

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Mikroorganizmusok életfolyamatainak molekuláris analízise

A primycin antibiotikum hatásmechanizmusának vizsgálata *Candida albicans* élesztősejteken

PhD értekezés tézisei

Virág Eszter Andrea

Témavezet :

Prof. Pesti Miklós

egyetemi tanár



PÉCS, 2011

BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben a rezisztens *Candida albicans* és *nem-albicans* fajok okozta fertőzések száma erősen 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 G-pozitív baktériumokra, patogén gombákkal $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ -től, G-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 fertőzéseknel 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 támadáspontját. A támadáspont meghatározása alapjául néhány korábbi kísérletes adat támpontként 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 elállított ergoszterin hiányos mutáns törzset használtuk. Ezek a modellszervezetek lehetővé tették a primycin hatására bekövetkező membrán dezorganizáció és struktúra változás tanulmányozását, összehasonlító elemzését. Ismerve a modell szervezetek pontos membrán összetételét, lehetőségünk nyílt a primycin támadáspontjának molekuláris szintű elemzésére is.

Mivel a primycin egy antibiotikum komplex, amely három fő komponensből 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 feltétele egyrészt az antibiotikum gyógyszerként való engedélyezési eljárásnak, másrészt szerepet játszik az antibiotikum illetve annak félszintetikus változatainak alkalmazásában és továbbfejlesztésében.

CÉLKIT ZÉSEK

A primycin támadáspont és hatásmechanizmus felderítésére a következők, 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 hat a kölcsönhatásra. Mivel a primycin egy többkomponensű komplex, ezért indokoltnak láttuk a komponenseinek plazma membránra gyakorolt hatásának vizsgálatát. Választ kerestünk arra is, hogy a vizsgált *C. albicans* fém 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 következményeit, a barrierfunkció és a sejt morfológiai hatás vizsgálatát végeztük el a következő kísérletsorozattal:

1. A primycin antifungális hatásának vizsgálata a szülői (*33erg*⁺) és ebből el állított 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*⁺ törzsen EPR spektroszkópiával.
4. A primycin fém 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.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A primycin biológiai aktivitásának vizsgálatához és két mikroorganizmus törzset használtunk. Az *erg-2* törzs egy ergoszterin hiányos mutáns, ami az adenin auxotróf, ergoszterint termel vad típusú *33erg⁺* törzsből lett elállítva nitrozoguanidin kezeléssel.

Minimális gátló koncentráció (MGK) vizsgálata

Meghatároztuk az MGK-t *makrodilúciós módszerrel* a következő módon: 5 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendáltunk fel a kultúrán növesztett kis telepekből vett sejteket. Beállítottuk a sejtsűrűséget OD_{595} -ön 0,12 értékre, ez megfelel 4×10^6 sejt ml^{-1} sejtsűrűségnek. Ebből 2000-szeres hígítást készítettünk, hogy elérjük a 2×10^3 sejt ml^{-1} -es sejtszámot. A sejtsuszpenzióból egy-egy mintához 1,35 ml-t mértünk ki félkémcsövekbe. Ehhez adtuk hozzá 150 μ l térfogatban az adott primycin törzsolatot, amely így tízszeresére hígult. 48 óra elteltével mértük a szuszpenziók OD_{595} értékeit.

A *mikrodilúciós technika* során a ferde táptalajon két napig növesztett sejteket lemostuk 3 ml desztillált víz hozzáadásával. Ezt követően Bürker-kamrával, beállítottuk a sejtszámot 10^5 sejt ml^{-1} -re. 0,8-6,4 $mg\ ml^{-1}$ primycin törzsolatokat 50-szeresére hígítottuk RPMI tápoldatban. A microplate lemezre a következő módon vittük fel: minden üregbe 100 μ l primycin oldatot és 100 μ l sejtsuszpenziót pipettáztunk. A lemezt 48 órán keresztül $37^\circ C$ -on inkubáltuk. A lemezek leolvasása szobahőmérsékleten $\lambda = 595$ nm hullámhosszon történt.

