

PhD értekezés tézisei

**PERTURBÁNSOK HATÁSA BIOLÓGIAI ÉS MODELL  
MEMBRÁNOKRA**

Farkas Nelli

Program: Fehérje szerkezet és működés

Programvezető: dr. Belágyi József

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Bioanalitikai Intézet

Pécs

2004

# BEVEZETÉS

Élő szervezetekben a legkisebb, önmagát reprodukálni képes szerkezeti egységnek a sejtet tekintik. A sejten belül lejátszódó folyamatok nagymérvű rendezettséget mutatnak, ennek fenntartásához a környezettől egyfajta elhatárolódás szükséges, amit a citoplazma membrán biztosít. Ez a membrántípus fenntartja az extracelluláris és intracelluláris tér közti összetétel különbözőségét, részt vesz az anyagcsere és jelátviteli folyamatokban, valamint a környezetből érkező ingerek elsődleges felvevője. Tehát nem pusztán egy passzív határoló felület, mely megadja a sejt megfelelő alakját, hanem aktív kapcsolatot tart fenn a sejt és a környezete között. Mindezen okokból a citoplazmamembrán a sejtek életműködése szempontjából alapvető, ezért szerkezetének és működésének vizsgálata kiemelt fontosságú.

A membrán sajátosságait, mint az már a 19. század óta ismeretes, alapvetően két komponens határozza meg, a lipid- és a fehérje-összetétel. Minden biológiai membrán, legyen az plazmamembrán vagy bármilyen más a sejten belül előforduló membránféleség, azonos módon épül fel: szárazanyag-tartalmuk 40-60 %-a lipid, 30-50 %-a fehérje és kb. 10 %-a szénhidrát. A különböző komponensek aránya és típusa jellemző az adott membránra. A membránok fontos jellemzője még a fázisátalakulási hőmérséklet, amit nagymértékben megszab a molekulák közti kapcsolat, azaz függ a membrán fehérjeösszetételétől, és a membránlipidek zsírsav oldalláncai közötti van der Waals kölcsönhatás erősségétől is. Fázisátalakulás alatt azt a folyamatot értjük, mely során a membrán egy rendezettebb, ún. gél kristályos állapotból egy rendezetlenebb folyékony, ún. kvázikristályos állapotba kerül.

A membrán különböző szerkezeti állapotaiban a lipidek eltérő mozgási tulajdonsággal rendelkeznek. A gélkristályos állapot tekinthető rigidebbnek, amelyben a molekulák csak korlátozott mozgással rendelkeznek. A kvázikristályos, folyékony állapothoz rendelik a nagyobb fluiditást. Ebben az állapotban több mozgástípus is előfordulhat: laterális (oldalirányú) diffúziós, rotációs, és a nagyon ritkán előforduló flip-flop mozgás. A nagyobb fluiditás fokozott permeabilitást is jelent.

A membránban lezajló molekuláris mozgások  $10^7$ - $10^8$  s<sup>-1</sup> frekvenciatartományba esnek, éppen ezért az elektronparamágneses rezonancia (EPR), magmágneses rezonancia (NMR) illetve optikai technikákkal a mozgások jól nyomonkövethetők. E módszerek alkalmasak a membránokban lezajló változások jellemzésére is.

Számos vegyületcsoportról, mint például az alkoholokról, bizonyos antibiotikumokról, altatókról, fájdalomcsillapítókról és nyugtatókról kimutatták már, hogy a sejtekre gyakorolt fiziológiás hatásaik közül lényeges a membránok szerkezetében indukált változás. Ismeretes az a tény is, hogy a megváltozott membránszerkezet magával vonhatja a transzportfolyamatok változását, károsodását is, ami kihat az egész organizmus működésére.

