

PRIMYCIN HATÁSA MEMBRÁNOK ALKÁLI KATION TRANSZPORTJÁRA*

BLASKÓ KATALIN

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Budapest

A primycint VÁLYI-NAGY és mtsai (1954) fedezték fel, kémiai szerkezetét ABERHARDT (1974) és FEHR (1976) állapították meg. A molekula egy 35 szén-atomos laktongyűrűből áll, amelyhez többek között egy cukor és egy guanidinocsoport kapcsolódik. Ez utóbbi révén a molekula pozitív töltéssel rendelkezik. Amfifil karakterű, egy hidrofób és két hidrofil részből áll. A primycin hatásos antibiotikum Gram pozitív baktériumokra, s újabb tapasztalatok szerint elősegíti a sebgyógyulást. Jelentőségét fokozza, hogy baktérium rezisztencia nem alakul ki vele szemben. Hátránya viszont toxikussága, jelenleg csak felületi kezelésre alkalmas.

A primycin hatásmódjára vonatkozó első biokémiai vizsgálatok eredménye szerint az antibiotikum gátolja a DNS függő RNS szintézist (VÁLYI-NAGY, DARÓCZY 1967). Számos más vizsgálat alapján azonban kiderült, hogy hatásában a membránnal való kölcsönhatásnak elsődleges szerepe van. Így pl. HORVÁTH és mtsai (1979) baktériummembrán, MÉSZÁROS és mtsai (1979) mitokondrium belső membrán permeabilitásának növekedését mérték primycin jelenlétében. KÖVÉR és mtsai (1976) kimutatták, hogy a primycin izommembránon a K^+ permeabilitás csökkentése révén depolarizációt okoz. Annak érdekében, hogy különböző membránok permeabilitására gyakorolt hatásáról átfogóbb képet kapjunk, megvizsgáltuk a primycin hatását humán vörösvérsejt alkáli kation transzportjára és bimolekuláris lipid membrán elektromos vezetőképességére.

Vizsgálati módszerek

Modellmembránként sík bimolekuláris lipid membránt (BLM) alkalmaztunk. A BLM-et egy teflon kupa oldalán levő 1,5 mm átmérőjű nyíláson készítettük a megfelelő lipid 1–2%-os n-dekános oldatából (MUELLER és mtsai 1964). A membrán két oldalán azonos koncentrációjú alkáli klorid oldat volt. Az elektromos mérésekhez kloridozott ezüst elektrodákat és Keithley elektro-

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

mértet használtunk. A primycint a BLM kialakulása után adtuk a membrán egyik vagy mindkét oldalán levő vizes oldatba és mértük a membránon átfolyó áramerősséget a külső feszültség vagy az idő függvényében.

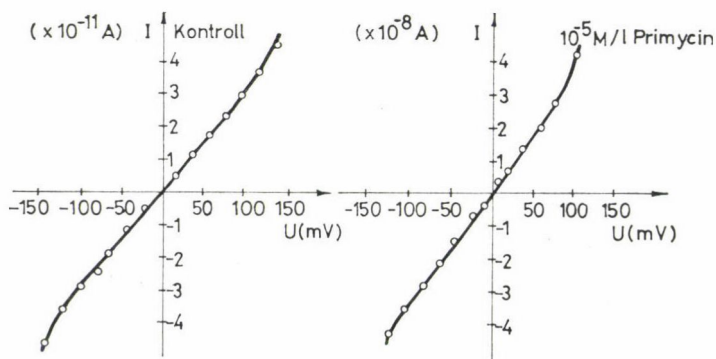
Vörösvérsejtek transzportvizsgálatát radioizotóp kinetikai módszerrel végeztük, nyomjelzőként a vizsgált ion radioizotópját alkalmazva (GYÖRGYI, KANYÁR 1972, GYÖRGYI, BLASKÓ 1974). Frissen vett vért 37 °C-on a kérdéses izotóppal equilibráltuk, majd centrifugálás és mosás után a vörösvérsejtet plazma mennyiségű műszerumban szuszpendáltuk és 20 °C-on mértük a vörösvérsejtből a plazmába kiáramlott aktivitás mennyiségét, K^+ , Rb^+ , Cs^+ esetében. Na^+ ionok vizsgálatakor az izotópot az extracelluláris térhez adtuk és a vörösvérsejt aktivitás növekedését mértük.

