

Biológiai szempontból jelentős határfelületek vizsgálata nemlineáris optikai spektroszkópiai módszerekkel

Kutatási zárójelentés

Nyilvántartási szám: T047368

Kutatási időszak: 2004. április 1. - 2008. december 31.

Témavezető: Keszthelyi Tamás

Az MTA Kémiai Kutatóközpontban 2002. januárban került felállításra egy összegfrekvencia-keltési spektrométer. A Kutatóközpont ezzel a beszerzéssel olyan eszközt állított a felületkémiai kutatások szolgálatába, mely lehetőséget nyújthat határfelületek és határfelületi jelenségek felületspecifikus, roncsolásmentes, nagy érzékenységgel történő *in situ* vizsgálatára.

Az összegfrekvencia-keltési spektroszkópia alkalmazásával részletes felvilágosítást nyerhetünk a határréteg kémiai összetételéről, a határréteg molekuláinak elhelyezkedéséről, elrendeződéséről, irányítottágáról, és konformációs viszonyairól, illetve az ezen tulajdonságokban bekövetkező változásokról. A készülék üzembe helyezésekor illetve a jelen pályázat 2003-as benyújtásakor a módszer teljesítőképességet a heterogén katalízis, elektrokémia és polimerkémia területén már számos eredmény igazolta. Várható volt, hogy a módszer nagy jelentőségre tesz szert a biológiai felülettudomány területén is, hiszen segítségével biológiai anyagok és felületek kölcsönhatásai molekuláris szinten deríthetők fel.

A jelen OTKA pályázattal elsődleges célunk az volt, hogy a rendelkezésünkre álló korszerű módszer lehetőségeinek kiaknázásával csatlakozzunk a biológiai felülettudomány területén folytatott élvonalbeli kutatásokhoz.

A pályázat benyújtásakor az irodalomban még csak néhány publikáció foglalkozott biológiai jelentőségű határfelületek összegfrekvencia-keltési spektroszkópiai vizsgálatával. Ezek demonstrálták, hogy a technika képes felületen adszorbeált, illetve a felületi határrétegben elhelyezkedő aminosav, polipeptid és fehérjemolekulák detektálására. Éppen ezért a pályázatban olyan kutatásokat terveztünk, melyek határfelületeken adszorbeált biomolekulák elhelyezkedésének, rendezettségének és orientációjának vizsgálatán keresztül egyrészt biomolekulák és szintetikus anyagok közötti határfelületek kölcsönhatásainak molekuláris szintű megismerésére irányultak, másrészt a sejtmembránok egyszerű modelljeiként szolgáló foszfolipid rétegek szerkezetének és kölcsönhatásainak feltárását célozták.

Tisztában voltunk azonban azzal, hogy egyrészt a tervezett kutatási program olyan egymásra épülő kísérleteket tartalmazott, melyek sikere nem volt garantálható, másrészt, hogy egy ilyen gyorsan fejlődő területen a már ott dolgozó, vagy oda időközben bekapcsolódó külföldi kutatócsoportok laboratóriumaiból kikerülő eredmények nagymértékben befolyásolhatják a saját laboratóriumunkban folytatott kutatások irányát. A munkatervben ezért jeleztük is, hogy a kutatási terv, az évek során egyre növekvő mértékben, csak tájékoztató jellegűnek volt tekinthető.

A pályázat első évére tervezett feladatok, bár nem a szoros értelemben vett biológiai határfelületek vizsgálatával foglalkoztak, a következő évek kutatásainak előkészítésül szolgáltak. Ezeket a feladatokat maradéktalanul végrehajtottuk. A második év során azonban azzal szembesültünk, hogy a pályázat által érintett tudományterületen dolgozó számos külföldi kutatócsoport által publikálásra került eredmények részben lefedték a munkatervben kitűzött feladatokat. Emellett, a saját

laboratóriumunkban a jelen OTKA pályázat keretein kívül elért eredményeinkkel együtt, rámutattak olyan tényezőkre, melyek az általunk is használni kívánt módszer alkalmazhatóságát jelentősen korlátozták. Lehetőségünk nyílt azonban egy olyan együttműködés kialakítására, melynek keretében a pályázat fő témájához szorosan kapcsolódóan biokompatibilitás szempontjából igen jelentős polimer-rendszereket tudunk vizsgálni. Ugyanakkor az együttműködő partner által rendelkezésünkre bocsátott, illetve közösen kialakított kísérleti lehetőségek nagyon jól előkészítették a munkatervben későbbre vállalt egyes feladatok megoldását.

