztünk feltárni. A bakteriális és

humán membránok lipid kettősrétegét modellező lipid/víz rendszerekre kifejtett fiziko-kémiai hatások tanulmányozásához a szulfadiazint és néhány aminoglikozidot választottuk ki.

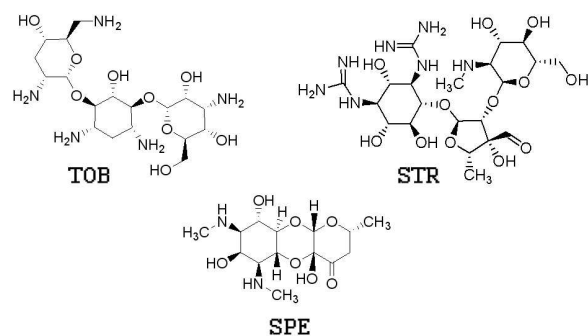


2. ábra: A szulfadiazin kémiai szerkezete.

A szulfadiazin egy szintetikus antimikrobiális hatóanyag (2. ábra), mely számos baktériummal szemben hatásos. A humán gyógyászatban már ritkábban, de az állattartásban még az utóbbi években is széles körben használt takarmányadalék. Bár az Európai Unióban az antibiotikumok adalékanyagként történő alkalmazását már betiltották, ez a hatóanyag számos társával együtt nagy mennyiségben került ki a környezetbe súlyos károkat okozva a talajok és vizek élőlényeiben, köztük ezen élőhelyek mikroszkopikus lakóiban is.

A klinikai gyakorlatban az aminoglikozidok széles körben elterjedt antibiotikumok az aerob Gram-negatív fertőzések kezelésére. Az aminoglikozidok alkalmazása során a mellékhatások mellett, a kórokozó baktériumok rezisztenciája

is problémát okoz. A lipid-antibiotikum kölcsönhatások felderítése céljából, pontosabban az antibiotikumok sejtbe jutásának, hatásmechanizmusának, és toxikus hatásának megismerésére széles körben modellmembránokon történő vizsgálatokat végeznek.



3. ábra: A vizsgált aminoglikozidok kémiai szerkezete.

Vizsgálatainkhoz az aminoglikozid csoport három tagját választottuk ki (3. ábra). A *Pseudomonas* törzsek ellen hatásos tobramicin (TOB) a humán gyógyászatban gyakran használt tipikus aminoglikozid. A sztreptomycin (STR) az egyik legtoxikusabb aminoglikozid, és mára szinte teljesen kiszorult a terápiás drogok közül. A szpektinomycin, (SPE) bár hasonló hatásmechanizmusa miatt az aminoglikozidok közé sorolják, valójában egy eltérő kémiai szerkezetű molekula.

Az aminoglikozidok hibásan átvitt fehérjéken keresztül közvetett módon rombolják a bakteriális membránokat. Ezért a további kutatások során a lipid/víz alapú rendszerekben megjelenő változásokat összetett modellrendszerekben kívántuk utolérni. Kezeletlen vagy előzetesen antibiotikummal kezelt, baktériumból kivont membrán fehérjéket és lipopoliszacharidokat kevertünk a szintetikus foszfolipid rendszerekhez. Ezek a rendszerek a biológiai és a modellmembránok jellemzőit is mutatják.

2. Kísérletek

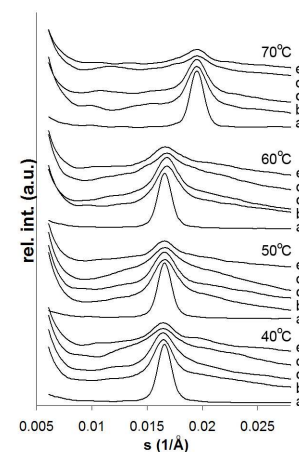
A humán sejtmembránok modellezésére teljesen hidratált 1,2-dipalmitoil-foszfátidil-kolin (DPPC)/víz rendszert, a bakteriális citoplazma membrán modellezésére pedig, különböző lipid arányok mellett, teljesen hidratált 1,2-dipalmitoil-foszfátidil-etanolamin (DPPE) – 1,2-dipalmitoil-foszfátidil-glicerol (DPPG)/víz rendszereket használtuk. Az alkalmazott lipid mólarányokat a rendszer fiziko-kémiai tulajdonságai és biológiai relevanciája alapján választottuk ki.

