

# SZERKEZET ÉS FUNKCIÓ VIZSGÁLATOK LIPID VEZIKULÁKON\*

BÁTHORI GYÖRGY\*, HOLLY SÁNDOR<sup>+</sup>, GRANDICS PÉTER<sup>”</sup> és NÁRAY ANIKÓ<sup>”</sup>

\* Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Biofizikai Intézet,

<sup>+</sup> MTA Központi Kémiai Kutató Intézete,

<sup>”</sup> Semmelweis Orvostudományi Egyetem, II. sz. Kémiai-Biokémiai Intézet

Jelen munka célkitűzése az volt, hogy tanulmányozzuk a lipid kettős-réteg folyadékkristályos fázisátalakulásának szerepét különféle biológiai funkciókban (alkáliion transzport, membrán fúzió és lízis). Erre a célra legalkalmasabbnak az ún. lipid vezikula bizonyult, amely jól modellezi az élő sejt membránjának biomolekuláris lipidrétegét. Izoláltan (más biológiai folyamatoktól függetlenül) tanulmányozható rajta a célkitűzésben említett mindhárom funkció, ugyanakkor egyértelműen mutatja a lipidek folyadékkristályos fázisátmenetét is. A lipid vezikulák előállítása céljából módosítottuk a KREMER (1977) által leírt módszert. Az így előállított liposzómák viszonylag nagytérűek (100–200 nm), homogén méreteloszlásúak voltak és nem tartalmaztak lipid bomlástermékeket, valamint oldószer (alkohol) maradványokat. A fázisátalakulások detektálására apparens abszorpció elvén alapuló optikai módszert dolgoztunk ki. A lipid kettősréteg molekuláris szerkezetében és mozgásaiban a fázisátalakulás során létrejövő változások felderítésére infravörös spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk. Tekintettel a víz erős abszorpciójára az infravörös tartományban, mintáink mérésére Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai (FT-IR) módszert alkalmaztunk, amelynek segítségével a lipid molekula fejcsoportjának rezgési szinképe tanulmányozható. Erről a régióról relatíve kevés információ áll rendelkezésre, ugyanakkor mind a transzporthoz szükséges lipid-ion kölcsönhatásban, mind a fúzió első lépésében a két vezikula közti fal–fal kölcsönhatásban kulcsszerepet játszik.

Végül egy modellrendszer fejlesztettünk ki a lipid vezikula-élősejt kölcsönhatás (fúzió) tanulmányozására. Kísérleteinkben patkány timusz limfocitákba juttattunk be különféle anyagokat a vezikulák segítségével. Ezek a kísérleteink egyúttal a vezikulák egyik gyakorlati alkalmazhatóságának (célzott intracelluláris gyógyszer bejuttatás) irányába mutatnak.

\* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13–16. között Sümegen elhangzott előadás.

### Felhasznált anyagok és módszerek

A lipid vezikulákat részben szintetikus lecitinből (dipalmitoilfoszfátidilkolinból, DPPC Merck) részben tojás-lecitinből készítettük.

Az elektronmikroszkópos felvételek szerint vezikuláink egyrétegűek voltak, nem tartalmaztak többszörös kettősrétegű frakciókat. Átmérőjük kb. 120 nm; a méreteloszlásuk csak abban az esetben homogén, ha kiinduláskor alkalmazott etanol oldat nem tartalmaz 10 mg-nál több lecitint milliliterenként és az injektálás legalább 10 ml vizes oldatba történik. Ennél nagyobb lecitin, ill. alkohol mennyiségek alkalmazása során mind az analitikus UC, mind az oszlopkromatográfia tanúsága szerint a méreteloszlás inhomogénné vált.

Az infravörös spektroszkópiai mérések az esetek túlnyomó részében nem mutattak ki alkoholt a készítményekben (két esetben maradt vissza alkohol).