A transzportsebességet a ki-, illetve a beáramlott radioaktív ionnak az összaktivitás százalékában kifejezett értékével jellemeztük.

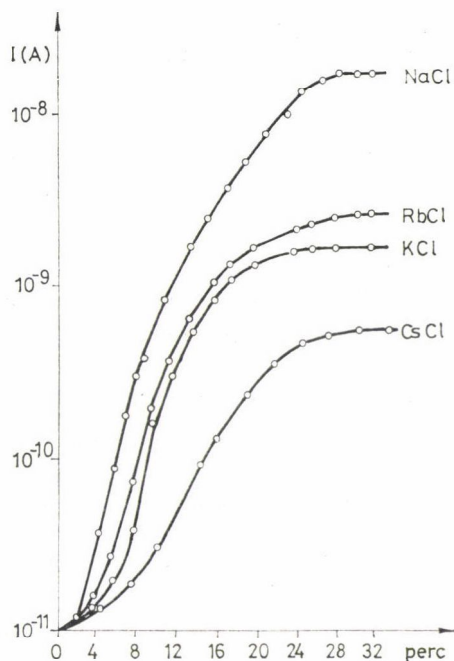
Eredmények és értékelésük

A bimolekuláris lipidmembránon történő méréshez membránanyagként foszfatidilszerint alkalmaztunk. A módosítatlan foszfatidilszerin BLM fajlagos ellenállása, ha a membrán két oldalán azonos koncentrációjú híg (10^{-3} M) alkáli kloridoldat van 10^8 ohm cm^2 értékű (PAPAHADJOPOULOS és OHKI 1964), s az áram-feszültség karakterisztika szimmetrikus lefutású pozitív és negatív feszültségtartományokban. 10^{-6} – 5×10^{-5} M primycint adva a vizes fázishoz a BLM áram-feszültség karakterisztikájának jellege nem változott, de a membrán ohmikus ellenállása mintegy 2–3 nagyságrenddel csökkent.

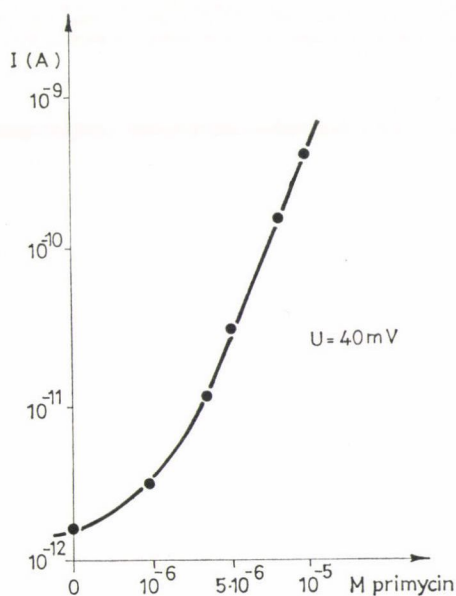
A primycinnel módosított BLM vezetőképessége nagymértékben függött a vizes fázisban levő alkáliion fajtájától, és a vezetőképesség változása jellegzetes időbeli kinetikát mutatott. A 2. ábrán a 40 mV feszültség mellett mért áramerősségeket mutatjuk be az idő függvényében. Primycint adva a vizes



1. ábra. Foszfatidilszerin BLM áram-feszültség karakterisztikái primycin nélkül és primycin jelenlétében). 10^{-3} M NaCl a membrán mindkét oldalán pH 4, $t = 25^\circ \text{C}$



2. ábra. Primycin hatása foszfatidilszerinből készült BLM vezetőképességére különböző alkáli-ionok jelenlétében. A görbék a 40 mV-nál mért áramerősség értékeket mutatják a primycin hozzáadásától számított idő függvényében



3. ábra. Foszfatidilszerin BLM vezetőképessége a primycin koncentráció függvényében. A BLM 10^{-3} M KCl-ben készült. Az áramerősséget 40 mV külső feszültség mellett mértük