A lipidek fázisátmeneti hőmérsékletét és a hozzá tartozó entalpiaváltozást differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) segítségével határoztuk meg. A kisszögű röntgenszórásos mérések (SAXS) a nagyobb távolsághoz, míg a nagyszögű mérések (WAXS) a kisebb távolságokhoz tartozó szerkezetekről adnak információt. A fagyasztatóréses (FF) elektronmikroszkópia széles mérettartományban direkt vizuális információt ad a mintákban kialakult struktúrákról.

A *Pseudomonas fluorescens* baktérium lipopoliszacharid, illetve belső és külső membránfehérje profiljainak feltárására, valamint a molekulatömegek meghatározására elektroforetikus technikákat alkalmaztunk.

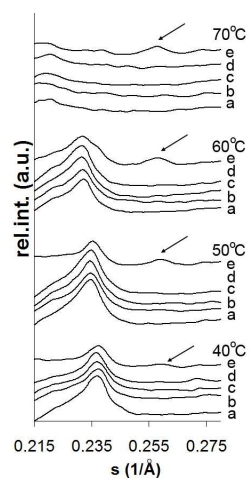
3. Eredmények

A szulfadiazin (SD) jelenléte a bakteriális modellrendszer szabályos rétegszerkezetű formáinak leépüléséhez vezet. A szulfadiazin koncentrációjától függő változások csak a nagy DPPE koncentrációjú rendszer rendezett vezikuláiban (DPPG/DPPE+DPPG=0,05) figyelhetők meg (4. ábra). A rétegek közötti rendezettséggel együtt a rétegek közötti kölcsönhatás is megszűnik, szétcsatolódnak, mely a biológiai rendszerekben a membrán-membrán kapcsolatok megszűnését okozza.



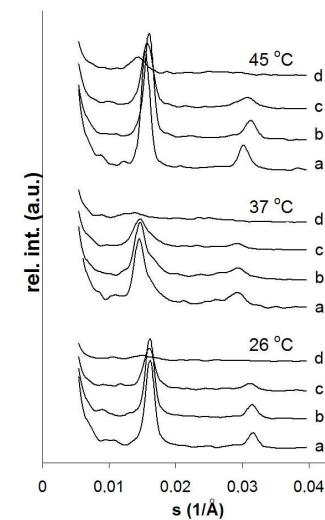
4. ábra: A DPPE-DPPG/víz rendszer kisszögű röntgenszórási (SAXS) görbéinek Bragg csúcsai a szulfadiazin hatására kiszélesednek (gél állapot (40, 50, 60 °C), folyadékkristályos állapot (70 °C), DPPG/DPPE+DPPG=0,05, SD/lipid=0 (a), 10^{-3} (b), 10^{-2} (c), 10^{-1} (d) és 10^0 (e)).

A rétegszerkezet szulfadiazin koncentrációtól függő változása nem jár együtt az alrác perturbálódásával. Gél állapotban a lipidek kettősrétegen belüli pakolódására jellemző diffrakciós csúcs nem tolódik el, a szulfadiazin a fejcsoport és annak a vízréteg felőli régiójában marad, beépülése nem torzítja a szénláncok alrácsát. A hatóanyag 0,1 – 1 SD/lipid molarány tartományban önálló szerkezeti formában, mikrodoménekben különül el, amit a láncpakolódásra jellemző csúcs mellett detektálható további diffrakciós csúcsok jeleznek (5. ábra).