Vizsgálataink során meghatároztuk, hogy a vezikulák hány százalékát zárták be annak az oldatnak, amelyben készítettük őket. A meghatározás az oldatban levő anyagok mennyisége alapján történt. Erre a célra mintegy tíz alkalommal 0,1 M dinátrium hidrogénfoszfátot, két esetben triciált c-AMP-t egy alkalommal pedig triciált GDP-t használtunk. A fúziós kísérletek során a patkány timusz limfocitákba triciált c-AMP-ot, triciált GDP-t, piridoxálfoszfátot és jelzetlen c-AMP-ot juttattunk be. A  $\beta$ -méréseket Packard gyártmányú  $\beta$ -folyadékszcintillációs készüléken végeztük.

A vezikulákat KREMER módszere szerint állítottuk elő. Esetenként 1, illetve 10 ml kevert vizes oldatba különféle lipid koncentrációjú etanol oldatot fecskendeztünk be. Az injektálás konstans sebességét egy automata injektáló eszközzel (Infumat, MTA KUTESz) biztosítottuk. Az elkészült oldatból az alkoholt dializálással, néhány esetben diafiltrálással (Amicon diafiltráló cella) távolítottuk el. Egyes esetekben vákuum desztillálást (Rotadeszt, MTA KUTESz) alkalmaztunk.

A vezikulaátmérő méreteloszlását részben oszlopkromatográfiával (Sepharose 4B), részben analitikus ultracentrifúgával ellenőriztük.

A fázisátalakulás detektálására alkalmazott apparens abszorpció elvének lényege, hogy a különféle kolloid méretű részecskék az átmérőjük nagyságrendjébe eső hullámhosszúságú fényt erősen szórják, s ezt egy közönséges spektrofotométerben intenzitáscsökkenésként észleljük.

Méréseink során a lipid vezikulákat tartalmazó mintát egy Perkin-Elmer 200 típusú UV-VIS spektrofotométerben programozottan felfűtöttük, majd hűtöttük (sebessége 0,2—1,0 fok/perc között volt változtatható). A minta hőmérsékletét egy termoelem segítségével elektronikusan detektáltuk. A jelet megfelelő erősítés után egy XY-író (EMG NE 230) X tengelyére vittük. Az Y tengelyre a spektrofotométer analóg kimenetéről levett jelet kapcsoltuk.

Az infravörös spektroszkópiai méréseket a MTA Központi Kémiai Kutató Intézetében egy Nicolet 7199 típusú rendszeren végeztük. KRS-5-ből

készült küvettát használtunk (20  $\mu\text{m}$  rétegvastagság). Első lépésben többször felvettük az adott hőmérsékleten az oldószerek (víz, 0,1 M KCl) spektrumát, majd ezek átlagát a készülék memóriájában tároltuk. Ezután ugyanilyen körülmények között elkészítettük a lipid vezikula és víz együttes spektrumát. Ezen spektrumokból készített átlagspektrumból — a beépített számítógép segítségével — kivontuk a víz átlagspektrumát. Ezeknél a méréseknél 1 ml vizes oldószert kb. 50 mg DPPC-t tartalmazott.

### Eredmények, diszkusszió

#### 1. A fázisátalakulás detektálása apparens abszorpció segítségével:

Az 1. és 2. ábra lipid vezikulák, illetve összehasonlításul lipid diszperziók fázisátalakulását mutatja. Az ábrák tanúsága szerint a két folyamat néhány részletben eltér egymástól. Diszperziók esetében a 41,5 °C-nál található ún. főátmenet szűkebb hőmérséklet-tartományban megy végbe, valamint 25 és 30 fok között egy előátmenet, az ún. pretransition található. Az utóbbi átmenet hiszterézissel bír és feltehetőleg a vezikulák aggregációjához rendelhető (PETERSEN és CHAN 1978).

A vizsgálatokban mért fázisátalakulási hőmérséklet megegyezik a DSC-vel mért értékkel (SZŐGYI és mtsai 1980).