A *szaporodás gátlás* vizsgálata során 100 ml-es lombikokban 20-20 ml tenyészetet rázattunk. A tenyészetekhez hozzáadtuk a megfelelő primycin törzsolatokat (0,8-25,6 $\mu g\ ml^{-1}$). 3 óránként megmértük a tenyészetek OD_{595} -át. Az OD eredményeket grafikonon ábrázoltuk az idő függvényében.

Membrándinamikai vizsgálatok „steady-state” fluoreszcencia spektroszkópiával

Méréseinkhez 10^8 sejt ml^{-1} protoplaszt szuszpenziót készítettünk, amelyet 15 percig kezeltünk $128\ \mu g\ ml^{-1}$ primycinnel. A mintákat 2-szer mostuk, majd TMA-DPH fluorofórral jelöltük 5 percig, óvatos keverés mellett, sötétben tartva. Az excitációs hullámhosszt $\lambda = 340$, az emissziós hullámhosszt $\lambda = 430$ nm-en detektáltuk. Meghatároztuk a fluoreszcens anizotrópiákat 0 és $35^\circ C$ között $5^\circ C$ -ként haladva.

Membrándinamikai vizsgálatok elektronparamágneses rezonancia (EPR) spektroszkópiával

Méréseinkhez 10^8 sejt ml^{-1} protoplaszt szuszpenziót készítettünk, amelyet 15 percig kezeltünk 0-128 $\mu g\ ml^{-1}$ primycinnel illetve primycin A1, A2 és C1 komponensekkel. A mintákat kétszer mostuk, majd 500 μ l, 10^8 sejt ml^{-1} protoplaszt szuszpenzióhoz 3 μ l-t adtunk az 5-SASL (13 mM) törzsolatból. A mintákat 3 percig jelöltük, félpercenkénti kevergetéssel.

Konvencionális EPR mérések: Az EPR spektrumokat 0 és 30 °C között vettük fel 2 °C ként. A m szer beállításai a következők voltak: mikrohullámú teljesítés 10 vagy 20 mW, tér moduláció 100 kHz, amplitudó 2 G, mágneses tér erősség 3480 és a pásztázott tértartomány 100 G. A kiértékeléshez a konvencionális spektrumok $2A'_{zz}$ paraméterét határoztuk meg, amely a spektrum magas és alacsony területek szélső értékeinek különbségei. A kapott $2A'_{zz}$ értékeket Arrhenius-ábrázolás szerint, a reciprokhőmérséklet függvényében értékeltük. Az Arrhenius-ábrázolás során töréspontot tapasztaltunk, amely azt jelentette, hogy a membránban bekövetkezett a fázisátalakulás.

Szaturációs transzfer (ST-)EPR mérések: 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 spinjelösszevetleges rotációs korrelációs idejét tudtuk meghatározni (τ).

A primycin kölcsönhatásának vizsgálata különböző membránalkotókkal: *In vitro* fluoreszcencia mérések

Méréseink során 10^{-3} M olajsavhoz növekvő koncentrációjú primycint adtunk. Mindkét komponens oldószere DMSO volt. Steady-state fluoreszcens méréseket végeztünk. Felvettük az emissziós spektrumokat 16 °C és 36 °C között 2 fokonként. Az integrációs idő: 0,2 s volt.

A primycin biológiai hatásának vizsgálata.

A sejtben kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel: A kísérlet során 10^8 sejt ml^{-1} sejtszámú szuszpenziót készítettünk Sörensen 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 következőképpen: a mintákat centrifugáltuk és megmértük a felülúszó abszorbananciáját $\lambda = 260$ 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 felfuszpendáltuk, kevertük és 30 percig 100 °C-on inkubáltuk. Az inkubálást követően lecentrifugáltuk majd a felülúszóból újból abszorbananciát mértünk $\lambda = 260$ nm-en.

Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat: 15 ml 24 órás tenyészetet 15 percig 4000 fordulat perc^{-1} fordulatszámmal centrifugáltunk 4°C-on. A sejteket kétszer mostuk Na-foszfát pufferben. A mosást követően az üledéket újra szuszpendáltuk 5 ml glutáraldehidoldatban. Ezt követően 1 óráig át szobahőmérsékleten fixáltuk a sejteket, majd centrifugáltuk és mostuk Na-foszfát pufferben. A mintákhoz egyenként 1 ml OsO_4 oldatot adtunk és 1 óráig

keresztül inkubáltuk szobah mérsékleten, 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 %).

EREDMÉNYEK

Minimális gátló koncentrációk vizsgálata

A primycin makro- és mikrodilúciós módszerrel végzett MGK értékei jelentős különbséget mutattak a *C. albicans 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 $12 \mu\text{g ml}^{-1}$ makrodilúcióval és 12 és $16 \mu\text{g ml}^{-1}$ mikrodilúcióval).

A primycin szaporodás gátlás vizsgálatában a szülői, *C. albicans 33erg⁺* törzs ismét érzékenyebbnek bizonyult, mint az ergoszterin hiányos mutáns, *erg-2* (szülői inél $64 \mu\text{g ml}^{-1}$, a mutáns törzsnél pedig $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin koncentráció eredményezte a teljes szaporodás gátlást). Ahogy a fenti adatokból látszik, hogy a primycinre való érzékenységet jelentősen befolyásolja a plazma membrán összetétele. A legnagyobb különbség a két törzs plazma membrán összetételében egyrészt a mutáns ergoszterin hiánya, másrészt a telítetlen zsírsavak aránya.

Membrándinamikai vizsgálatok „steady-state” fluoreszcencia spektroszkópiával

A primycin membrán struktúrában előidézett változás vizsgálatára első sorban „Steady-state” fluoreszcencia 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 szonda molekula korrelációs ideje nő, az ezt jellemző anizotrópia pedig csökken). Mivel az általunk használt membrán jelölő TMA-DPH a membrán felszínhez közeli hidrofób régiójának mozgását jellemzi és a kezelt minták szignifikánsan alacsonyabb anizotrópia értékek voltak minden hőmérsékleten - a kontroll mintákhoz képest a *C. albicans 33erg⁺* törzsnél - a kapott adatok arra engedtek 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. Az ergoszterin hiányos mutáns törzs esetében a kezelt minta anizotrópia értékei a hőmérséklet emelésével végig nagyobb értékeket mutattak, mint a kontroll mintánál. Az adatok azt tükrözik, hogy a mutáns törzs membrán szerkezete a primycin hatására merevebb lett a vizsgált régióban. A két törzs közötti, primycin okozta membrándinamikai változásban kapott

ellentmondás a következő összefüggések következményeként magyarázható. A *C. albicans 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.

Membrándinamikai vizsgálatok EPR spektroszkópiával

A konvencionális és ST-EPR technikákkal szinte a lipid és membrán rendszerekben található összes molekuláris mozgás sebessége leírható. A konvencionális mérések során számított $2A'_{zz}$ spektrális paraméter egyik a legtöbbször 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. Kísérleteinkben a primycin koncentráció függvényében növekvő $2A'_{zz}$ értékek azt mutatták, hogy a jelölő molekula mozgékonyasága a növekvő primycin koncentráció hatására csökkent a vizsgált régióban. A mindkét törzs esetében kapott $2A'_{zz}$ értékek telítődése a növekvő primycin koncentráció függvényében a plazma membrán „ns-os régiójának” primycin felvételének korlátját bizonyította. A telítődés a *C. albicans 33erg⁺* törzs esetében $64 \mu\text{g ml}^{-1}$, az *erg-2* törzs esetében pedig $256 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin kezelésnél mutatkozott, amely értékeknél a szaporodás gátlásban már teljes gátlást tapasztaltuk. A $2A'_{zz}$ értékeket a reciprokhőmérséklet függvényében ábrázolva egy nem-lineáris összefüggést kapunk és egy jól meghatározható fázis-tranzíciós hőmérsékletet (T_m) lehet belülről 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. 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. Mivel a *C. albicans erg-2* törzs membránja nem tartalmaz eroszterint, megállapítható, hogy a primycin fő támadáspontja nem az ez a vegyület.

