

Zárójelentés a "Toxikus molekulák és nehézfém ionok hatása medellmembrán rendszerekre" T 0430055 számú OTKA kutatásról (2003-2005.)

Bóta Attila BME, Fizikai Kémia Tanszék

Kérés: A kutatás anyagából, a megjelent 12 közleményeken felül 3 kézirat készült el és még 3 van előkészítés alatt. Kérem a minősítést a esőbb megjelent közlemények alapján módosítani.

Bevezetés

A lezárult OTKA (T 43055, 2003-2005.) tevékenységem két korábbi OTKA pályázatomra és egy Német-Magyar Bilaterális Kutatási és Technológia együttműködésre alapult. 1995 óta rendelkezik tanszékünk kisszögű röntgenberendezéssel, ami munkáim fő vizsgálati módszere lett. A „Hibahelyek hatása liotróp rendszerek fázisátmenetének lefolyására” (T 014396, 1994-1996.) a vezikulák (más szóval liposzómák) egyik jellemző rendszerének, a dipalmitoil-foszfátidil-kolinból (DPPC) és vízből álló típusának a szerkezeti sajátosságait tanulmányoztam. A „Kolloidrendszerek szerkezetváltozásainak in situ nyomon követése kisszögű röntgenszórásos módszerekkel” című (T 026332, 1998-1999.) OTKA támogatás lehetőséget adott a röntgenvizsgálatok mérési módszerének kibővítésére más technikákkal történő kombinálásra. A TÉT együttműködés (TÉT, témavezető: Bóta A., 1999-2002) során indult el a toxikus halogénezett fenolok sejtmembránra kifejtett hatásának liposzómákon, mint modellrendszereken történő vizsgálata.

A kutatási munka során vizsgált rendszerek:

2,4-diklórfenol, 2,4-dibrómfenol, szulfadiazin, sztreptomycin, tobramicin, spektinomycin, a *Salmonella minnesota* Re 595 mutáns baktériumtörzsből előállított lipopoliszacharid (endotoxin), a réz (II), a cink (II) és a kadmium (II) ionok, mint toxikus hatású molekulák illetve ionok a DPPC, DPPE, DPPE-DPPG, DPPE-DPG, DPPE-DPPA lipidalapú liposzómákban, valamint a Synperonic(A7)- víz rendszer.

Felhasznált módszerek: kisszögű röntgenszórás (SAXS), nagyszögű röntgenszórás (WAXS), anomális kisszögű röntgenszórás (ASAXS), kalorimetria (DSC), fagyasztva törés és elektronmikroszkópos vizsgálat (TM) valamint kvantumkémiai, molekuladinamika és szóráselméleti számítások.

Az eredmények ismertetése előtt, a bíráló munkájának megkönnyítése érdekében, röviden összefoglalom a vizsgált rendszerek tulajdonságait.

A biológiai membránok általános szerkezeti sajátossága a lipid molekulák önszerveződésekként kialakult kettősréteg, mely sok más komponenssel is kiegészül. Összességében a biomembránok igen összetett, nagyszámú paraméterrel rendelkező rendszerek. A nagyszámú paraméter egyidejű megfigyelése és hatásainak figyelembe vétele nem lehetséges, de „modell” rendszerek vizsgálatával következtethetünk a valós membrán kettősrétegének tulajdonságaira, az abban lejároló folyamatokra. A leginkább vizsgált modellmembrán rendszerek szintetikus lipidekből és vízből állnak. Az élő szervezet sejtmembránjait modellezhetjük liposzómákkal, mivel a liposzóma alapegységének, a kettős lipidréteg szerkezete azonos a biomembránok strukturális felépítésével. A liposzómák olyan gömbszimmetrikus alakzatok, amelyekben a víz és a foszfolipid kettősréteg váltakozó héjrendszert építenek ki. A multilamellás liposzómákban a rétegek száma 20-500 között változhat. A lipidek elegyedési tulajdonsága, vagy ennek ellenkezője visszavezethető a fejcsoportok természetére és a lipidek molekuláris geometriájára. Geometriailag hengeres alakúak azok a telített zsírsavlánccal rendelkező lipidek, melyek poláris fejcsoportjának keresztmetszeti területe megegyezik az apoláris szénhidrogén lánc régió keresztmetszeti

területével. Ezek az ún. „kettősréteg lipidek”, azaz alakjukból következően vizes közegben spontán módon kettős rétegű, lamelláris szerkezetet formálnak. Ezzel ellentétben azok a lipidek, melyeknek kisebb a fejcsoport átmérője, mint a zsírsavlánc régióé, geometriailag egy csonka kúphoz hasonlítanak. Ezek a lipidek, lamelláris helyett nagyobb görbületű - például inverz hexagonális (H_{II}) vagy köbös- lipid struktúrát vesznek fel. Ebből a tulajdonságból adódóan „nem kettősréteg” lipideknek is nevezik őket. Az ilyen csonka kúp geometriájú lipidek vízben, annak fiziko-kémiai tulajdonságától illetve koncentrációjától függően, alakíthatnak ki inverz struktúrákat. Amennyiben a lipidek fejcsoport átmérője nagyobb, mint a szénlánc régióé, akkor poláris oldószerben diszpergálva ezen molekulákat, hexagonális (H_I) struktúra kialakulása várható. A foszfolipidek fizikai karakterizációja, azaz a kialakult mikrostruktúra szerkezetének ismerete nagyon fontos ahhoz, hogy pontos következtetéseket vonhassunk le a valódi membránokban is kialakuló különböző szerkezetű mikrodomének funkciójával kapcsolatban, és tágabb értelemben a valós membránok e tulajdonságán alapuló működési mechanizmusát illetően.

A legtöbb biológiai membrán precízen úgy szabályozza a foszfolipid összetételét, azaz a „kettősréteg” és „nem kettősréteg” lipidek arányát, hogy az éppen a lamelláris- nem lamelláris fázisátmenet határán legyen. A „nem kettősréteg” molekulák a membrán egyes részein felhalmozódnak és ott megnövelik a lipidrétegek görbületét, így elősegítik a membránban a nem lamelláris forma kialakulását. A biológiai membránok e tulajdonsága elengedhetetlen a megfelelő működéséhez, mint például a membránfúziós feladatok tökéletes biztosításához vagy egyes membránhoz kötött enzimek aktivitásának befolyásolásához.