#### 2. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai vizsgálatok:

Az infravörös spektrumban látható abszorpciós sávok a lipid molekulák funkcióscsoportjainak rezgőmozgásaitól (vibrációk) származnak. A molekula vibrációs spektrumának változásából a molekula konformációjának változásaira is következtethetünk.

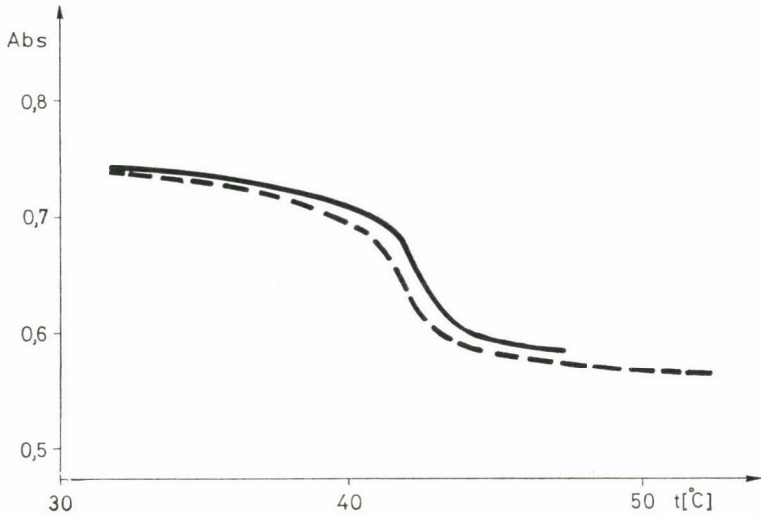
Vizsgálatainkat 28 °C, 37 °C, 42 °C és 48 °C-on végeztük. Ezek közül négy spektrumkészletet mutatunk be illusztrációképpen a 3–6. ábrákon. A spektrumokat a beépített számítógép segítségével elemeztük és megállapítottuk, hogy:

- A metilénsoport szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgése a magasabb frekvenciák felé tolódott el.
- A foszfátsoport vegyértékrezgésében nem tapasztaltunk a sáv helyében és alakjában változást. A spektrumban tapasztalható változások mind az intramolekuláris, mind az intermolekuláris rend változására felvilágosítást adnak. Példaként tekintsük a szimmetrikus  $\text{CH}_2$  vegyértékrezgést. Az intermolekuláris rend változása intenzitásbeli változást, az intramolekuláris rendé pedig hullámhossz-eltolódást, valamint kisebb mértékben intenzitásváltozást okoz (GABER és PETICOLAS 1977).

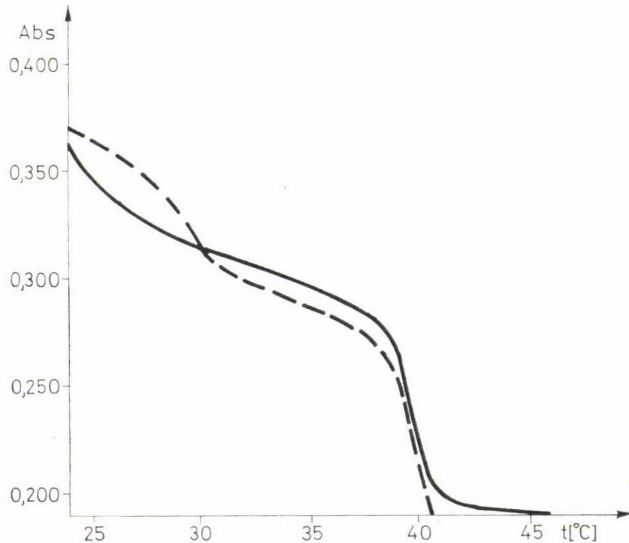
A fenti eredmények általában megegyeznek CAMERON és mtsai (1978, 1980) lipid diszperziókon nyert adataival. Egyetlen jelentős különbség, hogy 48 °C-on a vezikulák metilénsoportjainak aszimmetrikus C—H vegyérték-

rezgési sávja a folyadékkristályos állapotban felhasad ( $2923\text{ cm}^{-1}$ ). Ezt a vezikulák és a diszperziók közti finomabb szerkezeti különbségek következményének tartjuk.