A harmadik évtől kezdve ezért a munkatervtől némileg eltérve, azonban szigorúan ragaszkodva a pályázat eredeti témafelvetéséhez, kezdtünk foglalkozni sejtmembránok egyszerű modelljeiként szolgáló lipid rétegek vizsgálatával. Ezen vizsgálatokkal célunk a lipid réteg szerkezetének vizsgálata, valamint lipidek és egyéb oldott biológiai molekulák kölcsönhatásának a lipid réteg szerkezetében bekövetkező változások nyomon követésén keresztül történő tanulmányozása volt. A harmadik és negyedik, valamint a Műszaki és Természettudományi Kollégium által engedélyezett ötödik kutatói év során számos olyan alapkutatási eredményt értünk el, mellyel hozzá tudunk járulni a membránszerkezet és működés egyes részleteinek jobb megértéséhez. A vizsgálatok eredményeiről 2007-ben egy nemzetközi konferencián tartottam előadást, melynek kedvező fogadtatása meggyőzött arról, hogy erőfeszítéseinket érdemes ebbe az irányba koncentrálni. Hazai fórumokon beszámolók és szemináriumok formájában is bemutattuk eredményeinket, ezáltal lehetőség nyílt a tématerületen dolgozó hazai kutatócsoportokkal olyan együttműködések kialakítására, melyek a gyakorlati alkalmazás lehetőségét is magukban hordozzák.

A pályázat utolsó évében elsősorban az együttműködésben végzett kísérleti munkára koncentráltunk, ami ahhoz vezetett, hogy az előző évek eredményeinek közlése még nem fejeződött be, a dolgozatok benyújtása a 2009-es évre maradt. Ezért kérem, hogy amennyiben ennek szükségét látja, a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket.

A kutatási támogatás hatékonyabb elköltése érdekében két alkalommal, 2005-ben és 2008-ban, kértem az egyes költségvetések közötti átcsoportosítást, amire a Műszaki és Természettudományi Kollégiumtól az engedélyt meg is kaptam. Mivel a pályázatban vállalt és teljesített kutatómunka olyan eredményeket hozott, melyek fényében annak további folytatása indokoltnak látszott, a támogatás dologi költségei pedig jelentős pénzügyi összeg maradt meg, 2007. szeptemberben pályázatom futamidejének 2008. december 31-ig történő, 1 éves meghosszabbításához kértem engedélyt a Műszaki és Természettudományi Kollégiumtól. A határidő-módosításhoz a Kollégium hozzájárult.

Az alábbiakban éves bontásban ismertetjük az elért eredményeket.

2004.

Egy olyan eljárást dolgoztunk ki, amely egyrészt megkönnyítheti, másrészt pedig pontosabbá teheti felületi molekulák orientációjának és konformációjának az összegfrekvencia-keltési spektrumokból történő meghatározását. Az irodalomban elterjedten használt képletek ugyanis feltételezik, hogy az egyes funkciós csoportok szimmetriája molekulákba való beépüléskor változatlan marad, továbbá a hiperpolarizálhatósági tenzor nullától különböző elemeit egyszerű modellek alapján becsülik. Ez a feltételezés az esetek többségében nem helytálló, ezért az általunk az orientáció-eloszlás meghatározásához kidolgozott képletek egyrészt figyelembe veszik a funkciós csoportok valós szimmetriáját, másrészt a hiperpolarizálhatósági tenzor elemeit becslés helyett kvantumkémiailag számítottuk. A fenti eljárást hidroxámsavakból és foszfonovegyületekből üvegfelületen kialakított Langmuir-Blodgett rétegek metilcsoportjainak orientáció-eloszlásának meghatározására használtuk.