5. ábra: A DPPE-DPPG/víz rendszer nagyszögű röntgenszórási (WAXS) görbéinek változása szulfadiazin hatására (gél állapot (40, 50, 60 °C), folyadékkristályos állapot (70 °C), DPPG/DPPE+DPPG=0,05, SD/lipid=0 (a), 10⁻³ (b), 10⁻² (c), 10⁻¹ (d) és 10⁰ (e)). A nyíllal jelölt csúcs a szulfadiazint nagy koncentrációban tartalmazó mikrodomének képződését mutatja.

A humán sejtek membránját modellező szabályos, sokrétegű DPPC/víz rendszerben az aminoglikozidok a réteges szerkezet periodikus ismétlődését megszüntetik (hasonlóan ahhoz a hatáshoz, amit a szulfadiazin okoz a 0,05 DPPG/DPPE+DPPG rendszerben).

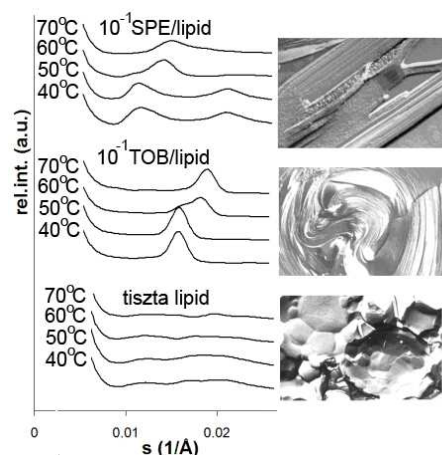


6. ábra: A DPPC/víz rendszer kisszögű röntgenszórási (SAXS) görbéinek változása szpektinomycin hatására (gél (26 °C), hullámos gél (37 °C) és folyadékkristályos (45 °C) állapotok, SPE/lipid=0 (a), 10⁻² (b), 10⁻¹ (c), 10⁰ (d)).

Az eltérő kémiai szerkezetű aminoglikozidok a modellrendszerekben is eltérő mértékű változásokat okoznak. Az aminoglikozidok a DPPC/víz rendszer szerkezetében

különböző mértékű korreláció-csökkenést okoznak. A legnagyobb mértékű szétcsatolódási effektust a szpektinomycin idézi elő (6. ábra).

Az aminoglikozidok a DPPE-DPPG rendszerben a szulfadiazin hatásával ellentétes változást okoznak, a lipid alaprendszer rendezetlen rétegszerkezetét periodikus formává alakítják. A hatás különösen a 0,2 DPPG/DPPE+DPPG móltörtű rendszerben szembetűnő.

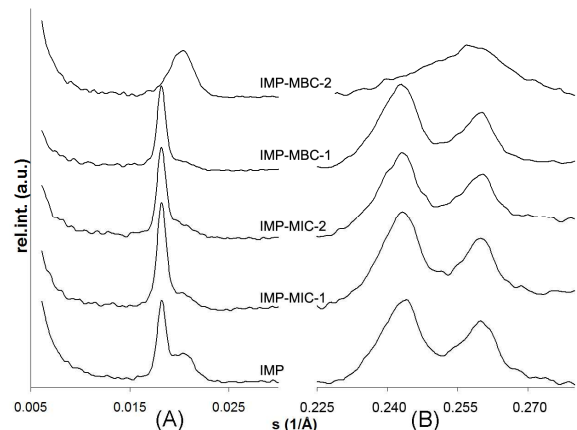


7. ábra: DPPE-DPPG/víz rendszer kisszögű röntgenszórási (SAXS) görbéinek változása és fagyasztatással feltárt morfológiája aminoglikozidok (AG) hatására (DPPG/DPPE+DPPG=0,2, AG/lipid= 10^{-1} , szpektinomycin (SPE), tobramicin (TOB)).

Az alaprendszer tobramicin hatására történő, szabályos

sokréteges, valamint a szpektinomycin hatására bekövetkező, a membránszerkezettől teljesen eltérő, nem réteges formává történő átalakulásait kisszögű szórási görbékkel és fagyasztatással azonosítottuk (7. ábra).