ST-EPR méréseket végeztünk, hogy jellemezzük a primycin kezelés hatására bekövetkezett „igen lassú” molekuláris mozgásokat a lipid kettős rétegben. Munkánk során 20 °C-on felvett ST-EPR spektrum C'/C csúcsarányát határoztuk meg, majd ebből

következtettünk a τ_c értékekre. Primycin kezelés hatására a membránba beépült spin jelöl anizotróp mozgása megváltozott. A kontrol plazma membránban anguláris mozgás ($\tau_c \cdot 10^{-6}$ - 10^{-8} s) és a jelöl hossz tengelye körüli forgást ($\tau_c \cdot 10^{-8}$ - 10^{-9} s) is ki lehetett mutatni. Kezelés hatására, azonban, ezek a mozgások már nem voltak detektálhatók és a membrán próba sokkal lassabb mozgásokat mutatott. Közel szobah mérsékleten 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 átszervező dött membrán szerkezetére utaltak.

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

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. A T_m alapján a primycin komponensek a spin jelöl környezetének a fluiditását a ns-os fázisban a következő sorrendben csökkentettük: kezeletlen ($12,5\text{ }^\circ\text{C}$) < A2 ($14,3\text{ }^\circ\text{C}$) < C1 ($15\text{ }^\circ\text{C}$) < primycin komplex ($17,5\text{ }^\circ\text{C}$) < A1 ($21\text{ }^\circ\text{C}$). Az L''/L csúcsok arányaiból a következő mozgásokat becsültük: A2 (1×10^{-4} s) < primycin komplex (6×10^{-5} s) < C1 (5×10^{-5} s) < A1 = kezeletlen (10^{-7} s). 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: primycin komplex (4×10^{-6} s) < C1 (10^{-6} s) < A2 (9×10^{-7} s) < A1 (5×10^{-7} s) < kezeletlen (2×10^{-8} s).

A primycin f membránalkotókkal való kölcsönhatásának vizsgálata *in vitro* „steady-state” fluorimetriával. A primycin kölcsönhatása az olajsavval.

Miután felvettük az emissziós spektrumokat, szükséges, de ugyanakkor elégséges számú Gauss-görbékre bontottuk. Összesen 4 Gauss-görbét tudtunk úgy illeszteni a spektrumokra, hogy az a legkisebb négyzetes hibával illeszkedjen. A változást mutató Gauss-görbékre a *Benesi-Hildebrand* módszert alkalmazva egyenest kaptunk, ami arra utalt, hogy a primycin és olajsav kölcsönhatásának eredményeként el álló termék sztöchiometriai aránya 1:1. A termodinamikai paramétereket a Van't Hoff elmélet alapján számítottuk ki, amely szerint az egyensúlyi állandók \ln mérséklet függvényében ábrázolt pontjaira illesztett egyenes meredekségéből az entalpiaváltozás (ΔH), tengelymetszetéből az entrópiaváltozás (ΔS) határozható meg. A kölcsönhatás erőssége, vagyis a szabadentalpia változás mértéke (~ 23 - 24 kJ mol⁻¹) szobah mérséklet közelében másodlagos kötések kialakulására utalt, ami