A kutatások másik fontos célja volt a biomolekuláris adszorpciós kísérletek során a későbbiekben modellfelületként alkalmazandó felületek minél részletesebb jellemzése. A modellfelületek létrehozását molekulák önszerveződésével és a Langmuir-Blodgett (LB) technika segítségével

végeztük. Gyakorlati szempontból is érdekes a két módszerrel kialakított monorétegek összehasonlítása, hiszen utóbbi egy pontosan irányítható és ellenőrizhető eljárás, míg molekulák önszerveződése spontán végbemenő folyamat. Modellvegyületként hosszú szénláncú hidroxámsavat (C18N) és egy foszfónovegyületet (C18P) választottunk, melyekből üveg, vas és rézfelületeken előállított monorétegeket vizsgáltunk az összegfrekvencia-keltési spektroszkópia segítségével, az MTA Kémiai Kutatóközpont Nanoszerkezetek és Felületmódosítás Osztály munkatársaival együttműködésben. Megállapítottuk, hogy az LB technikával C18N és C18P molekulákból mindhárom hordozón homogén, rendezett réteg alakítható ki. Az üveghordozós LB monorétegek összegfrekvencia-keltési spektrumainak analízisét az általunk kidolgozott és a fentiekben ismertetett módszerrel végeztük. Megállapítottuk, hogy a C18N és C18P molekulák alkiláncai a hordozó felületére közel merőlegesen helyezkednek el. Vas és rézfelületeken a spektrumokat a hordozóról származó nemrezonáns jel bonyolítja, azonban az alkilánccok elrendezése nem különbözik jelentős mértékben az üvegen találtaktól. Az önszerveződő rétegek kialakulásának időfüggését is tanulmányoztuk vas és réz felületen, továbbá a kialakult réteg szerkezetét az LB technikával készült rétegek szerkezetével hasonlítottuk össze. Az önszerveződő rétegek végleges rendezettségének kialakulásához az egyes hordozó-adszorbens párok esetén eltérő időre van szükség, azonban az összegfrekvencia-keltési spektrumok tanúsága szerint mindegyik esetben a kialakuló réteg rendezettsége megközelíti az LB technikával kialakított réteg rendezettségét.

Tudatosan módosított felületek létrehozására bizonyos hordozók esetén kovalens kötések kialakításával is lehetőség van. Trimetil-klórszilán szililező ágens alkalmazásával előállított eltérő hidrofobicitású üvegfelületek sorozatának összegfrekvencia-keltési spektrumait vettük fel. A hidrofobizált felületeket az MTA Kémiai Kutatóközpont Nanoszerkezetek és Felületmódosítás Osztály munkatársai készítették. A spektrumok bebizonyították, hogy a felületre vitt trimetilszilil csoportok jelenléte kimutatható, továbbá, hogy összefüggés van az összegfrekvencia-keltési spektrumok intenzitása és a felület hidrofobicitása között.

Az önszerveződő és LB rétegek vizsgálatának eredményeit egy folyóiratcikkben közöltük, a fenti modellfelületek alkalmazására azonban a kutatások fő hangsúlyának áthelyeződése miatt a későbbiekben nem került sor.

Egy részben kapcsolódó témában az ELTE Kolloidkémiai Tanszékkal együttműködve alkil-trimetil-ammónium-alkil-szulfátok oldat / levegő határfelületi viselkedését tanulmányoztuk összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával. A projekt eredeti célkitűzéséhez ezek a vizsgálatok oly módon kapcsolódtak, hogy biomolekulák adszorpcióját a vizes oldat / levegő határfelületen is terveztük vizsgálni. A tenzidelegyek vizsgálatával szerzett tapasztalatok és a vizsgálatok eredményei, elsősorban az adszorbeált réteg rendezettségére vonatkozó megállapítások, a későbbiekben segítették a foszfolipid monorétegek vizsgálatainál kapott eredmények értelmezését.

2005.

