

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

A primycin antibiotikum hatásmechanizmusának vizsgálata

Candida albicans élesztő sejteken

PhD értekezés

Virág Eszter Andrea

Témavezető:

Dr. Pesti Miklós

tanszékvezető egyetemi tanár

.....
Dr. Pesti Miklós

tanszékvezető egyetemi tanár

.....
Dr. Gábrriel Róbert

a Biológiai Doktori Iskola vezetője

PÉCS, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
3. IRODALMI ELŐZMÉNYEK.....	8
3.1. A primycin.....	8
3.1.1. A primycin szerkezete	8
3.1.2. A primycin hatásmechanizmusa	9
3.1.2.1. A primycin hatásspektruma.....	9
3.1.2.2. A DNS támadáspont.....	9
3.1.2.3. Enzimek, enzimindukció, mint lehetséges támadáspont.....	10
3.1.2.4. Plazma membrán támadáspont.....	10
3.1.2.5. Ioncsatorna képző funkció.....	11
3.2. <i>Candida albicans</i> modellszervezet.....	12
3.2.1. A <i>Candida albicans</i> jellemzése	12
3.2.2. A kísérletek során használt törzsek jellemzése	14
3.3. A plazma membránok funkciója	14
3.3.1. A lipid kettősréteg	15
3.3.2. A membránok lipid összetétele	16
3.3.3. A lipid-tutajok.....	17
3.3.4. A membránok molekuláris mozgásai	17
3.3.5. A membránok hőmérséklet függése, membrán fluiditás	19
3.4. Membrán fluiditás vizsgálatára szolgáló módszerek.....	22
3.4.1. „Steady-state” fluoreszcencia spektroszkópia	22
3.4.1.1. A fluoreszcens anizotrópia.....	22
3.4.1.2. A TMA-DPH fluoreszcens membrán próba.....	23
3.4.2. EPR spektroszkópia.....	24
3.4.2.1. A spin jelölt zsírsavak, mint membrán-próbák.....	26
3.4.2.2. EPR spektrumok és paraméterek	28
3.4.2.3. A spin jelölők rotációs-korrelációs ideje.....	29
4. CÉLKITŰZÉSEK	31
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
5.1. Mikroorganizmusok	32
5.2. Tápoldatok, táptalajok, oldatok	32
5.3. Anyagok	35
5.4. A törzsek fenntartása, tenyésztése	36
5.5. Sejtek gyűjtése, mosása.....	36
5.6. Szaporodási görbe felvétele és generációs idő meghatározása (Stephenson, 2003).....	36
5.7. A primycin szaporodásgátlásának meghatározása folyékony tenyészetben.....	36
5.8. A primycin MGK értékeinek meghatározása makrodilúciós módszerrel (Gyetvai és mtsi., 2006).....	37
5.9. A primycin MGK értékeinek meghatározása mikrodilúciós módszerrel (CLSI, 2008)	37
5.10. <i>C. albicans</i> protoplasztok képzésének menete (Pesti és mtsi., 2000).....	37
5.11. Primycin protoplasztólízis indukáló hatásának vizsgálata.....	38
5.12. Membrándinamikai vizsgálatok „steady-state” fluoreszcencia spektroszkópiával (MBongo és mtsi., 1997, Younsi és mtsi., 2000).....	38
5.13. Membrándinamikai vizsgálatok elektronparamágneses rezonancia spektroszkópiával	38

5.13.1. Konvencionális (V1) EPR mérések (Belágyi és mtsi., 1999)	39
5.13.2. ST-EPR (V2') mérések (Fajer és Marsh, 1982)	40
5.14. A primycin kölcsönhatásának vizsgálata különböző membránalkotókkal: <i>In vitro</i> fluoreszcencia mérések (Kunsági-Máté és mtsi., 2009b)	40
5.15. A sejtől kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel (Lee és Lewis, 1968, O'Neil és mtsi, 2004)	41
5.16. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat.....	41
5.17. Szignifikancia vizsgálatokhoz használt kétmintás t-próba	41
6. EREDMÉNYEK	43
6.1. A primycin antifungális hatásának vizsgálata	43
6.1.1. <i>C. albicans 33erg⁺</i> és <i>erg-2</i> törzsek generációs idejének meghatározása	43
6.1.2. Minimális gátló koncentrációk meghatározása mikrodilúciós módszerrel	44
6.1.3. A primycin MGK meghatározása makrodilúciós módszerrel a <i>C. albicans 33erg⁺</i> és <i>erg-2</i> törzseinél	44
6.1.4. A primycin szaporodás gátlásának vizsgálata <i>C. albicans 33erg⁺</i> és <i>erg-2</i> törzsein	45
6.2. A primycin plazma membránra kifejtett hatásának vizsgálata.....	46
6.2.1. A primycin protoplaszt lízist indukáló hatásának vizsgálata.....	46
6.2.2. <i>In vivo</i> "Steady-state" fluorimetriás membrándinamikai vizsgálatok	47
6.2.3. <i>In vivo</i> membrándinamikai vizsgálatok EPR spektroszkópiával	49
6.2.3.1. Konvencionális EPR vizsgálatok	49
6.2.3.2. ST- EPR vizsgálatok	51
6.3. A primycin A1, A2 és C1 komponensek <i>in vivo</i> membrándinamikai hatásának vizsgálata <i>33erg⁺</i> törzsen EPR spektroszkópiával.....	53
6.3.1. Konvencionális EPR vizsgálatok.....	53
6.3.2. ST- EPR vizsgálatok	54
6.4. A primycin fő membránalkotókkal való kölcsönhatásának vizsgálata <i>in vitro</i> „steady-state” fluorimetriával.....	56
6.4.1. A primycin kölcsönhatása az olajsavval	56
6.5. A primycin direkt és indirekt biológiai hatásának vizsgálata	59
6.5.1. A primycin közvetlen membránra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	59
6.5.2. A primycin közvetett, sejtfalra gyakorolt hatásának és a sejt morfológia változásának vizsgálata pásztázó elektron mikroszkóppal.....	60
7. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	61
7.1. A primycin antifungális hatásának vizsgálata	61
7.1.1. Minimális gátló koncentrációk meghatározása mikrodilúciós módszerrel	61
7.1.2. Minimális gátló koncentrációk meghatározása makrodilúciós módszerrel	61
7.1.3. Szaporodás gátlás vizsgálata.....	62
7.2. A primycin plazma membránra kifejtett hatásának vizsgálata	63
7.2.1. A primycin protoplaszt lízist indukáló hatásának vizsgálata.....	63
7.2.2. <i>In vivo</i> "Steady-state" fluorimetriás membrándinamikai vizsgálatok	63
7.2.3. <i>In vivo</i> membrándinamikai vizsgálatok EPR spektroszkópiával	64
7.2.3.1. Konvencionális EPR mérések.....	64
7.2.3.2. ST-EPR mérések	65
7.2.3.3. A konvencionális és ST-EPR mérések összevetése	66
7.3. A primycin A1, A2 és C1 komponensek <i>in vivo</i> membrándinamikai hatásának vizsgálata <i>33erg⁺</i> törzsen EPR spektroszkópiával.....	67
7.3.1. Konvencionális EPR mérések.....	67
7.3.2. ST-EPR mérések.....	68
7.3.3. ST- és konvencionális mérések összehasonlítása	69
7.4. A primycin fő membránalkotókkal való kölcsönhatásának vizsgálata <i>in vitro</i> „steady-state” fluorimetriával.....	71
7.4.1. A primycin kölcsönhatása az olajsavval	71

7.5. A primycin direkt és indirekt biológiai hatásának vizsgálata	74
7.5.1. A primycin közvetlen membránra gyakorolt hatásának vizsgálata	74
7.5.2. A primycin sejtfalra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	75
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	76
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	78
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	79
ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÁS (SUMMARY).....	88
PUBLIKÁCIÓS LISTA	90

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben a rezisztens *Candida albicans* és *nem-albicans* fajok okozta fertőzések száma erős növekedést mutatott. A primycin antibiotikum széles hatásspektrumából és sajátos hatásmechanizmusából eredően megoldást nyújthat a polirezisztens törzsek által okozott fertőzések kezelésére vagy megelőzésére.

A primycin már alacsony koncentrációban ($0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ -től) hatásos Gram pozitív baktériumokra, patogén gombákkal $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ -től, Gram negatív baktériumokkal szemben $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ -től fejt ki gátló hatását, beleértve a polirezisztens fajokat is. A primycin különböző sztatinnal kombinálva fokozottabb hatást fejt ki *in vivo* patogén élesztők és fonalas gomba fajok ellen. Jelenleg a primycin az Ebrimycin® gél hatóanyaga, melyet felszíni mikrobiális fertőzéseknél igen eredményesen használnak, mivel rezisztencia kialakulását vele szemben még nem tapasztalták. Kísérletes adatok bizonyítják, hogy a primycin a vér alakos elemeire lítikus hatást fejt ki. Mivel a primycin ilyen sokféle sejttípusra hat, hatásmechanizmusának vizsgálata ígéretes témának bizonyult.

Munkám kezdeti lépéseként meghatároztuk a primycin hatásmechanizmusát. A hatásmechanizmus meghatározása alapjául néhány korábbi kísérletes adat kiindulópontként szolgált, melyek szerint membrán permeabilitás változást és alkáli kation kiáramlást (K^+ , Rb^+ , Cs^+) írtak le primycin kezelés hatására humán eritrocitákon. Ezen adatok és a sejtek sokfélesége alapján feltételeztük, hogy a primycin hatásmechanizmus vizsgálatában a plazma membrán támadáspont irányába kell elindulnunk. Azonban hozzá kell tenni, hogy az ion kiáramlás önmagában nem jelent membrán támadáspontot. Például az azolok esetében tapasztalható ion kiáramlás, annak a következménye, hogy az ergoszterin bioszintézis egyik enzime a C14-es pozícióban lévő két metilcsoport eltávolítását végző demetiláz enzim gátlódik. Ezáltal ergoszterin helyett metilált szterinek épülnek a plazmamembránba, amelyek megváltoztatják a membrán biofizikai paramétereit és biológiai tulajdonságát, amely fokozott intracelluláris ionvesztéssel jár.

A munkám további része a primycin hatásmódjával és biológiai hatásának vizsgálatával foglalkozik. A kísérletekhez egy klinikai izolátumból származó *C. albicans* szülői törzset és az ebből előállított ergoszterin hiányos mutáns törzset használtuk. Ezek a modellszerkezetek lehetővé tették a primycin hatására bekövetkező membrán dezorganizáció és struktúra változás tanulmányozását, összehasonlító elemzését. Ismerve a modell szerkezetek pontos membrán összetételét, lehetőségünk nyílt a primycin támadáspontjának molekuláris szintű elemzésére is.

Mivel a primycin egy antibiotikum komplex, amely három főkomponensből áll, munkám részét képezte az egyes komponensek membrán hatásának vizsgálata, egymással, valamint

magával a primycinnel való összehasonlítása. Amely adatok fontos információt szolgáltathatnak a primycin esetleges ipari szintézisével kapcsolatban. Egy adott antibiotikum támadáspontjának és hatásmechanizmusának ismerete alapvető feltétel egyrészt az antibiotikum gyógyszerként való engedélyezés folyamata során, másrészt szerepet játszik az antibiotikum illetve annak félszintetikus változatainak alkalmazásában és továbbfejlesztésében.

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

$2'A_{zz}$	hiperfinom csatolási állandó
5-SASL	5-(4,4-dimetiloxazolidin- <i>N</i> -oxil)sztearinsav
amB	amfotericin-B
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DMSO	dimetil szulfoxid
EPR	elektronparamágneses rezonancia
<i>erg-2</i>	<i>C. albicans</i> ergoszterin hiányos törzse
<i>33erg⁺</i>	<i>C. albicans</i> ergoszterin termelő törzse
K	egyensúlyi állandó
MGK	minimális gátló koncentráció
MOPS	4-morfolinpropánszulfonsav
mtsi	munkatársai
OD	optikai denzitás
OD ₅₉₅	595 nm-en mért optikai denzitás
r	anizotrópia
rpm	fordulat perc ⁻¹
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSS	residual sum of squares
SEM	térhatású elektron mikroszkóp
±SD	minta szórása
ST-EPR	szaturációs transzfer EPR mérés
TMA-DPH	1-(4-trimetil-ammóniumfenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrién
T _m	fázistranzíciós hőmérséklet
τ _c	rotációs korrelációs idő
V1	1. harmonikus konvencionális EPR spektrum
V2'	2. harmonikus fázison kívüli szaturációs transzfer EPR spektrum
YPD	Yeast-extract Peptone Dextrose
ΔH	entalpia változás
ΔS	entrópia változás
ΔG	szabadentalpia változás

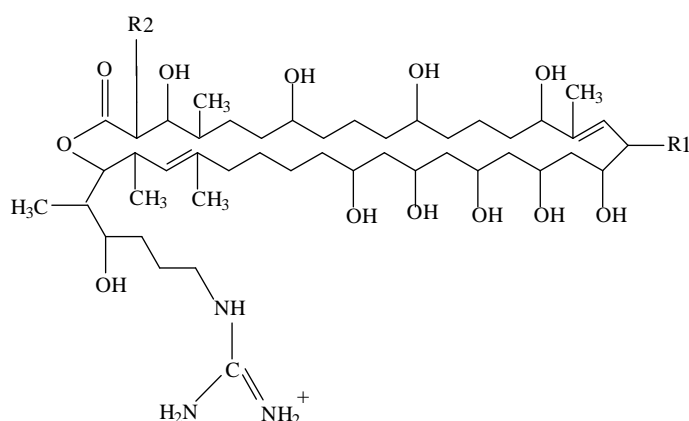
3. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

3.1. A primycin

A primycinről, mint az első magyar antibiotikumról Vályi-Nagy és munkatársai először 1954-ben a Nature-ben számoltak be. A hatóanyagot termelő törzset a viaszmony (*Galeria melonella*) béltraktusából izolálták. A primycin hőálló antibiotikum, vízben rosszul ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), szerves oldószerekben jobban oldódik (pl. metanolban $2 \mu\text{g ml}^{-1}$).

3.1.1. A primycin szerkezete

A primycin valójában egy antibiotikum komplex, amely a nem polién típusú makrolidlaktonok csoportjához tartozik. Komponenseit rétegekromatográfias módszerrel választották el. A vizsgálatok alapján a primycin több mint húsz, egymás hatását erősítő, pozitív töltésű, rokon szerkezetű (laktongyűrűs) molekulákból álló anyagkeverék. Oszlopkromatográfias módszerrel 12 vegyületet izoláltak tisztán, amelyek közül 9 szerkezetét derítették föl. Az addig megismert szerkezetű anyagok 3 alcsoportba (A, B és C) sorolhatók, terminális funkcionális csoporttól függően (1. táblázat). Igazolták, hogy az A1 komponens 50 %-ban, van jelen a keverékben. A primycin szerkezeti képletét az 1. ábra, a fő komponenseinek az R1 és R2 terminális funkcionális csoportok alkotóit pedig az 1. táblázat mutatja (Aberhart és mtsi., 1970).



1. ábra

A primycin szerkezete.

	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
R1	α-D-arabinofuranozil			H	H	H	OH	OH	OH
R2	butil	pentil	hexil	butil	pentil	hexil	butil	pentil	hexil

1. táblázat

A primycin szerkezetében megtalálható terminális funkcionális csoportok.

3.1.2. A primycin hatásmechanizmusa

3.1.2.1. A primycin hatásspektruma

A primicin egy széles spektrumú antibiotikum, amely az Ebrimycin gél® hatóanyaga. A gél terápiás alkalmazásának fő területe a pirogén bőrfertőzések megelőző kezelése. A baktériumok többségénél a primycin hatékonyságának pH optimuma pH: 8-as értéknél van.

Az Ebrimycin gélt felszíni mikrobiális fertőzések kezelésénél eredményesen használják, mivel gátolja a Gram-pozitív, Gram-negatív baktériumok és a gombák növekedését. Alacsonyabb koncentrációjú Ebrimycin® csak a Gram-pozitív baktériumokból képzett vezikulumok permeabilitását növeli meg a szubsztráttal szemben, a Gram-negatívokét nem. E különbséggel magyarázható az Ebrimycin® antibakteriális spektruma. Magasabb Ebrimycin® koncentrációk a membrán ATP-áznak gátlószerei, ezzel magyarázható a Gram-negatív baktériumokkal szemben megfigyelt növekedés gátlás. Az Ebrimycin® a Gram-pozitív baktériumokra, és a polirezistens törzsekre is baktericid hatású, a Gram-negatívokra bakteriosztatikus. A primicinnel szembeni rezisztencia kialakulását még nem írták le. *In vivo* kimutatták, hogy a primycin számos antibiotikum (penicillin, tetraciklin-származékok, sztreptomycin, neomicin) hatását fokozza (Uri és Actor, 1979, Uri, 1986, Bálint, 1987, Biro és Várkonyi, 1987, Meszaros és Vezekenyi, 1987, Papp és mtsi., 1990, Nyilasi és mtsi., 2010).

3.1.2.2. A DNS támadáspont

A primycin hatásmód kutatásánál lehetséges támadáspontként vizsgálták a DNS-t és a DNS illetve RNS polimerázt *in vitro*. A vizsgálatok szerint a primycin kölcsönhatásba lépett a DNS-el. Blum (1965) adatai szerint a primycin nem változtatta meg az izolált DNS

olvadáspontját, a poliA és poliU komplex képzését, valamint a DNS molekulák közötti komplexképzést, annak ellenére, hogy kölcsönhatásba lépett a dsDNS-sel *in vitro* (ss DNS-sel viszont nem). *Esherichia coli*-ban a primycin gátolta az RNS és DNS polimeráz I-et 100 μM -os koncentrációban, amely koncentráció biológiailag nem releváns hiszen az *E. coli*-nál mint G-negatív baktériumnál a minimális gátló koncentrációnál közel két nagyságrenddel magasabb ez a kezelési koncentráció (Blum, 1965).

A fenti eredmények nem nyújtanak érdemi adatot a DNS-nek, mint támadáspontnak vizsgálatához. Nem derül ki, hogy a primycin egyáltalán bejut-e a sejtbe.

3.1.2.3. Enzimek, enzimindukció, mint lehetséges támadáspont

A további enzimaktivitás primycin okozta változásához, néhány farmakokinetikai, toxicitási adat a következőket mutatta: patkány vérében nem volt kimutatható *Bacillus subtilis* elleni aktivitás, ha 10 g kg^{-1} -ot adtak orálisan, hasonlóan nem volt a vérben primycin aktivitás kimutatható, ha 150 mg kg^{-1} dermális kezelést kapott a patkány, egéknél az LD50 > 3000 mg kg^{-1} orális adagolás mellett, 56 mg kg^{-1} intravénás adás esetén. Ez azt jelenti, hogy állati szervezetben a gyomorból és a bőr felszínéről a primycin nem jut a vérpályába (Vályi-Nagy és mtsi., 1954).

Élő patkányban a primycin gátolta a triptofán piroláz aktivitását és ötszörösére növelte a máj tirozin aminosztransferáz aktivitását. A publikációk koncepciója szerint ezek a kísérletek feltételezték az *in vitro* kísérletek alapján a primycin–DNS kölcsönhatást és ezen keresztül az enzimindukciós folyamatokra gyakorolt hatását. A megfigyelt enzimaktivitás változások a szerzők prekonceptiós kísérlettervezése ellenére nem valószínű, hogy a DNS–primycin kölcsönhatás miatt, hanem a magas dózisú primycin adagolás hatására a membránkárosításon keresztül pleiotrop fiziológiai hatásként jöttek létre (Vályi-Nagy és Daróczy., 1967, Nógrádi, 1988).

3.1.2.4. Plazma membrán támadáspont

Minden adat arra utal, de nem bizonyítja, hogy a primycin támadáspontja a plazma membrán. Tisztázatlan viszont, hogy a primycin a membrán melyik komponensével, milyen módon lép kölcsönhatásba.

Blaskó és mtsi. (1986) vizsgálatai rámutatnak arra, hogy a primycin molekulák, szerkezetükből adódóan, egy lakton gyűrűt, egy cukor komponenst és egy guanidin csoportot tartalmazó amfifil molekulaként a mesterséges membrán kettős lipid rétegének a hidrofób rétegébe képesek behatolni és dimer formában ion csatornákat képezni. Eritrocitákat és

vörösvértesteket kezeltek primycinnel, majd mérték ^{42}K izotóp kiáramlást a sejtekből mely már $3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ primycines kezelés hatására jelentős növekedést mutatott.

Az ismert plazma membrán károsító antibiotikumok, mint például a polién antibiotikumok esetében az antibiotikum-plazmamembrán kölcsönhatás azon alapul, hogy maga a vegyület lipofil ezért be tud integrálódni a membránba. Kölcsönhatásba lép a szterinekkal addíciós komplexet képezve – a kölcsönhatás erőssége a szterin szerkezetétől függ – a kölcsönhatás eredményeképpen membrán dezorganizáció lép fel. A dezorganizáció során ionok és makromolekula aegységek vesztese következik be. (Ghannoum és Rice, 1999)

Az azol vegyületek esetében a membránt károsító hatás azon alapul, hogy C14 demetiláció gátlás történik. A demetiláció gátlás a második és következő sejtgenerációkban a metilált szterinek feldúsulását eredményezi. Mind ezek által a membránfunkció módosul és a hatóanyagok koncentrációjától függően sejtpusztulás, következik be (Ghannoum és Rice, 1999, Hori és mtsi., 1993)

3.1.2.5. Ioncsatorna képző funkció

A primycin ioncsatorna képző működése miatt koncentrációjával egyenesen arányos a *B. subtilis* sejtekből kiáramló ionok okozta vezetőképesség növekedés. Mitokondriumoknál, vörösvértesteknél szelektív ionkiáramlást okozott. Neuromuszkuláris idegsejtekben fokozta az acetil-kolin kiáramlását. Ezen kísérletek is ionvesztést mutattak ki, de nem bizonyították, hogy a primycin az ioncsatornákra hat (Mészáros és mtsi. 1979, Blaskó és Györgyi, 1981, Blaskó és mtsi., 1979, 1986, Henderson és Marshall, 1984).

A vizsgált ionok felvétele aktív transzporttal történik és így koncentrálnak a sejtben. Ezen ionok veszteséről, leadásáról nincs irodalmi adat. Ugyanakkor kísérletes tény, hogy a sejtek hypotoniás közegben folyamatosan veszítik a sejtekbe koncentrált ionokat, ami arra utal, hogy a membránbarrier nem tökéletes és fizikokémiai, nevezetesen az ozmotikus viszonyok csökkenése elegendő az ionvesztés kiváltásához.

3.2. *Candida albicans* modellszervezet

3.2.1. A *Candida albicans* jellemzése

A *C. albicans* egy oportunista patogén mikroorganizmus, amely kommenzalistaként megtalálható az emberi szervezet gasztrointesztinális és genitourinális rendszerében, valamint hozzátartozik a bőr természetes mikroflórájához is. A legyengült immunrendszer következményeként (például kemoterápiás kezelést kapó daganatos betegek, HIV fertőzöttek és újszülöttek esetében) súlyos fertőzéseket okozhat. Az okozott kórképek sokfélesége és kimenetele miatt - a gombás fertőzések és halálozások mintegy 50%-ért, valamint az élesztők által okozott belső szervi mikózisok 85%-ért felelős - az egyik legveszélyesebb humán patogén gombának tekintik (Odds, 1988, Scherer és Magee, 1990, Jurányi, 1998, Tortorano és mtsi, 2006).

A diploid *C. albicans* természetben előforduló izolátumait nagyfokú heterozigótaság jellemzi, sem szexuális, sem paraszexuális sejtciklusa nincs, illetve nem ismert. Ezért a fajban lévő genetikai információ átvitelére egyetlen lehetséges mód a szomatikus hibridizáció. Kariotipizálása alapján az izolátumok kromoszóma száma 6-8 (Berman és Sudbery, 2002).

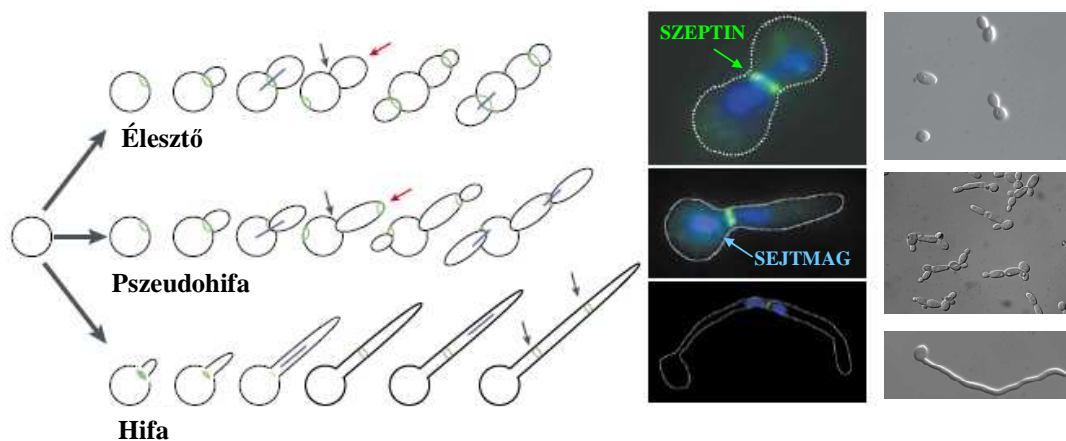
Mivel a *C. albicans* egy eukarióta szervezet a sejtbiológiai folyamatainak egy része hasonló az emberihez, ezért az ellenük alkalmazott antifungális szerek káros mellékhatásokat okozhatnak. A candidiázis kezelésére használt dózisok ezen okokból inkább fungisztatikusak mint fungicidek. A *C. albicans* kutatásokban az antifungális szerek támadáspontjának meghatározása ezért fontos szerepet tölt be (Berman és Sudbery, 2002).

Támadáspont és vegyülettípus szerint a leghatásosabb antifungális szerek: (i) a poliének (pl. amfotericin-B, nisztatin), amelyek irreverzibilisen kötődnek a gomba sejtmembránjának ergoszterin molekuláihoz; (ii) az azolok (pl. mikonazol, flukonazol), amelyek gátolják az ergoszterin bioszintézist; (iii) és a DNS-analógok (pl. 5-fluorocitozin), amelyek a gombák fehérje szintézisét gátolják DNS-szinten (Ghannoum és Rice, 1999, Berman és Sudbery, 2002).

A *C. albicans*-nak három sejt típusa létezik: (1) élesztő sejtalak (vagy blasztospóra), (2) pszeudohífa és (3) hifa (2. ábra). A gömbölyded, különálló élesztősejtek bizonyos környezeti tényezők hatására eltérő sejt típusokat hoznak létre. A sejtek szérumban csíratömlőt képeznek, amely fonalas képletekben (hífa vagy pszeudohífa) nő tovább. Az ilyen hífák hosszúak és erősen polarizáltak. Más körülmények között, például mély mikózisnál a hifa mellett kimutatható a pszeudohífa sejt típus (2. ábra). A pszeudohífák általában egymáshoz kapcsolódó ellipszoid alakú élesztősejteknek tűnnek és elágaznak. A legfontosabb

különbségek az élesztő, pszeudohífa és hífa sejtípusok között a növekedés polarizáltságában, a szeptin gyűrű és a sejtmag elhelyezkedése, valamint az anyasejthez viszonyított befűződés elhelyezkedésében van. Mindezek a leánysejtek leválásának képességét befolyásolják (2. ábra). A sejtípus váltás sejt felszíni antigén fehérje váltást is jelenti, tehát egy virulencia faktor, mely lehetővé teszi, hogy a kórokozó változtassa a sejtípusokat és ez által „ki tudjon bújni” a humán szervezet humorális és celluláris védelmi rendszere alól (Berman és Sudbery, 2002, Sudbery és mtsi., 2004).

A *C. albicans*-ra jellemző, hogy tápanyag szegény környezetben klamidospórát képez, amelyek kialakulhatnak a pszeudohifák vagy a hifák végén egyaránt. A klamidospórák nagy, megvastagodott falú sejtek, amelyeknek hő- és szárazságtűrő képessége nagy. Mivel klamidospórát a *Candida* fajok közül csak a *C. albicans* képez, ezért ezt a tulajdonságát azonosító bélyegként használják (McGinnis, 1980, Odds, 1988, Barnett és mtsi., 1983).