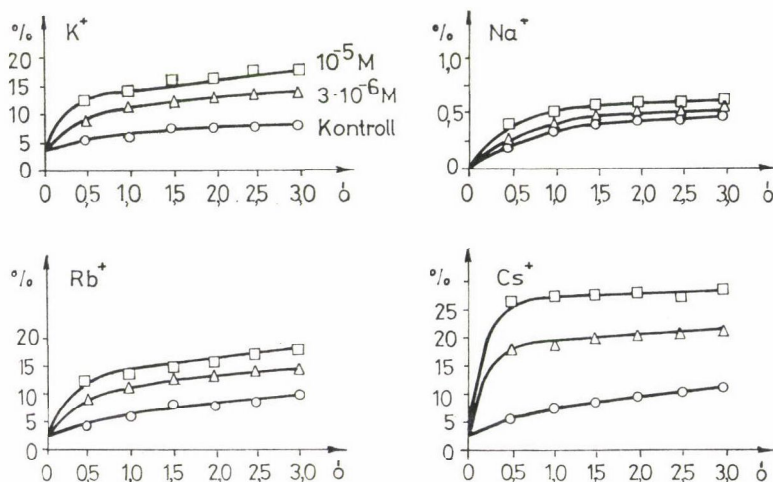
fázishoz a membrán vezetőképessége fokozatosan nőtt és mintegy félóra múlva telítésbe ment. Adott primycin koncentráció esetén az itt mért vezetőképesség értékekből a következő ionszelektivitási sorrend adódott: $\text{Na}^+ > \text{K}^+ \sim \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$.

További érdekes megfigyelésünk volt, hogy a BLM vezetőképességének változása nem függött attól, hogy a primycint a membrán melyik oldalán levő vizes fázishoz adtuk. A membrán vezetőképessége és a primycin koncentrációja között nem lineáris a kapcsolat (3. ábra).

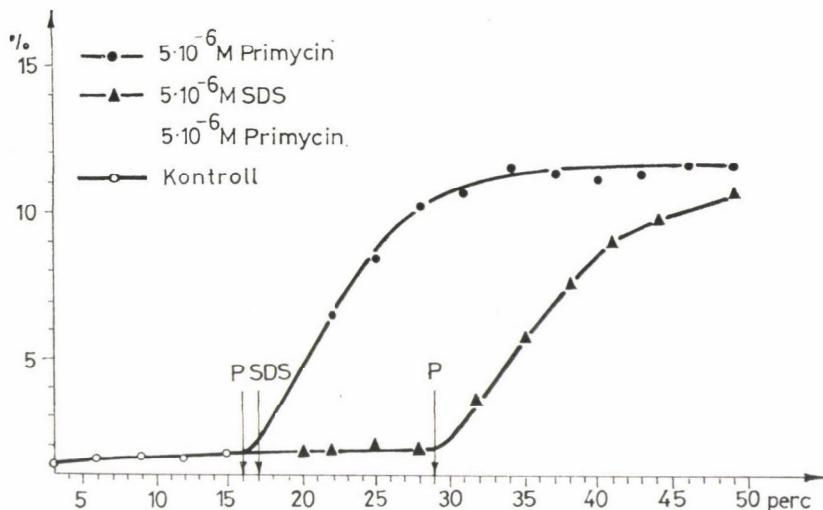
Tapasztalatunk szerint a primycin nem befolyásolta a lecitin: koleszterin 2:1 keverékből készült BLM vezetőképességét.

A bimolekuláris lipid membránokon eddig végzett mérések eredményei alapján a primycin hatásmódjára vonatkozólag a következő feltételezéseket tettük: A primycin kölesönhatásba lép a membrán-lipid rétegével, amelynek első lépése a molekula pozitív csoportja és a membrán felület negatív töltése közötti kölesönhatás, amely elősegíti a molekulának a membrán felülethez való megfelelő kötődését. A molekula ezután amfifil sajátosságának megfelelően beépül a lipid molekulák szénhidrogénláncai közé, környezetében fellazítva a struktúrát, jobban vezető domainekeket hoz létre.