Az ELTE Kolloidkémia Tanszékével együttműködve biológiai szempontból igen jelentős vízoldható poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli(etilén-oxid) (PEO-PPO-PEO) blokkos kopolimerek víz / levegő határfelületi viselkedését tanulmányoztuk. A Pluronic néven kereskedelmi forgalomba kerülő kopolimerek nagy molekulású nemionos felületaktív anyagok. Amfifil jellegűek és nem toxikusak, így számos fontos feladatot látnak el szintetikus és biológiai anyagok közötti határfelületeken. Célunk volt különböző módon létrehozott felületi rétegek szerkezetének összehasonlítása: vizes oldat tömbi fázisából a felületre adszorbeált és vízfelületre illékony szerves oldószeres oldatból terített rétegeket vizsgáltunk összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával és felületi-oldalnyomás izotermák mérésével. Az adszorbeált rétegek esetén a felületi koncentráció a tömbfázisbeli koncentráción keresztül változtatható, míg a terített rétegek esetében a felületre felcseppentett anyagmennyiség változtatásával vagy Langmuir-kádban az elfoglalt felszín változtatásával érhető el a felületi koncentráció változtatása. Három különböző kopolimert

vizsgáltunk, melyeknél a központi PPO blokk azonos, a PEO láncok hosszúsága viszont eltérő volt. Ezen keresztül lehetőség nyílt az egyes blokkoknak a molekula konformációjára és orientációjára gyakorolt hatásának vizsgálatára. A rövid PEO blokkot tartalmazó polimerek esetén a felületi molekulásűrűség növelésével konformációváltozással járó fázisátalakulást észleltünk, ami a leghosszabb PEO blokkot tartalmazó polimernél nem volt megfigyelhető. Megállapítottuk, hogy a hidrofil PEO blokkok a teljes polimermolekula szerkezetét, a központi PPO blokkok konformációját is meghatározzák. A cseppenként felvitt és komprimált Langmuir rétegek szerkezetében megfigyelt különbségek a monoréteg kialakulásának kinetikai vonatkozásaira hívták fel a figyelmet, a cseppentett rétegek esetében a láncok összegabalyodása akadályozza a kedvező egyensúlyi konformáció és rendezettség kialakulását.

Emellett a biológiai rendszerek esetében nagyon fontos szerepet játszó molekuláris felismerés vizsgálatát kezdtük meg szerves modellvegyületek, hosszú alkiláncokat tartalmazó kalixarén származékok, alkalmazásával. Az összegfrekvencia-keltési spektrumok alapján valószínűsíthető, hogy molekulák oly módon helyezkednek el a határfelületen, hogy a kalixarén-váz fordul a víz felé míg az alkiláncok a levegő felé irányulnak. A vizsgálatokat a későbbiekben a kalixarének felületi elhelyezkedésében és konformációjában vendégmolekulák felismerésekor és szelektív megkötésekor bekövetkező változások követésével terveztük folytatni, de erre a pályázat során már nem került sor.

2006.

A kutatási munkaterv szerint foszfolipid kettősrétegek vizsgálatára a 2007-es kutatói évben került volna csak sor. Saját és irodalmi eredmények alapján azonban célszerűnek tartottuk, hogy ezeket a vizsgálatokat lipid monorétegeken végzett kísérletek előzzék meg, valamint hogy ezek a vizsgálatok a polipeptidek és fehérjék önszerveződő rétegeken való adszorpciójának tanulmányozása helyett kerüljenek megvalósításra. A 2005-ben a Pluronic kopolimerek vizsgálata során együttműködő partnerünkkel közösen kialakított kísérleti infrastruktúra lehetővé tette víz, illetve vizes oldatok felületére terített, amfifil molekulákból kialakított monomolekuláris rétegek összegfrekvencia-keltési spektroszkópiás vizsgálatát. Ezek a vizsgálatok lehetővé teszik a lipid réteg szerkezetének meghatározását, valamint a lipid réteg szerkezetében bekövetkező változások nyomon követésén keresztül a lipidek és egyéb oldott biológiai molekulák kölcsönhatásainak megfigyelését.