2. ábra

A *C. albicans* sejtípusai.

(Berman és Sudbery, 2002, Sudbery és mtsi., 2004)

A *C. albicans* rendszertanilag a fungi imperfecti csoportba tartozik, amely csoport tagjai mint eukaryota modellszervezetek kiválóan alkalmasak biokémiai, molekuláris és sejtbiológiai folyamatok tanulmányozására (Barnett és mtsi., 2000).

A *Candida* genuszba több mint 150 faj tartozik, ezek közül azonban csak néhány jelentős orvosilag. A legjelentősebb patogének a *C. albicans* után a *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. zeylandoides*, *C.*

pulcherrima, *C. norvegica*, *C. lipolytica*, *C. inconspicua* és a *C. guilliermondii* (Odds, 1988, Haynes, 2001).

3.2.2. A kísérletek során használt törzsek jellemzése

Vizsgálatainkban a humánpatogén *C. albicans* imperfekt élesztő 2 törzsét használtuk: a nisztatin érzékeny *C. albicans* $33erg^+$ adenin auxotróf törzsét és ebből nitrozoguanidin kezeléssel előállított nisztatin rezisztens, ergoszterin hiányos *erg-2* mutánst. A mutáns keresztrezisztenciát mutatott az azol vegyületek csoportjába tartozó mikonazollal szemben (Pesti és mtsi., 1981a).

Meghatározták négy polién antibiotikum (nisztatin, amfotericin B, kandicidin, piramicin) minimális gátló koncentrációját (MGK) ennél a két törzsnél. Azt tapasztalták, hogy mind a négy antibiotikum esetében az *erg-2* mutáns kevésbé volt érzékeny, mint a szülői $33erg^+$ törzs. Nisztatin esetében tizenháromszoros, amB-nél nyolcszoros, kandicidinnél és piramicinnél tizenhatszoros volt a különbség a két törzs között. Majd megvizsgálták az ergoszterin abszorpciós spektrumát, és míg a szülői törzsnél az ergoszterin jellegzetes négycsúcsú spektrumát meg lehetett határozni, addig a mutáns törzsnél ergoszterin nem volt kimutatható. Az *erg-2* mutánsban ergoszterin helyett zimoszterin és fekoszterin intermedierek felhalmozódását bizonyították, amely a $\Delta 8$ - $\Delta 7$ izomeráz enzim mutációjának tulajdonítható. A sejtek a mutáns törzs esetében az ergoszterin kiesését túlkompensálták. Az egyes foszfolipidek és zsírsavak arányát oly módon változtatták meg, hogy a végeredmény a mutáns membránjának merevebbé válása lett, melyet a szerzők *in vitro* kísérletekben lipid extraktumon bizonyítottak (Pesti és mtsi., 1985).

In vivo kísérletben protoplasztokat használva megmérték a $33erg^+$ és az *erg-2* törzseknél a plazmamembrán rend paraméter (S) értékeit. A kísérletek azt mutatták, hogy az ergoszterin termelő $33erg^+$ törzshöz képest a fázistranzíciós érték az *erg-2* mutánsban 13 °C-ról 17 °C-ra nőtt bizonyítva, hogy nem csak *in vitro*, hanem *in vivo* is megnövekedett a plazma membrán merevsége (Pesti és mtsi., 2000).

3.3. A plazma membránok funkciója

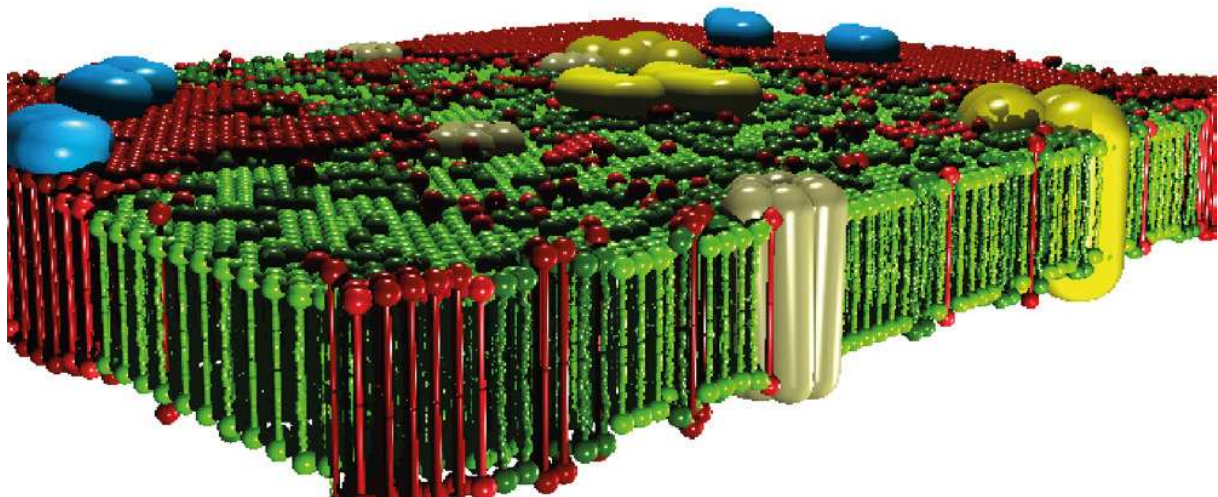
A plazma membránnak nemcsak a sejtek védekező rendszerének kialakításában van alapvető szerepük, de a transzport és a táplálkozási folyamatokban is nélkülözhetetlenek. Megakadályozza az ionok és molekulák szabad (korlátlan) diffúzióját, ugyanakkor speciális

transzportfolyamatok révén biztosítják a szükséges anyagok felvételét és eltávolítását. Ezáltal a plazma membrán hozzájárul az intracelluláris tér sajátos összetételének kialakításához, ami a sejt működéséhez szükséges, és biztosítja az anyagcserét. Központi szerepet töltenek be a sejtek közötti felismerésben, enzim katalízisben, sejt adhéziós és membrán fúziós folyamatokban (Gárdos és mtsi., 1983, Somogyi, 1989).

3.3.1. A lipid kettősréteg

1972-ben Singer és mtsi. leírták az úgynevezett folyékony mozaik membrán modellt, amely integráns fehérjékről és a kettős réteg aszimmetrikus lipid összetételéről is beszámolt. Singer és mtsi. szerint a fluid rétegben lévő lipidek összetétele homogén volt. Azóta ez a membrán modell számos fejlesztésen és finomításon esett át. A legjelentősebb változtatást 1997-ben Simons és Ikonen, és Brown és London (1997). írták le. Ellentétben Singer „homogén lipid réteg állításával” ezek a kutatók fényt derítettek arra, hogy a biológiai membránok nem formálnak homogén folyékony lipid fázist. A membrán lipidek fázis-elkülönített mikrodoménekbe szerveződnek, ún. lipid-tutajokba, amelyeknek sajátos összetétele és molekuláris mozgása van. Ezek a mikrodomének egymástól is és a környező folyékony kristály fázistól is különböznek (Eaman és Deleu, 2010).

A 3. ábra bemutatja a biológiai membránok struktúráját ismereteink jelenlegi állása szerinti ábrázolásban: a képen látható a foszfolipidek heterogenitása valamint a különböző lipid-típusok csoportosulása és domén formálása is (Eaman és Deleu, 2010).



3. ábra

A biológiai membránok modern ábrázolása.

© Seeger/Heimburg, Niels Bohr Institute.

3.3.2. A membránok lipid összetétele

A biológiai membránok sokkomponensű összetett szerkezetű rendszerek. A membrán lipidek amfifil molekulák: hidrofil feji részből és egy hidrofób zsírsavlánc régióból állnak. Ez utóbbi főként alifás szénhidrogén láncokból, aromás csoportokból vagy policiklikus struktúrájú vegyületekből áll (Helenius és Simson, 1975, Lichtenberg és mtsi., 1983).

A membrán lipidek szerkezetük és kémiai tulajdonságuk alapján 3 fő csoportra oszthatók: foszfolipidek, glikolipidek és szterinek.

A biológiai membránokban, legnagyobb számban jelen lévő lipidek a glicerofoszfolipidek, amelyek az összes lipid frakció 40-60 %-át alkotják. A glicerofoszfolipidek vázát egy glicerín alkotja, amely az *sn*-1 és *sn*-2 pozícióban észterezett, valamint a harmadik szén atomjához (*sn*-3) alkohol molekulák kapcsolódnak (kolin, etanolamin, szerin, glicerín vagy inozitol), ezekhez pedig a negatív töltésű foszfát csoport kapcsolódik és így alkotja a foszfolipid poláros feji régióját. Az *sn*-1 pozícióban lévő zsírsav lánc általában telített és 16 vagy 18 szénatomból áll. Az *sn*-2 helyen lévő láncok azonban hosszabbak és általában telítetlenek (McElhaney és Tortellotte, 1971).

A szfingolipidek a membrán lipidek egy másik igen fontos csoportja. Szfingozinból vagy fitoszfingozinból állnak, amelyhez egy hosszú (24 szénatomszámú) telített zsírsavlánc kapcsolódik. Az acetilált szfingozinokat ceramidoknak is nevezzük. Szfingomielin és glikoszfingolipidek jönnek létre, ha a ceramid hidroxil csoportjához egy kolin molekula és egy oligoszacharid molekula kapcsolódik (Eaman és Deleu, 2010).

A szterinek a membrán lipidek egy különleges csoportja. A szterinek policiklikus struktúrájú vegyületek. Az emlős membránban a fő szterin a koleszterin, azonban a gombák és protozoonok membránjában az ergoszterin. A szterinek beépülnek a foszfolipidek közé úgy, hogy hidroxil csoportjuk a lipidek poláris fejével vannak kölcsönhatásban, merev szteránvázuk pedig immobilizálja a szénhidrogénláncok azon részeit, amelyek a fejhez közelebb esnek. Ennek következtében gátolják a membrán fázisátmenetét is, mert a lipidek szénhidrogénláncai nehezebben tudnak kölcsönhatásba lépni egymással az alacsonyabb hőmérsékleten (Eaman és Deleu, 2010).

A plazma membránban jelen lévő lipid asszimetria felelős a membrán görbületéért, amely alapvető biológiai folyamatokban fontos szerepet tölt be pl. vezikula lefűződésnél vagy membrán fúzióknál (Zimmerberg és Chernomordik, 1999).

Továbbá meghatározza a membrán potenciált, amelynek kulcsfontosságú szerepe van a membrán-közvetített biológiai folyamatokban, mint pl. drogok, proteinek kötődése a membrán

felszínhez, integráns membrán fehérjék beékelődése a membránba vagy a membrán transzport folyamatába (McLaughlin, 1989).

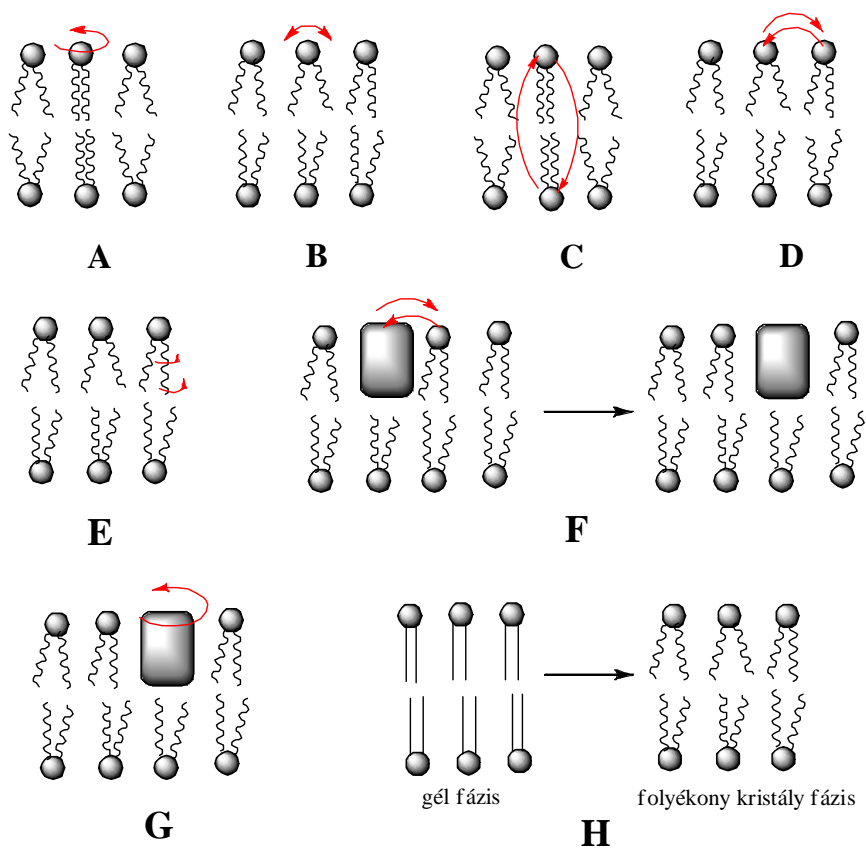
3.3.3. A lipid-tutajok

Számos, a közelmúltban megjelent tanulmány szerint, az állati és élesztő sejteknél egyaránt megfigyelhető a sejtmembrán laterális szubkompartmentalizációja. A mikrodomének egy szterineken (főként koleszterinben) gazdag típusát összefoglaló néven lipid-tutajoknak (lipid-„raft”) nevezzük. Egyaránt található bennük glikozil-foszfatidil-inozitol kihorgonyozott, a membránon át nem érő, és integráns membránfehérje is. Ezek a lipid domének folyamatosan újjászerveződnek, majd felbomlanak, pl. koleszterin domének a telítetlen foszfatidilkolin membránokban hozzávetőlegesen 10 ns-os életidővel rendelkeznek, továbbá a klatrinnal bevont „gödröcskék” életideje pár másodpercre és a sejtadhézióért felelős struktúrák életideje pedig több órára tehető. (Brown és London, 2000, Wisniewska és mtsi., 2003, Zhu és mtsi., 2006).

A lipid-tutajoknak egyes apikális (de nem bazolaterális) membránfehérjék szintézishelyről a membránokba való juttatásában és a membránban való laterális kompartmentalizáltság kialakításában tulajdonítottak szerepet állati sejtek esetében. *Saccharomyces cerevisiae*-ben a lipid-tutajok első felismert funkciója a fehérjék rendeltetési helyükre való szállítása volt. Azóta a témában számos publikáció jelent meg, és a lipid-tutajoknak számos más biológiai funkciót tulajdonítanak, többek között a jelátvitelben, sejtadhézióban és bizonyos patogének illetve toxinok kötődésében. (Damjanovich és mtsi, 2006, Zhu és mtsi., 2006, Brown és London, 2000).

3.3.4. A membránok molekuláris mozgásai

A biológiai membránok dinamikus struktúrák. A membrán kettős rétegben a lipideknek mind a pozíciója, mind az iránya folyamatosan változik. Legfőképpen a szénhidrát lánc konformáció változása következik be (néhány pikoszekundum alatt). A membránban jelen lévő lipidek mozgásai lehetnek: rotációs diffúzió, vagyis a lipid molekulák képesek saját tengelyük körül forogni, merőlegesen a membrán síkjára; anguláris mozgás; laterális diffúzió úgymint 2 szomszédos lipid molekula helycseréje és „flip-flop” mozgás vagy transzverzális diffúzió, azaz egyik rétegből a másikba való ugrás. Ez a folyamat azonban termodinamikailag nem kedvező, azaz nagyon ritkán, közel havonta egyszer fordul elő (4. ábra). A lipid-mozgások sebességét a 2. táblázat foglalja össze (Hemminga, 1983).



4. ábra

Molekuláris mozgások a biológiai membránokban. Jelölések: rotációs diffúzió (A), anguláris mozgás (B), flip-flop (C), laterális diffúzió (D), fluiditás grádiens (E), proteinek laterális diffúziója (F), anizotróp protein rotáció (G), lipid fázis tranzíció (H). (Hemminga, 1983 nyomán)

mozgás típus	korrelációs idő, τ_c
rotációs diffúzió	10^{-8} - 10^{-9} s
anguláris	10^{-6} - 10^{-8} s
fluiditás grádiens	10^{-9} -s
„flip-flop”	1-60 perc.
laterális diffúzió	10^{-8} cm ² s ⁻¹
proteinek laterális diffúziója	10^{-9} cm ² s ⁻¹
anizotróp protein rotáció	10^{-5} - 10^{-6} s
folyékony kristály fázis	10^{-9} s
gél fázis	10^{-5} s

2. táblázat

A különböző molekuláris mozgások sebessége a biológiai membránokban.

3.3.5. A membránok hőmérséklet függése, membrán fluiditás

A membrán fluiditásnak nagyon fontos szerepe van a biológiai folyamatokban: például hűtésre a membrán viszkozitása megnő és a transzport folyamatok leállnak. A fluiditás a lipidösszetétel és a hőmérséklet függvénye (Janiak és mtsi., 1979).

A rövidebb és telítetlen zsírsavakat tartalmazó membránokat nehezebb fagyasztani (alacsonyabb a fagyáspontjuk), mert a rövidebb és merevebb láncok között gyengébbek a Van der Waals erők, ezért nehezebben lépnek egymással kapcsolatba. Mivel a membrán fluiditás létfontosságú a membrán folyamatok fenntartásához, ezért a váltakozó hőmérsékleten tartózkodó sejtek szabályozzák membránjaik lipidösszetételét a hőmérséklet függvényében, a membrán fluiditás közel állandó értéken tartása érdekében. Hőmérséklet csökkenés esetén a sejtek több telítetlen zsírsavat építenek be a membránba, ezért az fluidabb lesz (Janiak és mtsi., 1979).

Vizes közegben a biológiai membránok lipid kettős rétege különböző fizikai állapotot vehet fel, amelyet a molekuláris rendezettséggel és a lipidek mozgásával lehet jellemezni (5. ábra). A fizikai-kémiai paraméterek, úgymint hőmérséklet, pH, ionerősség és más tényezők, mint pl. a lipid összetevők kémiai szerkezete vagy a szterinek jelenléte, vagy hiánya nagymértékben befolyásolja a membránok természetét. A két szélsőséges fázis, amely a biológiai membránokban létezik az ún. gél (5. B ábra) és fluid (5. C, D ábra) fázis. A gél (ún. „solid-ordered”) fázisban a lipidek egy kétdimenziós háromszögbe rendeződnek a membrán síkjában. A zsírsav láncok transz konfigurációt vesznek fel és maximum hosszúságig nyújtva vannak, amely struktúra egy rendkívül tömör lipid hálózatot eredményez. Egy ilyen fázisban a laterális diffúzió, mint mozgás erősen korlátozott. A folyékony (ún. „liquid-disordered”) fázisban a fent leírt kétdimenziós háromszög alakú rács teljesen eltűnik, mivel a lipid láncok egy rendezetlen, „transz-gauche” izomerizációt mutatnak. Ebből következik, hogy egy ilyen struktúrájú folyékony kettős réteg a laterális diffúzióknak és a rotációs diffúzióknak kedvez (Janiak és mtsi., 1979).

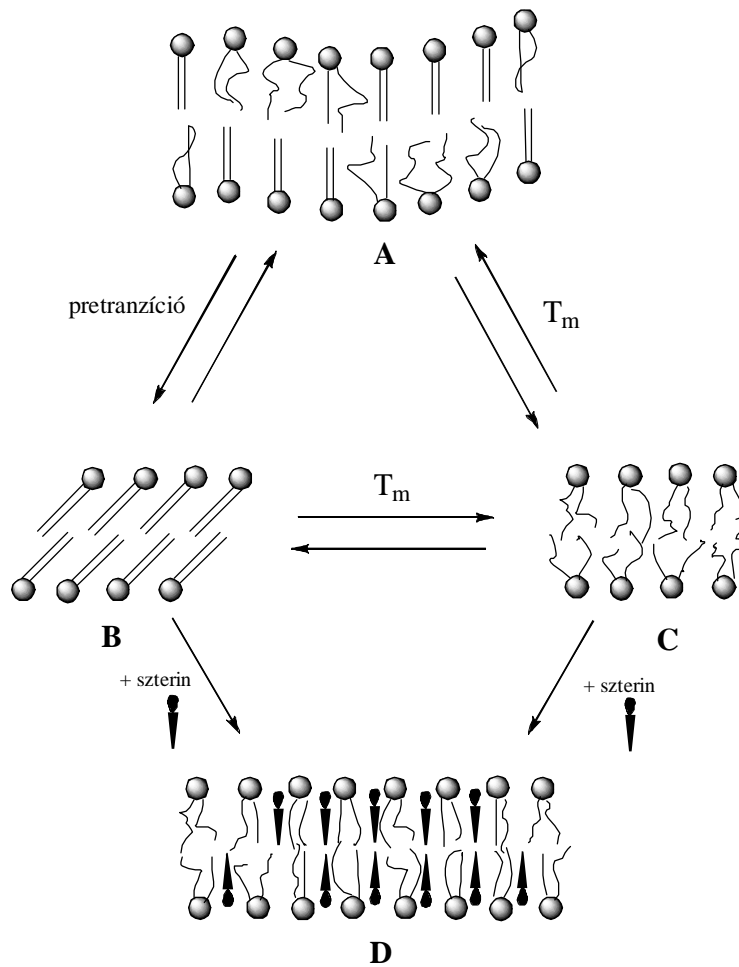
A gél és a fluid fázis közötti átmenet egy szűk hőmérséklet tartományban megy végbe, ez a hőmérséklet a fázis átmeneti hőmérséklet (T_m). Tehát a T_m az a hőmérséklet, amely szükséges a lipidek olvadásához, azaz a gél fázisból a folyékonyabb fázisba való átmenetéhez. Ez a hőmérséklet függ a lipid hidrofób régiójának szerkezetétől és meghatározható pl. EPR technikával. Néhány membrán lipid esetében, mint pl. a foszfatidilkolin a hőmérséklet emelésével a molekuláris rendezettség 2 lépcsőben alakul ki. A fő T_m előtt néhány fokkal,

létezik egy ún. pretranzíciós hőmérséklet. Ez a jelenség a lipidek feji régióinak az oldószerrel való megnövekedett reakció készségéből adódik. A foszfatidiletanolaminok például, amelyek a foszfatidilkolinoktól feji régióban különböznek, nem mutatnak pretranzíciót (McIntosh, 1980, Heimburg, 2000).

Heimburg (2000, 2007) szerint a pretranzíció és a fő fázistranzíció is részét képezik a szénhidrogénlánc olvadási átmenetének és az egyikből a másikba való átalakulásuk, egyidejűleg, magával vonja a lipidek rendezettségének és a membrán görbületének a változását is. Mindebből az következik, hogy azoknál a lipideknél, ahol ez a pretranzíciós hőmérséklet tapasztalható, van egy további lamelláris fázis. Ez az ún. „Ripple-fázis” (5. A ábra), amely egy részlegesen rendezetlen lipid fázis. Jellemző rá a periódikusan ismétlődő egy-dimenziós hullámváz a lipid kettős réteg felszínén. Feltehetően ez a felszínen megfigyelhető hullám vonulat a rendezetlen és a rendezett lipid domének periódikusan ismétlődő elrendeződéséből adódik (Janiak és mtsi., 1979, Heimburg, 2000, 2007, de Vries és mtsi., 2005).

Szterinek jelenlétében a lipid kettős rétegben jelen van egy extra lamelláris fázis, az ún. „liquid-ordered” fázis (5. D ábra). Az ilyen lipid elrendeződésekben a gél és a fluid fázis egyaránt jelen van (Ipsen és mtsi., 1987).

A „liquid-disordered” és „liquid-ordered” fázisok, valamint a „liquid-ordered” és „solid-ordered” fázisok ugyanazon lipid kettős rétegben együttesen is előfordulhatnak. Természetesen az, hogy az adott membránban melyik fázis a domináns, nagymértékben függ a membrán kémiai struktúrájától. A biológiai membránokban jelen lévő glicerofoszfolipidek nagy része az *sn*-2 helyen telítetlen zsírsavakat tartalmaz. A kettős kötések jelenléte a cisz konfigurációban egy „csomót” eredményez a szénhidrát láncban és meggátolja a lipidek tömörülését. Ebből következik, hogy a lipideknek ez a csoportja a rendezetlenebb lipid doméneket teszi ki. Ellentétben a szfingolipidekkel, amelyek hosszú telített alkil láncokat tartalmaznak és akár egymás között is létrehozhatnak van der Waals és hidrogén kötések. A szfingolipidek tehát rendezettebb lipid fázis kialakításában vesznek részt (Rock, 1990, Wang és mtsi., 2000).



5. ábra

A lipid kettősréteg különböző fizikai állapotainak sematikus rajza vizes közegben.

Jelölések: „Ripple-fázis” (A), gél vagy „solid-ordered” fázis (B),
 folyékony vagy „liquid-disordered” fázis (C),
 liquid-ordered” fázis (D).

(Eaman és Deleu, 2010 nyomán)

Összegezve, a membrán lipidek laterális szerveződése a feji régió természetétől nagymértékben függ. Azok a membrán lipidek, amelyek relatíve kicsi poláris feji részt tartalmaznak, mint pl. a foszfatidiletanolamin, egy tömörebb lipid elrendeződést engednek kialakítani, mivel kisebb térfogati akadályt kell legyőzniük (Brown és mtsi., 2002, Rappolt és mtsi., 2004).

Továbbá a szterinek különböző mértékben tudnak a különböző lipidekhez kapcsolódni, és pl. a telítetlen zsírsavakat tartalmazó lipidek esetében csökkentik, míg telített zsírsavakat tartalmazó lipidek esetében növelik a membrán fluiditását. Mindezek befolyásolják a fehérjék

szerveződését is a membránban, pl. azok a fehérjék, amelyek tartalmaznak telített alifás láncokat, a rendezettebb lipid fázisban vannak jelen (Brown és mtsi., 2002).

3.4. Membrán fluiditás vizsgálatára szolgáló módszerek

A sejtmembrán szerkezetére, rendezettségére és a belső dinamikájának vizsgálatára számos módszer ismeretes. Ide tartoznak az elektronmikroszkópos (EM) és röntgen diffrakciós vizsgálatok, a fluoreszcencián alapuló technikák, az elektronparamágneses rezonancia spektroszkópia (EPR), a mágneses rezonancia spektroszkópia (NMR), valamint a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) (Grell, 1981).

A modellszervezetek membránjának szerkezetében bekövetkező szerkezeti és dinamikai változások vizsgálatára a fent említett módszerek közül a fluoreszcens és elektronparamágneses rezonancia spektroszkópiákat alkalmaztuk.

3.4.1. „Steady-state” fluoreszcencia spektroszkópia

3.4.1.1. A fluoreszcens anizotrópia

A fény transzverzális hullám (tehát, a mágneses és elektromos térerősség vektora a terjedési irányra merőlegesen rezeg). A transzverzális hullámok polarizálhatók.

A fluorofórok fluoreszcenciára képes molekulák. A fluoreszcencia sajátosságáért, azaz az abszorpciós (excitációs) és emissziós vektorok tulajdonságaiért a fluoreszcens molekula elektron rendszere a felelős. Az abszorpciós vektor megszabja a foton abszorpciójának valószínűségét. A rendszer a legnagyobb valószínűséggel az abszorpciós vektorral párhuzamos síkban polarizált fény elnyelésére képes. A fluorofórhoz rendelt emissziós vektor a rendszer által emittált fény polarizációs síkját szabja meg. Ez a két vektor általában egybe esik, vagy nagyon kicsi szöget zár be egymással (Burger, 2002).

Ha egy fluorofórokot tartalmazó oldatot megfelelő hullámhosszúságú polarizált fényvel világítunk meg, akkor az oldatban rendezetlen irányítottsággal elhelyezkedő fluorofórok közül csak a megfelelő orientációjúak képesek abszorpcióra. Ez a jelenség a fotoszelekció. Ezt felhasználva információt nyerhetünk a fluorofórok mozgásáról, valamint a környezetükről. Ha a fluorimétert kiegészítjük 2 polarizátorral, az egyiket a gerjesztési, monokromátor és a minta, a másikat az emissziós monokromátor és a minta közé illesztjük, akkor polarizált megvilágítás mellett detektálhatjuk a fluoreszcencia tetszőleges síkban polarizált komponensét. Ezen intenzitások segítségével definiálható az additív fizikai mennyiség, a fluoreszcencia anizotrópia, amely a következőképpen adható meg:

$$r = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}}$$

Ahol I_{vv} és I_{vh} : a polarizált fluoreszcens komponensek. Az alsóindexek az excitációs és emissziós polarizátorok irányaira utalnak. Az egyenletből a teljes fluoreszcens intenzitás határozható meg (Kuhry, 1983).

