

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A sejtmembrán biofizikai tulajdonságainak és  
dinamikájának szerepe sejtpenetráló peptidok felvételében  
és lokális ligandumkoncentráció-gradiensek  
kialakulásában**

**Tóth Gabriella**

**DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2026**

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **A sejtmembrán biofizikai tulajdonságainak és dinamikájának szerepe sejtpenetráló peptidok felvételében és lokális ligandumkoncentráció-gradiensek kialakulásában**

**Tóth Gabriella**

**Témavezetők: Dr. Batta Gyula, Prof. Dr. Nagy Péter Viktor**



**DEBRECENI EGYETEM**  
**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**  
**Debrecen, 2026**

## TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	6
<b>1. Bevezetés</b> .....	<b>9</b>
1.1 Sejtpenetráló peptidek.....	9
1.2 Ligandumok.....	11
<b>2. Irodalmi áttekintés</b> .....	<b>12</b>
2.1 Membránok.....	12
2.1.1 A biológiai membránok felépítése [37].....	14
2.1.2 A plazmamembrán funkciói.....	19
2.1.2.1 Nem facilitált transzmembrán transzport.....	20
2.1.2.2 Fehérjék segítségével lejátszódó membrántranszport.....	21
2.1.2.2.1 Facilitált diffúzió.....	22
2.1.2.2.1.1 Hordozófehérjék általi transzport.....	22
2.1.2.2.1.2 Ioncsatornák.....	22
2.1.2.2.2 Aktív transzport.....	24
2.1.2.2.2.1 Elsődlegesen aktív transzport.....	25
2.1.2.2.2.2 Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATP-áz.....	25
2.1.2.2.2.3 Másodlagosan aktív transzport.....	25
2.1.2.3 Egyéb módok a membránon keresztüli áthaladásra.....	25
2.1.2.3.1 Pinocitózis, fagocitózis, membránbimbózás (blebbing).....	27
2.1.2.3.2 Exocitózis.....	28
2.2 Sejtpenetráló peptidek.....	30
2.2.1 Felfedezésük: a penetratin.....	31
2.2.2 Klasszifikáció.....	32
2.2.2.1 Kationos peptidek.....	33
2.2.2.2 Amfipatikus peptidek.....	33
2.2.2.3 Hidrofób peptidek.....	34
2.2.3 Sejtbejutási mechanizmusok.....	34
2.2.3.1 Direkt penetráció.....	35
2.2.3.2 Endocitózis.....	36
2.2.4 Bejutást befolyásoló tényezők.....	38
2.2.4.1 Dipóluspotenciál.....	38

<b>2.3</b>	<b>Plazmamembrán által indukált helyi ligandum kötődés</b> .....	<b>40</b>
2.3.1	Ligandumok.....	40
2.3.2	Szerkezetük meghatározása.....	40
2.3.3	Receptorok.....	41
2.3.3.1	Sejtfelszíni receptorok.....	41
2.3.3.2	Tirozin-kináz receptorok.....	43
2.3.3.2.1	Epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és az ErbB2.....	44
2.3.4	Ligandum kötődés.....	47
2.3.4.1	Ligandum indukált EGF-receptor dimerizációja és aktiválása.....	48
2.3.5	Koncentráció gradiens kialakulása.....	51
<b>2.4</b>	<b>Biofizikai módszerek a membránvizsgálatokban</b> .....	<b>51</b>
2.4.1	Fluoreszcens mikroszkópia: konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia (CLSM).....	51
2.4.2	Förster féle rezonancia energiatranszfer (FRET).....	54
2.4.3	Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS).....	57
2.4.4	Idő-korrelált egyfoton-számlálás (TCSPC).....	61
2.4.5	Áramlási citometria.....	63
2.4.6	Fluoreszcens jelölések.....	64
2.4.6.1	Penetratinok fluoreszcens jelölése az intracelluláris lokalizáció meghatározására.....	64
2.4.6.2	Antitestek jelölése fluorofórokkal.....	64
<b>3.</b>	<b>Problémafelvetés</b>	<b>67</b>
<b>4.</b>	<b>Célkitűzés</b>	<b>68</b>
<b>5.</b>	<b>Anyagok és módszerek</b>	<b>69</b>
5.1	A sejtpenetráló peptidek sejtbe történő bejutásának vizsgálata.....	69
5.1.1	Sejtvonalak.....	69
5.1.2	Sejtpenetráló peptidek.....	69
5.1.3	Penetratin bejutási hatékonyságára irányuló vizsgálatok.....	70
5.1.4	Dipóluspotenciál szintjének megváltoztatására irányuló kísérletek.....	70
5.1.5	Az atorvasztatin hatása a dipóluspotenciálra.....	71
5.1.6	Sejtek endocitózis gátlása.....	72
5.1.7	Fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidek lizoszómális degradációjának vizsgálata a sejtbe történő bejutást követően.....	73
5.1.8	Módosított $\beta$ -penetratin sejtbe történő bejutásának feltérképezése.....	74

