

Received: 2010.07.15
Accepted: 2010.09.03
Published: 2010.10.13

Biologiczna aktywność związków lizosomotropowych

The biological activity of lysosomotropic agents

Ewa Obłąk¹, Anna Krasowska²

¹ Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

² Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie

Substancje lizosomotropowe to związki biologicznie czynne, znajdujące zastosowanie jako substancje bakteriobójcze, fungicydy oraz leki. Są to najczęściej słabe organiczne zasady, które gromadzą się w kompartmentach komórkowych o niskim pH, takich jak lizosomy lub wakuole. Mechanizm ich działania jest różnorodny, zależny od budowy chemicznej związku, oraz rodzaju komórki, z którą oddziałuje.

Badania nad wpływem związków lizosomotropowych na mikroorganizm eukariotyczny – drożdże *Saccharomyces cerevisiae* przyczyniły się w znacznym stopniu do wyjaśnienia mechanizmu działania tych związków. Wykazano, że związki te mogą wbudowywać się w błony komórkowe i hamować aktywność H⁺-ATPazy. Innym mechanizmem działania jest typowe zachowanie lizosomotropowe, tzn. związki te gromadzą się w wakuolach drożdży, powodują ich rozpad, a uwolnione enzymy wakuolarnie indukują autolizę komórki. Wykazano również, że niektóre związki lizosomotropowe są substratami ABC transporterów u drożdży.

Słowa kluczowe:

związki lizosomotropowe • *Saccharomyces cerevisiae* • surfaktanty

Summary

Lysosomotropic agents have antitumor, antifungal and antimicrobial properties. These small, amphiphilic compounds, as weak bases, readily penetrate the lipid bilayer and diffuse into acidic subcellular compartments such as lysosomes or vacuoles. The mechanism of action of lysosomotropic compounds can be distinct, depending on their chemical structure and/or the kind of cells influenced. Our investigations of the influence of lysosomotropic agents on *Saccharomyces cerevisiae* have lead to a partial explanation of their mechanism of action. The amphiphilic character enables the compounds to penetrate the lipid bilayer and disturb its structure and functions and can inhibit the activity of plasma membrane H⁺ATPase. The accumulation of the compounds in yeast vacuoles, disrupting them and killing yeast cells, is another mechanism of action. Lysosomotropic agents can be substrates for ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* cells.

Key words:

lysosomotropic agents • *Saccharomyces cerevisiae* • surfactant

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=920815>

Word count:

2011

Tables:

3

Figures:

7

References:

44

Adres autorki: dr Ewa Obłąk, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: ewa.oblak@microb.uni.wroc.pl

Wykaz skrótów: **ABC** – ATP-Binding Cassette; **DM-11** – chlorowoderek estru 2-(dimetyloamino)etylowego kwasu laurynowego; **DMAL-12** – chlorowoderek N,N-dimetyloalaninianu n-dodecyłowego; **DMAL-12s** – szczawian N,N-dimetyloalaninianu n-dodecyłowego; **DMG-12** – chlorowoderek N,N-dimetyloglicynianu n-dodecyłowego; **NBD-PE** – N-(7-nitrobenzo-2-oks-1,3-diazol-4-yl)-1,2-diheksadekanoyl-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina sól trietyloamoniowa; **Pdr5, Snq2 i Yor1** – transportery występujące u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*; **PYG-12** – chlorowoderek α -pirolidynoocanu n-dodecyłowego; **rho⁺** – drożdże z prawidłowym procesem oddechowym; **rho^o** – mitochondrialne mutanty oddechowe pozbawione całkowicie mitochondrialnego DNA i niezdolne do oddychania na glicerolu lub etanolu; **TMA-DPH** – (1-(4-trimetyloaminofenyl)-6-fenyl-1,3,5-heksatrien) p-toluenosulfonian.

1. ZWIĄZKI LIZOSOMOTROPOWE

Substancje lizosomotropowe to pojęcie wprowadzone przez de Duve'a i wsp. [10], do określenia związków chemicznych, mogących wnikać do komórki i gromadzić się w kompartmentach komórkowych o niskim pH, takich jak lizosomy komórek zwierzęcych czy wakuole komórek roślinnych lub grzybowych.

Związki lizosomotropowe to najczęściej słabe organiczne zasady, zazwyczaj trzeciorzędowe aminy o wartościach stałej dysocjacji kwasowej pK_a mieszczących się w przedziale 5–9. Przy tych wartościach pK_a są one najszybciej transportowane do lizosomów lub wakuoli. Po osiągnięciu lizosomu, amina wychwytuje proton i przechodzi w formę związku amfifilowego i – jeżeli ma odpowiednią strukturę – wykazuje właściwości kationowego surfaktantu oddziałując na błonę lizosomalną (lub wakuolarną) i białka błonowe. Jednocześnie następuje podniesienie wewnątrzlizosomalnego pH nawet o 1,7 jednostki, co ma duży wpływ na procesy transportowe i funkcjonowanie lizosomu [13]. Substancje lizosomotropowe mają bardzo różną strukturę, a wspólnym jej fragmentem jest atom azotu nadający cząsteczce słabo zasadowy charakter [16]. Zalicza się do nich np. chlorek amonowy, N-dodecyloimidazol, fungicydy (dodyna) oraz wiele znanych leków nasercowych (verapamil) [1,16,19].