A fluoreszcencia intenzitás arányos a megvilágítás intenzitásával, ezért a két intenzitás különbsége nem kizárólag a polarizációra jellemző. Tehát a fényforrás intenzitásának hatását ki kell szűrni. Ezt a 2 intenzitás különbségének a két intenzitás összegével való normálásával érhetjük el (Lakowicz, 2006).

Az anizotrópia esetében a nevező az intenzitás 3 komponensének összege, (ebből az x és y síkba eső intenzitások megegyeznek) ezért az anizotrópia additív.

Az anizotrópia meghatározásához figyelembe kell venni, hogy a készülék nem azonosan érzékeny a vertikálisan és horizontálisan polarizált fényre, ezért a mért I_{vv} és I_{vh} értékek nem hasonlíthatók. Ennek kiküszöbölésére használjuk a műszerre jellemző, G korrekciós faktort:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$$

A fluorofór mozgásterét, ha a „steady-state” mérések alapján jellemezzük, akkor egy időben átlagolt értékhez jutunk. Tehát a „steady-state” méréseket a potenciálisan felmerülő változások nyomon követésére alkalmazzuk, azaz ezek tájékoztató jellegűek. Minderről pontosabb képet a fázis fluorimetriás élettartam vizsgálatok adnak (Lakowicz, 2006). (Munkánk során a plazma membránban bekövetkező változások részletesebb elemzését EPR spektroszkópiával végeztük.)

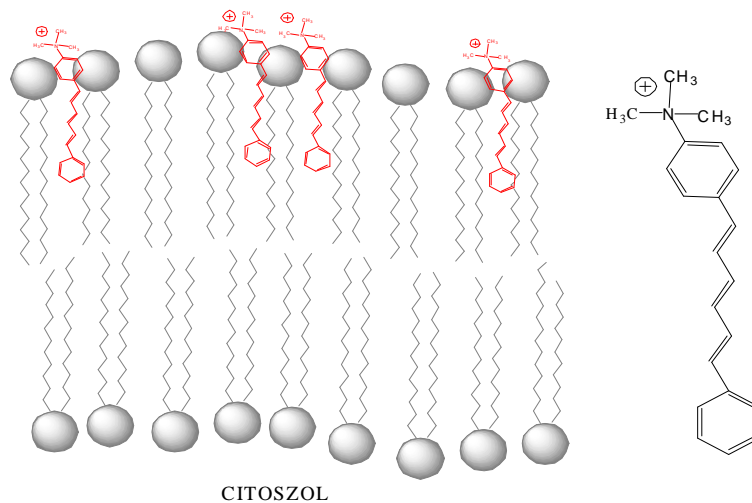
3.4.1.2. A TMA-DPH fluoreszcens membrán próba

A TMA-DPH egy olyan, a DPH fluorofórból származtatott pozitív töltésű amfifil vegyület, amelyet kifejezetten élő sejteken való membrán fluiditás vizsgálatára fejlesztettek ki. A vegyület csak akkor fluoreszkál, ha beépült a membránba (6. ábra) (Lakowicz, 2006).

Az elmúlt néhány évben a biológiai membránok fluoreszcens jelölése könnyebb feladattá vált azáltal, hogy a lipid-próbák széles választéka került forgalomba. Ezek a lipid-próbák kötődhetnek a zsírsavláncokhoz vagy magához a foszfolipidekhez is. Az, hogy a jelölő molekula a lipid kettősréteg milyen mélységében jelöl, az adott molekula oldalláncának hosszúságától függ. A TMA-DPH a membrán-víz interfázishoz közel tud elhelyezkedni azáltal, hogy az egyik fenilgyűrűhöz trimetilammónium csoport kapcsolódik. A TMA-DPH gyorsan be tud épülni a kezelt sejtek membránjába, és huzamosabb ideig ott tud maradni

specifikusan elhelyezkedve. Mivel a molekula TMA csoportja a foszfolipidek külső poláros feji régiójához épül be, a DPH része pedig a zsírsav láncok régiójába ékelődik, a vegyület alkalmazása során a negatívan töltött membrán doménekről, vagyis a membránok belső oldaláról és a lipidek fejcsoport régiójáról is egyaránt kapunk információt (Prendergast és mtsi., 1981, Kuhry, 1983, Ferretti, 1993).

Ha a fluorofór hozzákapcsolódott a foszfolipid külső feji részéhez, a fluorofór rotációs mozgásának kinetikai változása (anizotrópia változás) fogja jellemezni a membránfluiditás változást. A fluoreszcens anizotrópia a molekula rotációs diffúziójának az inverze, azaz az anizotrópia érték csökkenése, a membrán fluiditás növekvésére utal (Ferretti, és mtsi., 1993, Jourd'Heuil és mtsi., 1993).

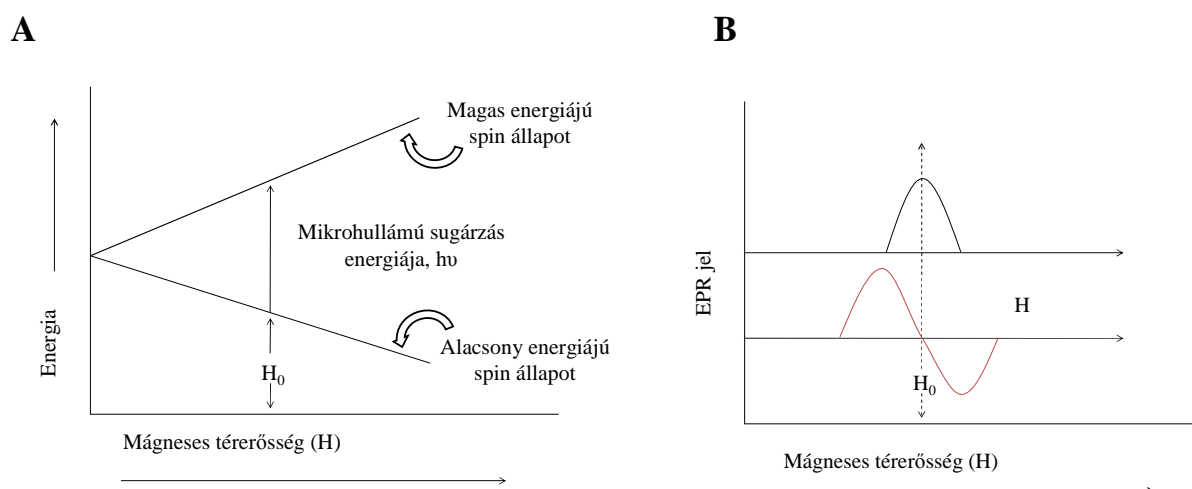


6. ábra

A TMA-DPH molekula szerkezete és elhelyezkedése a membránban. (Saját ábra)

3.4.2. EPR spektroszkópia

Az EPR technika az egyik legalkalmasabb módszer a lipidek, membránok és fehérjék szerkezeti és dinamikai tanulmányozására. Az EPR spektrométer a mintában lévő párosítatlan elektronnal rendelkező anyagok, pl. szabad gyökök vagy spin jelölők mikrohullámú energia abszorpcióját tudja mérni a mágneses térerősség függvényében (7. ábra).



7. ábra

Az elektronok spin állapotai (A) és az EPR jel (B) a mágneses térerősség függvényében.

(www.muszeroldal.hu/measurenotes/ESR.pdf)

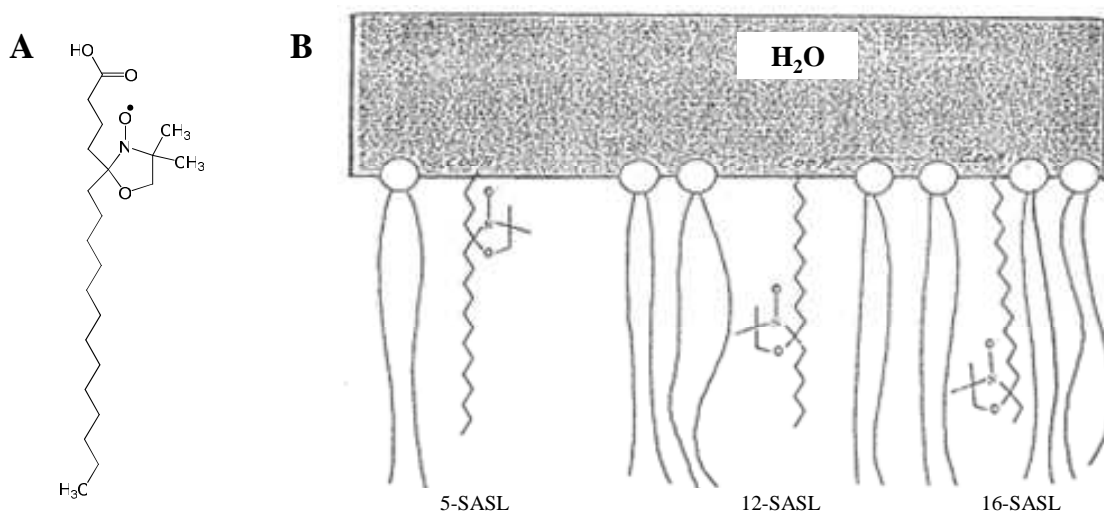
Mivel az elektronnak mágneses momentuma van, a protonhoz hasonlóan 2 energia nívóval rendelkezik. Elektronspin rezonancia lép fel, ha a külső mágneses térben „pörgő” elektron spinállapota átfordul. A nettó energia abszorpció akkor következik be, amikor a molekula párosítatlan elektronjai az alacsonyabb energia szintről a magasabb, megengedett energia szintre kerülnek. Ez az átmenet detektálható és megjeleníthető az EPR spektrum által, valamint függ a párosítatlan elektront tartalmazó molekula mennyiségétől, orientációjától, mozgásától és környezetének mágneses tulajdonságaitól. A módszer csak a kompenzálatlan spinű elektront tartalmazó vegyületek vizsgálatára alkalmas. A rezonanciaabszorpció energiáját a következőképpen lehet meghatározni:

$$E = h\nu = g\beta H_k$$

Ahol ν az alkalmazott sugárzás rezgésszáma, h a Plank-állandó, g a spektroszkópiai felhasadási faktor (amely általában 2 körüli érték, a szabad elektronnál 2,0023) és függ a molekula és a kristályszerkezettől, β a Bohr magneton és H_k a külső mágneses tér erőssége. Az EPR készülék a konstans frekvenciájú elektromágneses sugárzás mellett a mágneses teret változtatja. Az EPR spektrum a mikrohullámú energia abszorpciós spektrum első deriváltja a mágneses térerő függvényében ábrázolva (Burger, 2002).

3.4.2.1. A spin jelölt zsírsavak, mint membrán-próbák

A membrán vizsgálatokhoz gyakran használnak olyan zsírsavakat, melyek szénhidrogén-láncának valamelyik C atomjához nitroxil gyök (NO^\bullet) van kovalensen kapcsolva. A zsírsav-jelölők a foszfolipek hossz tengelyével párhuzamosan helyezkednek el. A nitroxil gyökök pozíciójának változtatásával lehetőség nyílik a lipidek szerkezetének, illetve változásának nyomon követésére a membrán különböző mélységeiben. Ilyen spin jelölők pl. az 5-, 7-, 12- és 16-SASL-k (doxilsztearinsavak), amelyek elhelyezkedése a membránban jól ismert (8. ábra). (Az elnevezésüket az alapján kapták, hogy a nitroxil gyök a zsírsav lánc hányadik C atomjához kapcsolódik.) Az 5 és 7-SASL a lipidek poláros, feji régiójáról szolgáltatnak információt, míg a 12 és 16-SASL a lipid kettősréteg belső, hidrofób részének állapotát tükrözik.

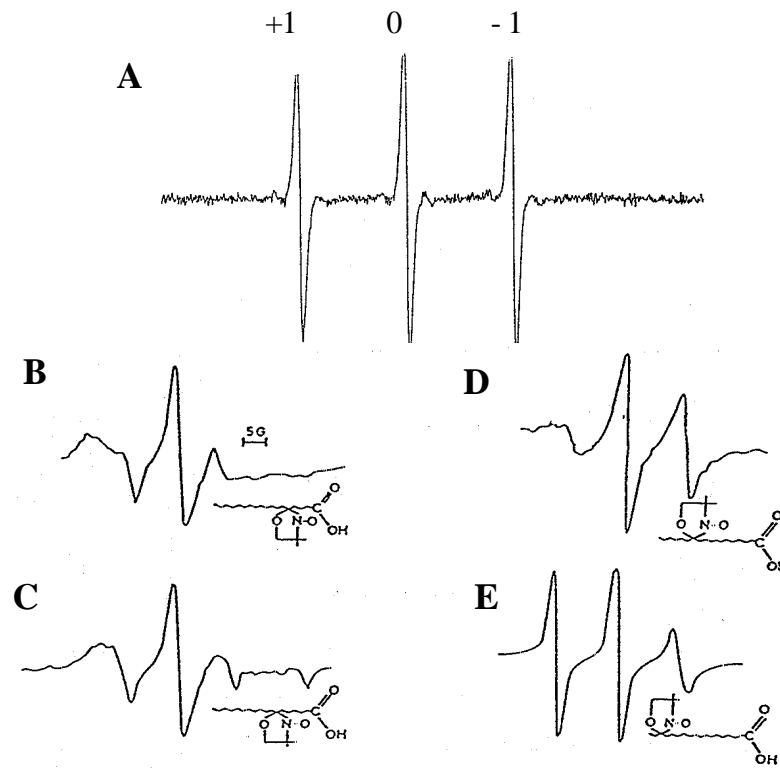


8. ábra

Az 5-SASL szerkezete (A) és az 5, 12 és 16-SASL-k elhelyezkedése a liposzóma membránban (B) (Hoebeke, 2000).

A zsírsavak karboxil csoportja és a szénhidrogén lánc nitroxil gyököt tartalmazó C atomja közötti távolságot kiszámították, feltételezve, hogy a molekula lineárisan nyújtott állapotban van jelen. Ez alapján a molekuláris távolság rendre 8, 10,5, 17 és 21,5 Å az 5-, 7-, 12-, 16-SASL-k esetében. A metanolban oldott 5-, 7-, 12-, 16-SASL-k EPR spektruma 3 szimmetrikus abszorpciós vonalból áll (mivel a nitroxil gyök magspinje a mágneses térben

három lehetséges orientációval rendelkezik, $m_l = +1, 0, -1$), amelyek szinte azonos távolságúak (mágneses mértékegységben mérve) és intenzitásuk is hozzávetőlegesen azonos (9. A. ábra) .



9. ábra

EPR abszorpciós spektrumok. Jelölések: Metanolban oldott 5-SASL (A), Lipidbe beágyazott 5-SASL (B), 7-SASL (C), 12-SASL (D) és 16-SASL (E) EPR spektrumai. (Hoebeke, 2000)

Az EPR spektrum érzékeny a spin jelölők rotációs mozgására. Drasztikus változás következik be a spektrumban, ha a paramágneses rész elmozdul (ilyen jelenség pl. akkor jön létre, ha a mintában lévő paramágneses vegyület gyorsabb vagy lassabb mozgást végez).

Attól függően, hogy a nitroxil gyök hol helyezkedik el a membránban, a spektrum képe a különböző membrán mélységek dinamikáját és rendezettségét tükrözi (9. B-E. ábra).

Hoebeke és mtsi., 2000 dimirisztol foszfatidilkolin liposzómákba ültettek 5-, 7-, 12- és 16-SASL-ket és elemezték a jelölők EPR spektrumait. A liposzómákat alkotó lipidek poláris feji része, amelyről az 5- és 7-SASL szolgáltatja az információt egy merev és rendezett

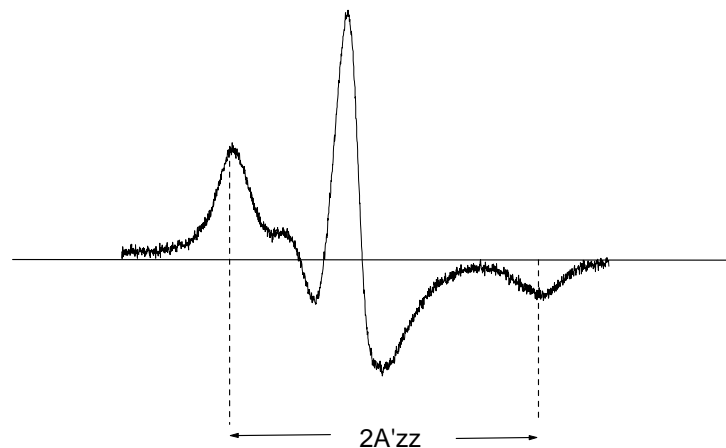
struktúrát mutatott (9. ábra, B és C), míg a 12- és 16-SASL-el jelölt hidrofób belső membrán részek fluidak voltak (9. ábra, D és E) (Hoebeke, 2000).

3.4.2.2. EPR spektrumok és paraméterek

A lipid rendszerekben és biológiai membránokban anizotróp molekuláris mozgások vannak jelen. Az EPR spektrum alakja függ a szondamolekula forgásának frekvenciájától (pontos megfogalmazással: a szondamolekula rotációs diffúziójától).

A disszertáció alapjaként szolgáló vizsgálatainkban az 5-SASL-el jelölt minták konvencionális és szaturációs transzfer (ST)-EPR spektrumait elemeztük ki.

A konvencionális méréseinknél az alacsony mikrohullámú teljesítés mellett az 1. harmónikus fázison belüli jelet detektáljuk (V1 spektrum), amelynek képe a 10. ábrán látható.



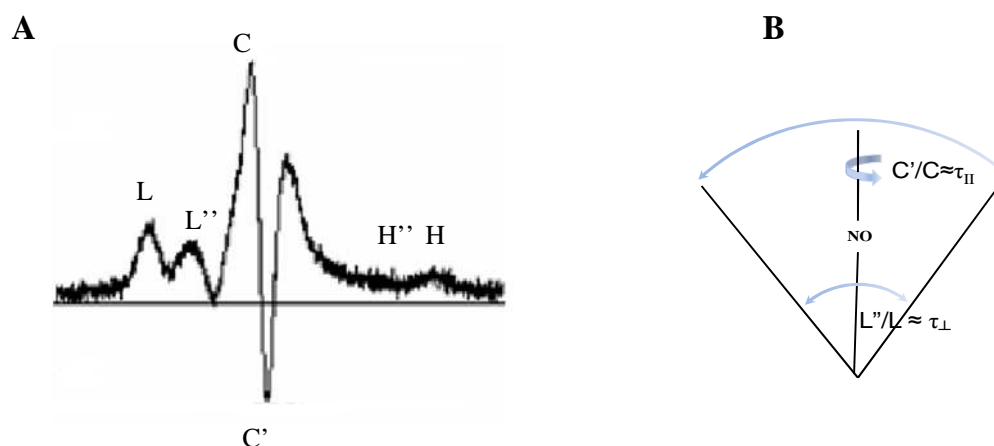
10. ábra

A V1 spektrum és a $2A'_{zz}$ spektrális paraméter meghatározása. (Saját ábra)

Az értékelés során a V1 spektrumok magasterű, és alacsonyterű szélső értékeit, amely a spinjelölő hiperfinom csatolási állandója ($2A'_{zz}$), vettük figyelembe. A $2A'_{zz}$ a membránokban lejátszódó változások jellemzésére használt egyik leggyakoribb paraméter, amely egy olyan anizotróp mozgást jellemez, ahol a szondamolekula a hossz tengelye körül egy β nyílásszögű kúpon belül mozog. Ez a nyílásszög az S (rend paraméter) ismeretében kiszámítható (Goldman és mtsi., 1972, Israelachvili és mtsi., 1974, Gaffney 1976, Marsh 1980, Farkas és mtsi., 2003).

Az ST-spektroszkópia egy nem lineáris elektron paramágneses rezonancia módszer, amely képes a spin jelölt zsírsav rotációs diffúzióját μ s vagy lassabb időskálán detektálni. A

módszer azon az elven alapul, hogy az ST-EPR spektrum (V2' spektrum) integrálja a spin jelölő párosítatlan elektronjának rács-relaxációjára érzékeny, amely függ a jelölő rotációs korrelációs idejétől. Bizonyos mikrokörnyezetben a spin jelölőnek relaxációs ideje μs -s skálán mozog. A spin jelölő spektrumának paraméterei függenek a jelölő mikrokörnyezetének polaritásától, szerkezetétől és dinamikájától. Az V2' spektrumból a spin jelölők többféle korrelációs ideje határozható meg. Az ST-mérés során magas mikrohullámú teljesítmény mellett a 2. harmónikus fázison kívüli jelet detektáljuk. Ennél a teljesítménynél szaturációs kondíciók mellett a spin rendszer nem képes a tér modulációt követni és ez fázis eltolódásként mutatkozik a jelben. Az V2' spektrum középső csúcsaránya, $C'/C \approx \tau_{\parallel}$, a spin jelölő anizotróp mozgását („forgását”) jellemzi a molekula saját hossz tengelye körül. A spektrum $L''/L \approx \tau_{\perp}$ és H''/H csúcsarányai (11. A ábra) magának a hossz tengelynek korrelációs mozgását, illetve idejét határozzák meg (Krinichnyi, 1991, Hemminga és mtsi., 1999, Marsh, 2007)



11. ábra

5 SASL V2' spektrumának képe és spektrális paraméterei (A),
 valamint a paraméterekhez tartozó
 molekuláris mozgások (B).

(Saját ábra)

3.4.2.3. A spin jelölők rotációs-korrelációs ideje

A biológiai rendszerekbe bevitt spin jelölők mozgékonyasága jellemezhető a rotációs korrelációs idővel (τ_c). (A rotációs korrelációs idő alatt azt az időt értjük, amely alatt a szabadgyök vagy molekula kitüntetett tengelye egységnyi térszöggel elfordul). A lipid

rendszerek és membránok erősen rendezett struktúrák, a bennünk létrejövő molekuláris mozgás sebessége változhat az „igen lassú” ($\tau_c \approx 10^{-4}$ s) mozgásoktól, mely a gélszerű rendszerekben tapasztalható, a „gyors” ($\tau_c \approx 10^{-10}$ s) mozgásokig, amely pedig a folyékony kristály állapotra jellemző. A konvencionális EPR, amely megközelítőleg a 10^{-12} - 10^{-9} s nagyságrendű molekuláris mozgásokra érzékeny, kiválóan alkalmas a folyékony kristály szerkezetű membránok, vagy membrán fázisok tanulmányozására (Hemminga, 1983).

A membránokban lezajló „igen lassú” molekuláris mozgások nyomon követésére viszont az ST-EPR a megfelelő módszer, amely 10^{-8} - 10^{-3} s-os nagyságrendű mozgásokra érzékeny (Hemminga és mtsi., 1983).

A konvencionális és ST-EPR módszerekkel nyomon lehet követni szinte az összes molekuláris mozgást (ld. 4. ábra és 2. táblázat), amely a membrán rendszerekben megy végbe. Azonban a spin jelölők rotációs mozgásának természete anizotróp lipid és membrán rendszerekben nagyon összetett lehet. Általában az anizotróp Brown reorientációhoz és a spinjelölő mozgásának meghatározásához három független diffúziós koefficiens (vagy három rotációs korrelációs idő) szükséges (Hemminga, 1983).

4. CÉLKITŰZÉSEK

A primycin támadáspont és hatásmechanizmus felderítésére a következő, egymásra épülő kísérletsorozatot terveztük abból a célból, hogy a primycin élesztő sejtek *in vivo* kölcsönhatásának adatait figyelembe véve meghatározzuk a primycin plazma membránra gyakorolt hatását két biofizikai mérési módszert alkalmazva. A részletesen jellemzett, ergoszterin tartalmú (*33erg*⁺) és ergoszterin hiányos (*erg-2*) törzsekre azért esett a választás, mert ezen törzsek alkalmazásával felvilágosítást kaphatunk arra, hogy az eltérő plazma membrán összetétel milyen módon befolyásolja a kölcsönhatásra. Mivel a primycin egy többkomponensű elegy, ezért indokoltnak láttuk fő komponenseinek plazma membránra gyakorolt hatásának vizsgálatát. Választ kerestünk arra is, hogy a vizsgált *C. albicans* fő membránkomponensei közül, az ergoszterinnel (71 %-a a szterinkomponenseknek), a foszfatidilkolinnal (53,9 %-a a foszfolipideknek) és az olajsavval (35 %-a a zsírsavaknak) kölcsönhatásba lép-e a primycin. A fenti eredmények ismeretében a primycin-plazma membrán kölcsönhatás biológiai következményei, a barrierfunkció és a sejt morfológiai hatás vizsgálatát végeztük el.

1. A primycin antifungális hatásának vizsgálata a szülői (*33erg*⁺) és ebből előállított ergoszterin-mutáns (*erg-2*) törzsekre. A primycin minimális gátló koncentrációinak meghatározása makrodilúciós és mikrodilúciós módszerekkel, valamint a primycin szaporodás gátlás vizsgálata.

2. A primycin *33erg*⁺ és *erg-2* törzsek plazma membránjára kifejtett hatásának vizsgálata *in vivo* „*Steady-state*” fluoreszcens és EPR spektroszkópiákkal.

3. A primycin A1, A2 és C1 komponenseinek *in vivo* membrándinamikai hatásának vizsgálata *33erg*⁺ törzsön EPR spektroszkópiával.

4. A primycin fő membránalkotókkal való (olajsav, ergoszterin, foszfatidilkolin) kölcsönhatásának vizsgálata *in vitro* „*steady-state*” fluorimetriával.

5. A primycin biológiai hatásának vizsgálata. Közvetlen hatása a plazma membránra és közvetett, sejt morfológiára kifejtett hatásának vizsgálata.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Mikroorganizmusok

Két mikroorganizmus törzssel dolgoztunk, amely törzsek adatait a 3. táblázat foglalja össze. Az *erg-2* törzs egy ergoszterin hiányos mutáns, ami az adenin auxotróf, ergoszterint termelő vad típusú *33erg⁺* törzsből lett előállítva (Pesti és mtsi., 1981).

Faj	Törzs	ATCC kód	Jellemzők
<i>Candida albicans</i>	<i>33erg⁺</i>	ATCC44829	ade ⁻ , ergoszterin termelő
<i>Candida albicans</i>	<i>erg-2</i>	ATCC44831	ade ⁻ , ergoszterin deficiens

3. táblázat

C. albicans modellszervezetek adatai

5.2. Tápoldatok, táptalajok, oldatok

A táptalajok összetétele mindenben azonos a tápoldatok összetételével, kivétel, hogy 2% agar-agar is tartalmaznak pH-juk pedig 5,6.

RPMI-1640 tápoldat, pH 7,0 (Sigma-Aldrich)

A tápoldat kiegészítői: RPMI-1640 vitamin oldat (Sigma), RPMI-1640 aminosav oldat (Sigma), Na-bikarbonát, L-glutamin, MOPS, 50 mg l⁻¹ adenin.

YPD tápoldat, pH 6,5

élesztőkivonat	1%
pepton	2%
glükóz	2%
adenin	50 mg liter ⁻¹

0,1 M-os Na-foszfát puffer, pH 7,2

28 ml 0,2 M NaH₂PO₄

72 ml 0,2 M Na₂HPO₄

Desztillált vízzel kiegészítve 400 ml-re

2,5 %-os glutáraldehid oldat

90 ml 0,1 M Na-foszfát puffer

10 ml 25 % glutáraldehid

2 %-os ozmium-tetroxid-oldat

0,2 g OsO₄

100 ml desztillált víz

(Sötétben, +4°C-on tároltuk.)

0,6 M-os KCl-oldat

22,368 g KCl-ot 500 ml desztillált vízben oldunk fel.

Fiziológiás sóoldat

9 g NaCl-ot 1000 ml desztillált vízben oldunk fel.