Az élő szervezetek számára kis mennyiségben esszenciális nehézfémek nagyobb koncentrációban már általában mérgezőek. Ezen nehézfémek membránra gyakorolt hatásának tanulmányozásához modellként a jelentős környezetterhelést okozó krómot választottuk, mely ion biológiai szerepéről sok ismeret áll rendelkezésünkre. Tudjuk, hogy komplexet képez a biológiailag fontos molekulákkal, DNS-DNS, DNS-fehérje kötéseket hoz létre, csökkentve ezzel az átírás megbízhatóságát. Ismeretes az is, hogy a Cr(VI)-Cr(III) redukció során számos szabadgyök keletkezik, mint hidroxil-, szuperoxid-, thyl- illetve glutatinilgyök. A különböző sejtösszetevők érzékenyek az oxidatív támadásokra, károsításokra. Mindezen összetevők közösen járulhatnak hozzá a króm mutagén

és karcinogén hatásához, és valószínűleg változásokat indukálnak a membrán szerkezetében is.

Egy másik, szintén jelentős szabadgyök-indukáló képességgel rendelkező vegyületcsoport a policiklikus aromás szénhidrogének (PAH). Ismeretes, hogy a PAH vegyületek nagy mennyiségben fordulnak elő a cigarettafüstben és a kipufogógázokban, de az ipari tevékenység következtében (kokszolás, hőerőművek, alumíniumgyártás, élelmiszertartósítás) is nagy mennyiség jut a levegőbe, így jelentős légszennyezést okoznak. Számos publikációt közöltek már ezeknek a benzol származékoknak biológiai hatásáról a sejten belül, azonban kevés az adat membránra gyakorolt hatásukról.

Az egyre növekvő környezetszennyezés mellett az emberiségnek más társadalmi problémákkal is meg kell küzdenie. Ezek közé tartozik a drogprobléma, a kábítószeres és központi idegrendszerre ható egyéb anyagok (narkotikumok, stimulánsok, szerves oldószer gőzök) kóros és káros élvezete. A bódulatot okozó élvezeti szerek által okozott függőség kialakulása, a szerek patofiziológiai hatásai jól ismertek, az elvonás után jelentkező tünetek kezelése jórészt megoldott. A narkotikumok, kábítószeres molekuláris szintű hatásairól azonban kevés adat áll rendelkezésre. Több kábítószer esetén kimutatták, hogy a függőség kialakulásában szerepet játszik az idegsejtek receptoraiban bekövetkező változás. Az effektus nagy hasonlóságot mutat az érzéstelenítők által indukált változásokkal, ezért bizonyos anesztetikumok, mint például a tetrakain, alkalmasnak tűnnek drogeffektus modellezésére.

# CÉLKITŰZÉSEK

Méréseink során olyan anyagok hatását kívántuk vizsgálni biológiai és modell membránokon, amelyekről ismert, hogy a szervezetbe kerülve megváltoztatják annak normális biokémiai, élettani működését. Kísérleteinkkel igazolni szeretnénk volna, hogy ezen anyagok jelentősen megváltoztatják a lipid régió szerkezetét és dinamikáját, ami a transzportfolyamatok módosulását is magával vonhatja, és szerepet játszhat a kialakuló élettani változásokban.

1. A jelentős környezetszennyezést okozó krómról tudott, hogy kromát anion formájában áthalad a membránon, és Cr(III)-má redukálódik, számos szabadgyököt indukálva. A króm ion áthaladása során létrejövő membránperturbáció vizsgálatára Schizosaccharomyces pombe szülői, króm-szenzitív és rezisztens mutáns törzsein végeztünk méréseket. Célunk volt annak kimutatása is, hogy a nehézfém rezisztencia és szenzitivitás kapcsolatban állhat membránszerkezeti különbözőséggel.

2. Környezetbiológiai mérések mutatják, hogy a levegőben található por és koromszemcsékhez jelentős mennyiségű policiklikus aromás szénhidrogén adszorbeálódik. Egy nemzetközi Copernicus pályázatba bekapcsolódva célunk volt kiválasztott PAH vegyületek membránnal való kölcsönhatásának vizsgálata, és az okozott változás jellemzése.