Bizonyos anyagok, idegen (általában a sejt számára mérgező) molekulák biológiai membránnal, így modellmembránnal történő kölcsönhatása is igen különböző lehet, attól függően, hogy milyen struktúrájú, méretű és töltésű a membránt alkotó lipidek poláris fejcsoportja. Ezek a tulajdonságok fontosak a membrán 2-dimenziós felépítésében és erősen befolyásolják a kölcsönhatások módját és erősségét. A biológiai membránokat alkotó molekulák (lipidek, fehérjék stb.) laterális irányban nem egyenletesen oszlanak el, hanem szigeteket képezhetnek. Ezt a tulajdonságot fázis szeparációnak nevezik az irodalomban, mely bizonyos körülmények között modell membránok vizsgálatakor is tapasztalható. A fázis szeparációnak nagy biológiai jelentősége van a fiziológiás folyamatokban. A szeparáció során a membránban metastabil domének képződnek, melyek specifikus transzport és fúziós folyamatokért felelősek. A domének kiterjedése és alakja egyaránt befolyásolja a membrán tulajdonságait, vízáteresztő képességét, a membrán potenciált, a lipidek és fehérjék laterális irányú diffúzióját.

A megfigyelt modellrendszerünk – ami lipid adott fölös mennyiségű vízben vagy pufferben történő diszpergálásával készült – liotróp folyadékkristályként viselkedik. Ez egy olyan lipid/víz rendszer, amely a hőmérséklet és az összetétel függvényében jellegzetes szerkezeti tulajdonságokat mutat. Ezeket a sajátságokat mutató rendszereket liotróp folyadékkristályként említik az irodalomban. Az ilyen rendszerekre jellemző, hogy a hőmérséklet mellett a koncentráció hatása is jelentős. A létrejövő struktúrák nagymértékben függenek az oldószer molekula- amfipatikus molekula kölcsönhatásoktól.

A vizsgált modellmembrán, az alkotó foszfolipid fajtájától függően, a hőmérséklet függvényében általánosságban négyféle fázisállapotban fordul elő. A kialakult fázisállapotok száma illetve jellege függ a rendszert alkotó foszfolipid, vagy foszfolipid keverék tulajdonságaitól. A fázis elnevezés itt nem a klasszikus értelemben vett fázisra utal, hanem mikrofázisokra, olyan szupermolekuláris képződményekre, amelyeknek a kiterjedése a makroszkópikus részecskék és a molekulák mérettartománya (1-100 nm) közé esik.

Ezen ismeretek birtokában érthetjük meg, hogy miért változik a membránok sajátsága a hőmérséklet függvényében. Ugyanis a különböző struktúrájú kettősrétegek nagyon eltérő mobilitással rendelkeznek. Különböző a lipidmolekulák közötti kölcsönhatás, ami az idegen

molekulák oldhatóságára drámai módon hat, ezen keresztül pedig az idegen molekulákra vonatkozó permeabilitás is változik. Általánosságban a növekvő hőmérséklettel a következő liotrop (és egyben rétegszerű, „layer” = L) fázisai fordulnak elő: kristályos fázis (L_c), gél fázis (L_β), hullámos gél fázis (P_β), folyadékkristályos fázis (L_α). A különböző összetételű és tulajdonságú modellmembránok tanulmányozásánál a lipid összetétel kiválasztása a biológiai relevanciájuk alapján történt. A dipalmitoil-foszfátidil-kolinból (DPPC) készített teljesen hidratált liposzóma rendszert alkalmaztunk humán sejtmembrán modellezésére, mivel ez a foszfolipid valamennyi humán sejt membránjában megtalálható. A Gram-negatív baktériumok külső membránjának modelljeként a két fő komponenséből dipalmitoil-foszfátidil-etanolaminból (DPPE) és dipalmitoil-foszfátidil-glicerolból (DPPG) felépülő liposzómákat használtuk. A bakteriális membrán modellezésére ezen kívül további két biológiailag releváns liposzóma rendszert is megvizsgáltunk. Az egyik rendszer dipalmitoil-foszfátidil-etanolaminból (DPPE) és dipalmitoil-foszfátidsavból (DPPA), a másik dipalmitoil-foszfátidil-etanolamin (DPPE) és a membránban mindig jelenlévő biológiailag nagy jelentőségű dipalmitoil-glicerol (DPG) keverékéből épült fel. Valamennyi DPPE alapú liposzóma rendszer 80 mól % DPPE-t és 20 mól % fent említett lipidet tartalmaz. A kiválasztott 80 mól % DPPE megközelíti az élő rendszerekben is megtalálható PE mennyiséget. Az egyéb membránalkotók mennyiségét egységesen 20 mól %-nak választottuk a különböző összetételű liposzóma rendszerek egyértelmű összehasonlíthatósága érdekében. A DPPE alapú liposzóma rendszerekben - a fent említett DPPC/ víz rendszertől eltérően - a hőmérséklet emelésével nem alakul ki a hullámos gél fázis (P_β). (A hullámos gél fázis hiánya a foszfolipid molekulák eltérő szerkezetéből adódik.)

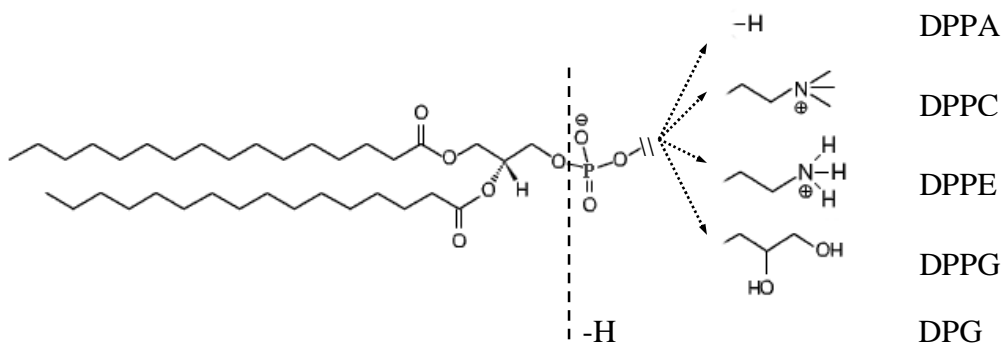
DPG: 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol.

DPPA: negatív töltésű fejcsoportot tartalmazó 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfát.

DPPE: ikerionos fejcsoportot tartalmazó 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidiletanolamin.

DPPC: ikerionos fejcsoportot tartalmazó 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidilkolin.

DPPG: negatív töltésű fejcsoportot tartalmazó 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidilglicerol.



A vizsgálatoknál felhasznált lipidek szerkezeti képlete

A tématerületek eredményei

A 2,4-diklórfenol hatása DPPC/víz valamint DPPE/víz alapú vezikulákra

A klórfenolok elterjedt vegyületek, amelyet a vegyipar „hasznos” intermediereként használ fel, vagy „káros” szennyezőként a természetes vizekben is megjelennek. A klórtartalmú aromás vegyületek káros biológiai hatása jól ismert: koncentrációjának

függvényében toxikózist, vagy karcinogenitást okoz. A sejtekben az oxidatív foszforilációt (ADP – ATP átmenet) gátolja. A legnagyobb mennyiségben előállított klórfenol a 2,4-diklórfenol (továbbiakban DCP-nak jelölve), amit a 2,4-diklórfenoxiacetát gyomirtóhoz használnak fel.