Sörensen foszfát puffer, pH: 6,5

Reagensek:

„A” oldat: 0,2 M dinátrium-hidrogén foszfát törzsoldat

Na₂HPO₄ X 2 H₂O 35,61 g

vagy Na₂HPO₄ X 7 H₂O 53,65 g

vagy Na₂HPO₄ X 12 H₂O 71,64 g

desztillált vízzel kiegészítve 1000 ml-re

„B” oldat: 0,2 M nátrium-dihidrogén foszfát törzsoldat

NaH₂PO₄ X H₂O 27,60 g

vagy NaH₂PO₄ X 2 H₂O 31,21 g

desztillált vízzel kiegészítve 1000 ml-re

pH 6,5-ös pufferhez: 15,75 ml „A” oldat

34,25 ml „B” oldat

Sejtfalbontó enzim oldat

*„csigaenzim” 2 %

Trioderma harzianumból izolált lizáló enzim (Sigma) 0,2 %

0,6 M-os KCl-ban feloldva.

A sejtfalbontó oldatot miután a komponensei feloldódtak, 10 percig centrifugáltuk 10000 fordulát perc^{-1} -es fordulatszámom (Heraeus Multifuge 3S-R, rotor: #3334), majd átöntöttük steril falkoncşőbe, hogy a kiülepedett szennyeződésekől megszabadítsuk.

*, „*Csigaenzim*”: *Helix pomatia* szárított gyomornedv preparátum. A preparátum a Szegedi Tudomány Egyetem, Természettudományi és Informatikai karának, Mikrobiológiai Tanszékén készült.

Primycin törzsoldatok

25,6 mg primycint 1 ml DMSO-ban oldottunk fel. Ebből felező hígítást készítettünk DMSO-val a 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 mg ml^{-1} törzsoldatokhoz. A törzsoldatok mindig 1%-ban kerültek a mintákba.

TMA-DPH törzsoldat (2 mM)

4 mg TMA-DPH-t feloldottunk 4,332 ml dimetil-formamidban.

Sötétben, + 4°C-on tároltuk. A TMA-DPH törzsoldat mindig 1 %-ban került a mintába.

5-SASL törzsoldat (13 mM)

5 mg 5-SASL -t oldottunk fel 1 ml etanolban.

-25°C-on tároltuk.

5.3. Anyagok

anyag neve	összegképlet	mol. tömeg, g mol ⁻¹	gyártó cég
adenin	C ₅ H ₅ N ₅	135,13	Sigma
agar-agar	-----		Merck
amB	C ₄₇ H ₇₃ NO ₁₇	924,08	Sigma
bacto-pepton	-----		Difco
dinátrium-hidrogén foszfát	Na ₂ HPO ₄	141,96	Reanal
5-SASL	C ₂₂ H ₄₂ NO ₄	384,57	Sigma
élesztő kivonat	-----		Merck
ergoszterin	C ₂₈ H ₄₄ O	396,66	Sigma
etanol, 96%	CH ₃ CH ₂ OH	46,07	Spektrum-3D
glükóz	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	Sigma
foszfatidilkolin	-----	760,09 (átlag)	Sigma
kálium-klorid	KCl	74,56	Reanal
L-glutamin	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	246,14	Sigma
MOPS	C ₇ H ₁₄ NNaO ₄ S	231,25	Sigma
nátrium-bikarbonát	CHNaO ₃	84,01	Sigma
nátrium-klorid	NaCl	58,44	Reanal
nátrium-dihidrogén foszfát 2-hidrát	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	156,02	Reanal
N,N-dimetil-formamid	C ₃ H ₇ NO	73,09	Sigma
olajsav	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,46	Sigma
*primycin (komplex)	C ₅₅ H ₁₀₇ N ₃ O ₂₁ S	1178,5 (átlag)	PannonPharma Kft.
primycin A1	C ₅₉ H ₁₁₄ N ₃ O ₁₇ ⁺	1137,55	PannonPharma Kft.
primycin A2	C ₆₀ H ₁₁₆ N ₃ O ₁₇ ⁺	1151,57	PannonPharma Kft.
primycin C1	C ₅₄ H ₁₀₆ N ₃ O ₁₃ ⁺	1005,43	PannonPharma Kft.
TMA-DPH	C ₂₁ H ₂₄ N · C ₇ H ₇ O ₃ S	461,62	Csertex

4. táblázat

Felhasznált anyagok.

*A PannonPharma Kft. által 2006.11.07-én részünkre bocsátott 8,08 g kristályos primycin minta. Az átadott dokumentáció alapján a minta hatóanyag tartalma 865,03 E mg⁻¹. A mintát +4 °C-on tároltuk.

5.4. A törzsek fenntartása, tenyésztése

A sejteket YPD táptalaj felületén Petri-csészére kioltva tenyésztettük 30 °C-on, minden héten friss tenyészetet készítettünk. A kísérleteink során mindig 1 napos előkultúrával dolgoztunk. A tenyészetek rázatása 30 °C-on és 150 fordulat perc^{-1} fordulatszámon történt. A kezdeti sejtsűrűség OD_{595} -ön: 0,12 volt (ez 4×10^6 sejt ml^{-1} -nek felel meg). Az OD -t Spectronic® Genesys™2 spektrofotométerrel mértük. A méréseket középlogaritmikus stádiumban lévő sejtekkel végeztük. A törzsek tartós tárolása 50 %-ban glicerint tartalmazó tápoldatban -80 °C-on kétévenkénti felújítással történt (Spencer, 1996).

5.5. Sejtek gyűjtése, mosása

A 100 ml térfogatú középlogaritmikus tenyészetet 3000 fordulat perc^{-1} (1017 g) fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk (Heraeus Multifuge 3S-R, rotor: #3334 centrifugával), majd kétszer mostuk fiziológiás sóoldatban (protoplasztok esetében 0,6 M-os KCl oldatban) ugyanazon centrifugálási paraméterek mellett.

5.6. Szaporodási görbe felvétele és generációs idő meghatározása (Stephenson, 2003)

Szilárd táptalajon nevelt előkultúrából 100 ml folyékony tenyészetet készítettünk. A kezdeti OD_{595} -t 0,1 re állítottuk be. A tenyészeteket ráztuk és 3 óránként mintát vettünk, OD_{595} -t mérünk, és sejtszámolást végeztünk Bürker-kamrával. 3 párhuzamos mérést végeztünk. A számolásnál, 10^7 nagyságrendű milliliterenkénti sejtszámnál tízszeres, 10^8 -nál százszoros hígítást alkalmaztunk.

A generációs időt a következő egyenlet alapján határoztuk meg:

$$k = \frac{\log(N) - \log(N_0)}{t} \quad \text{és} \quad t_{\text{gener}} = \frac{0,301}{k}$$

Ahol N : a sejtszám a középlogaritmikus fázis kezdetekor, N_0 : a sejtszám a középlogaritmikus fázis végén és t : a 2 mintavétel között eltelt idő.

5.7. A primycin szaporodásgátlásának meghatározása folyékony tenyészetben

100 ml-es lombikokban 20-20 ml tenyészetet ráztunk. A tenyészetekhez hozzáadtuk a

megfelelő primycin törzsoldatokat (0,8- 25,6 mg ml⁻¹). 3 óránként megmértük a tenyészetek OD₅₉₅-át. Az OD eredményeket grafikonon ábrázoltuk az idő függvényében.

5.8. A primycin MGK értékeinek meghatározása makrodilúciós módszerrel (Gyetvai és mtsi., 2006)

5 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendáltunk fel előkultúrán növesztett kis telepekből vett sejteket. Beállítottuk a sejtsűrűséget OD₅₉₅-ön 0,12 értékre, ez megfelel 4 x 10⁶ sejt ml⁻¹ sejtsűrűségnek. Ebből 2000-szeres hígítást készítettünk, hogy elérjük a 2 x 10³ sejt ml⁻¹ –es sejtszámot. A sejtuszpenzióból egy-egy mintához 1,35 ml-t mértünk ki félkémcsövekbe. Ehhez adtuk hozzá 150 µl térfogatban az adott primycin törzsoldatot, amely így tízszeresére hígult. (Ennél a kísérletnél a primycin törzsoldatból készült hígításokat tápoldattal készítettük) 48 óra elteltével mértük a szuszpenziók OD₅₉₅ értékeit.

5.9. A primycin MGK értékeinek meghatározása mikrodilúciós módszerrel (CLSI, 2008)

A kísérlet során a ferde táptalajon két napig növesztett sejteket lemostuk 3 ml desztillált víz hozzáadásával. Ezt követően Bürker-kamrával, beállítottuk a sejtszámot 10⁵ sejt ml⁻¹-re. 0,8-6,4 mg ml⁻¹ primycin törzsoldatokat 50-szeresére hígítottuk RPMI tápoldatban. A microplate lemezre a következő módon vittük fel: minden üregbe 100 µl primycin oldatot és 100 µl sejtuszpenziót pipettáztunk. A lemezt 48 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A lemezek leolvasása MULTISKAN EX PRIMARY EIA V. 2.3 műszerrel történt szobahőmérsékleten λ=595 nm hullámhosszon.

5.10. *C. albicans* protoplasztok képzésének menete (Pesti és mtsi., 2000)

Az EPR és a fluoreszcens membránjelölő molekulák plazma membránba való bejutásának megkönnyítése érdekében, a sejtfal emésztésére volt szükség.

100 ml középlogaritmusos stádiumú tenyészet 50-50 ml-ét steril centrifugacsövekbe szétosztottuk, majd centrifugáltuk és mostuk a sejteket. A tisztított sejtekhez 5-5 ml sejtfalbontó enzimet mértünk. Rázógépben 37 °C-on 80-90 fordulat perc⁻¹ fordulatszámmal kevertettük egy órán keresztül. Közben fénymikroszkóp segítségével 15 percnként ellenőriztük a protoplasztok állapotát, hogy elkerüljük a sejtörmelékek feldúsulását a mintákban. (Erre azért volt szükség, mert a különböző csigaenzim preparátumok eltérő hatékonysággal bonthatják a sejtfalat.)

5.11. Primycin protoplasztízis indukáló hatásának vizsgálata

Beállítottuk a protoplasztszámot 10^8 sejt ml^{-1} -re. A tenyészetekhez hozzáadtuk a primycin törzsoldatokat és $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. Félóránként sejtszámolást végeztünk Bürker-kamrával, és meghatároztuk a minták OD_{595} -át.

5.12. Membrándinamikai vizsgálatok „steady-state” fluoreszcencia spektroszkópiával (MBongo és mtsi., 1997, Younsi és mtsi., 2000)

Méréseinkhez 10^8 sejt ml^{-1} protoplaszt szuszpenziót készítettünk, amelyet 15 percig kezeltünk $128\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ primycinnel. A mintákat 2-szer mostuk, majd TMA-DPH fluorofórral jelöltük 5 percig, óvatos keverés mellett, sötétben tartva.

Méréseinkhez termosztálható mintatartóval felszerelt Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluorimétert használtunk. Az excitációs hullámhosszt $\lambda=340$, az emissziós hullámhosszt $\lambda=430$ nm-en detektáltuk. A réseket mind a gerjesztési, mind az emissziós oldalon 5 nm-re állítottuk be. Meghatároztuk a fluoreszcens anizotrópiákat 0 és $35\text{ }^\circ\text{C}$ között $5\text{ }^\circ\text{C}$ -ként haladva.

5.13. Membrándinamikai vizsgálatok elektronparamágneses rezonancia spektroszkópiával

Méréseinkhez 10^8 sejt ml^{-1} protoplaszt szuszpenziót készítettünk, amelyet 15 percig kezeltünk 0 - $128\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ primycinnel illetve primycin A1, A2 és C1 komponensekkel. A mintákat kétszer mostuk, majd $500\text{ }\mu\text{l}$, 10^8 sejt ml^{-1} protoplaszt szuszpenzióhoz $3\text{ }\mu\text{l}$ -t adtunk az 5-SASL törzsoldatból. A mintákat 3 percig jelöltük, félpercenkénti kevergetéssel.

A méréseket diTC 2007 hőmérsékletszabályozóval ellátott ESP 300E spektrométerrel (Bruker BioSpin, Germany) végeztük. A hőmérsékletet $\pm 0,2\text{ }^\circ\text{C}$ pontossággal tudtuk meghatározni.

A spektrométer OS 9 operációs rendszert használ, a tárolt fájl az MS-Kermit program segítségével alakítható át IBM operációs rendszerű fájlá. Az IBM fájlokat KONV_DAT program segítségével ASCII kódú szöveges fájlá konvertáltuk. A spektrumok kiértékeléséhez a laboratóriumban kifejlesztett ILPC illesztő programot használtuk, amely képes az EPR spektrum szélsőértékeire polinomot illeszteni, meghatározza azok minimum és maximum helyeit és megadja azok egymástól való távolságát.

5.13.1. Konvencionális (V1) EPR mérések (Belágyi és mtsi., 1999)

A V1 EPR spektrumokat 0 és 30 °C között vettük fel 2 °C ként. A műszer beállításai a következők voltak: mikrohullámú teljesítés 10 vagy 20 mW, tér moduláció 100 kHz, amplitudó 2 G, mágneses térerősség 3480 és a pásztázott tértartomány 100 G.

A kiértékeléshez a konvencionális spektrumok $2A'_{zz}$ paraméterét határoztuk meg, amely a spektrum magasterű és alacsonyterű szélsőértékének különbségei. A kapott $2A'_{zz}$ értékeket Arrhénus-ábrázolás szerint, a reciprok hőmérséklet függvényében értékeltük ($1/T \times 10^3, \text{°K}^{-1}$). Az Arrhenius-ábrázolás során töréspontot tapasztaltunk, amely azt jelentette, hogy a membránban bekövetkezett a fázisátalakulás.

Ha a pontokra való illesztés során a két eltérő meredekségű egyenes jobb közelítést eredményez, mint egyetlen egyenes, akkor a lineáris regresszió feltételezésével számított reziduális négyzetösszeg (RSS_{lin}) nagyobb lesz a mért hőmérsékleti tartományban létező töréspontnál a két egyenesre vonatkozó reziduális négyzetösszegek összegénél (RSS_{min}). A négyzetösszegek különbségei a hőmérséklet vagy pontpárok függvényében másodfokú parabolát fognak mutatni; ennek minimumánál van a töréspont.

Az átlagos négyzetes eltérést becsülhetjük a kétféleképpen számított reziduális négyzetösszegek (egy illetve a két egyenes illesztésénél) különbségének a felével:

$$(RSS_{lin} - RSS_{min})/2 \text{ -vel,}$$

Ez tartalmazza a fizikai-kémiai folyamatból származó eltéréseket (szisztematikus ok), valamint a mérési hibát (véletlen ok) is.

Számítsuk ki a két különböző megközelítésnél a szórást. (Az átlagos négyzetösszeg négyzetgyöke), ahol n a mintaszámot jelöli, S_{lin} az egy egyenesre számított szórás S_{min} pedig a két egyenesre számított szórás:

$$s_{lin} = \sqrt{\frac{RSS_{lin}}{n}} \qquad s_{min} = \sqrt{\frac{RSS_{min}}{n}}$$

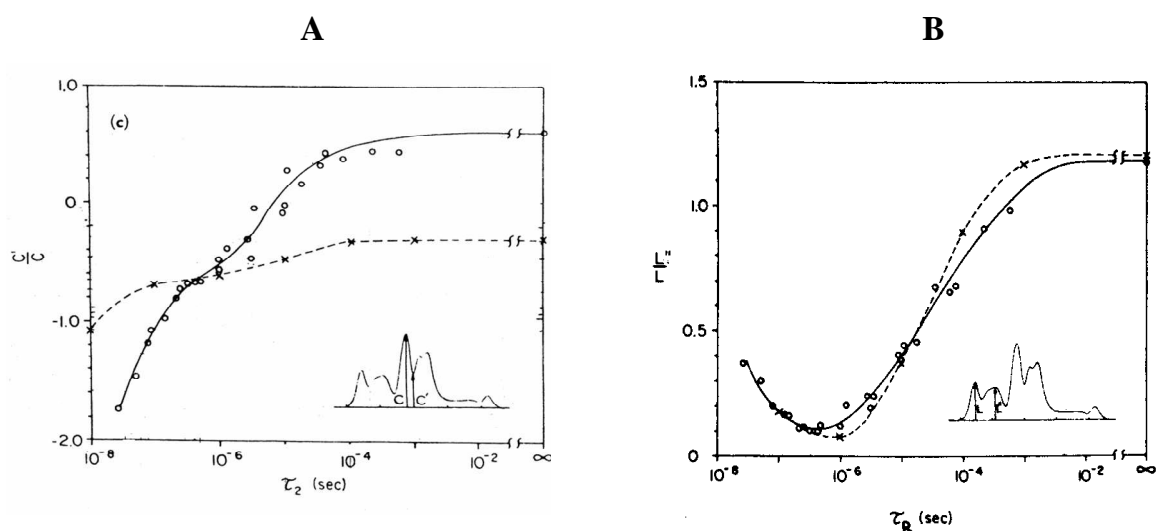
A két szórás nem teljesen független egymástól (a mérési hiba és a fizikai-kémiai folyamatból származó eltérés). Ha a két szórás azonos folyamatból származna (tehát nincs szisztematikus ok, ekkor a szabadsági fok $f = 1$), akkor a két variancia (szórás) nem különbözhet egymástól. Ezt F próba segítségével ellenőrizhetjük.

Ha az F próba értékét a $p = 0,95$ szignifikancia szint mellett választjuk, akkor a baloldalt nézve (különbség) megkapjuk a 95 %-os konfidencia intervallum geometriai úton történő becsülésének lehetőségét.

A számításokat a Johns és munkatársai által leírtak alapján, a PTE ÁOK-on fejlesztett számítógépes program segítségével végeztük el. Az illesztett egyenesek metszéspontja adta meg a membrán fázistranziós hőmérsékletét (Jones Molitoris, 1984).

5.13.2. ST-EPR (V2') mérések (Fajer és Marsh, 1982)

Méréseink során második harmonikus, 90° fázison kívüli, abszorpciós spektrumot vettünk fel 63 mW teljesítmény, 50 kHz tér moduláció és 5,5 G amplitudó mellett. A spektrumot fázison kívül, 100 kHz-en detektáltuk. Megmértük a C'/C és L''/L csúcsarányokat, amelyből a spin jelölő hozzávetőleges rotációs korrelációs idejeit tudtuk meghatározni (τ_c) a 12. ábrán látható kalibráció segítségével.



12. ábra

A rotációs korrelációs idő meghatározásához használt kalibrációk.

(Thomas és mtsi., 1976)

5.14. A primycin kölcsönhatásának vizsgálata különböző membránalkotókkal: *In vitro* fluoreszcencia mérések (Kunsági-Máté és mtsi., 2009b)

Méréseink során 10^{-3} M olajsavhoz növekvő koncentrációjú primycint adtunk. Mindkét komponens oldószere DMSO volt. Steady-state fluoreszcens méréseket végeztünk. (Műszer: Fluorolog τ 3 spectrofluorometric system (yobbin/von SPEX)) Felvettük az emissziós spektrumokat 16 °C és 36 °C között 2 fokként. Az integrációs idő: 0,2 s volt. 600 μ l-es kvarc küvettákat használtunk a mérésekhez.

5.15. A sejtől kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel (Lee és Lewis, 1968, O'Neil és mtsi, 2004)

A kísérlet során 10^8 sejt ml^{-1} sejtszámú szuszpenziót készítettünk Sørensen foszfát pufferben, amelyhez $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycint adtunk. A mintákból a 0., 1., 2., 3., 5. és 9. órában 1-1 ml mintát vettünk eppendorf csövekbe, és mértük a sejtmembránon átszivárgó fehérjék és nukleinsavak mennyiségét a következő képen: a mintákat centrifugáltuk és megmértük a felülúszó abszorbanciáját $\lambda=260$ nm hullámhosszon. A sejtben maradt 260 nm-en abszorbeáló anyagok mennyiségét az alábbi módon határoztuk meg: az eppendorf csövekben maradt üledéket, 100°C -os desztillált vízzel felszuszpendáltuk, kevertük és 30 percig 100°C -on inkubáltuk. Az inkubálást követően lecentrifugáltuk majd a felülúszóból újból abszorbanciát mértünk $\lambda=260$ nm-en.

5.16. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

15 ml 24 órás tenyészetet 15 percig 4000 fordulat perc^{-1} fordulatszámmal centrifugáltuk 4°C -on. A sejteket kétszer mostuk Na-foszfát pufferben. A mosást követően az üledéket újra szuszpendáltuk 5 ml glutáraldehid-oldatban. Ezt követően 1 órán át szobahőmérsékleten fixáltuk a sejteket, majd centrifugáltuk és mostuk Na-foszfát pufferben. A mintákhoz egyenként 1 ml OsO_4 oldatot adtunk és 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, sötétben. Az inkubálás után mostuk a mintákat Na-foszfát pufferben, majd kétszer steril desztillált vízben. A minták dehidratálását etanol hígítási sorral végeztük (30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 %). A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokat JEOL JSM 6300 Scanning Microscope műszerrel végeztük. A minta aranyozásához JEOL fine coat ion sputter JFC 1100 műszert használtunk.

5.17. Szignifikancia vizsgálatokhoz használt kétmintás t-próba

Minden esetben legalább három párhuzamos mintával végeztük a méréseket illetve a kiértékeléseket. A kapott értékek szignifikanciáját kétmintás t-próba alkalmazásával vizsgáltuk. Először meghatároztuk a különböző minták szórását:

$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$$

Ahol S : a szórás, n : a mintaszám, x : a mért értékek.

A szórások ismeretében meghatároztuk a becslés standard hibáját:

$$d = \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{n}}$$

Ahol d : a becslés standard hibája, S_1 és S_2 : a valószínűségi változók átlagoktól való eltéréseinek összegei a különböző mintákban, n : a mintaszám.

Következő lépésben meghatároztuk a t-próba t értékét:

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{d} \text{ és } FG = n(n-1)$$

Ahol \bar{X}_1 és \bar{X}_2 : a mérési eredmények átlagai, FG a szabadsági fokok száma. A t értéket a számolt szabadsági fok ismeretében behelyettesítettük a t-próba kritikus értékeit tartalmazó táblázat megfelelő helyére és a megfelelő valószínűségi szint kiválasztásával meghatároztuk a szignifikancia fokát.

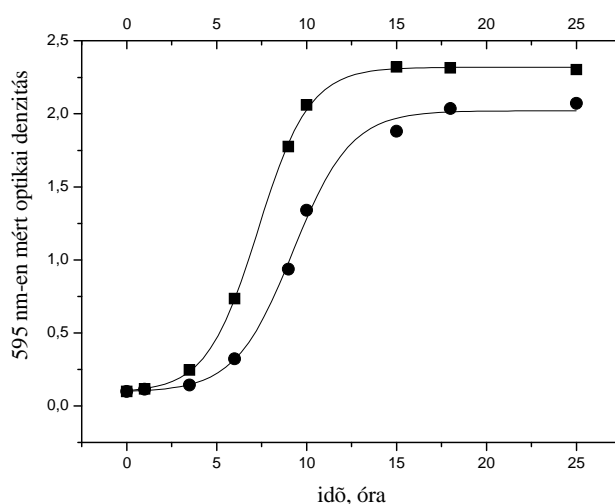
6. EREDMÉNYEK

6.1. A primycin antifungális hatásának vizsgálata

6.1.1. *C. albicans* 33erg⁺ és erg-2 törzsek generációs idejének meghatározása

A törzsek általános jellemzése céljából meghatároztuk a törzsek szaporodásának időfüggését, valamint a két törzs generációs idejét.

A 33erg⁺ szülői törzs generációs ideje: 1,6 óra, középlegitimikus fázisa: 8 óra, a mutáns erg-2 generációs ideje: 2,78 óra, a középlegitimikus fázisa: 10 óra volt (13. ábra, 5. táblázat). Az ebből adódó eltérések kiküszöböléséhez a további méréseknél a mutáns törzs esetében két óra fáziseltolással korrigáltunk.



13. ábra

A *C. albicans* 33erg⁺ (■) és erg-2 (●) törzsek szaporodási görbéi.

törzs	generációs idő
33erg ⁺	1,60 óra
erg-2	2,78 óra

5. táblázat

A *C. albicans* 33erg⁺ (■) és erg-2 (●) törzsek generációs ideje.

6.1.2. Minimális gátló koncentrációk meghatározása mikrodilúciós módszerrel.

A munkánk első lépéseként meghatároztuk a primycin MGK értékeit a *33erg*⁺ és az *erg-2* törzsekre mikrodilúciós módszert alkalmazva. Viszonyító anyagként az amB-t használtuk (6. táblázat).

A nisztatin rezisztens *erg-2* mutáns keresztrezisztenciát mutatott amB-vel szemben ugyanakkor toleránsabbnak bizonyult primycinnel szemben is mint a *33erg*⁺ törzs. A szülői törzs 12 µg ml⁻¹, a mutáns törzs 26 µg ml⁻¹ primycin MGK értékekkel rendelkezett. AmB esetében a szülői törzsnél már 0,063 µg ml⁻¹ viszont a mutánsnál csak 2 µg ml⁻¹ koncentrációval tapasztaltuk a MGK-t.

törzs	primycin	amB
<i>C. albicans</i> (<i>33erg</i> ⁺)	12	0,063
<i>C. albicans</i> (<i>erg-2</i>)	16	2

6. táblázat

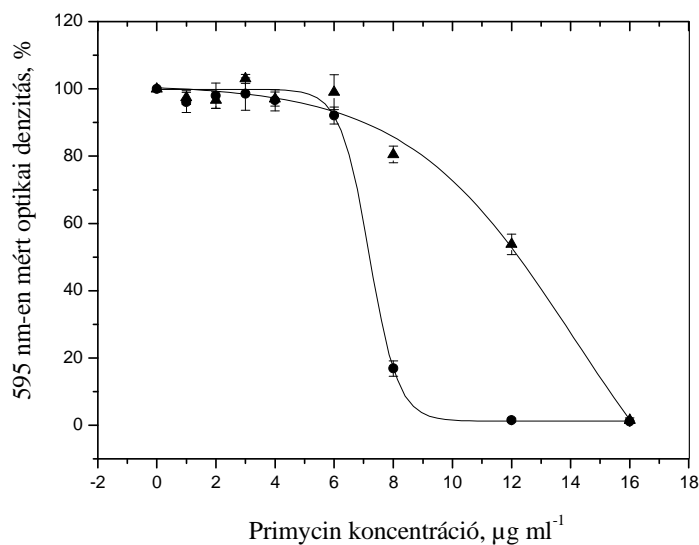
Primycin és amfotericin B minimális gátló koncentráció értékei (µg ml⁻¹) a

C. albicans *33erg*⁺ és *erg-2* törzsekre mikrodilúciós módszerrel.

6.1.3. A primycin MGK meghatározása makrodilúciós módszerrel a *C. albicans* *33erg*⁺ és *erg-2* törzseinél

Meghatároztuk a primycin minimális gátló koncentrációját a vizsgált két törzsön makrodilúciós módszerrel is, amely eredményeket a 14. ábra mutatja.

A MGK meghatározásnál az 5 % alatti értéket vettük gátlásnak. Ez alapján a *33erg*⁺ törzs 8 µg ml⁻¹, az *erg-2* törzs 12 µg ml⁻¹ MGK értékkel rendelkezett.



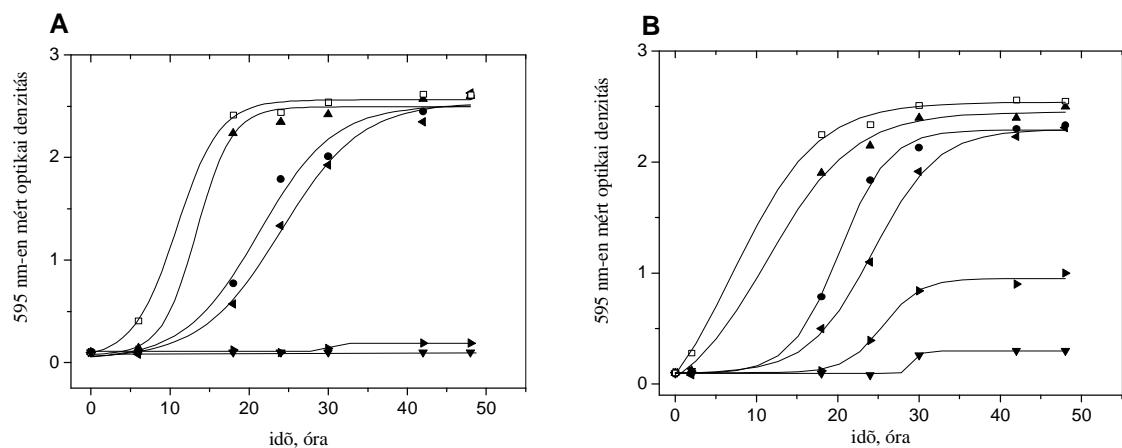
14. ábra

C. albicans 33erg⁺ (●) és erg-2 (▲) törzseinek
primycinnel szembeni érzékenysége
makrodilúciós módszerrel.

6.1.4. A primycin szaporodás gátlásának vizsgálata *C. albicans* 33erg⁺ és erg-2 törzsein

Ezt követően meghatároztuk a primycin szaporodásgátló hatását, hogy információt nyerjünk arról, melyik az a legkisebb primycin koncentráció, ami már gátolja a sejtek szaporodását, illetve, hogy melyik az a koncentráció, ami még nem letális, de késlelteti a szaporodást. Az eredményeket az 15. ábra foglalja össze.