Związki lizosomotropowe mają zastosowanie jako leki lizosomotropowe, substancje odwracające skutki oporności wielolekowej i fungicydy. Od lat substancje lizosomotropowe są badane w terapiach przeciwnowotworowych pod kątem zdolności ułatwiania działania cytostatyków, ponieważ wewnątrzlizosomalne pH komórek nowotworowych jest prawie o 0,5 jednostki niższe niż w komórkach zdrowych [42]. Sprzyja to gromadzeniu się substancji lizosomotropowych głównie w komórkach nowotworowych [4].

Dzięki zdolności do przekraczania bariery krew–mózg związki lizosomotropowe są stosowane w terapii choroby Creutzfeldta-Jakoba i innych chorobach prionowych. Wykazano, że substancje o charakterze lizosomotropowym, takie jak kwinaakryna, chlorokwina czy suramina, hamują proces akumulacji patologicznych protein w komórkach nerwowych przez ich konwersję do postaci niepatologicznych. Inny możliwy mechanizm działania tych związków to destabilizacja nieprawidłowo sfałdowanego białka na skutek podwyższenia lizosomalnego pH [11].

Inną funkcją tego rodzaju substancji może być przeciwdziałanie oporności wielolekowej, która polega m.in. na wydalaniu antybiotyków lub cytostatyków z komórki przez transportery ABC [14,20]. Przeciwdziałanie tej oporności jest uważane za najważniejszy problem w walce z nowotworami. Związki lizosomotropowe (np. N-dodecyloimidazol) zmieniając przepuszczalność błony lizosomalnej prowadzą do uwalniania do cytoplazmy enzymów lizosomowych (np. katepsyn – na ich działanie szczególnie wrażliwe są młode komórki), co w konsekwencji prowadzi do śmierci tych komórek [4,13,14].

2. ZNANE ZWIĄZKI LIZOSOMOTROPOWE, JAKO SUBSTANCJE PRZECIWDROBNOUSTROJOWE

Jednym z lepiej znanych i opisanych w literaturze naukowej związków lizosomotropowych, który wykazuje aktywność bakteriobójczą i grzybobójczą jest chlorokwina (CQ). Jest to 9-aminochinolina znana od 1934 roku jako lek przeciwmalaryczny [41]. Mechanizm działania chlorokwiny jest uzależniony od rodzaju patogenu, na który ten związek oddziałuje, chociaż nie wszystkie mikroorganizmy są wrażliwe na chlorokwinę. Związek ten przenika do wnętrza komórek, gdzie następuje jego uprotonowanie zgodnie z regułą Hendersona-Hasselbalcha [39]. Zne są dwa mechanizmy działania chlorokwiny: alkalizacja kwaśnych kompartmentów w komórkach zakażonych bakteriami lub grzybami albo potranslacyjne zmiany syntetyzowanych białek w komórkach zakażonych wirusami. Po raz pierwszy chlorokwinę użyto jako środka przeciwko przewlekłej gorączce Q. Alkalizacja wakuoli zawierających bakterie *Coxiella burnetti* (odpowiedzialnych za gorączkę Q) przywracała aktywność antybiotyków w komórkach [27]. Wiele innych bakterii czy grzybów ma zdolność rozwoju w kwaśnych wakuolach i wstępne badania wskazują na potencjalną przydatność chlorokwiny w zwalczaniu wywołanych przez nie chorób. Na przykład chlorokwina hamuje wewnątrzkomórkowe namnażanie się *Legionella pneumophila*, bakterii wywołującej chorobę legionistów. W tym przypadku chlorokwina blokuje degradację ferrytyny przez kwaśne proteazy, zakłócając metabolizm żelaza, niezbędny do namnażania *Legionella pneumophila* [5]. Chlorokwina hamuje również wewnątrzkomórkowy rozwój *Mycobacterium tuberculosis*, nie tylko przez podniesienie wewnątrzkomórkowego pH, ale również – podobnie jak w przypadku *Legionella* – zakłócając metabolizm żelaza tych drobnoustrojów [5]. Ponadto wykazano działanie

chlorokwiny przeciw takim bakteriom jak np.: *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* czy *Listeria monocytogenes* [2,18,29,37] i grzybom *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* [21,26].

Pochodne imidazolu, triazolu i dodyna znalazły zastosowanie jako fungicydy. Ich działanie polega na zahamowaniu biosyntezy steroli [17]. Inne substancje lizosomotropowe, takie jak chlorek amonu, prokaina, feniramina wykazują również aktywne działanie wobec wirusów [7]. Związki lizosomotropowe stają się alternatywą dla silnych utleniaczy stosowanych w procesie oczyszczania wód. Zastosowanie chloramin o właściwościach surfaktantów zamiast chloru daje silny efekt bakteriobójczy i grzybobójczy, przy znacznym obniżeniu szkodliwości dla środowiska [6].

3. MECHANIZM DZIAŁANIA ZWIĄZKÓW LIZOSOMOTROPOWYCH NA PRZYKŁADZIE DROŹDZY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Mechanizm toksycznego działania substancji lizosomotropowych nie został w pełni wyjaśniony. Wiadomo, że związki te wbudowując się w błonę lizosomu, zmieniają jej przepuszczalność, a w dużych stężeniach powodują jej zniszczenie. Prowadzi to do wypływu lizosomalnych, hydrolitycznych enzymów i autolizy komórki [28].