A DPPE/DCP/víz rendszert (10^{-3} – 10^{-1} DCP/DPPE molarány tartományban) tanulmányozva megállapítottuk, hogy a DCP, az egyéb szennyező molekulákhoz hasonlóan, a gél – folyadékkristályos átmenet entalpiaváltozását megnöveli, ami az egymásba alakuló gél és folyadékkristályos fázisok szerkezetében különböző mértékben bekövetkező változásaira vezethető vissza (gél fázisban mind a rétegszerkezet mind az alrács paraméterei megváltoznak, míg a folyadékkristályos fázisban nem detektálható változás).

Urbán Edit, Bóta Attila: DPPE(dipalmitoil-foszfatidil-etanolamin)/víz alapú liposzómák előállítása és szerkezetének tanulmányozása, **Olaj, Szappan, Kosmetika**, 52 (2003) 6-10.

E. Urbán, A. Bóta, E. Klumpp, Á. Csizsár: Vesicle system for mimicking the effects of 2,4-dichlorophenol on cell-membranes, **Colloid and Surfaces, A: Physicochem. and Eng. Asp.** 230 (2003) 201-206.

A DPPC/DCP/víz rendszer szerkezeti és morfológiai sajátosságait írtuk le, széles, $2 \cdot 10^{-2}$ – 1 DCP/DPPC molarányú tartományban. Két lényeges megfigyelést tettünk; Először: a DCP alacsony ($4 \cdot 10^{-2}$ DCP/DPPC molarány felett, de maximum 0.5 DCP/DPPC molarány alatt) megszünteti az előátmenetet, azaz megszűnik a hullámos és a nem hullámos gél fázisok közötti különbség. Ez még nem meglepő, de az igen, hogy a nem hullámos gél fázis alakul át DCP jelenlétében. A „megszűnő” előátmenet során nem csak a két, egymásba alakuló gél, hanem egy harmadik, az „interdigitated” (= „egymásba tolt”, az egymásba tolodott lipidek a kettősréteg helyett egyetlen réteget alkotnak). Ezen jelenségre magyarázatot adtunk. Másodszor: A DCP a gél fázis egy részét 0.1 DCP/DPPC molarány felett, 0.5 molarány felett pedig teljes mértékben interdigitated („egymásba tolt”) fázissá alakítja. A 2,4-diklórfenol ilyen hatása az irodalomban nem volt ismert. Az interdigitated fázis kialakulása a membránfunkciók drasztikus változását okozza, ezért élettani szempontból különös figyelmet érdemel.

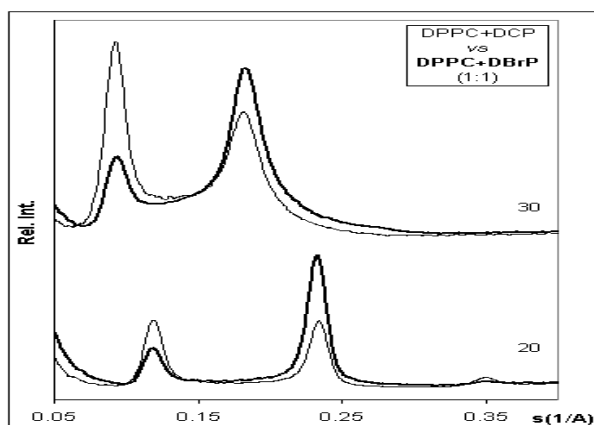
Á. Csizsár, E. Klumpp, A. Bóta, K. Szegedi: Effect of 2,4-dichlorophenol on DPC-water liposomes studied by X-ray and freeze-fracture electron microscopy, **Chemistry and Physics of Lipids** 126 (2003) 155-166.

Á. Csizsár: Effect of 2,4-dichlorophenol on biological model membranes, **Ph.D thesis**, (Nov./2003) (supervisor: A. Bóta, Budapest University of Technology and Economics, Dep. of Phys. Chem., University of Technology Aachen, Inst. of Molecular Biology and Applied Ecology, Germany)

A 2,4-diklórfenol helyettesítése a 2,4-dibrómfenollal

Vizsgálataink fő módszere a kis és nagyszögű röntgenszórás, amelynek alapja a kontraszthatás. Azonnal felmerül a 2,4-diklórfenolnak (a DCP-nek) a 2,4-dibrómfenolra (továbbiakban DBrP) történő cseréje. A csere jogosságát elsődlegesen kalorimetrikus módszerrel (DSC mérésekkel) vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy egy mól lipidre vetítve, a DCP-nek DBrP-re való helyettesítése, a mérési hibahatárokon kívül, nem jár változással (a DCP és DBrP, lipidrendszeren belüli, eltérő elhelyezkedése a különböző kölcsönhatások arányát megváltoztatva a DSC –vel tapasztalható effektusokhoz vezetne). Az alábbiakban bemutatok egy görbét, ami a két halogénszármazék cseréjével elérhető kontraszthatást mutatja:

A kontraszthatást illusztrálom az alábbi ábrán, amelyen a DPPC/DCP/víz, valamint a DPPC/DBrP/víz rendszerek kisszögű görbéi láthatók. A két görbe különbsége jelentős, ami a bróm és a klóratomok eltérő rendszámának, pontosabban elektronszámának a következménye.



A 20 és 30 °C-on mért szórásgörbék egymás fölé vannak tolvá. Az X-tengelyen a szórási szögből képzett szórási változó abszolút értéke van feltüntetve ($s=(2/\lambda) \sin \Theta$, ahol λ a röntgennyaláb hullámhossza, Θ a szórási szög fele). A vékony vonal a DCP, a vastag a DBrP tartalmú rendszer szórását mutatja. Szembetűnő az első és második diffrakciós csúcsok arányának változása a DCP-nek DBrP-re történő cseréjével.