Pseudomonas fluorescens baktériumból, tobramicin kezelés előtt és után preparált membránfehérjék vizsgálata alapján, az aminoglikozid hatására nagy móltömegű, hibás átíródásból keletkezett fehérjéket mutattunk ki. A kezelt és kezeletlen baktérium külső és belső membránjából származó fehérjék elválása nem volt teljes, ezért a fehérjekeverékek különböző modellmembránokhoz történő hozzáadásakor a lipid rendszer típusa és nem a fehérjék származási helye (belső vagy külső membránból preparált) volt a meghatározó. A DPPE-DPPG/víz alapú rendszerben a fehérjék hatására kétféle lipid-pakolódású sziget (a lipidek laterális irányú domén szerveződése, lipidraftok) alakul ki. A legnagyobb mértékű szerkezeti változásokat a drasztikus módon kezelt mintából származó membránfehérjék okozzák (8. ábra). A DPPC/víz rendszer szabályos rétegszerkezete a fehérjék jelenlétében jelentősen leromlik. Alacsonyabb kezelési időnél a szabályos rétegszerkezet teljesen eltűnik, míg a hosszabb kezelése után preparált fehérjék hozzáadásával komplex (amorf jellegű, ezért nem azonosított) szerkezet jelenik meg.



8.ábra A belső membránfehérje (IMP)/DPPE-DPPG/víz rendszerek SAXS (A) és WAXS (B) görbéi (DPPG/DPPE+DPPG=0,05, kezeletlen referencia rendszer (IMP), tobramicinnel kezelt rendszerek: MIC dózis, 1 órás kezelés (IMP-MIC-1), MIC dózis, 2 órás kezelés (IMP-MIC-2), MBC dózis, 1 órás kezelés (IMP-MBC-1), MBC dózis, 2 órás kezelés (IMP-MBC-2)).

P. fluorescens baktériumból nyert S-lipopoliszacharid a teljesen hidratált DPPC/víz modellrendszerben, alacsonyabb koncentrációtartományban a liposzómák szabályos rétegszerkezetének leépülését eredményezi. A nagy lipopoliszacharid molarányoknál – ahol a lipopoliszacharid mint gazdamolekula szerepel – komplex, a hőmérséklettől független szerkezeti formák alakulnak ki, melyek a lipopoliszacharid által indukált nem réteges, a lipidek által preferált réteges és e szerkezetek amorf formáinak keverékei.

4. Tézispontok

1. A teljesen hidratált 1,2-dipalmitoil-foszfátidil-etanolamin (DPPE) – 1,2-dipalmitoil-foszfátidil-glicerol (DPPG)/víz modellrendszerekben a szulfadiazin (SD) jelenléte a szabályos rétegszerkezet megszűnéséhez vezet. A rétegek korrelációjának csökkenése a SD koncentrációjának függvényében csak a nagy DPPE arányánál (DPPG/DPPE+DPPG=0,05) követhető. A leromlott rétegszerkezet összetett morfológiai képpel és domén képződéssel társul. A változások jelentős mértékben függenek a rendszer lipid összetételétől, a DPPE/DPPG aránytól. (1., 2., 3., 6. cikkek)
2. Megállapítottam, hogy a SD lipid kettősrétegbe történő beépülése mennyiségileg limitált: az 1/10 SD/lipid molarány tekinthető határértéknek. Ennél nagyobb SD/lipid koncentrációnál domének alakulnak ki, amit nagyszögű diffrakciós módszerrel igazoltam. (6. cikk)
3. Az aminoglikozidok, különösen a szpektinomycin (SPE) megszünteti a teljesen hidratált 1,2-dipalmitoil-foszfátidil-kolin (DPPC)/víz rendszer szabályos, többréteges szerkezetének korrelációját, amit ún. szétcsatolódási effektus, a kettősrétegek közötti távolságok véletlenszerű megnövekedése kísér. (4. cikk)