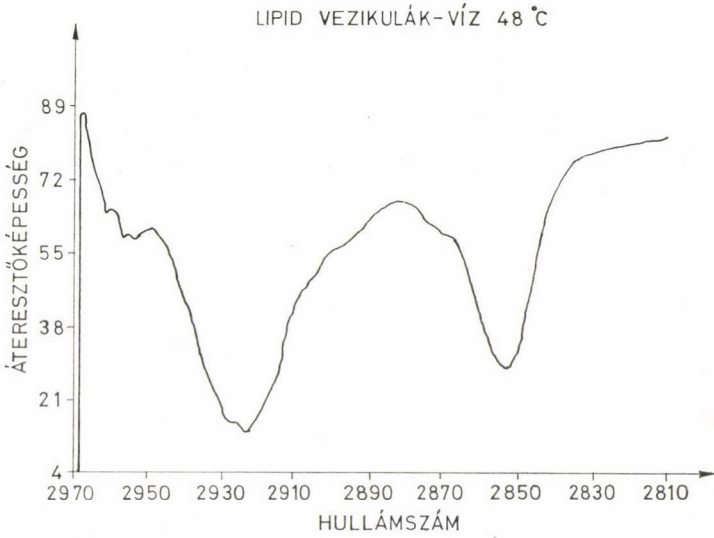
Elkészítettük a lipid vezikulák spektrumát  $0,1\text{ M KCl}$ -ot tartalmazó vizes közegben is. Itt azt tapasztaltuk, hogy a foszfát, valamint a szén-



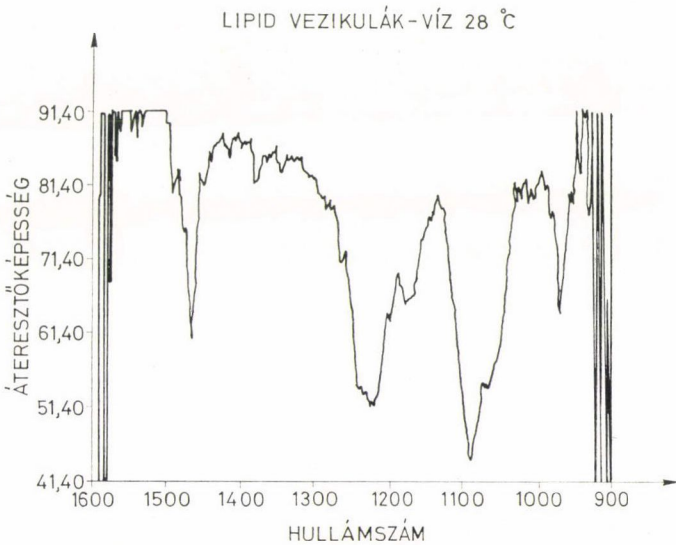
1. ábra. Dipalmitoilfoszfatidilkolin lipid vezikulák fázisátalakulása. Szaggatott vonal: fűtés, folytonos vonal: hűtés. Fűtési sebesség  $20\text{ °C/óra}$



2. ábra. Dipalmitoilfoszfatidilkolin diszperzió fázisátalakulása. Szaggatott vonal: fűtés, folytonos vonal: hűtés. Fűtési sebesség  $20\text{ °C/óra}$