3. A drogok, narkotikumok és inhalánsok jelentős részénél kimutatták, hogy a függőség kialakulásában szerepet játszanak az idegsejtek receptoraiban bekövetkező változások. Célunk volt egy olyan eljárás kidolgozása, amely jól modellezi a drogok által indukált változásokat, és a későbbiekben a humán anyagokon történő vizsgálatok eredményeinek értékelését megkönnyítheti.

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## Biológiai preparátumok

### 1. *Schizosaccharomyces pombe*

A *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztőt Lidner 1893-ban izolálta egy keletafrikai *pombe* nevű sörből, s napjainkra a *Saccharomyces cerevisiae* után az egyik legjellemzettebb élesztővé vált. A *Sch. pombe* különálló szűk csoportot képez az Ascomycetákon belül, egysejtű eukarióta hasadó élesztő, melynek homo és heterotallikus sejtciklusa jól ismert. Vizsgálatainkhoz heterotallikus auxotróf törzseket választottunk, majd ezekből állítottuk elő nitrozo-guanidin kezeléssel a króm szenzitív és rezisztens mutánsokat.

### 2. *Vörösvérttest, vörösvérttest ghost*

Az emberi vörösvérttestek a csontvelőben keletkező mag és intracelluláris organellum nélküli sejtek. Mindezen tulajdonságok és a viszonylag egyszerű preparálási technika ideális modellté teszi. Az emlős sejtekben számos membránféleség megtalálható, ebből a szempontból kivételt képez a vörösvérttest, mivel egyetlen membránja van, a citoplazma membrán. Ha a vörösvérttesteket hipotóniás oldatba helyezzük azok lizálnak, beltartalmuk kiürül, és citoplazmájuktól megfosztott ún. kísértetsejtek (ghostok) lesznek.

A ghost preparátumot Dodge és munkatársai által leírt módszert követve készítettük el.

### *3. Liposzóma*

Az amfipatikus foszfolipid molekulák vizes közegben viszonylag könnyen kettősréteget alkotnak, ami összezáródva liposzómát hoz létre. Ezek a vezikulák kiválóan alkalmasak különböző lipidösszetételű membránok modellezésére.

A méréseink során dipalmitoil- foszfatidil kolin tartalmú liposzómákat alkalmaztunk.

## **Mérési eljárások**

A biológiai rendszerekben, mint például a sejtmembrán, uralkodó rendezettség, illetve belső dinamika vizsgálatára több módszer is ismeretes, ide tartoznak a különböző fluoreszcens technikák, az elektronparamágneses rezonancia (EPR) spektroszkópia, valamint a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC).

### *1. EPR mérések és kiértékelésük*

Az EPR spektroszkópia során egy paramágneses minta energiaelnyelését detektáljuk a változó mágneses tér függvényében. A biológiai rendszerek általában nem rendelkeznek paramágneses centrumokkal, így ezzel a módszerrel közvetlenül nem vizsgálhatók. A spin jelölés technikája megoldást nyújt erre a problémára, a módszer lényege, hogy a rendszer kiválasztott helyeire stabilis szabadgyököt kapcsol, melynek mágneses térben való viselkedéséből következtetni lehet a biológiai rendszer szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. Membránok esetében egy olyan lipid kerül beépítésre, melynek zsírsavlánca

kémiaailag módosított, egyik szénatomjához egy nitroxid stabilis szabadgyök van kapcsolva. Membránokban uralkodó rendezettség jellemzésére egy rendparamétert (S) vezettünk be, melynek értéke 0 és 1 között változhat, tökéletes rendezettség esetén  $S=1$ . A rendparaméter segítségével a különböző membránok belső dinamikája jól összehasonlítható. A rendszer hőmérsékletváltozásra adott válasza, a rendparaméter-hőmérséklet függés hasznos információt szolgáltat a biológiai membránok viselkedésére.

A minták spinjelölését 5-SASL (5-(4,4-dimetil-oxazolidin-N-oxil) sztearinsav), 7-SASL (7-(4,4-dimetil-oxazolidin-N-oxil) sztearinsav) és HO-185 (4-(2-n-undecil-3-oxil-4,4-dimetil-oxazolidin-n-oxil) vajsav) jelölőkkel végeztük.