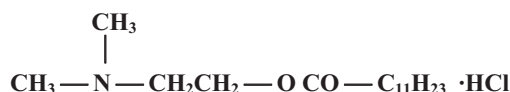
W komórkach grzybów istnieją analogiczne do lizosomów struktury – wakuole, co pozwala przypuszczać, że grzyby powinny być zabijane przez surfaktanty lizosomotropowe w podobny sposób jak komórki ssaków. Hussain i wsp. [19] badali wpływ N-dodecyloimidazolu na komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Wykazali oni, że efektywność jego działania na drożdże zależy od: pH podłoża (w pH 8,0 N-dodecyloimidazol bardziej uwrażliwia komórki drożdży niż w pH 5,0); fazy wzrostu – większą wrażliwość wykazują komórki we wczesnej fazie logarytmicznej niż w fazie stacjonarnej i od stężenia związku. Pod wpływem wysokich stężeń tego związku obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym zniszczenie wakuoli w komórkach drożdży.

Badania nad wpływem na komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* nowych pod względem struktury związków lizosomotropowych, wyjaśniły w dużej mierze mechanizm działania tych substancji. Trzeciorzędowe aminoalkohole zestryfikowane kwasem tłuszczowym są to przeważnie chlorowodorki i związki te występują w takiej formie krystalicznej. Są stabilne w trakcie przechowywania, dobrze rozpuszczalne w wodzie i przez to wygodne w badaniach (ryc. 1).

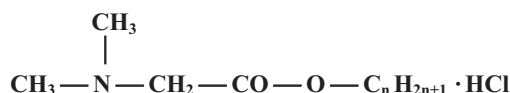
Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że minimalne hamujące stężenie (MIC) było najniższe dla związku DM-11 o 11-węglowym łańcuchu alkilowym. Znacznie większą aktywność uzyskano w pH=8,0 w porównaniu do jego aktywności w pH=6,0 (tabela 1). Taka właściwość jest charakterystyczna dla związków lizosomotropowych [19].

Związki lizosomotropowe wykazują działanie grzybostaticzne, co przejawia się hamowaniem wzrostu grzybów, a po dłuższym czasie inkubacji – jego wznowieniem przy ich wyższych stężeniach. Wzrost ten może być spowodowany rozcinaniem wiązania estrowego w cząsteczce związku lizosomotropowego przez esterazy syntetyzowane i wydzielane przez drożdże [25,36].

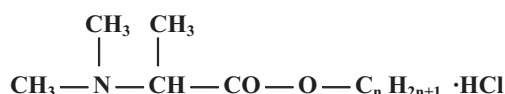
a) DM-11



b) DMG-n



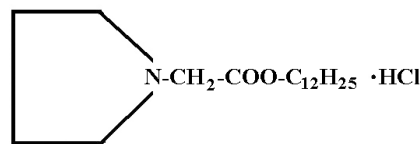
c) DMAL-n



d) DMAL-12s



e) PYG-12



Ryc. 1. Struktury chemiczne związków lizosomotropowych: a – chlorowodorek estru 2-(dimetyloamino)etylowego kwasu laurynowego (DM-11); b – chlorowodorek N,N-dimetyloglicynianu n-dodecyłowego (DMG-n); c – chlorowodorek N,N-dimetyloalaninianu n-dodecyłowego (DMAL-12); d – szczawian N,N-dimetyloalaninianu n-dodecyłowego (DMAL-12s); e – chlorowodorek α-pirolidynoocanu n-dodecyłowego (PYG-12), gdzie n=10, 12, 14, 16 jest liczbą atomów węgla w łańcuchu alkilowym

Ponadto wykazano, że aminoester DM-11 hamuje aktywność H⁺-ATPazy błony komórkowej *in vivo* (ryc. 2) i *in vitro*, jak również transport aminokwasów ([¹⁴C] leucyny) do komórki drożdży [31,35,43].

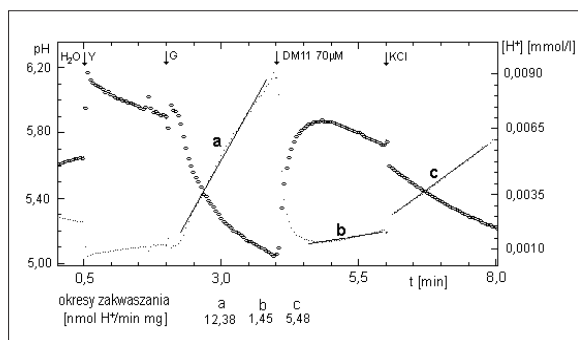
Związki lizosomotropowe, takie jak np. wolne trzeciorzędowe aminoestry znajdują się w stanie równowagi dynamicznej ze swoimi uprotonowanymi formami w pK_a. Równowaga ta jest zależna od pH roztworu. W środowisku kwaśnym (tj. przy niższym pH) preferowana jest forma uprotonowana. W środowisku alkalicznym aminoestry występują w formie nieuprotonowanej i mogą swobodnie przenikać przez błonę komórkową, umiejscawiając się w kwaśnych kompartmentach komórki drożdży (np. wakuolach) [16,19].

Badania nad aminoestrami (ryc. 1) – pochodnymi glicyny i alaniny (chlorowodorek N,N-dimetyloglicynianu n-dodecyłowego (DMG-12) i chlorowodorek N,N-dimetyloalaninianu n-dodecyłowego (DMAL-12)) wykazały,

Tabela 1. Minimalne hamujące stężenie (MIC) aminoestru DM-11 dla szczepu *Saccharomyces cerevisiae* prawidłowo oddychającego (ρ^+) i mitochondrialnego mutantu oddechowego ρ^o [31]

Związek	MIC [μ M]		
	pH	ρ^+	ρ^o
DM-11	6,0	140	120→140*
	8,0	40→40*	10→40*

* Wzrost po 9 dniach.