A két törzs között jelentős különbség volt tapasztalható. 64 µg ml⁻¹ primycin a szülői törzsnél (33erg⁺) közel teljes mértékű szaporodásgátlást okozott, ugyanez a koncentráció az erg-2 mutánsnál 18 órával késleltette a logaritmikus fázis beindulását és mintegy 60 %-kal csökkentette a sejtek hozamát. Ezen és a korábbi eredmények sejtették, hogy a két vizsgált törzs plazma membránjának összetétele meghatározó módon szerepet játszanak a primycin és a sejtek kölcsönhatásában.



15. ábra

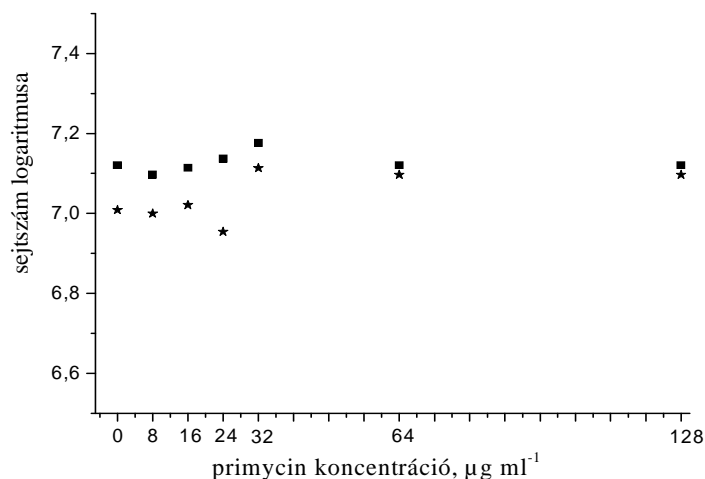
Primycin szaporodás gátlása *C. albicans* sejtekre. Jelölések: *33erg*⁺ (A),
erg-2 (B), primycin koncentrációk: kontroll (□), 16 (▲), 24 (●),
 32 (◄), 64 (►), 128 (▼) µg ml⁻¹.

6.2. A primycin plazma membránra kifejtett hatásának vizsgálata

6.2.1. A primycin protoplaszt lízist indukáló hatásának vizsgálata

A membrándinamikai kísérletek megkezdése előtt vizsgálatot végeztünk a primycin protoplaszt lízist okozó tulajdonságára. A protoplasztokat egy óráig kezeltük a 16. ábrán feltüntetett primycin koncentrációk mellett. Ennek a kísérletnek a célja az volt, hogy információt nyerjünk arról, hogy membrándinamikai vizsgálatok során alkalmazandó nagyobb, 128 µg ml⁻¹ primycin koncentrációt elbírnák-e viselni a sejtfauktól megfosztott sejtek. Ugyanis, ha a vizsgálatokban alkalmazott protoplasztok lízist szenvedtek volna, akkor a mért eredmények, nem sejtes állapotot tükrözték volna.

A 18. ábra bizonyítja, hogy primycin kezelés nem okozta a protoplasztok lízisést.



16. ábra

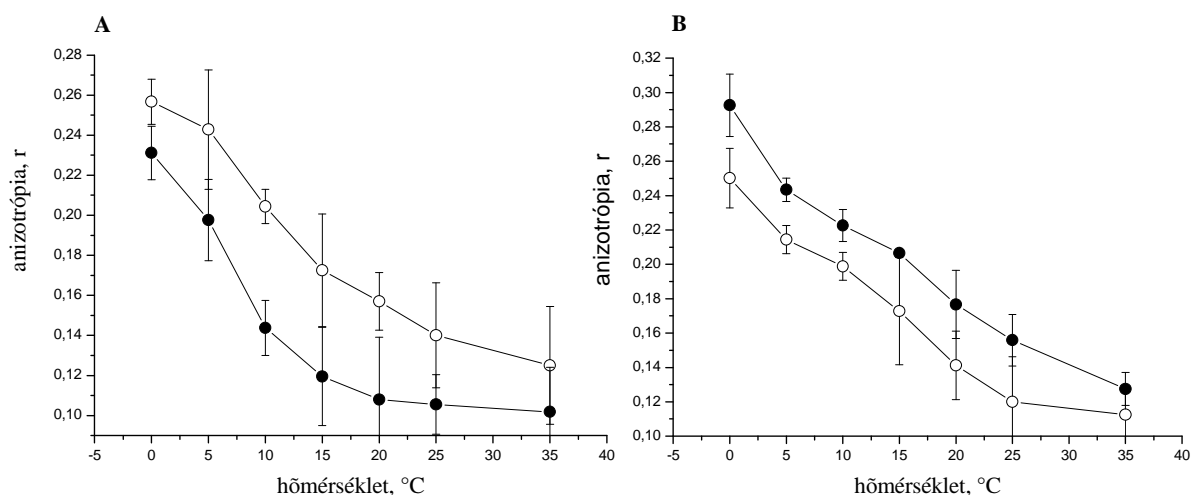
Különböző primycin koncentrációk protoplaszt lízist indukáló hatása.

Jelölések: *C. albicans 33 erg*⁺ (■) és *erg-2*(*).

6.2.2. *In vivo* "Steady-state" fluorimetriás membrándinamikai vizsgálatok

A primycin plazma membránra kifejtett direkt hatásának vizsgálatára a fluoreszcens anizotrópia változást vizsgáltuk. Kísérleteinkhez *C. albicans 33erg*⁺ és *erg-2* törzsek középlogaritmikus fázisú tenyészetéből készült protoplasztokat használtunk. A protoplasztokat 15 percig kezeltük 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycinnel. Méréseink során a protoplasztok membránjába beültetett TMA-DPH membrán-próba fluoreszcens anizotrópiáját határoztuk meg (17. ábra, 7. táblázat).

A *33 erg*⁺ szülői törzs kontroll mintáinak esetében az anizotrópia értékek 0,26 ($\pm 0,011$)-ről 0,13 ($\pm 0,029$)-ra, a primycinnel kezelt mintáinak esetében pedig 0,23 ($\pm 0,013$)-ról 0,10 ($\pm 0,022$)-re csökkentek a hőmérséklet fokozatos (5 °C-onkénti) emelésével. A kapott értékek fluidabb membránszerkezetre utalnak. Az ergoszterin hiányos mutáns törzs esetében a kontroll minta anizotrópia értékei 0,25 ($\pm 0,017$)-ről 0,11 ($\pm 0,016$)-re csökkentek a hőmérséklet emelésével, a kezelt mintáknál pedig 0,29 ($\pm 0,18$)-ról 0,12 ($\pm 0,009$)-re, amely értékek rigidebb membránszerkezetre utalnak.



17. ábra

A plazma membránba ültetett TMA-DPH fluorofór anizotrópia változásai.

Jelölések: *C. albicans* 33erg⁺ (A) és *erg-2* (B). Kontroll (○) és 128 µg ml⁻¹ primycinnel kezelt (●) minták.

Számszerűsített adatok a 7. táblázatban láthatók.

Hőmérséklet, °C	33erg ⁺				erg-2			
	kezelt	±SD	kontroll	±SD	kezelt	±SD	kontroll	±SD
0	0,2311	0,0133	0,2567	0,01123	0,2926	0,01811	0,2502	0,01737
5	0,1976	0,02026	0,2428	0,02979	0,2434	0,00688	0,2144	0,00826
10	0,1438	0,01377	0,2044	0,00847	0,2226	0,00932	0,1988	0,00811
15	0,1195	0,0246	0,1725	0,02814	0,2065	0,001	0,1728	0,03122
20	0,108	0,03104	0,157	0,0144	0,17667	0,01976	0,1412	0,02003
25	0,1055	0,01491	0,14	0,02618	0,15583	0,01491	0,12	0,02618
35	0,1018	0,0222	0,125	0,0294	0,1275	0,00954	0,1125	0,01618

7. táblázat

A 17. ábra számszerűsített adatai.

Öt független kísérlet anizotrópia értékeinek átlag (±SD) adatai.

A félkövér betűtípussal jelzett értékek szignifikáns különbséget mutattak

a Student-féle t-teszt szerint ($P < 0,05$).

6.2.3. *In vivo* membrándinamikai vizsgálatok EPR spektroszkópiával

Mivel a biológiai rendszerünkben a fluoreszcencia mérések nem bizonyultak elég érzékenyek, a továbbiakban a membránvizsgálatokra EPR technikát alkalmaztunk.

6.2.3.1. Konvencionális EPR vizsgálatok

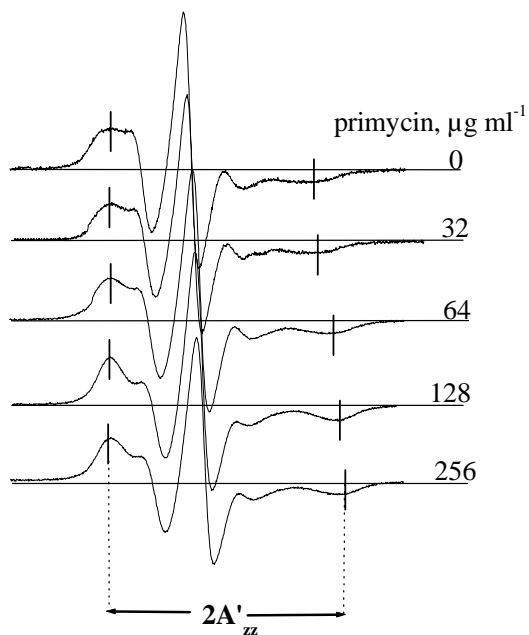
Kísérleteinkhez *C. albicans* $33erg^+$ és *erg-2* törzsek középlogaritmikus fázisú tenyészetéből készült 5-SASL-el jelölt protoplasztokat használtunk. A protoplasztokat 15 percig kezeltük 0, 32, 64, 128, 256 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycinnel. Felvettük a különböző koncentrációjú primycin kezelt minták konvencionális (V1) spektrumát 20 °C-on. Meghatároztuk a $2A'_{zz}$ spektrális paramétert és vizsgáltuk a koncentráció függését (18. ábra).

A növekvő primycin koncentráció hatására szélesebb $2A'_{zz}$ értékeket kaptunk (18. ábra), amelyek mindkét törzs esetében telítési görbét mutattak. A két törzs közötti különbség a görbék eltérő exponenciális fázisában jelentkezett. A telítődés a $33erg^+$ törzs esetében 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$, az *erg-2* törzs esetében pedig 256 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycin kezelésnél mutatkozott (19. ábra).

Felvettük a V1 spektrumokat 30 °C és 0 °C között 2 °C-ként majd a $2A'_{zz}$ értékeket a hőmérséklet függvényében ábrázolva meghatároztuk a membránokra jellemző fázisátmeneti hőmérsékletet (T_m). A fázisátmenet vizsgálatához, egy kiválasztott koncentrációval, 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycinnel kezeltük a protoplasztokat (20. ábra).

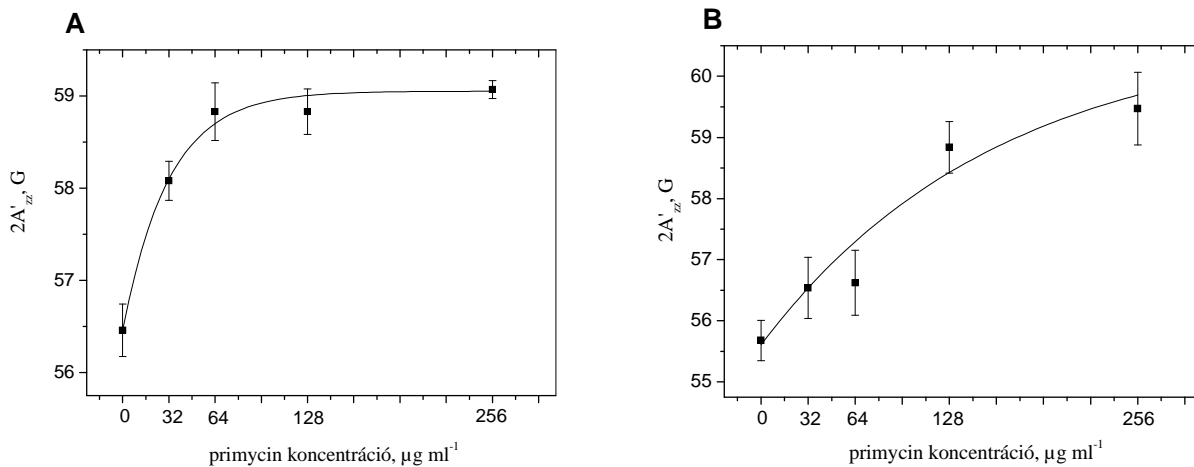
A $33erg^+$ törzs kezeletlen protoplasztjain mért T_m 11 °C, az *erg-2* protoplasztokon mért pedig 12,5 °C. A 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycin kezelés mindkét törzs esetében megnövelte ezt az értéket, mégpedig 16 °C és 17,5 °C – ra (20. ábra).

A T_m növekedése valamint a $2A'_{zz}$ kiszélesedése azt mutatta, hogy primycin hatására mindkét törzs plazmamembránja rigidebbé vált (18-20. ábrák). A rigiditás mértéke pedig koncentrációfüggést és telítődési görbét mutatott (19. ábra).



18. ábra

A. C. albicans 33erg⁺ törzs reprezentatív EPR spektrumai.

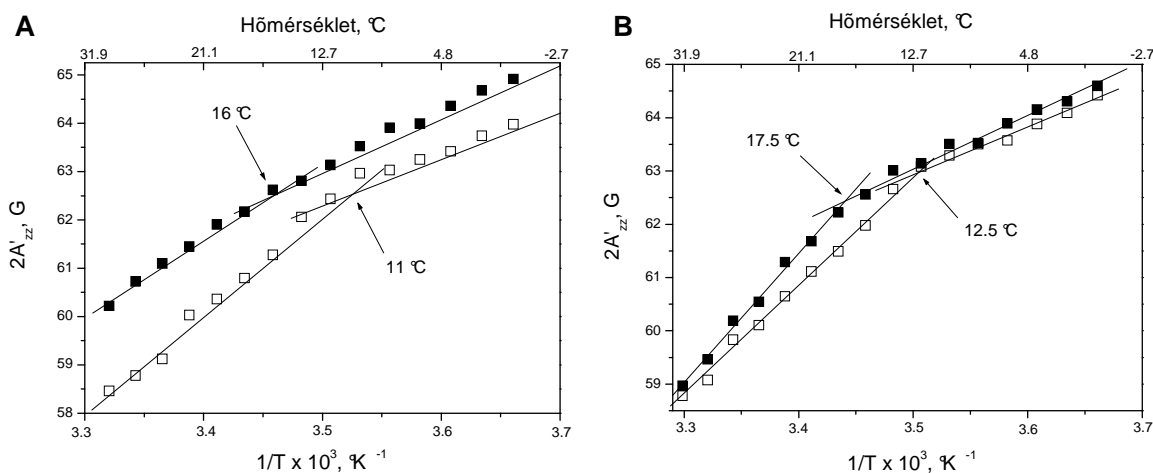


19. ábra

A. C. albicans 33erg⁺ (A) és *erg-2* (B) törzsek konvencionális EPR spektrumának

$2A'_{zz}$ értékeinek primycin koncentráció függése 20 °C-on.

(Az értékek 3 független mérés átlagai, \pm SD).



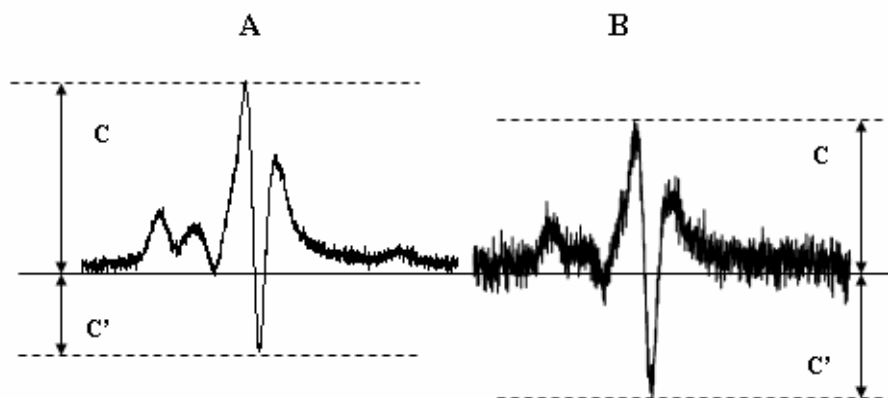
20. ábra

A. C. albicans 33erg⁺ (A) és *erg-2* (B) törzsek T_m-e
 kontrol (□) és 128 µg ml⁻¹ primycin kezelés hatására.
 (3 független kísérlet reprezentatív ábrája.)

6.2.3.2. ST- EPR vizsgálatok

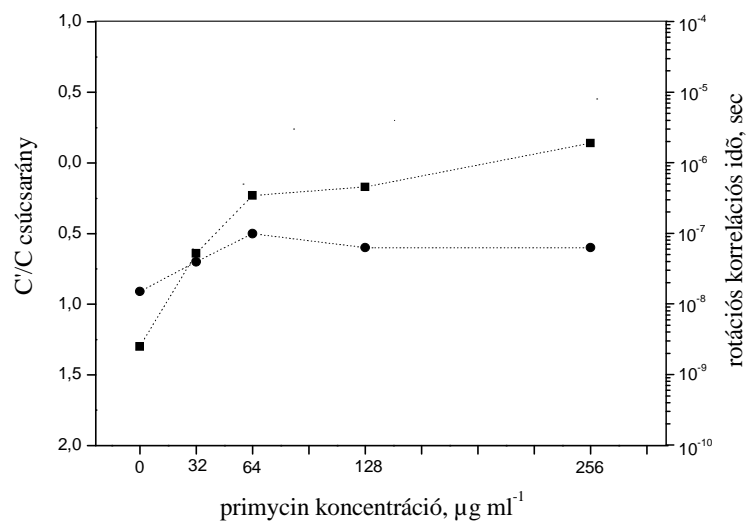
A konvencionális spektrumok kiértékelésekor azt tapasztaltuk, hogy a mintákban egy lassabb mozgás is jelen van, ezért meghatároztuk a minták ST-EPR spektrumait is (21, 23. ábra). A 0 - 128 µg ml⁻¹ primycin kezelt minták ST-EPR (V2') spektrumait 20 °C-on vettük fel, meghatároztuk a C'/C csúcsarányt és ebből következtettünk a hozzávetőleges rotációs korrelációs időkre (τ_c) (8. táblázat).

Primycin kezelés hatására 1-1,5 nagyságrenddel lassabb mozgásokat tapasztaltunk mindkét törzs esetében. A *33erg⁺* törzsnél azonban ez a változás szembetűnőbb, a kontroll mintán mért τ_c 0,06-ról 8 µs-ra lassult a kezelést követően. Az *erg-2* törzsnél ez a τ_c -beli lassulás 0,1-ről 1 µs-ra változott. A 22. ábra összehasonlítja a két törzs esetében tapasztalt rotációs korrelációs időket, amely mindkét törzs esetében egy nem lineáris változást mutat.



21. ábra

5-SASL-el jelölt *C. albicans 33erg⁺* protoplasztok membránjának reprezentatív V2' spektrumai. Jelölések: 128 µg ml⁻¹ (A) és 32 µg ml⁻¹ (B) primycinnel kezelt membránok.



22. ábra

A C'/C csúcsarány és az 5-SASL szonda molekula rotációs korrelációs idejének reprezentatív ábrája. Jelölések: *C. albicans 33erg⁺* (■) és *erg-2* (●). Számszerűsített adatokat a 8. táblázat tartalmazza.

primycin koncentráció, $\mu\text{g ml}^{-1}$					
törzsek	0	32	64	128	256
csúcsarány, C'/C					
<i>33erg</i> ⁺	-1,30 ($\pm 0,1$)	-0,64 ($\pm 0,03$)	-0,23 ($\pm 0,03$)	-0,17 ($\pm 0,01$)	0,14 ($\pm 0,01$)
<i>erg-2</i>	-0,91 ($\pm 0,03$)	-0,7 ($\pm 0,02$)	-0,5 ($\pm 0,02$)	-0,6 ($\pm 0,03$)	-0,6 ($\pm 0,04$)
rotációs korrelációs idő, $\tau_c 10^{-6}$ s					
<i>33erg</i> ⁺	0,06	0,5	3	4	8
<i>erg-2</i>	0,1	0,5	1	1	1

8. táblázat

A 22. ábra számszerűsített adatai.

Három független kísérlet C'/C értékeinek átlag (\pm SD) adatai

és az ezekből becsült τ_c értékek.

6.3. A primycin A1, A2 és C1 komponensek *in vivo* membrándinamikai hatásának vizsgálata *33erg*⁺ törzsön EPR spektroszkópiával

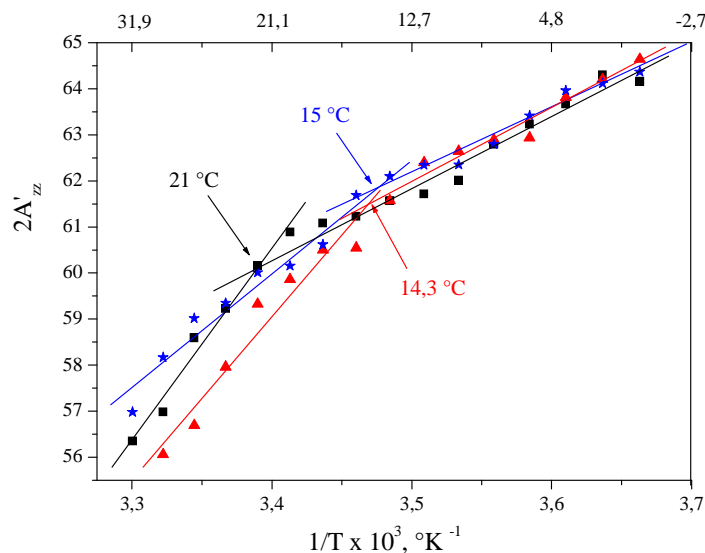
Megvizsgáltuk, hogy a primycin A1, A2 és C1 komponensek milyen módon befolyásolják a membrán állapotát. A vizsgálathoz a szülői, *33erg*⁺ törzsek protoplasztjait használtuk és kezeltük őket 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ adott típusú primycin komponenssel. A kezelés paraméterei megegyeztek a primycin komplexnél alkalmazott kezeléssel.

6.3.1. Konvencionális EPR vizsgálatok

Meghatároztuk és ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében a $2A'_{zz}$ paramétereket. A vizsgálat menete megegyezett a primycin komplexnél alkalmazott vizsgálattal. Meghatároztuk a különböző primycin komponensek okozta T_m-beli különbségeket (23. ábra).

A primycin komponensek között jelentős T_m-beli eltérést tapasztaltunk. A T_m a primycin A1 esetében 21 °C, A2 esetében 14,3 °C és C1 esetében 15 °C-nak bizonyult. Ezek az értékek a *33erg*⁺ kontroll mintán mért T_m értékéhez képest (11 °C) magasabbak, tehát a komponensek külön-külön is rigidizáló hatásúak, azonban a primycin komplex hatására kapott T_m értéknél (16 °C) csak a primycin A1 által okozott T_m bizonyult magasabbnak.

Tehát az önmagában alkalmazott primycin A1 rigidebb membránstruktúrát okozott, mint keverékben.



23. ábra

$^{33}\text{erg}^+$ törzs fázistranzíciós hőmérséklete $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin A1 (■),
A2 (▲) és C1 (*) komponensekkel való kezelés hatására.
(3 független kísérlet reprezentatív ábrája.)

6.3.2. ST- EPR vizsgálatok

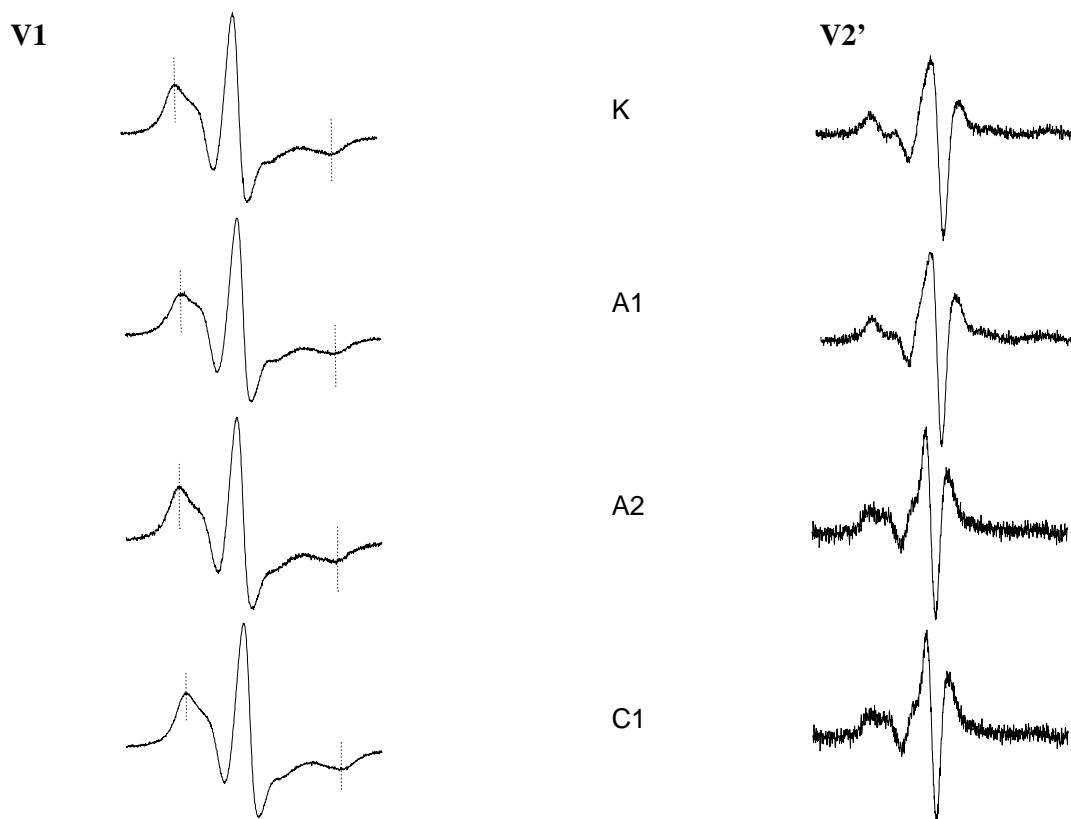
Ezt követően felvettük a V1 és V2' spektrumokat $20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on és meghatároztuk a mintákban lévő spin jelölő rotációs korrelációs idejeit (τ_c , τ_1), majd összehasonlítottuk a korábban mért primycin komplex eredményeivel. A spektrumbeli különbségeket a 24. ábra mutatja. A számszerűsített adatokat, feltüntetve a korábban mért kontroll illetve primycin (koplex) -el kezelt mintákon mért adatokat, a 9. táblázat foglalja össze.

A C'/C csúcsarányból becsült τ_c értékek a következő képen változtak az adott primycin komponensekkel való kezelése után: primycin A1 esetében 5×10^{-7} , A2 esetében 9×10^{-7} és C1 esetében 1×10^{-6} . Az L'/L csúcsarányból becsült τ_1 értékekben is jelentős változást tapasztaltunk, mégpedig: primycin A1-nél 1×10^{-7} , A2-nél 9×10^{-7} és C1-nél 1×10^{-6} -nak adódtak a τ_1 értékek.

	kontroll	primycin komplex	A1	A2	C1
$2A'_{zz}$ (G)	61,11	61,67	60,15	59,32	50,01
T_m (°C)	11	16	14,3	15	21
C'/C (τ_c , s)	2×10^{-8}	4×10^{-6}	5×10^{-7}	9×10^{-7}	1×10^{-6}
L''/L (τ_l , s)	8×10^{-6}	6×10^{-5}	1×10^{-7}	1×10^{-4}	5×10^{-5}

9. táblázat

A különböző primycin komponensekkel kezelt *C. albicans 33erg⁺* törzs plazma membránján mért spektrális paraméterek 20 °C-on.