A koleszterin a sejtmembránok kulcsfontosságú lipid alkotórésze, mely meghatározó szerepet játszik a membrán rugalmasságának, áteresztőképességének és mechanikai szilárdságának irányításában. Az általunk alkalmazott összegfrekvencia-keltési rezgési spektroszkópia alkalmas a lipid réteget alkotó molekulák elhelyezkedésének, rendezettségének és orientációjának vizsgálatára. Így célul tűztük ki a koleszterin molekulák elhelyezkedésének vizsgálatát különböző összetételű lipid monorétegekben, mely vizsgálatok eredményei fényt deríthetnek a koleszterin és más membránalkotó lipidek kölcsönhatásának egyes részleteire

Az orientáció meghatározásához szükséges a rezgési spektrumok pontos sávhozzárendelésének ismerete, mely azonban az irodalomból csak hézagosan állt rendelkezésre. A sávhozzárendelés pontosítására egyrészt felvettük víz felületére terített, telítetthez közeli állapotú koleszterin monoréteg összegfrekvencia keltési spektrumát különböző polarizáció kombinációkkal, másrészt kvantumkémiai számításokkal meghatároztuk a koleszterin rezgési frekvenciáit, a hozzájuk tartozó normálrezgéseket és a rezgési spektrumokban várható intenzitásokat. A számítási és mérési eredmények felhasználásával sikerült a koleszterin C-H vegyértékrezgéseinek hozzárendelését pontosítani, ezáltal lehetőséget teremtve az orientációs analízishez.

0-50% koleszterint tartalmazó foszfolipid (dipalmitoil-foszfátidil-kolin, DPPC) Langmuir monorétegeket terítettünk víz felszínére, és a réteg összenyomása, vagyis az egy molekulára jutó terület csökkentése mellett vettük fel ezek összegfrekvencia keltési spektrumait a C-H vegyértékrezgések tartományában. A spektrumok értelmezését megnehezítette a koleszterin és a foszfolipid sávjainak részbeni átfedése. A spektrumok alapján megállapítottuk, hogy a réteg

összenyomásával először a foszfolipid molekulák alkilláncai rendeződnek, majd ezt követi a koleszterinmolekulák rendeződése. A koleszterinmolekulák rendeződése a nagyobb koleszterintartalmú rétegeknél már kisebb mértékű összenyomásnál megkezdődik. Valószínű tehát, hogy a foszfolipid molekulák alkilláncai közötti hidrofób kölcsönhatások erősebbek az ezen alkilláncok és a koleszterin molekulák közötti kölcsönhatásoknál.

Az előbbieken ismertetett spektrumok értelmezése pontosabbá tehető és számszerűsíthető volna, ha a koleszterin és a foszfolipid sávjai egymástól elkülöníthetőek lennének. Erre lehetőséget ad, ha az egyik alkotó helyett annak deuterált származékát használjuk. A deuterált lipidek magas ára miatt az első ilyen kísérleteknél célszerűnek tűnt egy olcsóbban megvásárolható modellvegyület használata. Választásunk a sztearinsavra esett, mivel ezt az anyagot is gyakorta alkalmazzák egyszerű membránmodellként és deuterált származéka elfogadható áron beszerezhető. Mint az a foszfatidil-kolin és a sztearinsav fejcsoportjainak eltérő helyigénye és az alkilláncok számának különbözősége miatt várható volt, a sztearinsav / koleszterin kevert monorétegek viselkedése nem teljesen egyezik meg a DPPC / koleszterin rétegekével, a kvalitatív trendeket azonban hasonlóan találtuk. Ezen rétegek esetében is összenyomás során először a sztearinsav molekulák alkilláncai rendeződnek, amit a koleszterin molekulák rendeződése követ.

2007.

Polikationos polimereket gyakran alkalmaznak a sejtmembrán megszakítására és ezáltal a sejt belsejébe történő anyagtranszport elősegítésére. Ezek lehetnek szintetikus polimerek vagy természetes polipeptidek. Feltételezések szerint ezen polimereket a sejtek három lépésből álló endocitózissal veszik fel, amely folyamat első lépése a sejtmembrán lipidjeihez való kötődés. Ezért kationos polimerek lipid molekulákhoz történő kötődésének részletes jellemzése igen nagy jelentőségű a transzport folyamat irányítása és szelektív transzfer molekulák előállítására szempontjából. A polikation-lipid kölcsönhatások pontos megismerése által ugyanis elkerülhető lenne a nem specifikus kölcsönhatásokból eredő toxicitás veszélye. Saját kísérleteinkben foszfolipid monorétegek mint egyszerű membrán modellek és polielektrolit oldatok kölcsönhatásának vizsgálatával kívántunk hozzájárulni a membrán-polimer kötődés mélyebb megértéséhez.