Ryc. 2. Aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (*in vivo*) w obecności DM-11 (70 μ M). Strzałki wskazują kolejne dodawanie substratów (w stężeniach końcowych): Y – komórki drożdży (2 mg suchej masy), G – glukoza (200 mM), DM-11 (70 μ M), KCl (100 mM). Gruba linia – pH, cienka linia – stężenie $[H^+]$ [31]

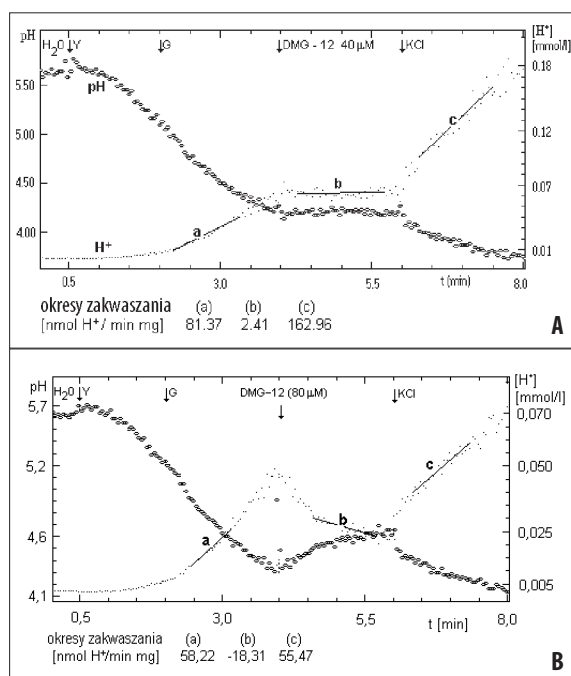
że związki te w kwaśnym pH (uprotonowane) działają na H^+ -ATPazę błony komórkowej drożdży. Najaktywniejsze są związki z 12-węglowym łańcuchem alkilowym (tabela 2) [32]. Natomiast te same aminoestry nie wykazują hamującego działania wobec ATPazy mitochondrialnej lub jej aktywność jest hamowana dopiero w wysokich stężeniach tych związków. Można to wyjaśnić tym, że w wyższym pH (pH 9,0), w którym aktywność ATPazy mitochondrialnej drożdży była testowana, aminoestry są w przeważającej części w nieuprotonowanej formie nieaktywnej. Można zatem sugerować, że wolne aminoestry nie działają na ATPazę mitochondrialną, a nieznaczny poziom inhibicji może być zależny od uprotonowanych form obecnych jako mniejszy ilościowo składnik w zrównoważonej mieszaninie (tabela 2) [32].

Hamujące działanie aminoestrów na H^+ -ATPazę błony komórkowej drożdży [32,33,34] zostało również potwierdzone w teście *in vivo* wg Kotyka [22]. Po dodaniu do zawiesiny komórek drożdży glukozy (która indukuje transport protonów przez H^+ -ATPazę błony komórkowej drożdży), obserwowany był spadek pH środowiska zewnętrznego. Jest on miarą aktywności tego enzymu [22]. Dodanie aminoestru (40 μ M DMG-12) powodowało zahamowanie wyrzucania protonów przez H^+ -ATPazę błony komórkowej drożdży (ryc. 3a), a przy wyższym stężeniu (80 μ M DMG-12) również niewielki wzrost pH środowiska (ryc. 3b).

Wykazano również, że aminoestry są inhibitorami transportu [14 C] leucyny do komórki drożdży. Związek DMAL-12s w stężeniu dwa razy wyższym niż MIC (160 μ M) hamował

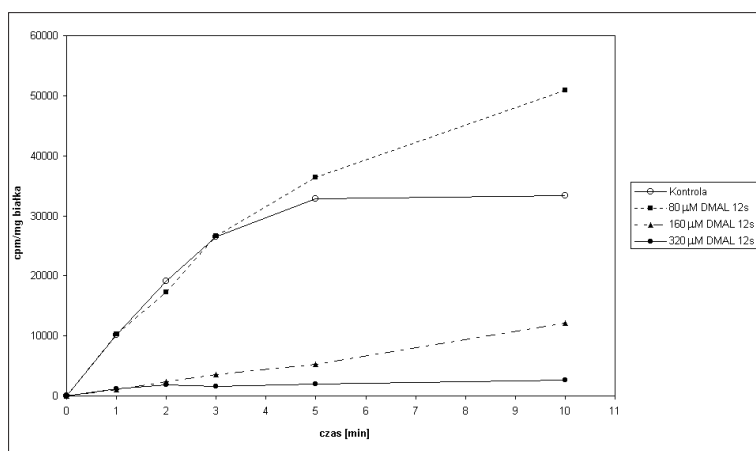
Tabela 2. Wpływ aminoestrów DMG-n i DMAL-n na aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej i ATPazy mitochondrialnej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (*in vitro*), gdzie n=10, 12, 14, 16 atomów węgla w łańcuchu alifatycznym [32]

Związek	MIC (μ M) w pH 6	I_{50}^* związku (μ M)	
		H^+ -ATPaza błony komórkowej	H^+ -ATPaza mitochondrialna
DMG-10	160	128	250
DMG-12	40	25	230
DMG-14	80	54	nie hamuje
DMG-16	>320	320	nie hamuje
DMAL-12	40	8	nie hamuje
DMAL-12s	80	17.5	nie hamuje