Szegedi, K., Bóta, A, E. Klumpp and Csiszár, Á: Intercalation of halogenated phenols in biological model membranes, Studied by small angle and anomalous small angle X-ray scattering (SAXS, ASAXS), Conf on Interfaces Against Pollution (IAP 2004) 24-27 May 2004. Jülich, Germany (**Poster, Abstract**)

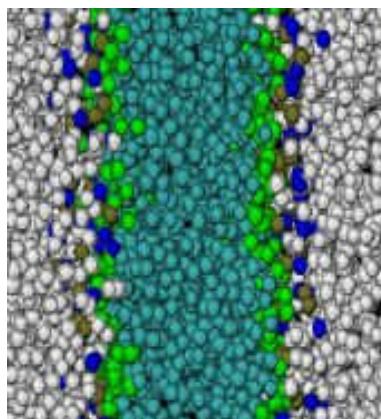
Bóta, A., Varga, Z. and Goerigk G.: Effects of toxic molecules/ions on biological model membranes, 19th ECIS Conference, Sept. 18-23. 2005, Geilo, Norway (**Poster, Abstract**)

A 2,4-DCP és a 2,4-DBrP molekulák összehasonlítása ab initio számítások alapján

A számítások Gaussian03 programcsomaggal készültek a molekuláris szintű elektrosztatikus potenciálok, parciális töltések meghatározása céljából. A számítások MP2 és DFT módszerekkel, az utóbbihoz B3LYP kicserélődési és korrelációs funkcionált használva. Összefoglalva az ab initio számítások eredményeit, kiderült, hogy a klór atomnak bróm atomra történő cseréje csak jelektéktelen változásokat okozhat a kölcsönhatásokban, olyanokat, amelyek a molekuláris szinten már elhanyagolhatók. Tehát a két molekula cseréje megengedhető, a kontraszthatás elérése érdekében. Az eredmények tükrében a molekuladinamikai szimulációkhoz használt a két molekula „durvaszemcsés” modellje megalkotása leegyszerűsödik; az ott alkalmazott közelítések mellett nem kell különbséget tenni a két fenolszármazék között, azokat egy (=azonos) modellel is leírhatók. [4 Zoli TDK, 5 Zoli diplomamunka].

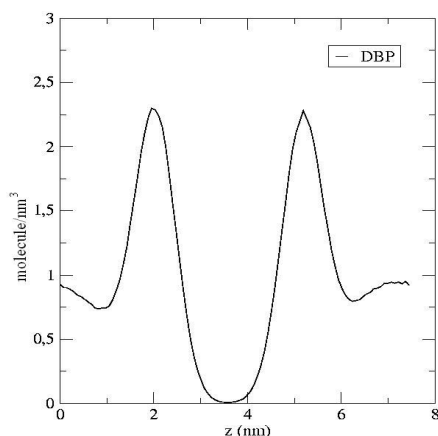
A halogénezett fenolszármazékok elhelyezkedésének molekuladinamikai szimulációja

A szimulációk GROMACS programcsomaggal, a S.J. Marrink által kidolgozott durvaszemcsés (CG) modell felhasználásával készültek. Ez a modell 3 – 5 atomhoz (a hidrogének kivételével), mint kölcsönható egységhez, rendel egy CG gömböt. Egy DPPC molekula 12 gömbből áll, annak két szénláncát kétszer négy db apoláros, glicerin vázát két neutrális foszfatidil illetve kolin részét pedig egy töltött részecske reprezentálja. A modellt megalkotói részletesen tesztelték, amely alapján alkalmasnak bizonyult valódi lipidmolekulák önrendeződésének szimulációjára. A kvantumkémiai számításokra alapozva elkészült a DCP illetve DBrP molekulák durvaszemcsés modellje, ami három gömbből áll; egy apolárosból, egy parciálisan töltöttből és egy (polarizált) neutrálisból. A szimulációs számítások 512 db lipid és 5400 db vízmolekulával és az ehhez 1/10 és 1/1 DCP(DBrP)/lipid arányban adott fenolszármazékkal történtek.



A durvaszemcsés modellel előállított kettősréteg

Az alábbi ábrán a fenolszármazékok kettősrétegen belüli elhelyezkedése látható a szimulációs számítás eredményeként. Mindkét fenolszármazék/lipid mólarány eseteit bemutatjuk, a hozzájuk tartozó lipidek rétegnormális irányú számszerinti gyakoriság egységben. A DCP (ill. DBrP) molekulák, a röntgenszórásos eredményekkel összhangban a fejcsoportokhoz közel helyezkednek el. Az alacsonyabb, 1/10 fenolszármazék/lipid mólarány mellett a lipidréteg vastagsága közel van a tiszta DPPC/víz rendszernek megfelelő értékhez (kb. 4 nm), de az lényegesen lecsökken a fenolszármazék 1/1 mólarányánál (kb. 2.5 nm), azaz kialakul az interdigitated fázis.



A gél állapotú liposzómák kettősrétegbe ágyazott, dihalogénezett-fenol molekulák számszerinti gyakoriság függvénye a rétegnormális mentén

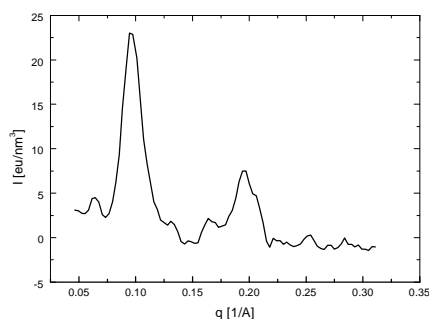
Varga Zoltán: Halogénezett fenolszármazékok hatása modellmembránok szerkezetére, **Diplomamunka** (2006) témavezető: Bóta A.

A DPPC/DBrP/víz rendszer tanulmányozása anomális kisszögű szórással (angol rövidítéssel ASAXS)

A DCP-nek DBrP-ra történt cseréje egy különleges mérési módszert adott a kezünkbe; az anomális kisszögű szórás lehetőségét. A hozzáférhető szinkrotron mérőhely 4 és 32 keV közötti energiájú röntgenfotonokat biztosít, ami nem teszi lehetővé a klór, de biztosítja a bróm atom anomális viselkedésének kihasználását. Az anomális (vagy más szóval anomális) szórás az elektron „kötött” jellegéből adódik, aminek az atom szórási tényezője komplex mennyiség lesz. Ha a rendszerünkben jelenlévő atom karakterisztikus abszorpciójának megfelelő (az abszorpciós él közelében) és attól távoli (ezt praktikusán kisebbségként kezeljük) energiákon mérünk, akkor az adott atom koncentrációjának függvényében el fog térni a két szórási görbe.

A két szórási görbe különbségét szeparált görbéknek hívjuk. A szeparált görbék az adott atom (amelynek abszorpciója közelében mértünk) lokális elhelyezkedésére lesznek informatívak. Az „informatív” meghatározás azért szerepel itt mert a szeparált görbéket elméletileg kifejtve két tagot tartalmaz, egy kereszttagot és egy „tiszta rezonáns” tagot. Az utóbbi csak az adott atom térbeli elhelyezkedését írja le (mintha az adott atom vákumban lenne, függetlenül a környezetétől).