5.1.8.1	Sejtpenetráló peptidek felvételének vizsgálata Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal.....	74
5.1.8.2	Penetratin felvételének vizsgálata FACS Aria áramlási citométerrel ..	74
5.1.8.3	A „ $\beta$ ”-penetratin „önkioltó” tulajdonságának vizsgálata .....	75
5.1.8.4	A penetratin celluláris felvétele koncentrációfüggésének vizsgálata ....	75
5.1.8.5	A penetratin aggregációs képességének meghatározása FRET méréssel .....	76
5.2	Plazmamembrán által indukált helyi ligandum-koncentrációs gradiensek kialakulásának vizsgálata.....	78
5.2.1	Sejtvonalak .....	78
5.2.2	Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia .....	79
5.2.3	A sejtmembrán körforgásának gátlása .....	79
5.2.4	Extracelluláris mátrix emésztése .....	80
5.2.5	Ioncsatornák blokkolása .....	80
5.2.6	A TAMRA-EGF koncentrációs gradiensének vizsgálata a GPMV-k környezetében .....	80
5.2.7	A viszkozitás mérése BODIPY-alapú molekuláris rotorral.....	81
5.3	Alkalmazott statisztikai analízisek .....	81
6.	Eredmények .....	83
6.1	A sejtpenetráló peptidekkel való vizsgálatok eredményei.....	83
6.1.1	A szintetizált penetratin tömegspektroszkópiás és HPLC-s analízise.....	83
6.1.2	Penetratin bejutási hatékonyságát befolyásoló tényező, a dipóluspotenciál vizsgálata floretin és 6-ketokolesztanol alkalmazásával .....	84
6.1.3	A sztatinok fokozzák a penetratin endo-lizoszómális felszabadulását a dipóluspotenciál csökkenése révén.....	85
6.1.4	A penetratin endocitózis révén megvalósuló sejtbe történő bejutása .....	88
6.1.5	A penetratin lizoszómális degradációja a megváltoztatott dipóluspotenciál esetében.....	89
6.1.6	Az $\alpha$ penetratin és a $\beta$ -penetratin felvételének vizsgálata Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal.....	91
6.1.7	Az $\alpha$ és a $\beta$ -penetratin felvételének vizsgálata FACS Aria áramlási citométerrel .....	93
6.1.8	A „ $\beta$ ”-penetratin „önkioltó” tulajdonságának vizsgálata .....	94
6.1.9	A penetratin celluláris felvételének koncentrációfüggésének vizsgálata .....	96

6.1.10 A penetratin aggregációs képességének meghatározása FRET méréssel.....	97
<b>6.2 Plazmamembrán által indukált helyi ligandum-koncentrációs gradiensek kialakulásának vizsgálata.....</b>	<b>98</b>
6.2.1 Fluoreszcens EGF koncentrációjának és diffúziós állandójának meghatározása a sejtmembrán közelében fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával .....	99
6.2.2 A sejtmembrán körforgásának gátlása .....	100
6.2.3 Ioncsatornák blokkolása .....	101
6.2.4 A TAMRA-EGF koncentrációs gradiensek vizsgálata a GPMV-k környezetében .....	103
6.2.5 Extracelluláris mátrix emésztése .....	104
6.2.6 A viszkozitás mérése BODIPY-alapú molekuláris rotorral.....	105
7. Diszkusszió.....	107
8. Összefoglalás.....	115
9. Summary.....	116
10. Köszönetnyilvánítás.....	117
11. Irodalomjegyzék.....	118
12. Tárgyszavak.....	131
13. Keywords.....	132
14. Kiegészítő ábrák.....	133
15. Melléklet.....	136
16. Függelék.....	137