4. Az aminoglikozidok jelenléte a DPPE-DPPG/víz modellmembrán rendszer (DPPG/DPPE+DPPG=0,2) szabálytalan, rosszul korrelált rétegszerkezetét periodikus, szabályos formává változtatja (szerkezetépítő hatás). A SPE (SPE/lipid=0,1) a réteges membránszerkezetet hexagonális szerkezeti formává alakítja. (5. cikk)

5. A tobramicin baktériumok fehérjeszintézisére gyakorolt hatását a kezelt baktériumokból kinyert fehérjékből és szintetikus lipidekből felépített modellrendszerben követtem. Kimutattam, hogy a belső membránfehérjékkel preparált DPPE-DPPG/víz alapú rendszer kettősrétegében, laterális irányban kétféle pakolódású domén alakul ki. Röntgenszórással bizonyítottam, hogy a külső membránfehérjékkel preparált DPPC/víz rendszerben a rétegszerkezet szabályossága csökken. (kézirat előkészületben)

6. Alacsony lipopoliszacharid (LPS) koncentrációnál (LPS/lipid= 10^{-3} , 10^{-2}) a *P. fluorescens* baktériumból nyert LPS a hidratált DPPC alapú liposzómák rétegszerkezetének leépülését eredményezi, míg az LPS koncentráció növelésével (LPS/lipid= 10^{-1} , 10^0) hőmérséklettől független, összetett formák alakulnak ki. (kézirat előkészületben)

5. Biológiai relevancia

A vizsgált gyűrűs szerkezetű molekulák vízben és apoláris oldószerekben is rosszul oldódnak. A szerkezeti hasonlóságok ellenére azt tapasztaltuk, hogy a szulfadiazin és a különböző aminoglikozidok eltérő módon léptek kölcsönhatásba a modellmembránokkal. Közös jellemzőjük, hogy a lipid/víz alapú rendszerek szerkezetében csak magasabb hatóanyag/lipid molaránynál okoztak drasztikus változást. Ezek alapján biológiai rendszerekben a szulfadiazin lipid kettősrétegre gyakorolt hatását csak a molekula lokális felhalmozódása esetében várjuk. Az aminoglikozidok modellrendszerekhez való nagy mennyiségben történő adagolása nagyobb biológiai relevanciával bír, mivel ezen antibiotikumok napi egyszeri, nagy mennyiségű adagolása széles körben elterjedt a humán terápiában.

A lipopoliszacharidok káros hatásuk kifejtése közben, első lépésként beépülnek a gazdaszervezet membránjába. Ezért kettősrétegbe való beépülésüket vizsgálva, feltárhatjuk az endotoxin molekulák koncentrációfüggő toxikus hatását. A fehérje/lipid/víz alapú rendszerek tanulmányozásával pedig közelebb juthatunk a komplex, biológiai membránok megértéséhez.

6. Közlemények

Publikációk

1. Oszlánczi, Á.; Bóta, A.; Varga, Z.; Goerigk, G. Effects of the sulfadiazine on the DPPE/DPPG/water vesicles. *Annual Report 2005 of HASYLAB at Deutsches Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg)* **2005 Part I/Environmental Science** 841-842.
2. Oszlánczi, Á.; Novák, C.; Klumpp, E. Effect of sulfadiazine on biological model membranes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2005** 82 457-462. IF: 1.630
3. Oszlánczi, Á.; Bóta, A.; Klumpp, E. Layer formations in the bacteria-membrane mimetic DPPE-DPPG/water system induced by sulfadiazine. *Biophysical Chemistry* **2007** 125 334-340. IF: 2.362
4. Oszlánczi, Á.; Bóta, A.; Czabai, G.; Klumpp, E. Structural and calorimetric studies of the effect of different aminoglycosides on DPPC liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009** 69 116–121. IF: 2.593

5. Oszlánczi, Á.; Bóta, A.; Klumpp, E. Influence of aminoglycoside antibiotics on the thermal behaviour and structural features of DPPE-DPPG model membranes. (2009) Nyomtatás alatt a *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* folyóiratban, IF: 2.593
6. Oszlánczi, Á.; Bóta, A.; Berényi, Sz.; Klumpp, E. Structural and morphological changes in the bacteria-membrane mimetic DPPE-DPPG/water system induced by sulfadiazine. (2009) Beküldve a *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* folyóiratba