Az anomális szórást felhasználva, az alacsony koncentrációjú ($2 \cdot 10^{-2}$ DBrP/DPPC mólarány) esetében kimutattuk a fenolszármazék inhomogén eloszlását a liposzómákban, ami fázisszeparációhoz vezet. Magasabb DBrP koncentrációjú minták esetében nagyobb anomális effektus érhető el, azaz a szeparált görbék relative nagy pontossággal határozhatók meg. Legalább három különböző energián mérve a szórási görbéket, a tiszta rezonáns tagot is meg tudtuk határozni. Ezzel atomi szintű feloldással tudtuk meghatározni a kettősrétegbe ágyazott DBrP molekulák átlagos helyzetét. A mellékelt ábrán bemutatjuk a lipid kettősrétegbe ágyazott DBrP molekula tiszta rezonáns szórását (pontosabban diffrakcióját, mert az csúcsokat tartalmaz).



A lipid kettősrétegbe ágyazott, magának a DBrP molekulának a kisszögű diffrakciója ($q=2\pi s$)

A DBrP-nak ilyen módon meghatározott helye nagyon jól egyezik avval, amit a molekula dinamikai számítások adtak. A méréseket 2005 nyarán, a kontroll-méréseket 2005 őszén végeztük, az eredmények publikálása folyamatban van.

Bóta, A.: “Durch Fremdstoffen verursachte, unregelmessige Strukturen der Liposomen” **Meghívott előadás** a Hamburgi Egyetem, Biokémia Tanszékén, 2003.06.26.

Bóta, A.: “Localisation of foreign molecules in multilamellar vesicles”, **Meghívott előadás** a Hamburgi Szinkrotron (HASYLAB) előadói napjára. 2004.01.28.

Bóta A., Varga Z., G. Goerigk, and E. Klumpp, ASAXS study of the localisation of the 2,4-dibromophenol in the DPPC/water multilamellar vesicles. **Annual Reports, DESY/HASYLAB**, 2004.

Z. Varga, A. Bóta, G. Goerigk: Location of dibromophenol in vesicle system, Annual Users Meeting , DESY HASYLAB, Jan. 27. 2006. Hamburg, Germany (**Poster, Abstract**)

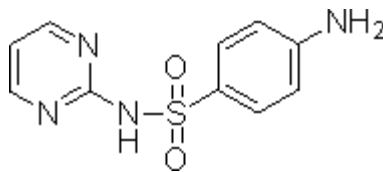
A. Bóta and E. Klumpp: Effects of contaminants on biological model membranes: The advantage of the ASAXS method for the study of the location of copper ions and dihalogenated phenol molecules, **Colloid and Surfaces, A: Physicochem. and Eng. Asp.** 265 (2005) 124-130.

A Szulfadiazin molekula hatása

A Szulfadiazin molekulával kapcsolatban azt kell tudni, hogy az állati gyógyászatban legnagyobb mennyiségben felhasznált antibiotikum. Nem csak betegség esetén, hanem a takarmány adalékeként rendszeresen alkalmazzák. Az állatok által kiűrt szulfadiazin a környezetben nagy károkat okoz, a talajlakó baktériumokat elöli.

A szulfadiazin (továbbiakban SD) molekula vizes közegben rosszul, de valamivel jobban oldódik, mint szerves közegben.

A szulfadiazin molekula :



A felhasznált modellmembrán rendszer, a DPPE/DPPG/víz alapú (DPPE/DPPG=4 mólarányal, ami megközelíti a baktériumok belső membránjának lipidösszetételét) liposzóma volt. Az alaprendszer termikus (DSC módszerrel vizsgálva), szerkezeti (kis és nagyszögű röntgenszórással ill. diffrakcióval követve) és morfológiai sajátságai (fagyasztva törés és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal) azt mutatták, hogy a rendszer homogén, ugyanakkor érzékeny. Ez azt jelenti, ha a rendszerbe egyéb komponens kerül a kettősrétegben szegregáció következik be, azaz sajátságaiban kis mértékben eltérő, kétféle domén alakul ki. Az egyikben a DPPE aránya megnő a másikban lecsökken. A szegregáció mértéke a SD hatására megnő, ugyanakkor a SD koncentrációjának függvényében (10⁻³ – 1 SD/lipid mólarányú tartományban vizsgálva) nem tapasztalható tendenciózus változás. A SD molekula nem épül be a kettősrétegbe, hanem arra „ráfekszik” és szignifikáns változást okoz a multiréteges szerkezetben. A rétegszerkezetben a nem reprodukálható változásokat okoz, ami a sokféle, metastabilisnak tekinthető szerkezeti hibák jelenlétére vezethető vissza. Az alábbi ábrán a kisszögű szórási (diffrakciós) görbék az összetett, az alaprendszer (DPPE/DPPG/víz) rétegszerkezetének kevésbé szabályos jellegét (gyenge korrelációját) mutatják, továbbá a SD hatására a rétegszerkezet további leromlását mutatják. A SD hatása a gél és a folyadékkristályos szerkezetben eltérő mértékű. Biológiai szempontból a gél fázisban okozott effektusok a nagyobb jelentőségűek.

Oszlánczi Á., Urbán E., Szegedi K., Varga Z. Bóta A. and E. Klumpp: Effects of sulfadiazine on biological model membranes, Conf on Interfaces Against Pollution (IAP 2004) 24-27 May 2004. Jülich, Germany (**Poster, Abstract**)

Oszlánczi Á., Urbán E., Bóta A. and E. Klumpp: Effects of sulfadiazine on biological model membranes, Shanghai International Conf on Physiological Biophysics (ICPB' 2004) 9-13. November 2004. Shanghai Convention Center, Chinese Academy of Sciences, Sanghai, China (**Poster, Abstract**)

Oszlánczi, Á., Bóta, A., and Klumpp, E.: Effects of sulfadiazine on biological model membranes, 19th ECIS Conference, Sept. 18-23. 2005, Geilo, Norway (**Poster, Abstract**)

Á. Oszlánczi, A. Bóta, Z. Varga, G. Goerigk: Effects of the sulfadiazine on the DPPE/DPPG/water vesicles, **Annual Reports**, DESY/HASYLAB, 2005.

Á. Oszlánczi, Cs. Novák, B. Kocsis: Effects of the sulfadiazine on biological model membranes, **J. of Thermal Analysis and Calorimetry**, 82 (2005) 463-469.