esetünkben a molekula szerkezetét figyelembe véve H kötések kialakulását jelentette. A termodinamikai paraméterek két olyan reakciót mutatnak, melyekhez közel azonos szabadentalpia változás tartozott, vagyis a kialakuló kétféle asszociátum stabilitása szobah mérséklet közelében lényegében egyforma volt. Ugyanakkor az ehhez tartozó entalpia és entrópia értékek igen nagymértékben eltértek. Ez az asszociátumot stabilizáló er k jelent sen eltér természetét mutatta. Következésképpen az olajsav-primycin komplex 2-féle kialakulása a következ : i) egyszeres hidrogén kötések kialakulása az olajsav karboxil csoportjának –OH csoportja és a primycin –OH csoport között és ii) hidrogén kötés kialakulása a primycin –OH csoport és az olajsav karboxil csoportjának O atomja között. A 2 féle kötés kialakulhat egyenként de együttesen is.

A primycin biológiai hatásai

A plazma membrán barrier funkciójának elvesztése beigazolódott a vizsgálat során. A $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycines kezelés hatására megnövekedett a szabad 260 nm-en abszorbeáló anyagok mennyisége az extracelluláris közegben. A dimorf *C. albicans* sejtek morfológiai változáson mentek keresztül azáltal, hogy a primycin megváltoztatta a sejtek bels milli jét és a sejt morfológia szabályozását. A SEM felvételeken határozott sejt felszíni eltorzulás tapasztaltunk, ami a plazma membrán barrier funkció elvesztésének lehet a következménye. A *C. albicans 33erg⁺* törzs esetében a $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ primycin koncentrációnál tapasztalt pszeudohifa sejt típus a primycin okozta jelátviteli funkciók változását is jelenthette.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A kísérletsorozat els lépéseként meghatároztuk a primycin MGK-ját mikro- és makrodilúciós technikákkal, valamint szaporodásgátlását a *C. albicans 33erg⁺*, szül i 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 jelent s 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 szül i törzsnél 64, a mutáns törzsnél pedig $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ nél volt kimutatható, ami egyben arra is utalt, hogy a plazma membránban lév lipid alkotók mennyisége és aránya alapvet en 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 μ s-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 μ s-ig.

3. A primycin f komponenseinek (A1, A2 és C1) membrándinamikai vizsgálatát szintén konvencionális és ST-EPR módszerekkel vizsgáltuk. A fázisátmenet vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az A1 komponens (128 μ 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 f komponensei létrehozhatnak egy harmadik, gél állapotú fázist, amely természetes körülmények között nincs jelen a plazma membránban. Ezáltal bebizonyítottuk, hogy a primycin átszervezi a lipidkettős réteget, 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 ($H:-27,77$) vagy külön-külön ($H:-8,08$) 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 μ g ml⁻¹-es 2 órás primycin kezelés hatására, ~62-76 %-os vesztesége a $33erg^+$ és $erg-2$ törzseknek. A sejt barrier funkciójának elvesztése közvetlenül azt eredményezte, hogy 64 μ g ml⁻¹ koncentrációjú primycin kezelés hatására unipoláris pszeudohifa formálódás és sejtfelszíni torzulás történt. *C. albicans* esetében ez a változás feltételezhetően a sejt belső mili-jének, 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 f komponenséinek eltérő membrán dinamikát kiváltó hatásának bizonyítása.

PUBLIKÁCIÓK

1. 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, Á., Kardos, R., 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.* (1) 63 (2012) 42-55. 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

Virág, E., Pesti, M., Kunsági-Máté, S. Complex formation between primycin and ergosterol. Entropy - driven initiation of modification of the fungal plasma membrane structure. *J. Antibiot.* DOI: 10.1038/JA.2011.140. IF: 1, 628

2. Az értekezés alapjául szolgáló, megjelenés előtt álló tudományos közlemények

Virág, E., Belágyi, J., Kocsubé, S., Vágvölgyi, Cs. and Pesti, M., Antifungal activity of primycin complex main components A1, A2, C1 on a *Candida albicans* clinical isolate and their effects on the dynamical change of 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)**

3. Az értekezéshez kapcsolódó előadások és 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. (előadás)

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. (előadás)

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