## Rövidítések jegyzéke

APPL1	adaptor fehérje amely tartalmaz PH domént, PTB domént és leucin cipzár motívum 1-t
ARF	alternatív leolvasási keret
cAMP	ciklikus adenosin-monofoszfát
CFP	cián fluoreszcens fehérje
CLSM	konfokális lézerpásztázó mikroszkópia
CREB	cAMP response element-binding protein
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
ECM	extracelluláris matrix
EDTA	etilén-diamin-teraacetát
EEA1	korai endoszóma antigén 1
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ER	endoplazmatikus retikulum
ErbB2	Eritroblasztikus leukémia vírus onkogén homológ 2
ESCRT	endoszomális válogató komplexek
ETC	elektrontranszport-lánc
FCS	fluorescence correlation spectroscopy
FITC	fluorescein-5-isothiocyanate
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor
GPMV	Óriás plazmamembrán vezikulum
GPI	Glikozil-foszfatidil-inozitol
GTN	transz-Golgi hálózat
HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
Ig	immunoglobulin
ILV	intraluminális vezikula
l <sub>d</sub>	rendezetlen folyadékállapot
LUV	nagy unilamelláris vezikulák

MAP	modell amfipatikus peptid
Mfn2–GRP75– IP3R	Mitofuzin 2-Glükóz-Szabályzott Protein 75- Inozitol-1,4,5-trifoszfát receptor: egy fehérjekomplex, amely az endoplazmatikus retikulum (ER) és a mitokondrium közötti kapcsolatot tartja fenn
MVB	multivezikuláris testek
PA	Pluronic-sav
PBS	foszfát puffer oldat
PC	foszfatidilkolin
P-CREB	a CREB foszforilált formája
PE	foszfatidiletanolamin
PFA	paraformaldehid
PKA	protein-kináz-A
PS	foszfatidil-szerin
RME	receptor mediált endocitózis
SM	szfingomielin
SNARE	soluble NSF-attachment protein receptors
SPP	sejtpenetráló peptid
TAT	transzaktivátor transit
TBS-T	Tris-pufferelt sóoldat
TCSPC	time-correlated single-photon-counting
TFE	trifluoroethanol
T <sub>m</sub>	fázisátmeneti hőmérséklet
TNBC	tripla-negatív emlőrák
TNF	tumor nekrozis factor

## **1. Bevezetés**

Az orvostudomány, korunk egyik legmeghatározóbb kutatási területe fejlődésében a sejtek szerkezeti és molekuláris szintű működését tanulmányozó sejtbiológia, alapvető szerepet játszik. A sejt a biológiai rendszerek legkisebb funkcionális egysége, amely képes önálló életfolyamatok végzésére, ezáltal azok alapvető struktúráját határozza meg. A sejtek egyik legfontosabb alkotója a sejtet körülvevő plazmamembrán. A membrán alapvető szerkezeti eleme a foszfolipid kettősréteg, amelynek külső felében preferenciálisan kolin-foszfolipidek, citoplazmatikus felében pedig amino-foszfolipidek találhatók [1]. Struktúrájának köszönhetően egy gátat képez a sejt és környezete között, ugyanakkor szabályozott, szelektív permeabilitása révén össze is kapcsolja a sejtet a környezetével. A plazmamembrán felépítése és működése szempontjából szükséges megemlíteni a sejt felszíni fehérjéket, amelyek jelentős szerepet játszanak a transzport- és jelátviteli folyamatokban, valamint a membránszerkezet kialakulásában is. Kutatási témám középpontjában a sejtmembrán olyan nem konvencionális szerepe áll, amellyel a membrán aktívan hozzájárul sejt felszíni receptorokhoz kötődő ligandumok koncentrációgradiensének kialakításához, ill. a membránon átjutni képes sejtpenetráló peptidek transzlokációjának lehetővé tételéhez. A plazmamembrán indukálta lokális ligandumkoncentráció kialakulása során a ligandumok a membránhoz kötődnek, és kialakuló koncentrációgradiens befolyásolja a receptorok működését. A sejtpenetráló peptidek különböző hozzájuk kapcsolt szállítványok membránon való átjuttatását célozzák meg, amelyet szintén meghatároz a membrán rendezettségéből eredő biofizikai tulajdonságai és aktív működése (pl. endocitotikus folyamatok). Méréseimhez az elmúlt néhány évtizedben elterjedt fluoreszcens technikákat alkalmaztam, melyek számos biológiai folyamat kvantitatív nyomon követésére adnak lehetőséget. Kutatásom során fluoreszcensen jelzett sejtpenetráló peptidekkel végeztem kísérleteket, vizsgálva azok bejutási hatékonyságát, felszabadulását az endoszómákból az intracelluláris térbe. A ligandumkoncentráció-gradiens kialakulásának analízise esetén olyan fluoreszcens molekulákat alkalmaztam, amelyek az általam vizsgált receptorokhoz kötődnek.