Á. Oszlánczi, A. Bóta, B. Kocsis: Structural and morphological changes of the DPPE-DPPG/water vesicles induced by sulfadiazine, kézirat, bíráló alatt **Colloid and Surfaces, B: Biointerfaces**

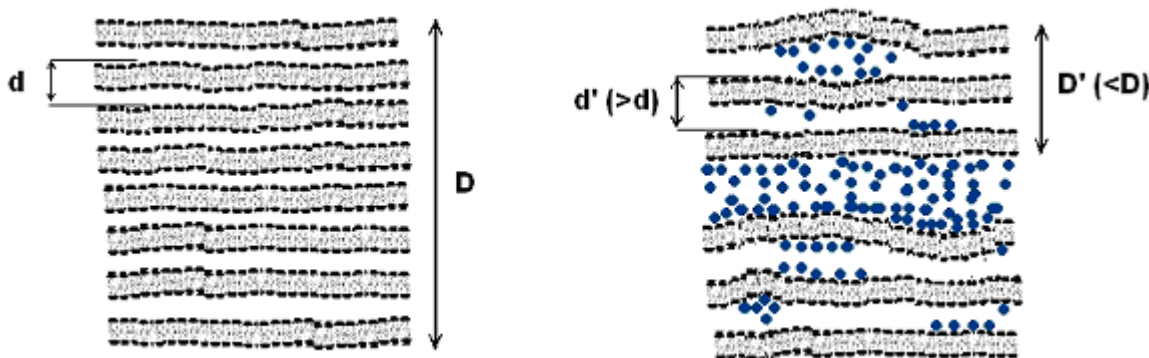
Az aminoglikozidok hatása DPPC/víz modellmembrán rendszerre

Az antibiotikumok alkalmazása olyan széleskörű az emberi terápiában, hogy jelenleg az egész világon előállított gyógyszerek több mint felét teszik ki. A SD molekula kapcsán (ami az állatgyógyászatban elsődleges), más, az emberi gyógyászatban használt szerek, azok közül is az aminoglikozidok, sejtmembrán-károsító hatását kívántuk tanulmányozni. Az aminoglikozidok igen gyors hatású, baktericid antibiotikumok, a baktériumok fehérjeszintézisét gátolják, úgy, hogy a riboszóma 30S alegységének egy fehérjéhez kötődnek. A sztreptomycin, a tobramicin, és a spektinomycin hatását tanulmányoztuk.

A vizsgált antibiotikumok a modell-rendszerül választott DPPC/víz liposzómarendszer termotróp és szerkezeti sajátságait egyaránt befolyásolja. Az alaprendszer termotróp

sajátságainál „idegen molekulák” jelenlétében szokatlan effektus mutatkozik; az alaprendszer előátmenetét és főátmenetét hasonló mértékben változik meg. Ez azért szokatlan effektus, mert a DPPC/víz rendszer előátmenete relatíve kis entalpiaváltozással járó folyamat, aminek az a következménye, hogy a gél és a hullámos gél állapotok közötti fázisátmenet gyengén elsőrendű karaktert mutat, azaz minden egyéb „idegen molekula” hatására megváltozik. A változás általában a fázisátmeneti hő további csökkenésével, vagy teljes megszűnésével jár, azaz az előátmenet folyamata megszűnik. Az alaprendszer másik fázisátmenete, a főátmenet általában az idegen molekuláknak csak lényegesen nagyobb koncentrációjánál módosul (lényegesen nagyobb koncentrációnál, mint ahol az előátmenetre már lényeges hatással van). Az elő- és főátmenetek hasonló mértékű változása egyben azt is jelzi, hogy ezek az antibiotikumok nem épülnek be a kettősrétegbe, hanem a kettősréteg poláros felszínén lokalizálódnak.

Az antibiotikum molekulák a vízrétegben helyezkednek el, a hidratációs kölcsönhatások „zavarása” révén, a rétegek periódikus kiépülését lerontják. A vizsgált három antibiotikum molekula finom szerkezeti különbségei „felelősek” azért, hogy a rétegvastagság a háromféle antibiotikum molekula esetében eltérőek, valamint azért is, hogy a vizsgált három karakterisztikus (a gél, a hullámos gél, a folyadékkristályos állapotoknak megfelelő) hőmérsékleten a hatás eltérő. A kisszögű röntgenvizsgálatok azt mutatják, hogy a rétegvastagság jelentékeny mértékben megnő és az alaprendszerre jellemző, szerkezeti egységes, nagyméretű domének mérete drasztikusan lecsökken. Az antibiotikum molekulák elhelyezkedése inhomogén, hiszen emiatt csökkennek a domének méretei, és annak okai az antibiotikumok kémiai karakterének valamint az alaprendszer hibahelyeinek kialakulásával magyarázhatók. A liposzómarendszerben, mint réteges modellmembrán rendszerben kialakult szerkezetet az alábbi sematikus képpel lehet jelezni. A felhasznált modellrendszert kívánatos tovább bővíteni; nevezetesen a rendszerhez adott fehérjemolekulák hidrofíl régiójának, az antibiotikum molekulák hatására történő konformációváltozásának tanulmányozására nyílna lehetőség.



A rétegszisztem a modellmembránban és annak változása antibiotikum hatására

A kontroll mérések elvégzése után kívánjuk az eredményeket publikálni.

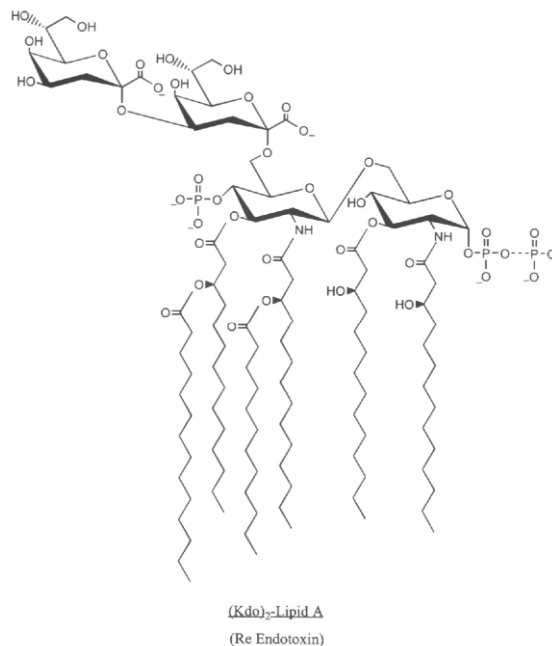
Czabai Gábor: Aminoglikozidok hatása dipalmitoil-lecitin/víz modellmembrán szisztemekre, **Diplomamunka**, témavezető: Bóta A. készült a BME Fizikai Kémia Tanszékén, 2005.

Lipopoliszacharidok hatása DPPC/víz, DPPC-DPPG/víz, DPPE-DPPA/víz és DPPE-DPG/víz alapú liposzómákra

A Gram-negatív baktériumok külső membránjának fő komponense az ún. lipopoliszacharid (LPS), más néven endotoxin. Ez a toxikus molekula a baktérium felszínéről leválhat és - amfipatikus tulajdonságából adódóan - közvetlenül a gazdaszervezet sejtjeinek,

vagy más baktériumok membránjába ágyazódhat. Ezzel a kölcsönhatással drasztikusan megváltoztatja a membrán tulajdonságait, melynek következtében a sejt képtelen lesz fiziológiai feladatainak tökéletes ellátására. Az LPS biológiai membránokra kifejtett közvetlen hatása az irodalomban kevésbé ismert, ezért ennek pontos megismerése további széleskörű tanulmányozást igényel. Ehhez a szisztematikus és fontossága miatt a világon intenzíven folytatott kutatásokhoz kapcsolódva az LPS molekulának humán és bakteriális sejtek membránjára kifejtett közvetlen hatását tanulmányoztuk a biológiai rendszereket megközelítő foszfolipid összetételű liposzómákon, mint modellmembrán rendszereken.