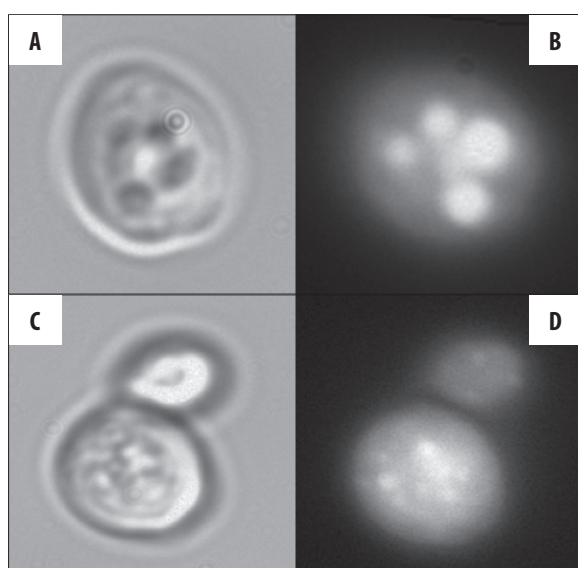
 I_{50}^* – stężenie związku, które hamuje 50% aktywności enzymu.Ryc. 3. Aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (*in vivo*) w obecności: A – DMG-12 (40 μ M); B – DMG-12 (80 μ M). Strzałki wskazują kolejne dodawanie substratów (w stężeniach końcowych): Y – komórki drożdży (2 mg suchej masy), G – glukoza, (200 mM), DMG-12 (40 lub 80 μ M), KCl (100 mM). Gruba linia – pH, cienka linia – stężenie $[H^+]$ [34]

transport tego aminokwasu w około 60%. Natomiast w obecności 320 μ M badanego związku hamowanie transportu [14 C] leucyny wynosiło 97% (ryc. 4) [33].

Podczas badań wpływu aminoestrów na pH w cytosolu i wakuoli u drożdży, stwierdzono, że w zależności od struktury, związki te działają w dwojaki sposób: mogą wywoływać wzrost fluorescencji kwinakryny (jednego ze wskaźników pH) w całej komórce (to znaczy obniżać



Ryc. 4. Transport [^{14}C] leucyny w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w obecności aminoestru DMAL-12s (szczawianu N,N-dimetyloalaninianu n-dodecyłowego) [33]



Ryc. 5. Mikrofotografie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (kontrast Nomarskiego A i C) i odpowiadające jej mikrofotografie fluorescencyjne (B i D) – komórki poddane działaniu aminoesstrów lizosomotropowych (A, B – PYG-12 i C, D – DM-11) i wybarwione kwinkaryną [23]

pH), jak w przypadku DM-11 [40] lub typowo dla związków lizosomotropowych, powodować alkalizację wakuoli, jak PYG-12 (ryc. 5) [24].

Zakwaszenie cytosolu prawdopodobnie jest spowodowane zahamowaniem aktywności H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży przez aminoesstry i zablokowaniu wypompowywania protonów z komórki (tabela 3). Te związki, które powodowały wzrost pH w wakuolach, oddziaływały na wakuolarną ATPazę blokując transport protonów do wakuoli (ryc. 5) [23].

Zmiany morfologiczne w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pod wpływem działania aminoestru DMAL-12 (chlorowodoru N,N-dimetyloalaninianu n-dodecyłowego) w pH 6,0 analizowano na elektronogramach z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (ryc. 6) [30]. W komórkach drożdży obserwowano zmiany w strukturze wakuoli, tj. duże nagromadzenie wtrętów

Tabela 3. Wpływ aminoesstrów PYG-12 i PYG-14 na aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej i ATPazy mitochondrialnej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (in vitro)

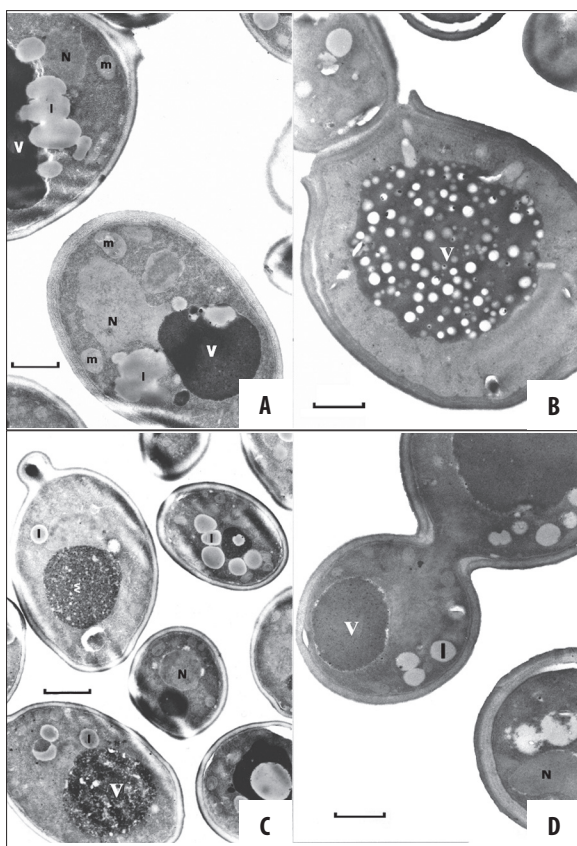
Związek	I_{50}^* związku (μM)	
	H^+ -ATPaza błony komórkowej	H^+ -ATPaza mitochondrialna
PYG-12	10,5	nie hamuje
PYG-14	16,5	nie hamuje

I_{50}^* – stężenie związku, które hamuje 50% aktywności enzymu.

wewnątrzcytoplazmatycznych, być może kropli lipidowych. Takich zmian nie obserwuje się w komórkach inkubowanych bez dodatku tego związku (kontrola). Natomiast w komórkach drożdży namnażanych w pH 8,0, w obecności badanego aminoestru wakuole (prawdopodobnie w starszych komórkach), ulegają dezintegracji, podczas gdy w młodych komórkach mają jednolitą elektronowo gęstą strukturę.