24. ábra

A *C. albicans 33erg⁺* törzs V1 és V2' spektrumai 20°C- on
 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycin A1, A2 és C1 komponensekkel való kezelést követően.
 (3 független kísérlet reprezentatív ábrája.)

6.4. A primycin fő membránalkotókkal való kölcsönhatásának vizsgálata *in vitro* „steady-state” fluorimetriával

6.4.1. A primycin kölcsönhatása az olajsavval

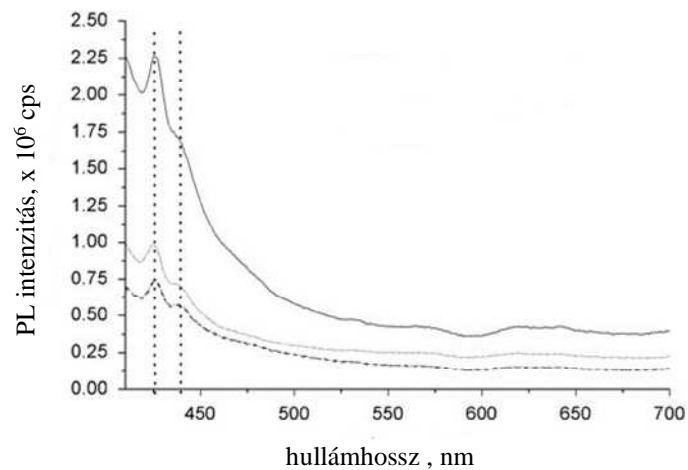
Korábbi, gyenge kölcsönhatások fluoreszcenciás meghatározására alkalmazott módszereket (Kunsági-Máté és mtsi., 2008, 2009a, b) követve „steady-state” fluoreszcencia-spektrumokat vettünk fel. Méréseink során 10^{-3} M olajsavhoz növekvő koncentrációjú primycint adtunk. Mindkét komponens oldószere DMSO volt. Felvettük az emissziós spektrumokat, 390nm-en gerjesztve, 16 °C és 36 °C között 2 fokonként (25. ábra). A vizsgált primycin és olajsav koncentrációkat a 10. táblázat mutatja.

A különböző primycin koncentrációjú oldatok emissziós spektrumait Gauss-görbékre bontottuk és az így kapott spektrális adatokat a Benesi-Hildebrand módszer alapján értékeltük ki (26. és 27. ábra) (ld. 7.4.Eredmények értékelése) (Benesi és Hildebrand, 1949). Az entalpia (ΔH) és entrópia (ΔS) változásokat a 28. ábra alapján számoltuk ki.

	[primycin] (M)	[olajsav] (M)
oldat1	8×10^{-4}	1×10^{-3}
oldat2	6×10^{-4}	1×10^{-3}
oldat3	4×10^{-4}	1×10^{-3}
oldat4	2×10^{-4}	1×10^{-3}
oldat5	1×10^{-4}	1×10^{-3}

10. táblázat

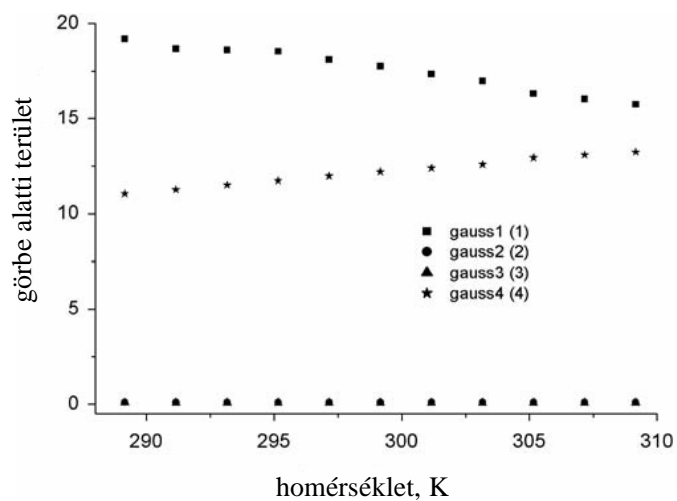
A fluoreszcencia mérés során használt koncentrációk



25. ábra

Az olajsav reprezentatív fotolumineszcens (PL) spektrumai különböző primycin koncentrációk jelenlétében, 295,16 K hőmérsékleten mérve.

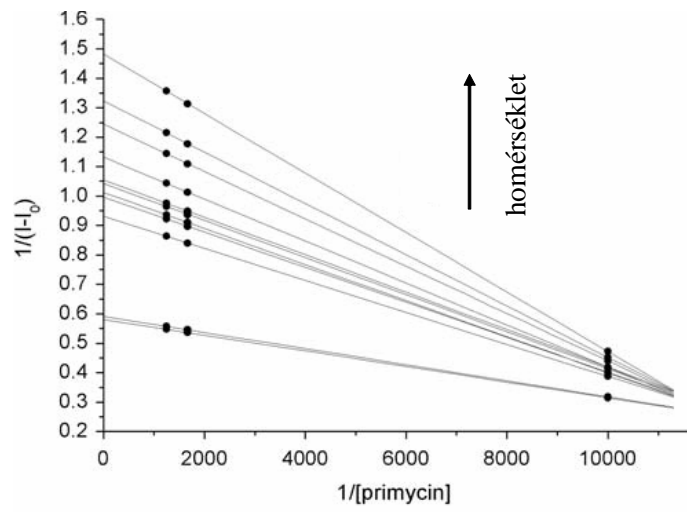
A szaggatott vonalak az egyensúlyi állandó megállapításához használt csúcsokat emelik ki.



26. ábra

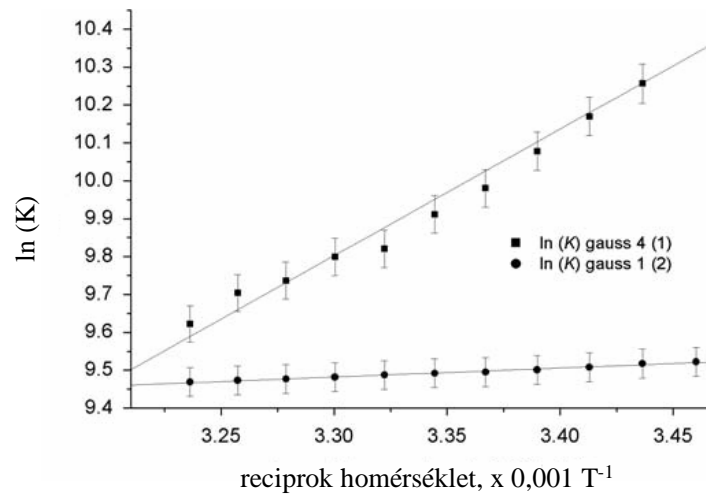
A Gauss-görbék alatti területek a hőmérséklet függvényében ábrázolva.

A görbe alatti terület értékei tetszőleges egységben vannak feltüntetve.



27. ábra

Az olajsav-primycin komplex-től származó fotolumineszcens (PL) jel Benesi-Hildebrand ábrázolása.



28. ábra

Egyensúlyi állandók (K) logaritmusai az T^{-1} függvényében ábrázolva

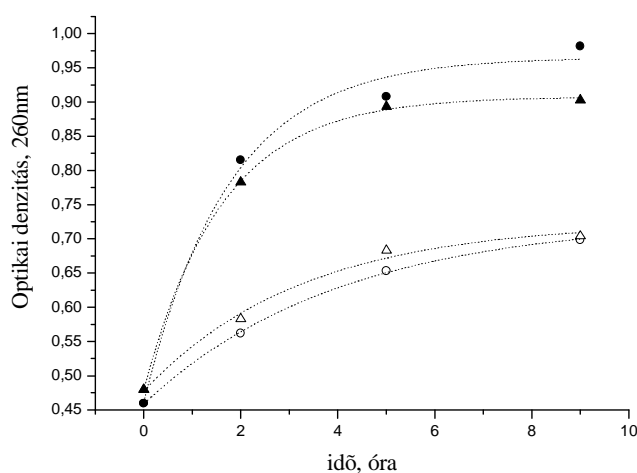
6.5. A primycin direkt és indirekt biológiai hatásának vizsgálata

A fenti eredmények bizonyították a primycin plazma membrán támadáspontú tulajdonságát. A továbbiakban a primycin-plazma membrán kölcsönhatás biológiai következményeire, a barrierfunkcióra és a sejt morfológia változására végeztünk vizsgálatokat.

6.5.1. A primycin közvetlen membránra gyakorolt hatásának vizsgálata

Megmértük a *C. albicans 33erg⁺* és *erg-2* törzsekből készített sejtszuszpenzióban a 260 nm-en abszorbeáló anyagok (nukleotidok, nukleozidok és szabad bázisok) sejtől való kiáramlását az extracelluláris terébe. Amennyiben a 260 nm-en abszorbeáló anyagok mennyisége nő a pufferben és az összesejtszám nem változik, a plazma membrán barrier funkciójának elvesztése következik be (29. ábra).

A primycin jelentős anyagkiáramlást okozott $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ kezelés hatására. Mindkét vizsgált törzs kontrol sejtszuszpenziója ~ 45-50%-nyi mennyiséget veszített a vizsgált anyagokból 5-9 óra elteltével, azonban a primycin kezelt sejtek már 2 óra elteltével ~62-76 %-os anyagkiáramlást mutattak. A vizsgálat során a kezdeti összesejtszám 10^8 sejt ml^{-1} körüli érték maradt a vizsgálat végéig. Tehát plazma membrán barrier funkciójának elvesztése bizonyítást nyert.



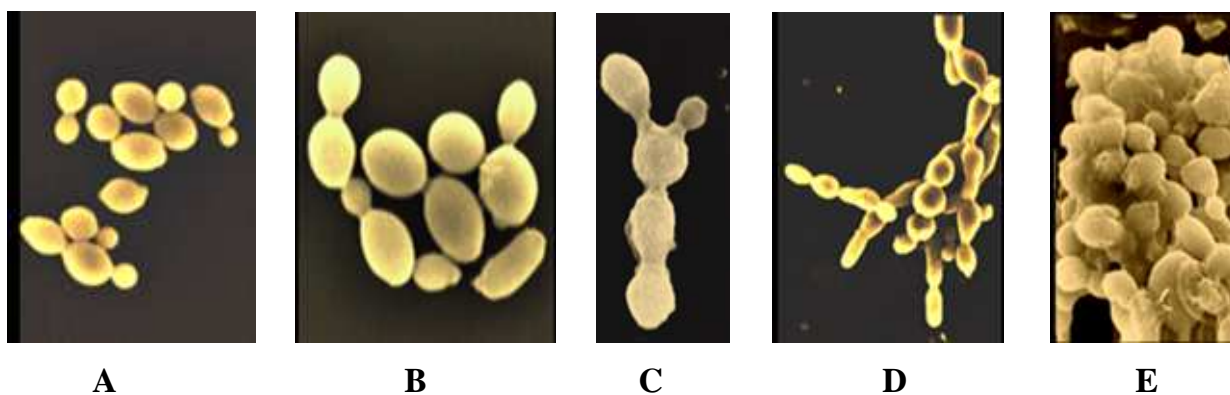
29. ábra

$64 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin hatására kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok vizsgálata.
Jelölések: *C. albicans 33erg⁺* (○) és *erg-2* (△) kontroll; *33erg⁺* (●) és *erg-2* (▲) kezelt minták. (3 független kísérlet átlagainak reprezentatív ábrája.)

6.5.2. A primycin közvetett, sejtfalra gyakorolt hatásának és a sejtmorfológia változásának vizsgálata pásztázó elektron mikroszkóppal

Vizsgálatainkhoz a szülői *33erg*⁺ törzs 24 órás tenyészetét használtuk, amelyet 0, 32 és 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycinnel kezeltünk.

A SEM felvételeken a kezeltetlen sejtek felszíne sima volt és néhány közülük multipoláris sarjsejtekkel rendelkezett, amelyeket jól el lehetett különíteni szülői és leány sejtekre (30. A. ábra). Azonban 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycin kezelés hatására csak unipoláris sejtosztódások voltak megfigyelhetők (30. B. ábra), míg 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kezelésnél pedig pszeudohifákat lehet látni (30. ábra C, D, E). A sejtek egy része mély horpadást mutatott a sejtfalban, másik része pedig deformált és befűződés-szerű mintázatot, amely valószínűleg a sejt intracelluláris anyagainak a plazma membránon keresztül történő kiáramlásának a következménye.



30. ábra

C. albicans 33erg⁺ SEM felvétele.

Jelölések: A: kontroll, 3500x-os nagyítás; B: 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 5000x;

C: 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 5000x, D: 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 2500, E: 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 5000 x-es nagyítás.

7. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

7.1. A primycin antifungális hatásának vizsgálata

7.1.1. Minimális gátló koncentrációk meghatározása mikrodilúciós módszerrel.

A primycin, amely elsősorban egy antibakteriális szer, 4-64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ között mutatott MGK értékeket 13 *Candida* faj esetében, ezzel szemben az amB 0,015-0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ közötti MGK értékeivel, sokkal hatásosabbnak bizonyult (Pénzes Ágota adatai, PTE, TTK, Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék).

Az amB MGK értéke a *C. albicans* ergoszterin mutáns *erg-2* törzsén magasabb (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) volt, mint a szülői *33erg*⁺ törzsön (0,063 $\mu\text{g ml}^{-1}$) és irodalmi adatok keresztrezisztenciáról is beszámoltak más polién antimikotikumokkal kapcsolatban, mint pl. filippin, candacidin vagy piramicin (Pesti és mtsi., 1981a). A primycin MGK értékei viszont közel azonosak voltak mind a szülői, mind a mutáns törzs (12 és 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$) esetében. A közel azonos MGK értékek arra utalnak, hogy a primycinnek nem az ergoszterin a fő támadáspontja (6. táblázat).

Tanszékünkön kollégáim, Dr. Juhász Ákos és Pénzes Ágota, elvégezték 74 db. *C. albicans* klinikai izolátumon a primycin és amB MGK meghatározását mikrodilúciós módszerrel. Az izolátumok mindkét antibiotikumra érzékenyek voltak. A primycin MGK-ja 19 esetben (25,7 %) 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ és 55 esetben (74,3 %) 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ volt. AmB esetében a következő MGK értékeket kaptuk: a 74 izolátumból 13 esetben (17,6 %) 0,063 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 43 esetben (58,1 %) 0,125 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 17 esetben (23,0 %) 0,250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ és 1 esetben (1,3 %) 0,500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Primycinre rezisztens humán patogén *Candida* fajt vagy *C. albicans* klinikai izolátumból származó törzset sem mi, sem a szakirodalomban még nem írtak le.

7.1.2. Minimális gátló koncentrációk meghatározása makrodilúciós módszerrel

A primycin makrodilúciós módszerrel végzett MGK értékei is jelentős különbséget mutattak a *33erg*⁺ és *erg-2* törzsek között. A vizsgálat alapján a szülői törzs (*33erg*⁺) érzékenyebbnek bizonyult, mint a mutáns (*erg-2*) törzs (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ és 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 14. ábra). A törzsek közötti különbség abból is adódhatott, hogy a két törzs plazma membránjában lévő telítetlen zsírsavak (16:2, 16:3 és 18:3) aránya között jelentős különbség van. A 16:2-es zsírsav a *33erg*⁺ esetében 0,9 míg az *erg-2* esetében 1,7 %-ban van jelen, ugyanígy a 16:3-as

2,2 valamint 3,7 és a 18:3-as 2,3 és 4.2 %-ban vannak jelen a szülői és mutáns törzsek plazma membránjában (Pesti és mtsi., 1985).

7.1.3. Szaporodás gátlás vizsgálata

A primycin szaporodás gátlás vizsgálatában a szülői, *C. albicans 33erg⁺* törzs ismét érzékenyebbnek bizonyult, mint az ergoszterin hiányos mutáns, *erg-2* (szülőinél $64 \mu\text{g ml}^{-1}$, a mutáns törzsnél pedig $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin koncentráció eredményezte a teljes szaporodás gátlást, 15. ábra).

Ahogy a fenti adatokból (7.1.1, 7.1.2, 7.1.3 fejezetek) is látszik, a primycinre való érzékenységet jelentősen befolyásolja a plazma membrán összetétele. A *33erg⁺* törzs plazma membránjában a fő szterinek az ergoszterin (71,5 %) és az ergosta-7-en-3 β -ol (14,3 %), ezzel szemben az *erg-2* törzsben a fő membránt merevítő molekulák a fekoszterin (55,6 %) és a zimoszterin (42,7 %), amely a $\Delta 8-\Delta 7$ izomeráz mutációjának a következménye. A megváltozott szterin összetétel egy foszfolipid-adaptációhoz vezetett az *erg-2*-es törzsben. Azaz csökkent a „fluidizáló lipidek”, úgymint a foszfatidilkolin vagy a foszfatidilszerin, mennyisége és nőtt a foszfatidiletanolamin, foszfatidilinozitol és foszfatidsav, azaz a „rigidizáló lipidek” mennyisége a membránban. Tehát a legnagyobb különbség a két törzs plazma membrán összetételében egyrészt a mutáns ergoszterin hiánya, másrészt a telítetlen zsírsavak aránya (Pesti és mtsi., 1985). A zsírsavösszetétel fontos szerepet játszik a membrán fluiditásban. Például a többszörösen telítetlen zsírsavak felhalmozódása alacsonyabb membrán fluiditáshoz vezet (Shinitzky és Henkart, 1980, MBongo és mtsi., 1997).

A mutáns, *erg-2* törzsben lévő ergoszterin hiány a Δ^8 szterinek felhalmozódásához, a zsírsavláncok hosszának rövidüléséhez és a telítetlen zsírsavak csökkenéséhez vezetett a szülői, *33erg⁺* törzshöz képest (Pesti és mtsi., 1982, Pesti és mtsi., 1985). Mivel a mutáns törzs az ergoszterin hiányát túlkompensálta, és úgy változott a plazma membránjának lipid összetétele, hogy a totál lipid extraktumon mért rend paraméter érték ($0,640 \pm 0,005$) magasabb volt, mint a szülői törzs esetében ($0,611 \pm 0,003$), ezért egy kompaktabb membránszerkezettel rendelkezett (Pesti és mtsi., 1995). Meghatározták *in vivo* EPR kísérletekben a két törzs plazma membrán dinamikája közötti különbséget. A sejteket 5-SASL-el jelölték, és meghatározták a $\Delta H(+1)$ spektrális paramétert, valamint a hiperfinom csatolások ($2A_{zz}$) közötti távolságot, amely a membránba beépített 5-SASL jelölő molekula mozgékonyágát jellemezte. A *33erg⁺* törzs esetében ez az érték kisebb volt valamennyi hőmérsékleten (0-30 °C) mérve, továbbá a szülői törzs membránjára 16 °C a mutánséra pedig 18,5 °C volt a jellemző fázisátmenet (Pesti és mtsi., 2000, Belágyi és mtsi., 1999)

7.2. A primycin plazma membránra kifejtett hatásának vizsgálata

7.2.1. A primycin protoplaszt lízist indukáló hatásának vizsgálata

Mivel a fenti eredmények rámutattak arra, hogy a primycin antibiotikum membránhatású, ezért a tervezett membrándinamikai vizsgálatok megalapozottnak bizonyultak. Mivel a *C. albicans* egy erős poliszacharid (glükán, mannán) és fehérje komplexből álló sejtfallal rendelkezik, ezért a membrán vizsgálatokhoz protoplasztokat, sejtfaluktól megfosztott sejteket használtunk. Mivel a kísérletekben magas koncentrációjú direkt primycin-plazma membrán kölcsönhatást vizsgáltunk, meg kellett győződnünk arról, hogy befolyásolja-e a primycin az érzékeny protoplasztok számát az idő függvényében. Azt tapasztaltuk, hogy a primycin még $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ -es koncentrációban sem okozott a vizsgált időtartam alatt (120 perc) protoplasztlízist (16. ábra).

7.2.2. *In vivo* "Steady-state" fluorimetriás membrándinamikai vizsgálatok

A primycin membrán struktúrában előidézett változás vizsgálatára elsősorban "Steady-state" fluoreszcens anizotrópia méréseket végeztünk. A vizsgálatok során mind a szülői, mind pedig a mutáns törzs esetében membrándinamikai változásokat tapasztaltunk. A növekvő hőmérséklet hatására tapasztalt csökkenő tendencia a mérés hitelességét támasztotta alá (mivel magasabb hőmérsékleten a membrán folyékonyabbá válik, tehát a sonda molekula korrelációs ideje nő, az ezt jellemző anizotrópia pedig csökken) (17. A. ábra).

Mivel az általunk használt membrán jelölő molekula (TMA-DPH) a membrán felszínhez közeli hidrofób régiójának mozgását jellemzi (Prendergast és mtsi., 1981, Kuhry és mtsi., 1983, Ferretti, 1993) és a kezelt minták szignifikánsan alacsonyabb anizotrópia értékűek minden hőmérsékleten - a kontroll mintákhoz képest a 33erg^+ törzsnél - a kapott adatok arra engednek következtetni, hogy a primycin kezelés hatására a jelölő molekula anizotróp mozgása nőtt. Tehát a membrán felszínhez közeli hidrofób régiójának viszkozitása csökkent, ami a primycin hatására bekövetkező lazább membrán struktúra jelenlétére utalt. Hasonló eredményeket kaptak Younsi és mtsi., 2000. AmB kezelés hatására az ergoszterin szintetizáló *Kluyveromyces lactis* élesztőn. Ugyanezt a módszert alkalmazva az AmB-vel kezelt minták alacsonyabb anizotrópia értékeket mutattak (Younsi és mtsi., 2000).

Az adatokból a következő feltételezéseket állapítottuk meg: (i) az AmB és a primycin is membrán komponensekhez kötődik (ez élesztő sejtek esetében a membránban, legnagyobb

számban lévő vegyületek, az ergoszterin és/vagy a zsírsavak). (ii) A kémiai kötés létrejötte aránylag gyors folyamat és a membránt alkotó vegyületek átszerveződéséhez vezet. (iii) Ez az átszerveződés membrán csatornák kialakulását eredményezheti, amelyek a membránt stabilizáló Mg^{2+} és Ca^{2+} ionok kiáramlásához vezethetnek. A foszfolipidek ezen kationok jelenléte nélkül elvesztik az egymással való stabilitásukat. (Allwood és Russel, 1970, Blaskó és mtsi., 1981, Blaskó és mtsi., 1986).

Az ergoszterin hiányos mutáns törzs esetében a kezelt minta anizotrópia értékei a hőmérséklet emelésével végig nagyobb értékeket mutattak, mint a kontroll mintánál (17 B. ábra). Az adatok azt tükrözik, hogy a mutáns törzs membrán szerkezete a primycin hatására merevebb lett a vizsgált régióban.

Korábbi adatokra támaszkodva (Pesti és mtsi., 1985) a két törzs közötti, primycin okozta membrándinamikai változásban kapott ellentmondás a következő összefüggések következményeként magyarázható. A *erg-2* törzsben a szterin/ foszfolipid arány csökkent és a telítetlen zsírsavak megnövekedett szintézise miatt a membrán eleve rigidebb állapotban volt. Tehát a különböző plazma membrán összetételű törzsek eltérően reagáltak a közvetlen primycin kezelésre. A módszer érzékenysége a mi, *in vivo* biológiai rendszerünkben (a nagy szórás értékek miatt, ami a sejtek belső szórásából is adódhatott) alacsonynak bizonyult, ezért a továbbiakban EPR spektroszkópiás módszert alkalmaztunk a primycin okozta membrán struktúra változások vizsgálatára.

7.2.3. *In vivo* membrándinamikai vizsgálatok EPR spektroszkópiával

A konvencionális és ST-EPR technikák a lipid és membrán rendszerek különböző molekuláris mozgásainak jellemzésére kiválóan alkalmas módszerek. Vizsgálatainkban 5-SASL spin jelölő molekulát használtunk a plazma membrán felszínhez közeli hidrofób régiójának tanulmányozására (Hemminga, 1983).

7.2.3.1. Konvencionális EPR mérések

A konvencionális mérések során számított $2A'_{zz}$ spektrális paraméter egyik a legtöbbet használt EPR-paraméterek közül, amelyet a membrándinamikai változások nyomon követésére használnak. A $2A'_{zz}$ paraméterrel a membránba beékelődött próba molekula ns-os korrelációs ideje becsülhető meg, valamint a molekula anizotróp mozgása jellemezhető, amely az adott régió „fluiditását” tükrözi (Hemminga, 1983). Kísérleteinkben a primycin koncentráció függvényében növekvő $2A'_{zz}$ értékek azt mutatják, hogy a jelölő molekula mozgékonyága a növekvő primycin koncentráció hatására csökken a vizsgált régióban (18.

és 19. ábrák). A mindkét törzs esetében kapott $2A'_{zz}$ értékek telítődése a növekvő primycin koncentráció függvényében a plazma membrán „ns-os régiójának” primycin felvételének korlátját bizonyítja. A telítődés a $33erg^+$ törzs esetében $64 \mu\text{g ml}^{-1}$, az $erg-2$ törzs esetében pedig $256 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin kezelésnél mutatkozik (19. ábra), amely értékeknél a szaporodás gátlásban már teljes gátlást tapasztaltuk (15. ábra).

A $2A'_{zz}$ értékeket a reciprok hőmérséklet függvényében ábrázolva egy nem- lineáris összefüggést kapunk és egy jól meghatározható fázis-tranzíciós hőmérsékletet lehet belőlük megállapítani 0 és 30°C között. A $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin kezelés mindkét törzs esetében 5°C -kal növelte a T_m -et (20. ábra). Magasabb hőmérsékleten a külső és belső csatolási állandók intenzitása már nem megoldható és a spektrum hajlamos izotróp „three-line” EPR spektrumnak látszani.

A kontrolltól eltérő T_m -ek utalnak arra, hogy a primycin molekulák kölcsönhatásba tudnak lépni a membránt alkotó vegyületekkel és ezáltal egy kevésbé flexibilis membrán szerkezet jön létre. A két törzs membránja között tapasztalt fázisátmenet különbségek pedig a már fentebb említett szterin összetétel és a telítetlen zsírsavak megváltozott arányának a következménye. A membrán ergoszterin tartalma erősen befolyásolja a plazma membrán dinamikáját: magasabb ergoszterin tartalom nagyobb rend paraméter értékeket eredményez az 5-SASL-el jelölt membránban (Pesti és mtsi., 2000), tehát a membrán rendezettebb struktúrájú magasabb ergoszterin tartalom esetén. Mivel az $erg-2$ törzs membránja nem tartalmaz ilyen vegyületet, megállapítható, hogy a primycin fő támadáspontja nem az ergoszterin.

7.2.3.2. ST-EPR mérések

ST-EPR méréseket végeztünk, hogy jellemezzük a primycin kezelés hatására bekövetkezett „igen lassú” molekuláris mozgásokat a lipid kettős rétegben. Az ST-EPR módszer olyan mozgások detektálására alkalmas, amelyek 10^{-7} és 10^{-3} s közötti rotációs korrelációs idővel (τ_c) rendelkeznek (Hyde 1978, Hyde és Dalton, 1979, Hemminga, 1983, Marsh, 1980).

Munkánk során az 5-SASL 20°C -on felvett ST-EPR spektrum C'/C csúcsarányát határoztuk meg, majd ebből következtettünk a τ_c értékekre (Squire és Thomas, 1986).

Reprezentatív ST-EPR spektrumot a 21. ábra mutatja. A $33erg^+$ és $erg-2$ törzseknél tapasztalt lipid mozgások becsült τ_c értékeit az 8. táblázat tartalmazza. Az alacsonyabb korrelációs idők azt mutatják, hogy a spin jelölő mozgékonyasága primycin kezelés hatására

csökkent, amely a primycin-lipidek közötti kölcsönhatás következménye a vizsgált membrán régióban.