Munkánk során a *Salmonella minnesota* Re 595 mutáns baktériumtörzsből előállított endotoxin hatását vizsgáltuk, amely csak lipid-A-ból és két KDO (3-dezoxi-D-manno-2-oktulónsav) molekulából épül fel. A *Salmonella* baktérium igen változatos betegségeket idéz elő, például a hastífusz, de leggyakoribb esetben a gastroenteritisz okozója.



Az Re- LPS általános szerkezeti felépítése

Az LPS alacsony koncentrációban (< 0.2 LPS/lipid mólarány) a humán modellmembránt modellező (DPPC/víz) rendszerben a szabályos rétegszerkezet leépülését okozza, míg magas koncentrációban (1 LPS/lipid mólarány) komplex struktúra kialakulását idézi elő. Az LPS által kedvezményezett köbös struktúra nem jelenik meg.

A DPPE-DPPG alapú modellmembránban az LPS kis mennyiségben is drasztikus változásokat okoz. Hatására a tiszta liposzóma rendszerrel feltételezett fázisszeparáció pregnáns módon megjelenik, melynek mértéke a hozzáadott LPS mennyiségének függvényében nő. Az LPS feltételezhetően a DPPE-ben gazdag domének szeparációját segíti elő. Emellett lokálisan felhalmozódva köbös szerkezetű régiókat alakít ki. A vizsgált 1/1 LPS/lipid mólarányú rendszerrel egyértelműen a Q^{224} csoportba tartozó köbös fázist indukál.

Az LPS-nek a DPPE-DPPA alapú liposzóma rendszerre kifejtett hatása eltérő a korábban bemutatott modellrendszereknél tapasztalt hatásoktól. Ennél a rendszerrel az LPS alacsony koncentrációban a rétegszerkezet leépülését okozza, majd az 1/10 LPS/lipid mólarányánál a lipidekkel az egész rendszerre jellemző köbös struktúrát alakít ki. Ez a szerkezet az 1/1 LPS/lipid mólarányánál még markánsabban megfigyelhető. A rendszerrel alacsony LPS koncentrációban (1/10 LPS/lipid mólarányánál) kialakuló Q^{224} köbös szimmetria összefügg a modellmembrán lipid összetételével, mivel mindkét foszfolipid komponens

(DPPE és DPPA) nem kettősréteget képző tulajdonságú. Ezek alapján megállapítható, hogy kis mennyiségű LPS molekula jelenléte is elegendő ahhoz, hogy a lamellárisból köbös szerkezet alakuljon ki. A kialakult Q^{224} -es köbös struktúra megegyezik a DPPE-DPPG rendszerben indukált szerkezettel. Ennek biológiai jelentőségét feltételezhetően - hasonlóan a DPPE-DPPG alapú rendszerhez- az LPS által a sejtek membránjában létrehozott lokális defektus adja.

A DPPE-DPG modellmembrán rendszer gél állapotú réteges szerkezete LPS hatására (1/100 LPS/lipid mólaránynál) stabilizálódik. A rendszerben három különböző nem kettősréteget képző molekula van jelen, ennek ellenére a lamelláris szerkezet mégis megmarad, sőt a rétegek közötti korreláció erősödik. Ez feltételezi, hogy a vizsgált modellmembránban réteges szerkezetet stabilizáló hatás lép fel. A három molekula (DPPE, DPG, LPS) közül, szerkezeti felépítéséből adódóan csak a DPG lehet képes arra, hogy a membránban „megforduljon”, azaz a nem szubsztituált fejcsoportjával a lipidek szénlánc régiója felé forduljon. Amennyiben ez a mechanizmus játszódik le a modell rendszerben, akkor a biológiai membránokban is elképzelhető a DPG-nek tulajdonítható szerkezetstabilizáló hatás. A vizsgált legnagyobb LPS koncentrációjú rendszernél, (1/1 LPS/lipid mólarány) a feltételezett DPG által stabilizált lamelláris szerkezet továbbra is megfigyelhető, de mellette az LPS-re jellemző köbös struktúra is kialakul. A rendszer folyadékkristályos állapotában hasonló tendencia figyelhető meg, mint gél állapotában. Az LPS koncentráció növelésével (1/10 LPS/lipid mólarány) a köbös szerkezet eltűnik, tisztán inverz hexagonális struktúra alakul ki. A köbös és az inverz hexagonális struktúrák szerkezetileg nagyon közel állnak egymáshoz, ezért az egyes domének könnyen átalakulhatnak a másik szerkezetté. A vizsgált LPS molekula planáris alakú, mely valószínűleg folyadékkristályos állapotban az inverz hexagonális struktúra kialakulásának kedvez. Tehát az alacsonyabb LPS koncentrációban megjelenő köbös szerkezetű domének LPS hatására inverz hexagonális csövekké alakulnak át.

E. Urbán, A. Bóta, B. Kocsis and K. Lohner: Distorsion of the lamellar arrangements of phospholipids by deep rough mutant Lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota*, **J. Thermal Analysis and Calorimetry**, 82 (2005) 513-517.

E. Urbán, A. Bóta and B. Kocsis :Effect of *Salmonella minnesota* R595 LPS on the dipalmitoylphosphatidyl-ethanolamine(DPPE)-dipalmitoylglycerol (DPG)-water model membrane system, **Chemistry and Physics of Lipids** (2006), in press

E. Urbán, A. Bóta and B. Kocsis: Non-bilayer formation in the DPPE-DPPG vesicle system induced by deep rough mutant of *Salmonella minnesota* R595 lipopolysaccharide, **Colloid and Surfaces, B:Biointerfaces** (2006) in press

E. Urbán, A. Bóta and B. Kocsis : Non-bilayer formation in different model membrane systems induced by R595 lipopolysaccharide, kézirat, bírálat alatt, **J. of Biophysical Chemistry** (2006)

Urbán Edit: *Salmonella minnesota* R595 lipopolysaccharid hatása modellmembrán rendszerekre, **Ph.D. értekezés**, témavezető: Bóta A., Készült: BME, Fizikai Kémia T. 2006.