Związki o charakterze amfifilowym, mają w swojej strukturze część hydrofilową i hydrofobową, mogą wbudowywać się w dwuwarstwę lipidową błon komórkowych. Aminoesstry lizosomotropowe zostały przebadane pod kątem zdolności wbudowywania się w błonę liposomową, składającą się z lipidów wyizolowanych z plazmalemy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W badaniach tych zastosowano znaczniki fluorescencyjne, umiejscawiające się w różnych regionach dwuwarstwy lipidowej: NBD-PE i TMA-DPH [12]. Związek DM-11 o 11 atomach węgla w łańcuchu alkilowym wbudowywał się w dwuwarstwę lipidową na poziomie TMA-DPH, czyli poniżej czwartego węgla łańcuchów alkilowych fosfolipidów błonowych. Wraz z wydłużaniem się lub skracaniem długości łańcucha alkilowego w cząsteczce aminoestru, obserwowane zmiany fluorescencji TMA-DPH były mniejsze. Sądzi się, że związek DM-9 nie wnikał w głębsze regiony dwuwarstwy liposomowej, co potwierdziła również wyższa wartość zmian intensywności fluorescencji sondy NBD-PE, umiejscawiającej się w regionie przypowierzchniowym dwuwarstwy (ryc. 7).

Na podstawie uzyskanych wyników można rozpatrywać kilka możliwych mechanizmów działania badanych związków



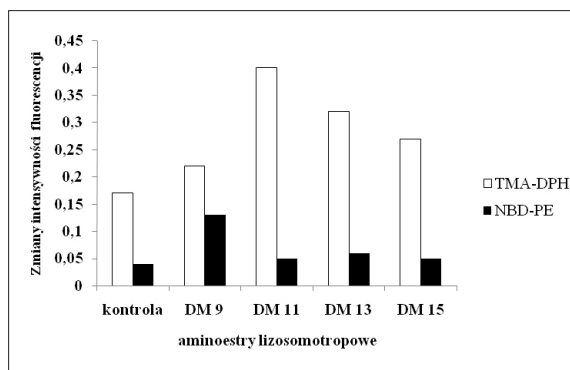
Ryc. 6. Elektronogramy komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z transmisyjnego mikroskopu elektronowego [30]. Komórek drożdży inkubowanych w YPG: A – w pH 6,0 bez suplementacji związku DMAL-12 (kontrola); B – w obecności 40 μ M DMAL-12; C – w pH 8,0 bez związku DMAL-12 (kontrola); D – w obecności 5 μ M DMAL-12; v – wakuola; l – krople lipidowe; N – jądro komórkowe; m – mitochondria

lizosomotropowych na aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży.

Po pierwsze aminoestry jako związki o charakterze amfifilowym mogą wbudowywać się swoim łańcuchem hydrofobowym w podwójną warstwę lipidową błony komórkowej, wówczas część hydrofilowa, zawierająca dodatnio naładowany atom azotu, pozostając na powierzchni błony komórkowej i konkurując z protonami transportowanymi przez H^+ -ATPazę błony komórkowej o miejsce w części polarnej dwuwarstwy, hamuje aktywność tego enzymu.

Po drugie aminoestry lizosomotropowe mogą bezpośrednio oddziaływać na H^+ -ATPazę błony komórkowej drożdży, blokując hydrolizę ATP i transport protonów z komórki.

Po trzecie, na skutek wnikania aminoestrów w dwuwarstwę lipidową, błona komórkowa staje się bardziej przepuszczalna dla protonów i innych jonów, a w związku z tym różnica potencjałów między wewnętrzną a zewnętrzną stroną błony może ulegać zmianie, co z kolei może być przyczyną hamowania aktywności H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży. Za tą hipotezą przemawia to, że dodanie aminoestrów do zawiesiny drożdży powoduje nie tylko zahamowanie spadku pH spowodowane naturalną aktywnością H^+ -ATPazy



Ryc. 7. Zależność zmian intensywności fluorescencji TMA-DPH i NBD-PE od rodzaju wbudowywanych do błony liposomowej (zbudowanej z lipidów z plazmalemy drożdży) aminoestrów lizosomotropowych

błony komórkowej drożdży, ale także jego wzrost, czasem aż do wartości wyjściowej (ryc. 2). Oznaczałoby to obniżenie ładunku dodatniego na zewnątrz błony, prawdopodobnie na skutek przenoszenia protonów do wnętrza komórki.

Zmianę ładunku powierzchniowego błony liposomowej udowodniono w pomiarach zmian fluorescencji fluoresceiny-PE pod wpływem aminoestrów. Związki te powodowały zmniejszenie dodatniego ładunku na powierzchni liposomów, co świadczyło o wzroście lokalnego, przybliżonego odczynu środowiska.