Primycin kezelés hatására a membránba beépül spin jelölő anizotróp mozgása megváltozott. A kontrol plazma membránban anguláris mozgás ($\tau_c \approx 10^{-6} - 10^{-8}$ s) és a jelölő hossz tengelye körüli forgást ($\tau_c \approx 10^{-8} - 10^{-9}$ s) is ki lehetett mutatni (Hemminga, 1983) Kezelés hatására, azonban, ezek a mozgások már nem voltak detektálhatók és a membrán próba sokkal lassabb mozgásokat mutatott (22. ábra). Közel szobahőmérsékleten a folyékony kristály fázis, amelynek a korrelációs ideje 10^{-9} s, kezelés hatására a gél fázis (10^{-5} s) állapotához közelített. A kontroll mintához viszonyított 1-1,5 nagyságrenddel lassabb mozgások pedig a kezelt minta átszerveződött membrán szerkezetére utaltak.

7.2.3.3. A konvencionális és ST-EPR mérések összevetése

A protoplasztok direkt primycines kezelése során a primycin molekulák egy része bejutott a membránba. (A kezelés során az extracelluláris térben maradt felesleges primycin mennyiséget mosással eltávolítottuk.) A membránban lévő primycin egy része bizonyos membránalkotó vegyületekkel, feltehetőleg a zsírsavakkal (ld. 7.4 fejezet) stabil kötéseket hozott létre, másik része a membránban maradt, és tulajdonságából adódóan (a primycin lipid oldékony vegyület) nem távozott a vizes fázisba.

A primycin kezelés hatására a membránban a következő folyamatok játszódtak le:

A konvencionális méréseink során a spin jelölt lipidekre karakterisztikus spektrumokat kaptunk (Hoebeke, 2000). A V1 spektrumok a spin jelölő ns-os korrelációs idejű mozgásáról adtak információt, amely egy anizotróp mozgáshoz rendelhető ($2A'_{zz}$ értékek: 50-60 G közöttiek voltak). Ez a mozgás arra utalt, hogy a plazma membránban volt olyan fázis ahol a jelölőnek szabad rotációs-diffúziója van. (A foszfolipidek heterogenitása miatt, a membránban eltérő molekuláris sebességgel rendelkező fázisokat detektáltunk.) A $2A'_{zz}$ értékek a primycin koncentráció emelésével egy telítési görbét mutattak (19. ábra), tehát a szonda molekula korrelációs ideje egy ideig csökkent, majd beállt egy állandó értékre. A membránnak ezen fázisában kialakult egy olyan flexibilitás, amely már nem volt csökkenthető további primycin molekulák hozzáadásával.

A mintában detektált ST-EPR jel (21. ábra) arra engedett következtetni, hogy a plazma membránban volt egy lassabb molekuláris mozgásokkal rendelkező fázis, ahol a szonda molekula korrelációs ideje μ s-os skálán mozgott (8. táblázat) (Krinichnyi, 1991, Hemminga és mtsi., 1999, Marsh, 2007). Ez a fázis a lipid kettősrétegnek egy olyan régiója ahol a

primycin képes volt kémiai kötést kialakítani bizonyos membránalkotó vegyületekkel (valószínű ez a zsírsav láncok régiója.) Ha növeltük a biológiai rendszerbe bevitt primycin molekulák számát, akkor a kémiai kötésbe kerülő primycinek száma is nőtt mindaddig, amíg szabad kötőhelyeket találtak a primycin molekulák. Bizonyos koncentráció felett ebben a fázisban is telítést tapasztaltunk. Feltehetőleg a „feleslegben” hozzáadott primycin molekulák a membrán mélyebb rétegeibe kerültek, valamint bejutottak a sejtbe. (Mivel az általunk használt spin jelölő csak a membrán felszínhez közeli hidrofób régiójáról adott tájékoztatást a primycin mélyebb rétegekben kifejtett hatását nem tudtuk detektálni.)

Egy köztes koncentrációt kiválasztva megvizsgáltuk a T_m -et, amelyből kiderült, hogy primycin kezelés hatására a membrán magasabb hőmérsékleten váltott át a gél fázisból folyékonyabb fázisba, tehát a primycin merevebbé tette a membránt, amely jelenség összefüggésben állt a fent említett primycin és membránalkotó vegyületek között kialakuló kémiai kötésekkel.

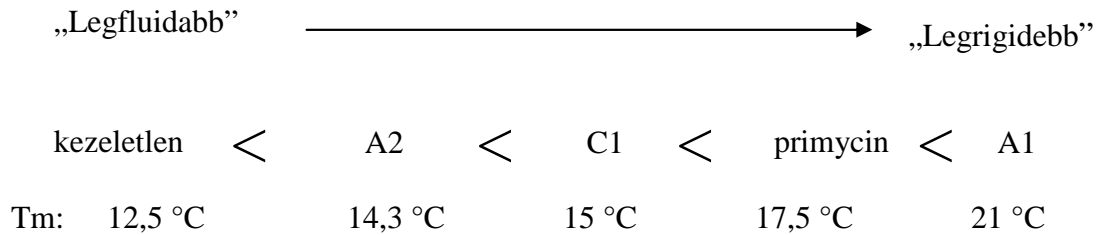
Szembetűnő a telítési görbék különbsége a szülői és mutáns törzsek között, amely a két törzs eltérő membrán szerkezetéből adódik. Az *erg-2* törzs esetében magasabb koncentrációnál tapasztaltunk telítődést a ns-os fázisban, tehát a μ s-os fázisban több primycin specifikus vegyületet tartalmazhatott a mutáns membránja.

7.3. A primycin A1, A2 és C1 komponensek *in vivo* membrándinamikai hatásának vizsgálata *33erg*⁺ törzsön EPR spektroszkópiával

Az egyes primycin komponensek hatásmechanizmusáról szóló megjelent szakirodalmat nem találtam. Mivel a primycin (komplex)- nek bizonyított plazma membrán károsító hatása van, feltételeztük, hogy az egyes komponensek is hasonló tulajdonságúak. Ezért elvégeztük a membrándinamikai vizsgálatokat az A1, A2 és C1-es komponensekkel is.

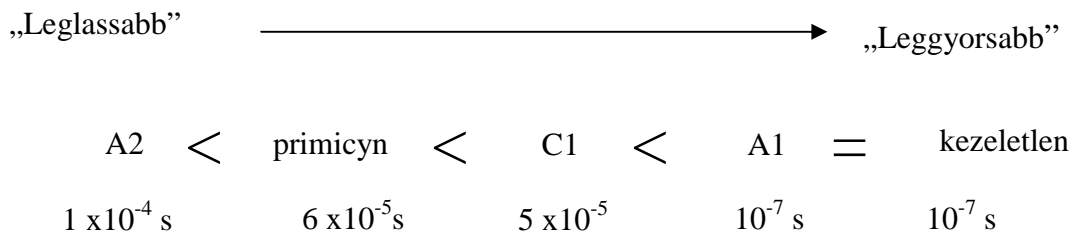
7.3.1. Konvencionális EPR mérések

A T_m alapján a primycin komponensek a spin jelölő környezetének a fluiditását a ns-os fázisban a következő sorrendben csökkentették (23. ábra):



7.3.2. ST-EPR mérések

Mivel az általunk vizsgált biológiai membrán rendszerben létezett olyan fázis, illetve fázisok ahol μ s-os nagyságrendű molekuláris mozgások mentek végbe, az ST-mérések (9. táblázat) a következő összefüggéseket mutatták. Az L'/L csúcsok (mesterséges membránok esetében) a szonda molekula hossz tengelyének anizotróp mozgását (szögelfordulását) írják le (Hemminga és mtsi., 1999, Marsh, 2007), azonban a mi *in vivo* biológiai membrán rendszerünkben ez a típusú mozgás a membrán összetettsége miatt csak valószínűsíthető volt. Az L'/L csúcsokból becsült τ_1 sebessége változó volt a különböző primycin komponensek esetében és a következő képen változott a primycin komponensek hatására:



A C'/C csúcsarányokban is szignifikáns különbségeket tapasztaltunk, mely szerint a szonda molekula saját hossz tengelye körül változó sebességben tudott forogni a különböző primycin komponensek membránban való jelenlétében. Ennek a, rendszerünkben feltételezett, mozgásnak (τ_c) a sebessége az alábbi módon változott:

„Leglassabb” \longrightarrow „Leggyorsabb”

primycin < C1 < A2 < A1 < kezeletlen
 $4 \times 10^{-6} \text{ s}$ 10^{-6} s 9×10^{-7} 5×10^{-7} 2×10^{-8}

Ha összevetjük a mozgás típusokat, megállapítható, hogy a primycin valamennyi vizsgált komponense külön-külön, vagy együttesen (primycin komplexként) növelte a plazma membrán viszkozitását a kezeletlen membránhoz képest.

A primycin komponensek közül az A1 komponens tűnt a legdestruktív hatásúnak a fázistranzíciós mérések alapján. Azonban ennek a vegyületnek a membránban való jelenléte a szonda molekula „ μs -os membránfázisban” való τ_1 mozgását nem befolyásolta (vagy csak igen kis mértékben).

Hasonló volt megfigyelhető a többi komponens esetében is. Mindez arra enged következtetni, hogy a vizsgált primycin komponensek mindegyike be tud épülni a plazma membránba és szerkezetüktől függően növelik a viszkozitást, vagyis szerkezetüktől függően kisebb-nagyobb mértékben rigidizálják a membránt.

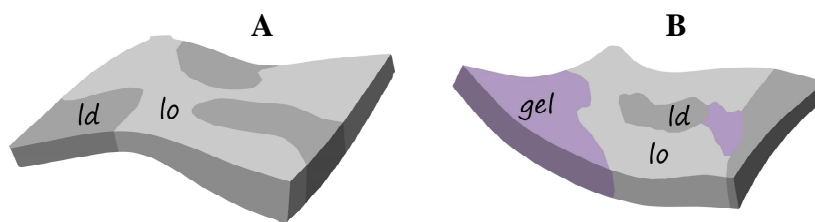
7.3.3. ST- és konvencionális mérések összehasonlítása

A lipidek heterogenitásának nemcsak strukturális, hanem funkcionális következménye is van. Az egyes lipid típusok csoportosulhatnak a membránban, és létre hozhatnak „raft”-okat, amelyek fázis elkülönüléshez és fázisformáláshoz vezetnek (Brown és mtsi., 2000, Wisniewska és mtsi., 2003). Ezeknek a fázisoknak sajátos összetétele és mozgása van (Simons és Ikonen, 1997, Brown és London, 1997) A lipid kettősrétegben két fő fázis van, amelyet a hőmérséklet befolyásol. A fázisok az egyes membránokra karakterisztikusak és nagymértékben függenek az alkil láncok hosszúságától és a szaturáció mértékétől. A fázistranzíciót tekintve az egyik fázist a T_m előtti szakasz definiálja, ez a gél fázis. Ebben a fázisban a lipid alkil láncok rendezettebb struktúrát mutatnak és mozgásuk is visszafogottabb. A T_m utáni szakasz a folyékony kristály vagy „liquid disordered” fázist jellemzi, amelyben az alkil láncok rendezetlenek és gyorsabb mozgást végeznek (Eaman és Deleu, 2010). Ha a lipid kettősréteg legalább két olyan lipidet tartalmaz, amelynek T_m -je különbözik, fázis elkülönülés fog a membránban bekövetkezni és a folyékony kristály és gél fázisok együttes jelenléte lesz megfigyelhető. A biológiai membránokban a (tiszta) gél fázis önmagában nem létezik, a szterinek jelenléte miatt. Azonban a két fluid fázis között fázis szeparáció jelensége

meg figyelhető. Azaz a „liquid ordered” fázis elkülönül a liquid disordered fázistól, amely szeparáció mértéke függ a szterinek mennyiségétől (Brown és London, 1998). (A pimycin jelenlétében is egy ilyenfajta fáziselkülönülés játszódhatott le a membránban.)

A „raft”doméneknek funkcionális szerepük, a legújabb kutatások szerint, igen jelentős. Rendezettségük eltéréséből adódóan befolyásolják a proteinek konformációváltozását ezáltal a jelátviteli rendszereket. A „raft”-okban lévő proteinek pedig elősegíthetik a domének közötti interakciókat. A szterinek kivonása a „raftok” funkcióját tönkretelheti és bizonyítottan a K^+ csatornához kötött domének funkció vesztéséhez vezet (Wisniewska és mtsi., 2003, Brown, 2000).

Az EPR mérések során számolt molekuláris mozgásokra alapozva, a kontroll (illetve az A1 komponens esetében) két fázist tapasztaltunk. Jól meghatározható volt a „liquid disordered”, azaz a fluid fázis (10^{-10} s-os molekuláris mozgásokkal, a $2A'_{ZZ}$ értékek alapján) és a „liquid ordered” fázis (10^{-6} - 10^{-8} s-os mozgásokkal, ST-mérések alapján). Azonban a pimycin kezelt mintáknál kimutatható volt, egy harmadik, a gél fázis is, amely a természetes, biológiai membránokban, önmagában, nincsen jelen (10^{-4} - 10^{-5} s-os mozgásokkal, ST-mérések alapján, ld. 11. táblázat) (Wisniewska és mtsi., 2003). A gél fázis létrejötte tehát a pimycin hatására bekövetkező lipid kettősréteg átszerveződésének a következménye. Valószínűleg a pimycin a telítetlen zsírsavakat tartalmazó foszfolipidekkel, kapcsolatba lép (ld. 7.4. fejezet) és szegregálódik. A telített foszfolipidek pedig létrehoznak egy erősen rendezett, gél fázist (31. ábra).



31. ábra

Membrán fázisok elképzelésének vázlata. Jelölések: kontroll membrán (A) a „liquid disordered” (ld) és „liquid ordered” (lo) fázisokkal, valamint a pimycin kezelt membrán (B) amelyben már a gél fázis (gel) is megjelenik a két másik fázis mellett.

A primycin hatására átrendeződött membránban a transzport fehérjék, valamint a csatornaképző fehérjék konformáció változást szenvednek, amelynek következtében elveszti a membrán a eredeti fiziológiás barrier funkcióját (Wisniewska és mtsi., 2003).

Továbbá irodalmi adatokból tudjuk, hogy a primycin gátolja az RNS polimeráz I és a triptofán piroláz aktivitását, valamint növeli a májsejtek tirozin aminoszferáz aktivitását, amely adatok bizonyítékul szolgálnak a jelátviteli funkciók sérülésére, a membrán fázisok átalakulásának következtében (Blum, 1965, Vályi-Nagy és Daróczy, 1967, Nógrádi, 1988).

	gél	"liquid ordered"	"liquid disordered"
kezeletlen	nincs	2×10^{-8} s	$\geq 10^{-10}$ s
primycin komplex	6×10^{-5} s	4×10^{-6} s	$\geq 10^{-10}$ s
primycin A1	nincs	1×10^{-7} s	$\geq 10^{-10}$ s
primycin A2	10^{-4} s	9×10^{-7} s	$\geq 10^{-10}$ s
primycin C1	5×10^{-5} s	10^{-6} s	$\geq 10^{-10}$ s

11. táblázat

A primycin és primycin komponensek hatására létrejött membránfázisok molekuláris mozgásainak ideje.

7.4. A primycin fő membránalkotókkal való kölcsönhatásának vizsgálata *in vitro* „steady-state” fluorimetriával

7.4.1. A primycin kölcsönhatása az olajsavval

Miután felvettük az emissziós spektrumokat (25. ábra), szükséges, de ugyanakkor elégséges számú Gauss-görbékre bontottuk. Összesen 4 Gauss-görbét tudunk úgy illeszteni a spektrumokra, hogy az a legkisebb négyzetes hibával illeszkedjen. Miután a 16-36 °C közötti hőmérséklet-tartományban megmértük, majd Gauss-görbékre bontottuk a fluoreszcencia-spektrumokat, a Gauss-görbék alatti területet a hőmérséklet függvényében ábrázoltuk (26. ábra).

A hőmérséklet emelésével ezek közül 2 Gauss-görbénél tapasztaltunk változást. Ebből az oldatbeli kémiai egyensúly vagy egyensúlyok eltolódására következtettünk. Ezért a továbbiakban ezekkel végeztük el a számításokat. A kiértékelést a *Benesi-Hildebrand* módszerrel végeztük (Benesi és Hildebrand, 1949):

$$\frac{1}{I - I_0} = \frac{1}{a} \cdot \frac{1}{[p]} \cdot \frac{1}{K} + \frac{1}{a}$$

A *Benesi-Hildebrand* egyenlet lényege, hogy amennyiben a kölcsönhatás eredményeként a reaktánsokból 1:1 sztöchiometriájú komplex képződik, akkor az adott hullámhosszon mért fluoreszcencia-intenzitás változás reciprokát ábrázolva a hozzáadagolt, egyre növekvő koncentrációjú vendégmolekula koncentrációjának reciprokának függvényében egyenest kell kapnunk. Amennyiben 1:1 a komplex sztöchiometriai aránya, akkor egy olyan egyenest kapunk, amelynek tengelymetszetét elosztva a meredekségével az egyensúlyi állandót (K) kapjuk eredményül. A számításhoz természetesen ugyanazon hullámhosszon mért intenzitás adatokat kell használni.

Esetünkben, a korábban változást mutató (gauss1 és gauss4) Gauss-görbékre a *Benesi-Hildebrand* módszert alkalmazva egyenest kaptunk, ami arra utalt, hogy a primycin és olajsav kölcsönhatásának eredményeként előálló termék sztöchiometriai aránya 1:1 (27. ábra).

A termodinamikai paramétereket a Van't Hoff elmélet alapján számítottuk ki, amely a következőkön alapul. Ha az egyensúlyi állandók logaritmusát az T^{-1} függvényében ábrázoljuk, egy egyenest kapunk. Az egyenes meredekségéből a ΔH , tengelymetszetéből a ΔS határozható meg (28. ábra):

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R}$$

	1. reakció	2. reakció
ΔH (J mol ⁻¹)	-27769,22	8078,66
ΔS (J mol ⁻¹ K)	-10,14	53,94
$\Delta G_{20^\circ\text{C}}$ (J mol ⁻¹)	-25798,20	23884,16

12. táblázat

A rendszerben megjelenő 2 reakció (a primycin –olajsav asszociátumok kialakulása)

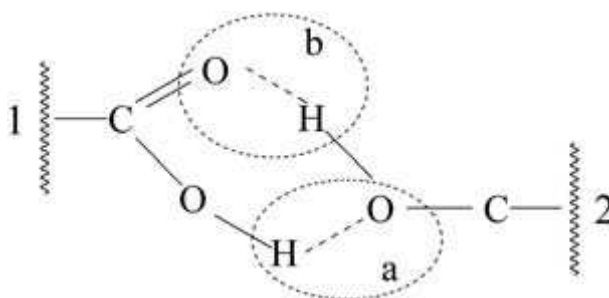
Van't Hoff elmélet alapján számított termodinamikai paraméterei.

A kölcsönhatás erőssége, vagyis a szabadentalpia változás mértéke (~23-24 kJ mol⁻¹) szobahőmérséklet közelében másodlagos kötések kialakulására utal, ami esetünkben a molekula szerkezetét figyelembe véve H kötések kialakulását jelenti (32 ábra).

A termodinamikai paraméterek két olyan reakciót mutatnak, melyekhez közel azonos szabadentalpia változás tartozik, vagyis a kialakuló kétféle asszociátum stabilitása szobahőmérséklet közelében lényegében egyforma. Ugyanakkor az ehhez tartozó entalpia és entrópia értékek igen nagymértékben eltérnek. Ez az asszociátumot stabilizáló erők jelentősen eltérő természetét mutatja.

Az olajsav-primycin kölcsönhatásban az ábrán látható hidrogénkötések kialakulhatnak egyenként és együttesen is (32. ábra). Könnyen belátható, hogy a külön-külön kialakuló H kötések esetében a komplex lényegesen nagyobb flexibilitással rendelkezik, mint amikor az ábrán látható kettős H kötés alakul ki. A kétféle kötés egyidejű kialakulása tehát merevíti az olajsav molekulát, egészen pontosan az olajsav mozgását gátolja.

Fontos megemlíteni, hogy a mozgás korlátozása a szabadsági fok korlátozását is eredményezi, ami a rendszernek a molekuláris asszociációt követő nagyobb rendezettségét vonja maga után. Tehát ilyen reakciók során az entrópia (ΔS) csökken. Mérési eredményeink is pontosan ezt mutatják.



32. ábra

Az olajsav (1) –primycin (2) kölcsönhatásban kialakuló hidrogénkötések
A külön-külön kialakuló H hidak (a) vagy (b) egy sokkal flexibilisebb
komplexet eredményeznek, szemben a kétféle
hidrogén kötés egyidejű jelenlétével.

Az első reakcióban, a két hidrogénkötés kialakulása esetén, az entalpiaváltozás (~ 27 kJ mol⁻¹) mintegy háromszorosa a második reakcióban megfigyeltnek (~ 8 kJ mol⁻¹), amikor csak egyetlen hidrogénkötés stabilizálja az olajsav-primycin komplexet.

Látható tehát, hogy a kettős H kötés jóval erősebb, mint az egy H kötés. Ugyanakkor az entrópiaváltozás az egyes H kötés esetében pozitív (nagyobb), míg a kettős H kötés esetében negatív (kisebb).

Fontos megjegyezni, hogy e tekintetben az entrópiaváltozás abszolút értéke a lényeges, az előjel kevésbé fontos. Ugyanis azt, hogy ez milyen entrópia-tartományban történik, egy additív tag tekinthető tag határozza meg. Ez az additív tag abból származik, hogy a molekuláris asszociációt egy legalább részleges deszolvatáció előzi meg, ami a sok kis oldószermolekulának a szolvátburokból történő távozása, azaz szabaddá válása miatt entrópiánövelő hatású (Kunsági-Máté és Iwata 2009c). Ezért, habár a molekuláris asszociáció a rendezettséget növeli (az entrópiát csökkenti), a deszolvatáció az entrópia olyan mértékű növekedését eredményezheti, hogy a bruttó folyamatban az entrópiaváltozás pozitív is lehet, mint ahogy azt egyik fenti esetben is láthatjuk (ld. 2. reakció ΔS értéke).

7.5. A primycin direkt és indirekt biológiai hatásának vizsgálata

7.5.1. A primycin közvetlen membránra gyakorolt hatásának vizsgálata

Az intracelluláris térből származó 260 nm-en fényabszorpcióval rendelkező nukleotidok, nukleozidok, és szabad bázisok kiáramlásának nyomon követése egyszerű és alkalmas módszer a primycin membrán barrier funkció károsodását okozó tulajdonságának kimutatására (Lee és Lewis, 1968, O'Neill és mtsi., 2004). Ezen anyagok kiáramlásával párhuzamosan ionos és nem ionos oldószerekben (például víz, 1M szukróz, 0,5M NaCl) Mg^{2+} ion, aminosav és protein kiáramlást is leírtak (Allwood és Russel, 1970).

A plazma membrán barrier funkciójának elvesztése beigazolódott a vizsgálat során. A $64 \mu g ml^{-1}$ primycines kezelés hatására megnövekedett szabad 260 nm-en abszorbeáló anyagok mennyisége az extracelluláris közegben (29. ábra).

Korábbi adatok is alátámasztják a primycin ezen tulajdonságát. A primycin idő és koncentrációtól függően növelte a humán eritrocitákon mért szelektív membrán permeabilitást alkáli fém kationokra nézve a következő sorrendben: $Cs^+ > Rb^+ = K^+ \gg Na^+$ (Blaskó és mtsi, 1981, 1986).

7.5.2. A primycin sejtfalra gyakorolt hatásának vizsgálata

A dimorf *C. albicans* sejtek morfológiai változáson mentek keresztül azáltal, hogy a primycin megváltoztatta a sejtek belső milliójét és a sejtmorfológia szabályozását (Odds, 1988).

A *C. albicans* esetében különböző külső környezeti tényezők befolyásolni tudják a hifa illetve a pseudohifa formálódást különböző jelátviteli utakon keresztül. A pseudohifa formálódásért, amelyet az élesztő sejtek erős polarizáltsága előz meg (unipoláris sejtek), a cAMP útvonal a felelős (Berman és Sudbery, 2002). A *33erg⁺* törzs esetében a $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin koncentrációnál tapasztalt pseudohifa sejtípus a primycin okozta jelátviteli funkciók változásának is lehet a következménye (ez esetben, valószínűleg a cAMP útvonal aktivitását növeli) ami a fent említett membrán fázis átrendeződés következménye lehet (31. ábra) (Wisniewska és mtsi., 2003).

A SEM felvételeken határozott sejtfelszíni eltorzulás tapasztaltunk, ami a plazma membrán barrier funkció elvesztésének lehet a következménye (30. E ábra). Hasonló sejtfelszíni elváltozást lehetett látni ugyanezen törzs fagyasztva-töréses elektron mikroszkópos felvételein nisztatin és mikonazol kezelést követően. A mikonazol kezelés plazma membrán, és ebből kifolyólag, sejtfaldezorganizációt okozott a *33erg⁺* törzsön, amely a sejtmembránba beépült metilált szterinek következménye volt (Pesti és mtsi., 1981a, Accoceberry és Noel, 2006).

8. ÖSSZEFOGLALÁS

1. A kísérletsorozat első lépéseként meghatároztuk a primycin MGK-ját mikro- és makrodilúciós technikákkal, valamint szaporodásgátlását a *C. albicans 33erg⁺*, szülői és ennek ergoszterin mutáns *erg-2* törzseire. Az MGK értékek meghatározására azért volt szükséges, hogy biológiailag releváns koncentrációkkal végezzük el a membrán-biofizikai méréseinket, illetve a primycin - plazma membrán kölcsönhatás biológiai következményeinek vizsgálatát. Kimutattuk, hogy a törzsek között jelentős érzékenységbeli különbség van: *33erg⁺* esetében 12 és 8, az *erg-2*-nél pedig 16 és 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MGK értékeket kaptunk mikro- és makrodilúciós módszerrel. A szaporodásgátlás a szülői törzsnél 64, a mutáns törzsnél pedig 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nél volt kimutatható, ami egyben arra is utalt, hogy a plazma membránban lévő lipid alkotók mennyisége és aránya alapvetően befolyásolja a primycin antimikrobiális hatását.
2. „Steady-state” fluoreszcens anizotrópia méréseink során bebizonyítottuk, hogy a primycin megváltoztatja a membrán dinamikáját. Ennek pontosabb jellemzésére EPR spektroszkópiát alkalmaztunk. Konvencionális EPR mérések segítségével bebizonyítottuk, hogy a primycin növeli a plazma membrán fázisátmeneti hőmérsékletét 11 °C-ról 16 °C-ra a szülői *33erg⁺* törzs esetében és 12,5 °C-ról 17,5 °C-ra az ergoszterin mutáns *erg-2* törzs esetében *in vivo*. ST-EPR technikát alkalmazva fényt derítettünk arra, hogy a primycin bizonyos, a membránban természetesen jelen lévő, molekuláris mozgásokat korlátozza a μs -os tartományban. A spin jelölő molekula rotációs korrelációs ideje a *33erg⁺* és *erg-2* kontroll minták esetében 60 és 100 ns volt. Ez a korrelációs idő fokozatosan csökkent a növekvő primycin koncentráció függvényében egészen 8 és 1 μs -ig.
3. A primycin fő komponenseinek (A1, A2 és C1) membrándinamikai vizsgálatát szintén konvencionális és ST-EPR módszerekkel vizsgáltuk. A fázisátmenet vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az A1 komponens (128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációban) rendelkezik a legnagyobb fázisátmeneti hőmérséklettel, 21 °C-al, vagyis ez bizonyult a leghatékonyabb primycin alkotó vegyületnek. Az A2 komponens 14,3 °C és a C1-es komponens 15 °C fázisátmeneti hőmérséklettel rendelkezett. Az ST-EPR vizsgálat során leírt molekuláris

mozgások segítségével bebizonyítottuk, hogy a primycin és a vizsgált főkomponensei létrehozhatnak egy harmadik, gél állapotú fázist, amely természetes körülmények között nincs jelen a plazma membránban. Ezáltal bebizonyítottuk, hogy a primycin átszervezi a lipidkettősréteget, amely a membránhoz kötött transzport fehérjék, valamint a csatornaképző fehérjék konformáció változását, ezáltal a normális barrier funkció elvesztését és a jelátviteli rendszerek sérülését, vonja maga után.