Urbán E., Kocsis B. and Bóta A.: Effect of *Salmonella minnesota* deep rough mutant lipopolysaccharide on model membranes, Shanghai International Conf on Physiological Biophysics (ICPB' 2004) 9-13. November 2004. Shanghai Convention Center, Chinese Academy of Sciences, Sanghai, China (**Poster, Abstract**)

Urbán, E. Kocsis, B. and: Bóta, A. Effect of *Salmonella minnesota* deep rough mutant lipopolysaccharide on model membranes, 19th ECIS Conference, Sept. 18-23. 2005, Geilo, Norway (**Poster, Abstract**)

Fémionok (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) hatása a DPPC/víz alapú liposzómákra

Általánosan, a kétértékű fémionok jelentős mértékben lerontják a liposzómák szabályosan ismétlődő rétegszerkezetét. Az anomális kisszögű szórás felhasználásával a rendszerbe vitt fémionok elhelyezkedése leírható. Megállapítottuk, hogy a liposzómákban a fémionok egy része szabályosan a réteges szerkezetnek megfelelően, a vízrétegben

(pontosabban a lipidek poláros fejcsoportjának közelében) helyezkedik el, másik domináns része a bizonyos vízrétegekben koncentrálnak, a liposzóma rétegtávolságát lényegesen meghaladó méretű doménekben helyezkedik el. Az elektronsűrűségre vonatkozó számítások eredményeképpen azt is állítjuk, hogy a liposzómában jelentő térfogati hányadban vannak olyan térrészek is, ahol a fémionok koncentrációja elhanyagolható, azaz fémion mentes vagy fémionokat csak nyomnyi mennyiségben tartalmazó részek is előfordulnak. Az anomális kisszögű szórás felhasználásával a fémion tartalmú domének méretét meghatároztuk, alakjukat gömbbel közelítve, a méreteloszlást Maxwell-típusú eloszlásfüggvénnyel, a fémion tartalmú domének átmérője átlagosan 600 – 800 Å. Ettől független módszer, a fagyasztva – törés és elektronmikroszkópos vizsgálat a méretre adott értéket megerősíti. A felvételeken jól szembejuthat, hogy a liposzómák héjai bizonyos helyeken szétnyílnak és a közöttük lévő „üreg” kiterjedése korrelál a röntgenvizsgálattal kapott mérettel. Ez a morfológiai kép egyben magyarázatot is ad arra, hogy mi az oka a réteg közötti szabályos ismétlődés megtörésének, azaz az interferencia feltétele megszűnésének, így a diffrakciós csúcsok kiszélesedésének. A fémionok elhelyezkedését a pH érték, valamint maguknak a fémionoknak a koncentrációja lényegesen befolyásolja.

A. Bóta and E. Klumpp: Effects of contaminants on biological model membranes: The advantage of the ASAXS method for the study of the location of copper ions and dihalogenated phenol molecules, **Colloid and Surfaces, A: Physicochem. and Eng. Asp.** 265 (2005) 124-130.

Bóta A., Varga Z., G. Goerigk, V. Csokai and S.S. Funari: Effects of the copper ions on the DPPC/water multilamellar vesicles observed by ASAXS technique, **Annual Reports, DESY/HASYLAB**, 2004.

Bóta, A., Varga, Z. and Goerigk G.: Effects of toxic molecules/ions on biological model membranes, 19th ECIS Conference, Sept. 18-23. 2005, Geilo, Norway (**Poster, Abstract**)

A. Bóta, Z. Varga, G. Goerigk: Location of copper ions in the DPPC/water vesicles observed by using anomalous small angle X-ray scattering, **Annual Reports, DESY/HASYLAB**, 2005.

Nanorészecskék előállítása liposzómákban

Nanorészecskék előállítására régóta használnak liposzómákat. Ezeknél az eljárásoknál a liposzóma belső vízmagját használják nanoreaktornak. Célszerűen, unilamelláris liposzómákat, más szóval vezikulákat (ULV) használnak fel. A fémionok, a fenti pontban bemutatott, elhelyezkedésének megismerése adta a kezünkbe a nanorészecskék liposzómák multilamelláris terében történő nanorészecske előállítási lehetőséget. A CdS részecskék, anomális kisszögű szórásából meghatározott, tiszta rezonáns tag mérésével folyamatosan monitorozhatjuk a nanorészecske formálódását. Az előállított nanorészecske átlagos átmérője 7 nm, ami a megfelelő paraméterek változtatásával változtatható és beállítható. (Az eredmények közlés alatt vannak.)

A. Bóta, Z. Varga, G. Goerigk: Displacement of metal ions in vesicles, Annual Users Meeting, DESY HASYLAB, Jan. 27. 2006. Hamburg, Germany (**Poster, Abstract**)

Bóta Attila : Formations and Locations of Domains of Foreign Ions and Molecules in Vesicle Systems (ASAXS Studies) (“Present Status and Future Perspectives of SAXS, WAXS and GISAXS Experiments at HASYLAB”, **Meghívott előadás** a Hamburgi Szinkrotron (HASYLAB) előadói napjára. 2006.01.26.

Vizsgálatok a Synperonic(A7)-víz rendszerrel

A Synperonic(A7) nemionos tenzid rendszer a kozmetikai iparban játszik nagy szerepet. A vízzel formált réteges szerkezete a membránokéhoz hasonló, és egy durva modellmembrán rendszernek tekinthető. Ennek figyelembevételével, a kényszerűség (az OTKA pályázat anyagi támogatását, a pályázat indulása után fél évvel, az abból vásárolt

költséges lipideket további két hónappal később vehettem kézbe) valamint az előző pontban bemutatott liposzómák interlamelláris terének, mint nanoreaktoroknak a felhasználása indította a rendszer szerkezeti tanulmányozására. Az általunk tervezett és épített eszközzel a Synperonic(A7)-víz rendszer (kontrolált körülmények között történő) nyírása közben kialakuló szerkezeteket kisszögű szórással, valamint fagyasztva töréssel tanulmányoztuk. A Synperonic(A7)-víz rétegszerkezete a nyírás során dráma változásokon megy át a μm -es skálán, míg a nm-es mérettatományban is szignifikáns változások történnek. Ezeket az eredményeket leírtuk. A rendszerbe vitt fémionok szerkezetmódosító hatásának vizsgálata még folyamatban van.

A. Bóta, Gy. Fetter: In situ shear investigation of the Synperonic(A7)-water system by small angle X-ray scattering and freeze-fracture, **Langmuir**, 20 (2004) 3901-3905.

Gy. Fetter, A. Bóta: Construction of a Shear Cell for SAXS and Freeze-fracture Studies, **Periodica Polytechnica** 45 (2004) 3-12.

Gy. Fetter, A. Bóta: SAXS and Freeze-fracture Studies of a lamellar tenside-water system in a Shear Cell during Thermal Treatment, **Journal of Biological Physics and Chemistry**, 4 (2004) 174-178.

Gy. Fetter, A. Szilágyi, M. Zrínyi and A. Bóta: Shear effect on the thermotropic behaviour of the Synperonic A7-water system, **J. Thermal Analysis and Calorimetry**, 82 (2005) 513-517.