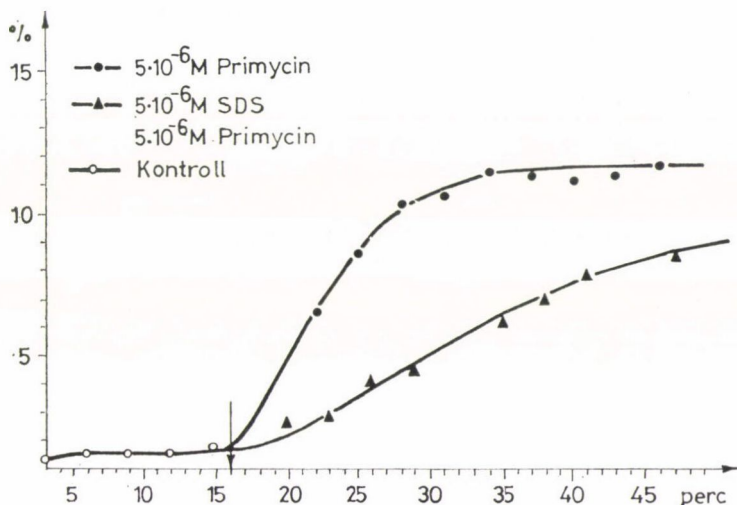
Kísérleteink másik részében a primycin humán vörösvérsejt alkáli kation transzportjára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A passzív transzport mérését 20°C -on végeztük az aktív transzportrendszer gátlása érdekében. Megjegyezzük, hogy ouabain jelenlétében hasonló eredményt kaptunk. A primycin az alkáli kationok aktív transzportját nem befolyásolja. Jelentősen növeli azonban



4. ábra. Humán vörösvérsejtek K^+ , Rb^+ , Cs^+ és Na^+ passzív transzport értékei az idő függvényében különböző extracelluláris primycin koncentráció esetén. A függőleges tengelyen a transzportált radioaktív ionnak az összes aktivitás százalékában kifejezett értékei vannak feltüntetve



5. ábra. Primycin, ill. SDS hatása humán vörösvérsejt passzív Cs⁺ transzportjára



6. ábra. Primycin, ill. primycin és SDS együttes hatása humán vörösvérsejt passzív Cs⁺ transzportjára

a membrán kation permeabilitását. A 4. ábrán a K⁺, Rb⁺ és Cs⁺ efflux értékeit, illetve Na⁺ influx értékeit ábrázoltuk az inkubációs idő függvényében. Míg kontroll körülmények között a K⁺, Rb⁺ és Cs⁺ passzív transzportjában nincs szignifikáns különbség, a primicin szelektíven növeli ezen ionok passzív transzportját. A legkifejezettebb hatást Cs⁺ ion esetében mértük, 1,5 órával 3×10^{-6} M primicin adagolása után a Cs⁺ efflux értéke mintegy háromszorosa, 10^{-5} M

primycin jelenlétében mintegy ötszöröse a kontroll értéknek. Kisebb és közel azonos mértékben emelkedett a K^+ és Rb^+ ionok transzportja. A Na^+ passzív transzport gyakorlatilag nem változott primycin hatására.

Vörösvérsejten is igazolni kívántuk az elektrosztatikus kölcsönhatás szerepét a primycin hatásban. Ezen vizsgálatokhoz negatív töltésű, hidrofób SDS-t használtunk. Cs^+ transzportra vonatkozó mérési eredményeket az 5. ábrán mutatjuk be. A görbe kezdeti szakasza a kontroll alacsony transzport sebességét mutatja. A nyíllal jelölt időpontban a plazmához adtuk a primycint és a permeabilitás a már ismert módon gyorsan emelkedett. Parallel kísérletben SDS-t adtunk a plazmához. Az SDS önmagában nem befolyásolta a Cs^+ transzportot. Néhány perc után azonos mennyiségű primycint adva a rendszerhez a primycin hatásra jellemző nagyságú és kinetikájú transzport növekedést mérünk. Ha azonban a primycint és az SDS-t együtt adagoltuk a helyzet megváltozott (6. ábra). Ebben a kísérletben a nyíllal jelölt időpontban együtt adtuk azonos koncentrációban a két anyagot. Látható, hogy a permeabilitás növekedése kisebb és időben is később jelentkezett. Feltételezhető, hogy az SDS kompetitíve gátolja a primycin és a membrán közötti töltés-töltés kölcsönhatást, s így nehezebbé válik a primycin beépülése a membránba.