Białka genów PDR (pleiotropic drug resistance) tworzące u *Saccharomyces cerevisiae* złożoną sieć pomp ABC i regulatorów transkrypcyjnych, kontrolujących ich ekspresję, które są analogami ssaczych białek MDR odpowiadających m.in. za zjawisko oporności wielolekowej [3]. Związki lizosomotropowe, mogą hamować aktywność transporterów ABC [38]. Inhibitory transporterów ABC mogą oddziaływać na pompy jonowe w dwojaki sposób, poprzez specyficzne oddziaływanie z tymi białkami, zakłócając ich aktywność lub wpływając na źródło energii dla pomp (syntezę ATP). Ponadto mogą hamować aktywność H^+ -ATPazy poprzez wpływ na fosfolipidy błonowe i zwiększenie przepuszczalności błony dla małych nieelektrolitów i kationów [8,9,15].

Przetestowano wiele związków lizosomotropowych pod względem ich toksyczności dla mutantów delecyjnych *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych zarówno pojedynczych pomp ABC – Pdr5, Snq2 oraz Yor1, jak również z delecjami podwójnymi i potrójnymi w różnych kombinacjach. Niektóre związki lizosomotropowe, na przykład DM-11 lub DM-13 są substratami poszczególnych pomp, które wypompowują je poza komórkę [38,44].

Uzyskane przez nas wyniki wykazały, że związki lizosomotropowe hamują wzrost drożdży, aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej, transport aminokwasów oraz są substratami wybranych transporterów ABC.

Przedstawiony stan badań w pracy wskazuje na możliwość zastosowania substancji lizosomotropowych zarówno w medycynie: jako leki w terapii przeciwnowotworowej, fungicydy i środki dezynfekcyjne w zwalczaniu patogenów oraz w rolnictwie jako środki ochrony roślin.