Szóbeli előadások

7. Oszlánczi, Á.; Bóta, A.; Kocsis, B. *Biológiai membránok szerkezetvizsgálata* Magyar Biofizikai Társaság Membrán Szekció tudományos ülése, **2003** november; MTA SzBK Klub, Szeged
8. Oszlánczi, Á.; Bóta, A.; Klumpp, E. *Szulfadiazin hatása modellmembránokra* Kari Doktoráns Konferencia, **2004** november; BME, Budapest

9. Bóta, A.; Csiszár, Á.; Oszlanczi, Á.; Urbán, E.; Fetter, G.; Drucker, T.; Varga, Z.; Goerigk, G. *Lyotropic liquid crystalline structures and their characterization (X-ray scattering, calorimetry, freeze-fracture)* Electronic-Liquid Communications, **2007** június; Liquid Crystal Institute, Kent State University, Kent, USA

Poszter előadások

10. Oszlanczi, Á.; Bóta, A.; Szegedi, K.; Urbán, E.; Klumpp, E. *Effects of sulfadiazine on biological model membranes* Interfaces Against Pollution Conference, **2004** május; Forschungszentrum, Jülich, Germany

11. Oszlanczi, Á.; Bóta, A.; Klumpp, E. *Effects of sulfadiazine on biological model membranes* International Conference on Physiological Biophysics, **2004** november; Shanghai, China

12. Oszlanczi, Á.; Bóta, A.; Klumpp, E. *Effects of sulfadiazine on biological model membranes* 19th Conference of the European Colloid and Interface Society, **2005** szeptember; Geilo, Norway

Egyéb közlemények

13. Oszlanczi, Á.; Somfai, B. *Kémiailag módosított faminták felületének jellemzése* – szóbeli előadás, II. helyezés a BME, Tudományos Diákköri Konferencia, Vegyészmérnöki Kar, Fizikai Kémia Szekciójában, **2001** november; BME, Budapest

14. Oszlanczi, Á.; Somfai, B. *Kémiailag módosított faminták felületének jellemzése* – szóbeli előadás, ELTE XXVI. OTDK Konferencia, Kémiai és Vegyipari Szekció, Kolloidika – makromolekuláris kémia – műanyag kémia tagozat, **2003** április; Budapest

15. Mohammed-Ziegler, I.; Oszlanczi, Á.; Somfai, B.; Hórvölgyi, Z.; Pászli, I.; Holmgren, A.; Forsling, W. Surface tension of natural and surface modified tropical and European wood species. *Journal of Adhesion Science and Technology* **2004** 18(6) 687-713. IF: 0.869

16. Oszlanczi, Á.; Adányi, N. K.; Kiss, A.; Tóth, Sz. B.; Bóka, B.; Kiss, A.; Csutorás, Cs. *Biosensor and HPLC analysis of biogenic amine content in food samples* – poster presentation, XIV. Euroanalysis Conference, **2007** szeptember; Antwerp, Belgium

17. Bóka, B.; Adányiné, N. K.; Szamos, J.; Oszlanczi, Á.; Csutorás, Cs.; Kiss, A. *Az enzimkémia szerepe az élelmiszeranalitikában a putreszcin példáján* (The role of the enzyme chemistry in the food analytics on the example of the putrescine) – poszter, VIII. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, **2007** október; Eger

18. Oszlanczi, Á.; Adányi, N. *Analysis of biogenic amines by comparing biosensor and HPLC-MS methods* – szóbeli előadás, Tudomány Napja Rendezvény, Élelmiszerbiztonsági kutatások az EGERFOOD Regionális Tudásközpontban, Eszterházy Károly Főiskola, Eszköz- és módszerfejlesztések az élelmiszeranalitikában Szekció, **2007** november; Eger