A Bruker ESP-300E EPR spektrométerrel végzett mérések paraméterei a következők voltak: mikrohullámú teljesítmény 10 vagy 20 mW, modulációs amplitúdó 1,0-2,0 G, mágneses térerősség 3480 G és 100 G scan. A méréseket 0-25 °C tartományban végeztük Sch. pombe esetében, a többi esetben 0-44 °C tartományban, 2 °C fokenként növelve a hőmérsékletet a spektrométerhez kapcsolt hőmérséklet-variátor segítségével. A spektrumok kiértékelését számítógépes program segítségével végeztük.

## 2. DSC mérések

A differenciális pásztázó kalorimetriát oldott biopolimerek termodinamikai átmeneteinek vizsgálatára használják. A módszer alkalmas proteinek, nukleinsavak olvadási sajátságainak leírására, de lipid szuszpenziók fázisátalakulási hőmérséklete is vizsgálható. Az előkészített minták, melyek összetétele a mérés során változatlan marad, előre programozott módon kerülnek felmelegítésre.



A műszer egyik legfontosabb része a hőmérsékletérzékelőkkel és fűtőszerkezettel ellátott minta cella és a vele azonos térfogatú referencia cella. A cellák felfűtése egyazon időben, ugyanolyan módon történik. Amennyiben az egyik cellában hőmérsékletindukált változás jön létre a fellépő reakció hőenergia igénye a műszer kimenetén  $\Delta T$  különbségként jelentkezik. A műszer elektromos vezérlése ilyen jellegű változás detektálásakor az adott cellában a fűtőáramot  $\Delta I$ -vel annyira megnöveli, hogy a két cella közti hőmérsékleti különbség kiegyenlítődjön. A mérések során tehát a rendszer entalpiaváltozását mérik a hőmérséklet függvényében.

A kalorimetriás mérések elvégzéséhez egy Setaram Micro DSC-II kalorimétert alkalmaztunk. Minden mérés 5-80 °C hőmérsékleti tartományban történt, 850  $\mu$ l-es konvencionális Hastelloy mintatartó edényekben. Az indukált denaturáció liposzómák esetében reverzibilisnek bizonyult. Az entalpiaváltozás a görbék alatti területek számításával került meghatározásra.

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink során különböző perturbánsok (Cr(VI), PAH, droganalóg, tetrakain) membránra gyakorolt hatását vizsgáltuk elektronparamágneses rezonancia spektroszkópia és differenciális pásztázó kalorimetria segítségével. E két technika alkalmazása lehetővé teszi a membránban lejátszódó lokális és globális szerkezeti és dinamikai változások jellemzését.

1. A mutagén, karcinogén valamint szabadgyök indukáló Cr(VI) ion esetében kimutattuk, hogy jelentős membránperturbáló hatással rendelkezik. A krómkezelés hatására a különböző Sch. pombe törzsek membránjának fluiditása megnő. Kimutattuk, hogy a szülői, króm-szenzitív, és rezisztens mutáns törzsek sejtmembránjai rotációsdinamikai paraméterek tekintetében eltérő sajátossággal rendelkeznek, ami a Sch. pombe törzsek esetében a membrán eltérő lipidösszetételére utal. A Cr(VI) által indukált változás a membránok különböző régióit nem egyformán érinti, az effektus a membrán hidrofóbabb régiójában kifejezettebb. Cr(VI)-vegyület hatására a membránok fázistranzíciós hőmérséklete csökkent a szülői és a króm-érzékeny mutáns esetében, míg a króm-rezisztens törzs esetében a fázisátalakulási hőmérséklet változását nem tapasztaltuk. Méréseink eredményeként megállapíthatjuk, hogy a króm által kiváltott fluiditásváltozás függ a membrán belső szerkezetétől, és részben összefügg a króm-rezisztenciával, a szenzitivitás kialakulásában a megváltozott membránstruktúrán kívül más fiziológias folyamatok sérülése is szerepet játszhat.