PIŚMIENICTWO

- [1] Agostinelli E., Seiler N.: Lysosomotropic compounds and spermine enzymatic oxidation products in cancer therapy. *Int. J. Onc.*, 2007; 31: 473–484
- [2] Artestein A.W., Opal S.M., Cristofaro P., Palardy J.E., Parejo N.A., Green M.D., Jhung J.W.: Chloroquine enhances survival in *Bacillus anthracis* intoxication. *J. Infect. Dis.*, 2004; 190: 1655–1660
- [3] Bauer B.E., Wolfger H., Kuchler K.: Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1461: 217–236
- [4] Boyer M.J., Horn I., Firestone R.A., Steele-Norwood D., Tannock I.F.: pH dependent cytotoxicity of N-dodecylimidazole: a compound that acquires detergent properties under acidic conditions. *Br. J. Cancer.*, 1993; 67: 81–87
- [5] Byrd T.F., Horwitz M.A.: Chloroquine inhibits the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. A potential new mechanism for the therapeutic effect of chloroquine against intracellular pathogens. *J. Clin. Invest.*, 1991; 88: 351–357
- [6] Caravelli A., Giannuzzi L., Zaritzky N.: Inhibitory effect of a surfactant on pure cultures of a filamentous and a floc forming micro-organism. *Environ. Technol.*, 2007; 28: 137–146
- [7] Castilla V., Mersich S.E., Damonte E.B.: Lysosomotropic compounds inhibiting the multiplication of Junin virus. *Rev. Argent. Microbiol.*, 1991; 23: 86–89
- [8] Conseil G., Decottignies A., Jault J.M., Comte G., Barron D., Goffeau A., Di Pietro A.: Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 2000; 39: 6910–6917
- [9] Conseil G., Perez-Victoria J.M., Jault J.M., Gamarro F., Goffeau A., Hofmann J., Di Pietro A.: Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity. *Biochemistry*, 2001; 40: 2564–2571
- [10] de Duve C., de Barse T., Poole B., Trouet A., Tulkens P., Van Hoof F.: Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.*, 1974; 23: 2495–2531
- [11] Doh-Ura K., Iwaki T., Caughey B.: Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J. Virol.*, 2000; 74: 4894–4897
- [12] Driessen A.J., van den Hooven H.W., Kuiper W., van de Kamp M., Sahl H.G., Konings R.N., Konings W.N.: Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 1995; 34: 1606–1614
- [13] Dubowchik G.M., Gawlak S.L., Firestone R.A.: The *in vitro* effects of three lysosomotropic detergents against three human tumor cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995; 5: 893–898
- [14] Dubowchik G.M., Padilla L., Edinger K., Firestone R.A.: Reversal of doxorubicin resistance and catalytic neutralization of lysosomes by a lipophilic imidazole. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994; 1191: 103–108
- [15] Egner R., Rosenthal F.E., Kralli A., Sanglard D., Kuchler K.: Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Mol. Biol. Cell*, 1998; 9: 523–543
- [16] Firestone R.A., Pisano J.M., Bonney R.J.: Lysosomotropic agents. 1. Synthesis and cytotoxic action of lysosomotropic detergents. *J. Med. Chem.*, 1979; 22: 1130–1133
- [17] Hassall, K.A.: The Biochemistry and uses of pesticides: structure, metabolism, mode of action, and uses in crop protection, 2nd ed.; Macmillan Press, London (UK) 1990: 335
- [18] Horowitz H., Carbonaro C.A.: Inhibition of the *Salmonella typhi* oral vaccine oral vaccine strain, Ty21a, by mefloquine and chloroquine. *J. Infect. Dis.*, 1992; 166: 1462–1464
- [19] Hussain M., Leibowitz M.J., Lenard J.: Killing of *Saccharomyces cerevisiae* by the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987; 31: 512–517
- [20] Jaffrezou J.P., Laurent G.: The intriguing link between modulation of both multidrug resistance and ligand-toxin conjugate cytotoxicity. *FEBS Lett.*, 1993; 323: 191–197
- [21] Jahn B., Langfelder K., Schneider U., Schindel C., Brakhage A.A.: PKSP-dependent of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol.*, 2002; 4: 793–803
- [22] Kotyk A.: Mechanisms of extracellular acidification by yeast. *Romanian J. Biophys.*, 1993; 3: 17–26
- [23] Krasowska A., Chmielewska L., Adamski R., Łuczyński J., Witek S., Sigler K.: The sensitive of yeast and yeast-like cells to new lysosomotropic agents. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2004; 9: 675–683
- [24] Krasowska A., Chmielewska L., Łuczyński J., Witek S., Sigler K.: The dual mechanism of the antifungal effect of New lysosomotropic agents on the *Saccharomyces cerevisiae* RXII strain. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2003; 8: 111–120
- [25] Kroon P.A., Faulds C.B., Brezillon C., Williamson G.: Methyl phenyl-lalkanoates as substrates to probe the active sites of esterases. *Eur. J. Biochem.*, 1997; 248: 245–251
- [26] Levitz S.M., Harrison T.S., Tabuni A., Liu X.: Chloroquine induces human mononuclear phagocytes to inhibit and kill *Cryptococcus neoformans* by a mechanism independent of iron deprivation. *J. Clin. Invest.*, 1997; 100: 1640–1646
- [27] Maurin M., Benoliel A.M., Bongrand P., Raoult D.: Phagolysosomal alkalization and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm. *J. Infect. Dis.*, 1992; 166: 1097–1102
- [28] Miller D.K., Griffiths E., Lenard J., Firestone R.A.: Cell killing by lysosomotropic detergents. *J. Cell. Biol.*, 1983; 97: 1841–1851
- [29] Nguyen H.A., Greller J., Paillard D., Dubois V., Quentin C., Saux M.C.: Factors influencing the intracellular activity of fluoroquinolones: A study using levofloxacin in a *Staphylococcus aureus* THP-1 monocyte model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006; 57: 883–890
- [30] Obląg E., Adamski R., Lachowicz T.M.: pH dependent influence of a quaternary ammonium salt and aminoester on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ultrastructure. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2003; 8: 105–110
- [31] Obląg E., Krasowska A.: The influence of organic nitrogen compounds on melanoma, bacterial and fungal cells. *Advan. Clin. Exper. Med.*, 2010; 19: 65–75
- [32] Obląg E., Lachowicz T.M., Łuczyński J., Witek S.: Lysosomotropic N,N-dimethyl α -aminoacid n-alkyl esters and their quaternary ammonium salts as plasma membrane and mitochondrial ATPases inhibitors. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2002; 7: 1121–1129
- [33] Obląg E., Lachowicz T.M., Łuczyński J., Witek S.: The aminoesters as inhibitors of plasma membrane H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2004; 8: 755–763
- [34] Obląg E., Lachowicz T.M., Łuczyński J., Witek S.: Comparative studies of the biological activities of the lysosomotropic aminoesters and quaternary ammonium salts on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biol. Mol. Lett.*, 2001; 6: 871–880
- [35] Obląg E., Łuczyński J., Witek S.: Wpływ struktury fragmentu kwasowego wybranych aminoestrów na zdolność inhibicyjną H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Monografia: Błony biologiczne pod redakcją J. Gabrielskiej i P. Misiaka, Wyd. Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław, 2008; 263–267
- [36] Parkkinen E., Oura E., Soumalainen H.: The esterases of baker's yeast. I. Activity and localization in the yeast cell. *J. Inst. Brew.*, 1978; 84: 5–8
- [37] Prada-Delgado A., Carrasco-Marin E., Pena-Macarro C., Del Cerro-Vadillo E., Fresno-Escudero M., Leyva-Cobán F., Alvarez-Dominguez C.: Inhibition of Rab5a exchange activity is a key step for *Listeria monocytogenes* survival. *Traffic*, 2005; 6: 252–265
- [38] Rogers B., Decottignies A., Kolaczowski M., Carvajal E., Balzi E., Goffeau A.: The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2001; 3: 207–214
- [39] Savarino A., Lucia M.B., Rastrelli E.: Anti-HIV effects of chloroquine: inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2004; 35: 223–232
- [40] Umemoto N., Yoshihisa T., Hirata R., Anraku Y.: Roles of the VMA3 gene product, subunit c of the vacuolar membrane H⁺-ATPase, on vacuolar acidification and protein transport. A study with VMA3-disrupted mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 18447–18453
- [41] Welles T.E., Plowe C.V.: Chloroquine-resistant malaria. *J. Infect. Dis.*, 2001; 184: 770–776
- [42] Wike-Hooley J.L., Havemann J., Reinhold J.S.: The relevance of tumor pH to the treatment of malignant disease. *Radiother. Oncol.*, 1984; 2: 343–366
- [43] Witek S., Goffeau A., Nader J., Łuczyński J., Lachowicz T.M., Kuta B., Obląg E.: Lysosomotropic aminoesters acid as H⁺-ATPase inhibitors in yeast. *Folia Microbiol.*, 1997; 42: 252–254
- [44] Witek S., Kolaczowski M., Lachowicz T.M., Kolaczowska A., Łuczyński J., Goffeau A.: Soft lysosomotropic compounds as new substrates of the yeast PDR Network. *Folia Microbiol.*, 1998; 43: 214–216

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.