3. ábra. Spektrumrészlet a metilénsoport vegyértékrezgéseinek régiójából

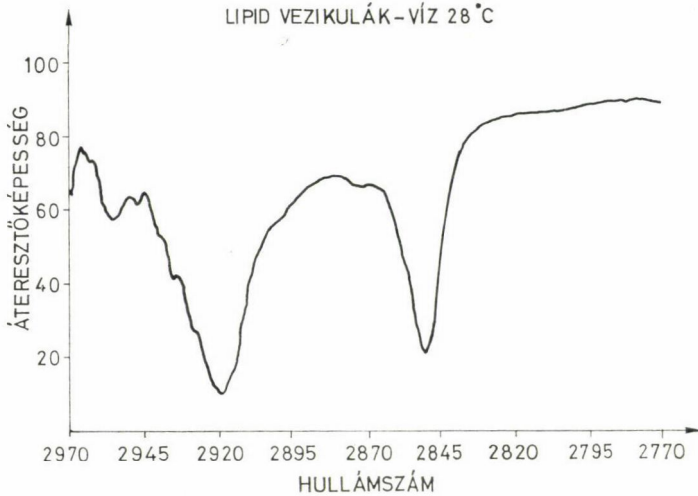


4. ábra. Spektrumrészlet a foszfátsóport vegyértékrezgéseinek régiójából

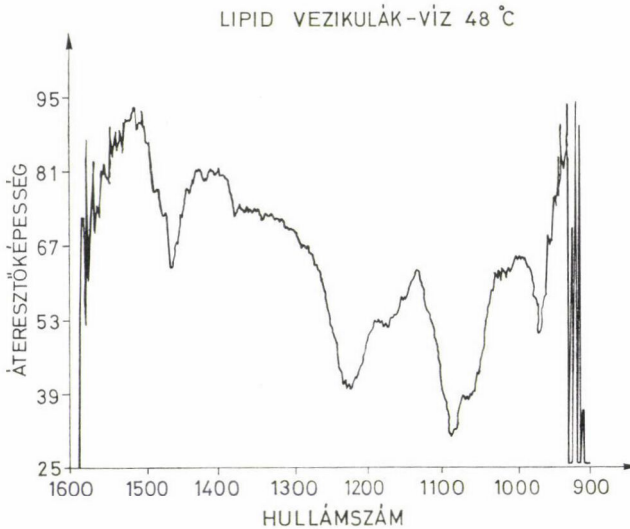
oxigén kötés vegyértékrezgéséhez tartozó sávegyüttes alakváltozást szenvedett a vízben felvett spektrumokhoz képest (1100 és 1000  $\text{cm}^{-1}$  között). A változásért feltehetőleg a kálium ionok töltésárnyékoló hatása a felelős.

### 3. Fúziós kísérletek:

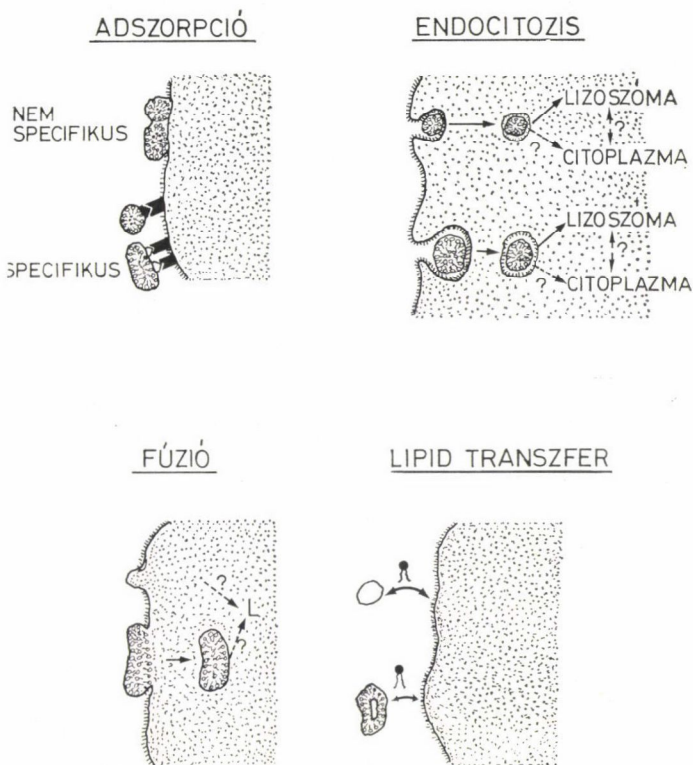
Meghatároztuk három különféle anyag segítségével, hogy az általunk készített lipid vezikulák optimális esetben a kiválasztott anyagnak hány százalékát tudják magukba zárni. Méréseink szerint a bezárt térfogat 10–15% közötti értékeket vehet fel. Megállapítottuk, hogy a patkány timusz limfociták a tojáslecitinből készült vezikuláknak csupán 1–2%-át veszik fel, ami azonban kb. 400 db vezikulát jelent sejtenként. Figyelembe véve a 10–15%-os