2. Modell és biológiai membránon végzett EPR és DSC méréseink PAH vegyületek esetében a membrán dinamikai paramétereinek megváltozását mutatták. A változás lényegesen függ a PAH vegyületek kémiai szerkezetétől.

A vizsgálatokból kiderült, hogy az anguláris gyűrűcsoportosulású vegyületek (pirén, krizén, benzo-a-pirén) esetében a membránperturbáció csak a globális szerkezeti változásokat visszatükröző DSC mérések segítségével mutatható ki, EPR alkalmazásával a jelölők lokális környezetében effektust nem tapasztaltunk. Két illetve három benzolgyűrűt tartalmazó PAH vegyületek esetében a membrán jelentős fluiditásnövekedését tapasztaltuk, ami az általunk használt mindkét mérési módszerrel kimutatható volt.

A kísérleteinkkel igazoltuk a PAHok membránokkal való kölcsönhatását. Az indukált változások szerepet játszhatnak a vegyületcsoport egészségkárosító hatásában is.

3. DSC és EPR technikák felhasználásával sikerült igazolni, hogy a vörösvértest membrán alkalmas modell a drogok hatásának vizsgálatára.

A modellvegyületként használt tetrakain szignifikánsan csökkent a riporter molekula EPR spektrumából számítható rendparaméter értékét, valamint a membránlipidek fázistranzíciós hőmérsékletét. A DSC és EPR mérések eredményei arra is utalnak, hogy a tetrakain nemcsak a membránfehérjék, hanem a lipidrégió rotációsdinamikai paramétereit is megváltoztatja, valamint konformációváltozást indukál a hemoglobin szerkezetében is.

Az aszkorbinsav pszeudo-elsőrendű reakcióval redukálja a membránba inkorporált spin szondát. A redukció kinetikáját a tetrakain megváltoztatja, ami azt jelenti, hogy a fluiditásváltozást permeabilitás változás kíséri.

Inhalánsok (nitrohígító, Technokol) alkalmazása esetén a tetrakain által indukált változásokkal megegyező effektusokat kaptunk. Az inhalánsok

hozzáadása a vörösvértest membrán fluiditását növelte. A megnövekedett fluiditás a permeabilitás változásával járt együtt.

Dependenciában szenvedő egyénektől származó mintákon történő méréseink arra utalnak, hogy a narkotikum tartós használata megváltoztatja a membránok szerkezetét. Inhalánsok tartós „használata” a membrán kisebb mérvű, míg gyógyszerfüggőség esetén nagyobb mérvű rigidizálódását vonja maga után. Inhaláns adása a drog által már tartósan perturbált mintákhoz is indukál fluidizációt. Gyógyszerfüggőség esetén tapasztalt rigiditásnövekedés nemcsak a lipidrégióban bekövetkező átalakulással áll összefüggésben, hanem a membránfehérjék szerkezetében bekövetkező változásokkal is. Ennek igazolására további EPR kísérletek elvégzését tűztük ki célul membránfehérjék paramágneses szondával történő megjelölésével.

A droghatás modellezésére kialakított rendszer a pillanatnyi effektus leírására és értelmezésére alkalmasnak tűnik, de a dependencia hatására kialakult változások elemzéséhez azonban kiegészítő mérések elvégzésére van szükség.

Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a drogokkal, droganalógokkal végzett kísérletek előremutatóak, a vizsgálatok folytatása újabb információkkal szolgálhat a gyógyászat számára.