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a primycin szelektíven növeli a foszfatidilszerin bimolekuláris lipidmembrán elektromos vezetőképességét és a humán vörösvérsejt membrán passzív alkáli kation transzportját. Az antibiotikum bázikus csoportja révén kötődik a negatív felületű membránhoz, majd amfifil karakterének megfelelően beépül a lipidmolekulák közé és lokálisan fellazítja a környezetében a membránstruktúrát, megnöveli a membrán permeabilitást. Ezt a feltételezést támasztják alá azok az eredményeink, amelyek szerint az extracellulárisan adott primycin növeli az ionok intracelluláris térből való kiáramlását, valamint az a tapasztalat, hogy a BLM áram—feszültség karakterisztikájának jellege nem függött attól, hogy a primycint a membrán melyik oldalához adtuk.

Ami pedig a kétféle rendszeren kapott eltérő ionszelektivitást illeti, ennek értelmezésénél nyilvánvalóan figyelembe kell venni a kétféle membrán jelentősen eltérő lipid összetételét és a fehérjével való kölcsönhatás lehetősége sem hagyható figyelmen kívül.

Összefoglalás

A primycin antibiotikum szelektíven növeli a humán vörösvérsejtek passzív alkáli kation transzportját és a negatív felületi töltésű bimolekuláris lipidmembrán elektromos vezetőképességét. A mesterséges membránokon nyert eredmények alapján feltételeztük, hogy az antibiotikum elektrosztatikus kölcsönhatás révén kötődik a membrán felülethez, majd hidrofób jellegének meg-

felelően beépül a lipidmolekulák szénhidrogén láncai közé és ott jobban vezető domáineket hoz létre. A primycin membránra gyakorolt hatásában a töltés—töltés kölcsönhatás szerepét humán vörösvérsejten végzett mérésekkel is igazoltuk.

IRODALOM

- ABEBHART, J., T. FEHR, R. C. JAIN, P. DE MAYO, O. MOTL, L. BACZYNSKI, D. E. F. GRACEY, D. B. MACLEAN, I. SZILÁGYI: Primycin. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 5816 (1976).
- ABERHABT, J., R. C. JAIN, T. FEHR, P. DE MAYO, I. SZILÁGYI: The constitution of primycin. I. Characterization, functional groups, and degradation to the secoprimycines. *J. Chem. Soc. (Perkin Trans)* 1974: 816 (1974).
- GYÖRGYI, S., K. BLASKÓ: Examination of the competitive effect of alkali ions in the K^+ , Rb^+ , and Cs^+ transport of rat erythrocytes. *Acta Biochim et Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 97 (1974).
- GYÖRGYI, S., B. KANYÁR: Application of a three compartment tracerkinetic model for comparing the K^+ , Rb^+ , and Cs^+ transport of erythrocytes. *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* **7**, 359 (1972).
- HORVÁTH, I., M. KRAMER, P. J. BAUER, K. G. BÜKI: The mode of action of primycin. *Arch. Microbiol.* **121**, 135 (1979).
- KÖVÉR, A., J. GESZTELYI, L. KÓNYA, A. DARÓCZY: Effect of primycin on excitation-contraction coupling of striated muscle *Studia Biophys.* **56**, 37 (1976).
- MÉSZÁROS, L., T. KÖNIG, M. PARÓCZAY, K. NÁHM, I. HORVÁTH: Effect of primycin on the permeability of mitochondrial inner membrane. *J. Antibiotics* **32**, 161 (1979).
- MUELLER, P., D. O. RUDIN, H. T. TIEN, W. C. WESCOTT: Formation and properties of biomolecular lipid membranes. in: *Recent Progress in Surface Science*, Vol. 1 pp. 379—393 Academic Press, Inc., New York (1964).
- PAPAHADJOPOULOS, D., S. OHKI: Stability of asymmetric phospholipid membranes. *Science* **164**, 1075 (1964).
- VÁLYI-NAGY, T., A. DARÓCZY: Effects of primycin on the induction of tryptophan pyrrolase. *Biochem. Pharm.* **16**, 1051 (1967).
- VÁLYI-NAGY, T., J. ÚRI, I. SZILÁGYI: Primycin, a new antibiotic. *Nature* **174**, 1105 (1954).