4. A primycin- membránalkotó vegyületek *in vitro* vizsgálataiban meghatároztuk egy primycin-olajsav komplex létrejöttét, amely molekula komplexet két hidrogénkötés együttesen ($\Delta H: -27,77$) vagy külön-külön ($\Delta H: -8,08$) stabilizál.

A fenti kísérletsorozattal bizonyítottuk, hogy a primycin támadáspontjai a membránban jelen lévő zsírsavak.

5. Bizonyítottuk, hogy a plazma membrán biofizikai változásainak a közvetlen biológiai következménye olyan nagy molekulású sejtalkotók, mint a 260 nm-en abszorbeáló nukleotidok, nukleozidok, és szabad bázisok, $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ -es 2 órás primycin kezelés hatására, ~62-76 %-os vesztesége a *33erg*⁺ és *erg-2* törzseknél. A sejt barrier funkciójának elvesztése közvetetten azt eredményezte, hogy $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációjú primycin kezelés hatására unipoláris pszeudohifa formálódás és sejt felszíni torzulás történt. *C. albicans* esetében ez a változás feltételezhetően a sejt belső miliójének, ionvesztésének és nukleinsav vesztesésének, valamint cAMP jelátviteli rendszerben történő változásának lehet a következménye.

Munkánkkal először bizonyítottuk - biofizikai módszerekkel - a primycin-plazma membrán direkt kölcsönhatását és magyarázatot adtunk arra, hogy a primycin hogyan képes szinte az összes sejt-féleségre hatni, valamint a korábbi primycin kutatások során kapott ellentmondásosnak tűnő hatásmechanizmus eredményeket is tisztáztuk.

Új eredményeknek számítanak: (i) a primycin plazma membrán rigidizáló hatása és (ii) a membrán fázis átrendeződést kiváltó hatása, (iii) a primycin zsírsavakkal történő hidrogén kötés kialakításának képessége valamint, (iv) a primycin főkomponenséinek eltérő membrán dinamikát kiváltó hatásának bizonyítása.

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A tanulás, és különösen a doktori tanulmányok hatalmas lemondással járnak nemcsak annak, aki a közvetlen résztvevője a folyamatnak, hanem mindazoknak, akik látszólag kívülállóként végigkísérik az embert ezen a hosszú nehézségekkel és örömeikkel teli úton. Egy ilyen munka soha sem egyetlen ember erőfeszítése, hanem mindazoknak az áldozatos munkája, akikkel együtt dolgozunk, és akik türelemmel és odafigyeléssel viseltetnek irántunk.

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek dr. Pesti Miklós professzor úrnak, hogy lehetőséget teremtett a doktori iskolában arra, hogy kutatói pályára léphessek és szakértelmével, emberségével segítette és irányította a kutatásaimat, tudományos munkámat.

Szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni dr. Belágyi József professzor úrnak, hogy lehetővé tette az EPR-es vizsgálatok véghezvitelét, szakmailag végigkísérte és támogatta a munkámat, valamint lehetőséget adott arra, hogy bepillantást nyerhessek a fizika bonyolult, ám rendkívül izgalmas világába.

Hálás köszönet illeti dr. Kunsági-Máté Sándor docens urat, hogy az *in vitro* fotolumineszcencia vizsgálatokban útmutatást adott és türelmével, segítőkészségével hozzájárult, hogy metodikai ismereteimet színvonalas fluorimetriás és kvantum kémiai módszerekkel bővíthessem.

Köszönöm Pallos József Péternek a PannonPharma Kft igazgatójának, hogy az Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékét bízta meg három kutatási pályázat megvalósításával biztosítva a kutatási program alapját szolgáló szakmai ismereteket és ezáltal lehetővé tette a kutatás forrásainak biztosítását.

Köszönöm Péntes Ágotának és Juhász Ákosnak hogy hozzájárultak, az általuk végzett kísérletek eredményeinek közléséhez az eredmények értékelése című fejezetben.

Szeretném megköszönni az Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak a mikrobiológiai munkákban nyújtott segítséget, különösen Gazdag Zoltánnak PhD, Horváth Eszternek PhD, Papp Gábornak PhD és Kálmán Nikolettának, akik, bátorítottak és elláttak értékes és praktikus szakmai tanácsokkal.

Nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek, családomnak, hogy minden feltételt megteremtettek ahhoz, hogy ez a disszertáció elkészülhessen.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Aberhart, J., Fehr, T., Jain, R. C., de Mayo, P., Motl, O. J. Primycin. 1970. Am. Chem. Soc. 92: 5816-5817.
- Accoceberry, I., Noel, T. Antifungals cellular targets and mechanisms of resistance. 2006. Therapie 61: 195-199
- Allwood, M. C., Russel, A. D. Influence of ionic and nonionic materials on thermally-induced ribonucleic acid degeneration and leakage in *Staphylococcus aureus*. 1970. J. Pharm. Sci. 59: 180-183.
- Balint, B. Favourable observations with Ebrimycin gel in the outpatient department of surgery. 1987. Ther. Hung. 35: 140-142.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. Yeast: Characteristics and identification. 1983. Cambridge University Press, Cambridge Cambridgeshire and New York.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. Yeast: Characteristics and identification, 3rd edn. 2000. Cambridge University Press, Cambridge.
- Belágyi, J., Pas, M., Raspor, P., Pesti, M., Páli, T. Effect of hexavalent chromium on eukaryotic plasma membrane studied by EPR spectroscopy. 1999. Biochim. Biophys. Acta. 1421: 175-182.
- Benesi, H., Hildebrand, J. A. Spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. 1949. J. Am. Chem. Soc. 71: 2703-2707.
- Berman, J., Sudbery, P. E. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. 2002. Nature Rev. Gen. 3: 918-930.
- Biro, J., Varkonyi, V. Ebrimycin gel in the treatment of pyodermas and bacterial secondary infections. 1987. Ther. Hung. 35: 136-139.
- Blaskó, K., Györgyi, S., Horváth, I. Effect of primycin on monovalent cation transport of erythrocyte membrane and lipid bilayer. 1979. J. Antibiot. 32: 408-413.
- Blaskó, K., Györgyi, S. Alkali ion transport of primycin modified erythrocytes. 1981. Acta Biol. Med. Germ. 40: 465-469.

- Blaskó, K., Shagina, L. V., Györgyi, S., Lev, A. A. The mode of action of some antibiotics on red blood cell membranes. 1986. *Gen. Physiol. Biophys.* 5: 625-635.
- Blum, J., Inhibition of growth of *Euglena* and *Astasia* by primycin and prevention of the effect by polynucleotides. 1965. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 635-645.
- Brown, D. A., London, E. Structure of detergent resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? 1997. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 103-114.
- Brown, D. A., London, E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. 1998. *J. Membr. Biol.* 164: 103-114.
- Brown, D. A., London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000. 275: 17221-17224.
- Brown, M. F., Thurmond, R. L., Dodd, S. W., Otten, D., Beyer, K. Elastic deformation of membrane bilayers probed by deuterium NMR relaxation. 2002. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8471-8484.
- Burger, K. *Az analitikai kémia alapjai, Kémiai és műszeres elemzés.* 2002. Alliter, Budapest.
- CLSI; Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Third edition. 2008. CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Damjanovich, S., Fidy, J., Szöllösi, J. *Orvosi biofizika.* 2006. Medicina, Budapest.
- de Vries, A. H., Yefimov, S., Mark, A. E., Marrink, S. J. Molecular structure of the Lecithin ripple phase. 2005. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102: 5392-5396.
- Eamann, M., Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. 2010. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14: 719-736.
- Fajer, P. G., Marsh, D. Microwave and modulation field inhomogenities and effect of cavity Q in saturation transfer EPR spectra. 1982. *J. Magn. Reson.* 49: 212-224.
- Farkas, N., Pesti, M., Belágyi, J. Effects of hexavalent chromium on the plasma membranes of sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. An EPR study. 2003. *Biochim. Biophys. Acta* 1611: 217-222.
- Ferretti, G. Properties of a phosphatidylcholine derivative of diphenyl hexatriene (DPH-PC) in lymphocyte membranes. A comparison with DPH and the cationic derivative

- TMA-DPH using static and dynamic fluorescence. 1993. *Membr. Biochem.* 10: 17-27.
- Gaffney, B. J. Fatty acid chain flexibility in the membranes of normal and transformed fibroblasts. 1975. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 664-668.
- Gaffney, B. J. Practical consideration for calculation of order parameters for fatty acid or phospholipids spin labels in membranes. 1976. Academic Press. New York.
- Gárdos, G., Szász, I., Sarkadi, B. *Membránok és membránbetegségek.* 1983. Medicina Könyvkiadó. Budapest.
- Ghannoum, M. A., Rice, L. B. Antifungal agents: mode of action, Mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. 1999. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 501-517.
- Goldman, S. A., Bruno, G. V., Freed, J. H. Estimating slow-motional rotational correlation times for nitroxides by electron spin resonance. 1972. *J. Phys. Chem.* 76: 1858-1869.
- Grell, E. *Membrane Spectroscopy.* 1981. Springer-Verlag. Berlin.
- Gyetvai, Á., Emri, T., Takács, K., Dergez, T., Fekete, A., Pesti, M., Pócsi, I., Lenkei, B. Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. 2006. *FEMS Yeast Res.* 6: 1140-1148.
- Haynes, K. Virulence in *Candida* species. 2001. *Trends Microbiol.* 12: 591-596.
- Helenius, A., Simson, K. Solubilization of membranes by detergents. 1975. *Biochim. Biophys. Acta.* 415: 29-79.
- Heimburg, T. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. 2000. *Biophys. J.* 78: 1154-1165.
- Heimburg, T. *Thermal biophysics of membranes.* 2007. Wiley. Germany, Weinheim
- Hemminga, M. A. Interpretation of ESR and saturation transfer ESR spectra of spin labeled lipids and membranes. 1983. *Chem. Phys. Lipids.* 32: 323-383.
- Hemminga, M. A., Van der Dries, I. J., Magusin, P. C. M. M., Van Dusschoten, D., Van der Berg, C. Molecular mobility in food components studied by magnetic resonance

- spectroscopy. 1999. Leslie and P.J. Lillford (eds.). Water management in the design and distribution of quality foods. Technomic Publishing, Lancaster.
- Henderson, F. Marshall, I. G. The effects of the antibiotic, primycin, on spontaneous transmitter release at the neuromuscular junction. 1984. Br. J. Pharmac. 81: 61-67.
- Hoebeke, M. ESR associated to spin label method in the study of photosensitization in liposomal solution. 2000. Bulletin. Roy. Scienc. Liege. 69: 103-110.
- Hori, K., Sakaguchi, A., Ishida, K., Nomura, T., Suzuki, K., Tsuchiya, S. Azole derivatives and antifungal drugs containing the same as an active component. 1993. United States Patent N. pat: 5, 183: 824.
- Hyde, J. S. Methods in enzymology. Enzyme structure. 1978. Academic Press. New York. p 480.
- Hyde, J. S., Dalton, L. R. Spin labeling: theory and applications, Vol. 2. 1979. L. J. Berliner. Academic Press. New York.
- Ipsen, J. H., Karlström, G., Mouritsen, O. G., Wennerström, H., Zuckermann, M. J. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. 1987. Biochim. Biophys. Acta. 905: 162-172.
- Israelachvili, J., Sjösten, J., Ericsson, L. E. G., MEhrström, M., Graslund, A., Ehrenberg, A. Theoretical analysis of the molecular motion of spin labels in membranes. ESR spectra of labelled *Bacillus subtilis* membranes. 1974. Biochim. Biophys. Acta 339: 164-172.
- Janiak, M. J., Small D. M., Shiplay, G. G. Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. 1979. J. Biol. Chem. 254: 6068-6078.
- Jones, R. H., Molitoris, B. A. A statistical method for determining the breakpoint of two lines. 1984. Anal. Biochem. 141: 284-290.
- Jourd'Heuil, D., Vaananen, P., Meddings, J. B. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. 1993. Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol. 264: 1009-1015.
- Jurányi, R. A fertőző betegségek általános és részletes járványtana. 1998. Medicina, Budapest.

- Krinichnyi, V. I. Investigation of biological systems by high resolution 2 mm wave band ESR. 1991. *Appl. Magnet. Res.* 2: 29-60.
- Kuhry, J. G., Fonteneau, P., Duportail, G., Maechling, C., Laustriat, G. TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. 1983. *Cell. Biophys.* 5: 129-140.
- Kulcsár, G. Microbiological activity of the active principle (primycin) of Ebrimycin gel. *Chinoin Dokumentation II/9-II/18*.
- Kunsági-Máté, S., Csók, Zs., Tuzi, A., Kollár, L. Permittivity-dependent entropy driven complexation ability of cone and paco tetranitro-calix[4]arene toward para-substituted phenols. 2008. *J. Phys. Chem. B* 112: 11743-11749.
- Kunsági-Máté, S., Kumar, A., Sharma, P., Kollár, L., Nikfardjam, M. P. Effect of molecular environment on the formation kinetics of complexes of malvidin-3-O-glucoside with caffeic acid and catechin. 2009a. *J. Phys. Chem. B* 113: 7468-7473.
- Kunsági-Máté, S., Bakonyi, S., Kollár, L., Desbat, B. Temperature-dependent solvent effect on the kinetic energy distribution on p-cresol molecule as building block of calixarene capsules. 2009b. *J. Incl. Phen. Macrocycl. Chem.* 64: 283-288.
- Kunsági-Máté, S., Iwata, K. Effect of cluster formation of solvent molecules on the preferential solvation of anthracene in binary alcoholic solutions. 2009c. *Chem. Phys. Lett.* 473: 284-287.
- Lakovicz, J. Principles of fluorescence spectroscopy, Third Edition. 2006. Springer. New York.
- Lee, T. C., Lewis, M. J. Mechanism of release of nucleotidic material by fermentating brewer's yeast. 1968. *J. Food Sci.* 33: 124-128.
- Lees, N. D., Kemple, M. D., Barbuch, R. J., Smith, M. A., Bard, M. Differences in membrane order parameter and antibiotic sensitivity in ergosterol-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. 1984. *Biochim. Biophys. Acta* 776: 105-112.
- Lichtenberg, D., R. J., Dennis, E. A. Solubilization of phospholipids by detergents: structural and kinetic aspects. 1983. *Biochim. Biophys. Acta.* 737: 285-304.
- Marsh, D., Molecular motion in phospholipid bilayers in the gel phase: long axis rotation. 1980. *Biochem.* 19: 1632-1637.

- Marsh, D. Saturation transfer EPR studies of slow rotational motion in membranes. 2007. *Appl. Magn. Res.* 31: 387-410.
- MBongo, N. M., Loiseau, P., Billon, M. A., Robert-Gero, M. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. 1997. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 352-357.
- McElhaney, R. N., Tourtellotte, M., E. 1971. The relationship between fatty acid structure and the positional distribution of esterified fatty acids in phosphatidylglycerol from *Mycoplasma laidlawii* B. *Biochim. Biophys. Acta* 202: 237-246.
- McGinnis, M. R. Laboratory handbook of medical mycology. 1980. Academic Press. New York.
- McIntosh, T. J. Difference in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. 1980. A molecular packing model. *Biophys. J.* 29: 237-246.
- McLaughlin, S. The electrostatic properties of membranes. 1989. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18: 113-136.
- Mészáros, L., König, T., Paróczai, M., Náhm, K., Horváth, I. Effect of primycin on the inner membrane permeability of rat liver mitochondria. 1979. *J. Antibiot.* 32: 161-166.
- Meszaros, C., Vezekenyi, K. Use of Ebrimycin gel in dermatology. 1987. *Ther. Hung.* 35: 77-79.
- Nógrádi, M. Primycin* (Ebrimycin®) – A new topical antibiotic. 1988. *Drugs of Today* 24: 563-566.
- Nyilasi, I., Kocsubé, S., Pesti, M., Lukács, G., Papp, T., Vágvölgyi C. *In vitro* interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. 2010. *J. Med. Microbiol.* 59: 200-205.
- Odds, F. C. *Candida* and candidiasis. A review and bibliography. 1988. Bailliére. Tindall. London, United Kingdom.
- O'Neill, A. J., Miller, K., Oliva, B., Chopra, I. Comparison of assays for detection of agents causing membrane damage in *Staphylococcus aureus*. 2004. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 1127-1129.

- Papp, T., Ménesi, L., Szalai, I. Experiences in the ebrimycin gel treatment of burns. 1990. *Ther. Hung.* 38: 125-128.
- Pesti, M., Campbell, J. M., Peberdy, J. F. Alteration of ergosterol content and chitin synthase activity in *Candida albicans*. 1981a. *Curr. Microbiol.* 5: 187-190.
- Pesti, M., Novák, E. K., Ferenczy, L., Svoboda, A. Freeze fracture electron microscopical investigation of *Candida albicans* cells sensitive and resistant to nystatin. 1981b. *Sabouraudia* 19: 17-26.
- Pesti, M., Paku, S., Novák, E. K. Some characteristics of nystatin-resistant sterol mutants of *Candida albicans*. 1982. *Acta Microbiol. Hung.* 29: 55-66.
- Pesti, M., Becher, D., Bartsch, G. The effect of miconazole on ergosterol-less mutant of *Candida albicans*. 1983. *Acta Microbiol. Hung.* 30: 25-29.
- Pesti, M., Horváth, L., Vigh, L., Farkas, T. ESR determination of plasma membrane order parameter, lipid content and phase transition point in *Candida albicans* sterol mutants. 1985. *Acta Microbiol. Hung.* 32: 305-313.
- Pesti, M., Sipiczki, M., Pintér, I. Scanning electron microscopy characterisation of colonies of *Candida albicans* morphological mutants. 1999. *J. Med. Microbiol.* 48: 167-172.
- Pesti M., Gazdag, Z., Belágyi, J. In vivo interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane, as revealed by EPR spectroscopy. 2000. *FEMS Microbiology Letters* 182: 375-380.
- Prendergast, F. G., Haugland, R. P., Callahan, P. J. 1-[4-(trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties and use as a fluorescence probe of lipid bilayers. 1981. *Biochemistry* 20: 7333-7338.
- Rappolt, M., Laggner, P., Pabst, G. Structure and elasticity of phospholipid bilayer in the $L\alpha$ phase: a comparison of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine membranes. 2004. *Recent Res. Dev. Biophys.* 3: 363-394.
- Rock, P. Organization of glycosphingolipids in phosphatidylcholine bilayers: use of antibody molecules and Fab fragments as a morphologic markers. 1990. *Biochemistry.* 29: 8484-8490.
- Scherer, S., Magee, P. T. Genetics of *Candida albicans*. 1990. *Microbiol. Rev.* 54: 226-241.

- Shinitzky, M., Henkart, P. Fluidity of cell membranes-current concepts and trends. 1980. Int. Rev. Cytol. 60: 121-147
- Singer, S. J., Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. 1972. Science 1975: 720-731.
- Simons K., Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. 1997. Nature 387: 569-572.
- Somogyi, J. A biomembránok szerkezete és működése. 1989. Akadémiai Kiadó. Budapest.
- Spencer, F. T. Maintenance and culture of yeasts. In: Yeast protocols. Methods in cell and molecular biology. 1996. Humana Press Inc. Totowa. New Jersey.
- Stephenson, F. H. Calculations in molecular biology and biotechnology. 2003. Elsevier Science. San Diego, California.
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. 2004. Trends Microbiol. 12: 317-324.
- Squire, T. C., Thomas, D. D. Methodology for increased precision in saturation transfer electron paramagnetic resonance studies of rotational dynamics. 1986. Biophys. J. 49: 921-929.
- Thomas, D. D., Dalton, L. R., Hyde, J. S. Rotational diffusion studied by passage saturation transfer electron paramagnetic resonance. 1976. J. Chem. Phys. 65: 3006-3024.
- Tortorano, A. M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspore, L., Grillot, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. 2006. Int. J. Antimicro. Ag.. 27: 359-366.
- Uri, J. V. Actor P. Crystallization and antifungal activity of primycin. 1979. J. Antibiot. 32: 1207-1209.
- Uri, J. V. Antibacterial activity of primycin against multiple strains of Gram-positive bacteria. 1986. Acta Microbiol. Hung. 33: 141-146.
- Vályi-Nagy, T., Uri, J., Szilágyi, I. Primycin, a new antibiotic. 1954. Nature 174: 1105-1006.
- Vályi-Nagy, T., Daróczy, A. Effects of primycin on the synthesis of tryptophan pyrrolase. Biochem. 1967. Pharmac. 16: 1051-1055.
- Wang, T. Y., Leventis, R., Silvius, J. R. Fluorescent based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: a model for molecular partitioning into lipid rafts. 2000. Biophys. J. 79: 919-933.

- Wisniewska, A., Draus, J., Subczynsky, W. K. Is a fluid mosaic model or biological membranes fully relevant? Studies on lipid organization in model and biological membranes. 2003. *Letters Cell. Molec. Biol.* 8: 147-159.
- Younsi, M., Ramanandraibe, E., Bonaly, R., Donner, M., Coulon, J. Amphotericin B resistance and membrane fluidity in *Kluyveromyces Lactis* strains. 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1911-1916.
- Zhu, D., Xiong, W. C., Mei, L. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. 2006. *J. Neurosci.* 26: 4841-4851.
- Zimmerberg, J., Chernomordik, L. Membrane fusion. 1999. *Adv. Drug. Delivery Rev.* 38: 197-205.

Internetről elérhető adatbázisok:

<http://www.om.hu/eisz/>

<http://www.bmn.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

<http://highwire.stanford.edu/>

ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÁS (SUMMARY)

Summary, presentation of novel findings

1. In the series of experiments the MICs of primycin by micro- and macrodilution methods and the primycin induced growth inhibition in shaken liquid medium for the strains of parental *C. albicans 33erg⁺* and its ergostrol mutant *erg-2* have been determined. The determination of MIC was necessary to continue the work with biologically relevant concentrations of primycin during the membrane- biophysical measurements and investigations of the biological consequences of primycin-plasma membrane interaction. We have been demonstrated significantly different MICs between the two investigated strains. In the micro- and macrodilution testing the parental strain proved to be more sensitive (MICs: 12 and 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) than its membrane mutant *erg-2* (16 and 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$). The MIC concentrations of growth inhibition in shaken liquid medium were 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for the strain *33erg⁺* and 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *erg-2*. These data suggested that the composition of plasma membrane influenced the mechanism of action of the antibiotic primycin.
2. Alterations in the dynamic of plasma membrane, as a consequence of 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycin treatment have been demonstrated by measurements of “steady-state” fluorescence anisotropy. More accurate characterization of the structural and dynamical changes of the plasma membrane was carried out by EPR spectroscopy. We proved a significantly higher phase transition temperature in the case of both treated strains than untreated. The phase transition temperatures of untreated strain *C. albicans 33erg⁺* and its mutant *erg-2* were 11 °C and 12.5 °C, respectively. After 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ primycin treatment, these values increased to 16 °C and 17.5 °C, revealing a significant reduction in the phospholipid flexibility. The saturation transfer EPR measurements demonstrated that, the rotational correlation times of the spin label molecule were changed after the treatment. The molecular motions, detected in the plasma membrane of untreated samples of strain *33erg⁺* and *erg-2*, were 60 ns and 100 ns. These correlation times decreased gradually by addition of increasing primycin concentrations, reaching 8 μs and 1 μs .

3. The effect on the membrane dynamic of the main components (A1, A2 and C1) of primycin was investigated by conventional and ST-EPR methods. Highest phase transition temperature has been demonstrated in the case of component A1 (21 °C) after 128 µg ml⁻¹ primycin treatment indicating that it was the most effective primycin compound. The phase transition temperatures of A2 and C1 derivatives were 14.3 °C and 15 °C. Describing different molecular movements, calculated from the ST-EPR spectra- the existence of a (gel) membrane-phase in the plasma membrane of the strain *C. albicans 33erg⁺* was demonstrated, that was formed by the contribution of the molecules of primycin. Thereby we have proved that the primycin reorganized the lipid bilayer leading to conformational changes of the membrane-bound transport- and channel-forming proteins, supposedly that biological consequence is the losing of physiological barrier function and disturbance in the signal transduction systems.
4. The *in vitro* fluorescence experiments of membrane-forming compounds and primycin interaction shown a primycin-oleic acid complex formation, stabilized by one or two hydrogen bonds that can be formed together (ΔH: -27,77) or separately (ΔH: -8,08). The above described series of experiments proved that the attack points of the antibiotic primycin were the membrane-forming fatty acids.
5. We have demonstrated that, the direct biological consequences of the biophysical changes of plasma membrane were: (i) the loss of high molecular weight cell-constituents, such as the 260 nm absorbing nucleotides, nucleosides and free bases caused by 64 µg ml⁻¹ for 2 hours primycin treatment (~ 62-76 % loss in the *C. albicans 33erg⁺* and *erg-2* strains); (ii) the loss of barrier function of cells that caused indirectly the unipolar pseudohypha formation and cell-surface distortion after a treatment of 64 µg ml⁻¹ primycin. In the case of *C. albicans*, these changes may be induced by the alteration of interior milieu of cells, the loss of essential ions and nucleic acids and by the alteration of cAMP signaling pathway, supposedly.

In our work the primycin - plasma membrane direct interaction was firstly demonstrated with biophysical methods. We explained that the antibiotic primycin how can be effective against almost all cell-types. We clarified the apparently contradictory results of previous researches about the mode of action of primycin.

Novel findings are: (i) rigidizing effect of primycin on the plasma membrane, (ii) inducer effect of primycin on the membrane phase rearrangement, (iii) primycin - fatty acid complex formation in the plasma membrane, (iv) alteration of plasma membrane dynamic caused by the main components (A1, A2 and C1) of primycin.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló, nemzetközi folyóiratban megjelent tudományos közlemények:

Virág, E., Pesti, M., Kunsági-Máté, S. Competitive hydrogen bonds associated with the effect of primycin antibiotic on oleic acid as a building block of plasma membranes, *J. Antibiot.* 63 (2010) 113-117. IF: 1, 628

Virág, E., Juhász, Ákos., Kardos, Roland., Gazdag, Z., Papp, G., Péntes, Á., Nyitrai, M., Vágvölgyi, Cs. and Pesti, M. *In vivo* direct interaction of the antibiotic primycin on a *Candida albicans* clinical isolate and its ergosterol-less mutant. *Acta Biol. Hung.* (accepted, in press) IF: 0.793

Virág, E., Belágyi, J., Gazdag, Z., Vágvölgyi, Cs. and Pesti, M. *In vivo* direct interaction of primycin antibiotic with the plasma membrane of *Candida albicans*: an EPR study. *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 42-48 IF: 4,647

Az értekezés alapjául szolgáló, megjelenés előtt álló tudományos közlemények:

Virág, E., Nyilasi, I., Belágyi, J., Pesti, M., and Vágvölgyi, Cs. Comparative examination of the mode of action of primycin complex and primycin components (**in manuscript**)

Virág, E., Pesti, M., Kunsági-Máté, S. Complex formation of primycin with ergosterol. Entropy driven initial step towards structural modification of fungal plasma membrane. (**in manuscript**)

Virág, E., Pesti, M., Kunsági-Máté, S. Complex formation between the antibiotic primycin and phosphatidylcholine as a target compound in plasma membrane. (**in manuscript**)

Az értekezéshez kapcsolódó előadások:

Virág, E., Gazdag, Z., Belágyi, J., Kardos, R., Nyitrai, M., Pesti, M. The mode of action of primycin antibiotic: membrane dynamics examinations by EPR. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és XI. Fermentációs Kollokvium, Keszthely, 2008, október 15-17.

Virág, E., Gazdag, Z., Belágyi, J., Kardos, R., Nyitrai, M., Kunsági-Máté, S., Pesti, M. A primycin antibiotikum hatásmechanizmusa: membrán dinamikai vizsgálatok EPR és steady-state fluorimetriás módszerekkel. A Magyar Biofizikai Társaság XIII. kongresszusa, Pécs, 2009, augusztus 23-26.

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek:

Virág, E., Gazdag, Z., Belágyi, J., Kardos, R., Nyitrai, M., Pesti, M. The mode of action of primycin antibiotic: membrane dynamics examinations by EPR. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és XI. Fermentációs Kollokvium, Keszthely, 2008, október 15-17.

Virág, E., Pesti, M., Kunsági-Máté, S. Olajsav-primycin kölcsönhatás modell. A Magyar Biofizikai Társaság XIII. kongresszusa, Pécs, 2009, augusztus 23-26.