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. N. Farkas, M. Pesti and J. Belágyi, *Effects of hexavalent chromium on the plasma membranes of sensitive and tolerant mutants of Schizosaccharomyces pombe. An EPR study.* Biochimica et Biophysica Acta, 2003. 1611:217-222
2. N. Farkas, J. Belagyi, D. Lőrinczy, *Calorimetric and spectroscopic properties of small globular proteins (bovine serum albumin, hemoglobin) after free radical generation.* Thermochemica Acta, 2003. 404:141-148.
3. N. Farkas, D. Lőrinczy, T. Dergez, F. Kilár and J. Belagyi, *Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on erythrocyte membranes by DSC and EPR.* Env. Tox. and Phar., 2004. 16:163-168
4. Z. Gazdag, N. Farkas, Zs. Fekete, N. Hartvig, M. Nyitrai, J. Belagyi, M. Pesti, *Chromium (III) and (VI)-induced plasma membrane processes in fission yeast.* Acta Microbiol. Immunol. Hung., 2000. 47:336

## Az értekezés alapjául szolgáló absztraktok

1. N. Farkas, J. Belágyi, M. Pesti: *Effect of chromium on plasma membrane of sensitive and resistant mutants of Schizosaccharomyces pombe strains.* I. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest, 1999.
2. Z. Gazdag, N. Farkas, Zs. Fekete, N. Hartvig, M. Nyitrai, J. Belágyi, M. Pesti: *Chromium (III) and (VI)-induced plasma membrane processes in fission yeast* Magyar Mikrobiológiai Társaság XVI. Nagygyűlése, Budapest, 1999.
3. Z. Gazdag, N. Farkas, Zs. Fekete, N. Hartvig, M. Nyitrai, J. Belagyi, M. Pesti: *Chromium (III) and (VI)-induced plasma membrane processes in fission yeast* 13th International Conference of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 1999.
4. M. Pesti, K. Czako-Vér, N. Farkas, J. Belágyi,: *Background of Cr(VI) sensitivity and tolerance in fission yeast.* 1st International Fission Yeast Meeting, Edinburgh, England, 1999.
5. K. Czako-Vér, G. Böjti, N. Farkas, J. Belágyi, M. Pesti: *Investigations of Schizosaccharomyces pombe chromium(VI) sensitive and resistant mutants.* XIX.

- Internationale Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Rimini, Italy, 1999.
6. N. Farkas, M. Pesti, J. Belágyi: *A Schizosaccharomyces pombe Cr(VI) szenzitív és rezisztens mutánsainak plazmamembrán vizsgálatára*. XXIX. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 1999.
  7. N. Farkas, M. Pesti, J. Belágyi: *Effect of chromium (VI) on plasma membrane of Schizosaccharomyces Pombe strains by EPR* 5th Symposium on Instrumental Analysis, Pécs, 1999.
  8. N. Farkas Zs. Gombkötő, Zs. Fekete, J. Belágyi: *Drogok által indukált konformációváltozás erythrocyta membránon*. XXX. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2000.
  9. F. Könczöl, N. Farkas, J. Belágyi: *Drogok okozta konformációváltozás erythrocyta membránon*. XII. Rendőrorvosi Tudományos Ülés, Pécs, 2000.
  10. N. Farkas, F. Könczöl, N. Hartvig, J. Belágyi: *Tetrakain indukált dinamikai változás a sejtmembránon*. XXXI. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2001.
  11. N. Farkas, F. Könczöl, J. Belágyi: *Dynamic changes on plasma membrane induced by tetracain* 6th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, 2001.
  12. N. Farkas, M. Pesti, J. Belágyi: *Changes induced by hexavalent chromium in plasma membrane of Cr(VI)-sensitive and resistant mutants of Schizosaccharomices pombe strains*. XXIXth Annual Conference on Yeast, Smolenice, Slovakia, 2001.
  13. N. Farkas, F. Könczöl, J. Belágyi: *Narkotikum indukált konformációváltozás biológiai membránokon*. MBT XX. Kongresszusa, Budapest, 2001.
  14. N. Farkas, T. Dergez, F. Könczöl, D. Lőrinczy, J. Belágyi: *Policiklikus aromás szénhidrogének hatásának vizsgálata biológiai membránokon*. XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2003.
  15. N. Farkas, D. Lőrinczy, T. Dergez, F. Könczöl, F. Kilar, J. Belágyi: *Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on erythrocyte membranes by DSC and EPR*. VII. International Symposium on Instrumental Analysis, Pécs 2003.