Poliétilénimin oldat felszínére terített semleges (ikerionos) DPPC, valamint anionos dipalmitoil-foszfatidil-glicerin (DPPG) monorétegek összegfrekvencia-keltési spektrumait vettük fel az oldat koncentráció és pH, valamint a felületi lipid borítottság függvényében. Az eltérő fejcsoporttal rendelkező lipidek tanulmányozásával várhatóan a polimer-lipid kölcsönhatások különböző részleteire következtethetünk. A spektrumokat összehasonlítottuk a tiszta víz felszínére terített monorétegek azonos pH és felületi borítottság mellett mért spektrumaival. Az egyes paramétereknek a spektrumokra gyakorolt hatását elemezve a lipid és polimer molekulák közötti kölcsönhatásokról nyertünk felvilágosítást. A C-H sávokból az alkilláncok konformációjáról és orientációjáról kaptunk információt, ezekből a réteg szerkezetét és rendezettségét illetően vontunk le következtetéseket. Az eredmények arra utalnak, hogy a vizsgált koncentráció, pH és felületi borítottság tartományokban a polietiléniminnel való kölcsönhatás várakozásainkkal ellentétben nem csökkenti, hanem éppen ellenkezőleg mind DPPC mind pedig DPPG esetében növeli a foszfolipid réteg rendezettségét.

Biológiai rendszerek természetes állapotukban mindig tartalmazzák vizet, és a vízmolekuláknak gyakran meghatározó szerepük van az adott funkció betöltésére alkalmas szerkezet létrehozásában. Az összegfrekvencia-keltési spektroszkópia kiválóan alkalmas a határfelületi vízszerkezet tanulmányozására. Az O-H vegyértékrezgésekre jellemző sávok felvételével és elemzésével a lipid monoréteg / polimer oldat határfelületen elhelyezkedő vízmolekulák viselkedését vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy tiszta vízre terítve a foszfolipid molekulák poláris fejcsoportjai a határfelületi vízmolekulák rendezettségét megnövelik, és ahogy várható volt ez a rendező hatás az anionos DPPG esetében nagyobb, mint az ikerionos DPPC esetében. A polikationnal történő kölcsönhatás mindkét esetben a vízszerkezet rendezettségének csökkenéséhez vezet, adott polimer koncentráció felett az

alkalmazott módszerrel már nem mutatható ki rendezett határfelületi vízréteg jelenléte. Ennek oka részben a kationos polimer árnyékoló hatása, részben pedig az lehet, hogy az erős polimer-lipid kölcsönhatás eredményeképpen a vízmolekulák kiszorulnak a határfelületi rétegből.

2008.

Az Eötvös Loránd Tudományegyetem kutatóival együttműködve a sejtmembrán modelljeként alkalmazott lipid monoréteg és antituberculotikus hatóanyagjelöltek valamint ezek peptidkonjugátumai között létrejövő kölcsönhatást tanulmányoztuk összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával. Célunk volt, hogy a membránszerkezetnek a biológiailag aktív vegyületekkel való kölcsönhatás következtében bekövetkező változását nyomon követve becslést adhassunk azok sejtpenetrációs képességre. A kölcsönhatások minél teljesebb megismerése végett három fajta kísérletet végeztünk: (i) vizsgáltuk a biológiailag aktív komponens (hatóanyag ill. hatóanyag-peptid konjugátum) oldat felszínére terített foszfolipid monorétegek szerkezetét a felületi lipid borítottság függvényében; (ii) nyomon követtük a telített foszfolipid monoréteg szerkezetében az aktív komponens oldatfázisba juttatását követően fellépő változásokat; (iii) tanulmányoztuk a foszfolipid-aktív komponens keverékfilm szerkezetét. Vizsgálatainkat telített, valamint a sejtmembránnal való jobb egyezés miatt telítetlen szánláncokat is tartalmazó foszfolipid filmekben végeztük. Az összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával végzett hármas kísérletsorozat nagyon jól kiegészítette az egyetemen végzett tenziometriai méréseket, és azokkal együtt részletes képet adott a vizsgálni kívánt kölcsönhatásokról, lehetővé téve a vizsgált hatóanyagjelöltek minősítését.