5. ábra. Spektrumrészlet a metilénecsoport vegyértékrezgéseinek régiójából



6. ábra. Spektrumrészlet a foszfátcsoport vegyértékrezgéseinek régiójából



7. ábra. A lipid vezikulák és sejtek kölcsönhatásának különféle módozatai

bezárt térfogatot ez egy rendkívül rossz bejuttatási határfokot jelent. Ezért a módszer csak biológiailag igen aktív anyagok esetén használható. Ebből a megfontolásból esett a választásunk a c-AMP-ra. A c-AMP hatását a limfociták szteroidkötő képességének változásával teszteltük és megállapítottuk, hogy a kötőképességet mintegy 160%-kal lehet növelni a kezletlen kontrollhoz képest. A c-AMP önmagában hatástalan, mivel nem jut be a sejtbe.

A semleges lipidekből pl. lecitinből készült vezikulák és a sejtek közti kölcsönhatás lehetséges módozatairól jelenleg az irodalomban vita folyik (POSTE és PAPAHDJOPOULOS 1978, PAGANO és mtsai 1978). Kísérleteink PAGANO és HUANG álláspontját látszanak alátámasztani, amely szerint semleges lipidekből készült, folyadékkristályos állapotú vezikulákkal is létrehozható az élősejt — vezikula fúzió. A 7. ábrán a kölcsönhatás lehetséges módozatai láthatók, PAGANO szerint.

A meglevő eredményeink és az irodalomban észlelhető tendenciák alapján vizsgálatainkat szeretnénk kiterjeszteni összetett (többféle lipidet tartalmazó) rendszerekre is. A transzport témakörben elsősorban a lipid—ion kölcsönhatás vizsgálatának kiszélesítését tervezzük a FT-IR technikával. Vizsgálni

kívánjuk néhány módosító anyag hatását a lipid struktúrákra (a vibrációs spektrumokra). A fúziós vizsgálatok folytatásánál, együttműködések segítségével, a gyakorlati hasznosítást szeretnénk célul kitűzni. Ezen a területen a lehetőségek szinte korlátlanok (GREGORIADIS 1980).

## IRODALOM

- CAMERON, D. G., MANTSCH, H. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 886–892 (1978).  
CAMERON, D. G., CASAL, H. L., MANTSCH, H. H.: *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1**, 21–36 (1979).  
GABER, B. P., PETICOLAS, W. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **465**, 260–274 (1977).  
GREGORIADIS, G.: *Nature* **283**, 814 (1980).  
KREMER, J. W. H., v. d. ESKER, M. W. J., PATHMAMAHARAN, C., WIERSEMA, P. H.: *Biochemistry* **16**, 3932–3935 (1977).  
PAGANO, R. E., WEINSTEIN, J. N.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**, 435–468 (1978).  
PAGANO, R. E., SANDRA, A., TAKEICHI, M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **308**, 185–199 (1978).  
PETERSEN, N. O., CHUAN, S. I.: *Biochim. Biophys. Acta* **509**, 111–128 (1978).  
POSTE, G., PAPAHDJOPOULOS, D.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **308**, 164–184 (1978).  
SZŐGYI, M., CSERHÁTI, T., SZABON, J.: *Biol. Oszk. Közl.* **24**, (1981).