### **1.1 Sejtpenetráló peptidek**

Manapság a biotechnológia és az orvostudomány egyik legfontosabb gyakorlati célja a daganatok és más, nehezen gyógyítható betegségek új kezelési lehetőségeinek kidolgozása. A legtöbb hagyományos kemoterápiás gyógyszer, például a ciklofoszfamid és paclitaxel nem

ütközik akadályokba a sejtmembránon keresztüli átjutást illetően, azonban számos újszerű, intracelluláris vagy intraorganelláris célpontokat célzó terápiás molekula számára a kettős foszfolipid réteg szinte áthatolhatatlan. A lipidmembrán, a belső hidrofób rétegének köszönhetően, szelektív gátként szolgál az extracelluláris tér és a citoplazma között minden nagyobb méretű és poláros molekula számára. Emellett a daganatterápiában jelentős problémát jelent sejtspecifitás hiánya, ami a kezelések hatástalanságához vezet. A legtöbb makromolekula-alapú gyógyszer (pl. peptidek, fehérjék, nukleinsavak), amelynek molekulatömege meghaladja az 500 Da-t, nem képes spontán módon átjutni a membránon, hacsak egy aktív vagy facilitált transzportmechanizmus nem könnyíti meg a bejutásukat. Ezáltal a sejtmembránokon áthatolni képes apró molekulák azonosításának eredményeképpen új gyógyszerbeviteli módszerek jöttek létre, amelyeknek jelentős szerepe lehet az orvostudományban. Ezt az áttörést a sejtpenetráló peptidek (SPP-k) figyelemre méltó felfedezése hozta meg. Egy 13 aminosavból álló szekvenciát (TAT<sub>48-60</sub>) fedezték fel, amely a humán immunhiányt előidéző vírus (HIV-1) transzkripció transzaktivátor (TAT) fehérjéjének, membránon való átjutási képességet kölcsönöz [2]. Valamint a *Drosophila Antennapedia* Homeotic transzkripció faktorából származó sejtpenetráló peptid, a penetratin felfedezése alapozta meg ezen kutatási terület fellendülését [3]. A sejtpenetráló peptidek olyan oligopeptidek, amelyek körülbelül 8-30 aminosavból épülnek fel és képesek endocitózissal, de akár közvetlenül a sejtmembránon keresztül bejutni a sejtekbe [4]. Az első SPP-k természetes eredetűek voltak, ugyanis több fehérje sejtbe jutási képessége alapján jutottak a felfedezésükre [5]. A legkorábban felfedezett SPP-k eredendően amfipatikus, hidrofób és kationos molekulák voltak. A sejtpenetráló peptidek jellemzően ezen tulajdonság legtöbbszörrel rendelkeznek. A sejtpenetráló peptideken alapuló terápiás kezelések kifejlesztését, hosszabb távon azok hatékonyságát kémiai módosításokkal lehet javítani azáltal, hogy a következő generációs SPP-k sejtpenetrációs képességét, stabilitását és szelektivitását növeljük. Ezek a tulajdonságok teszik a SPP-ket vonzó gyógyszerhordozó rendszerré, amely képes a tehermolekulák széles skáláját az intracelluláris környezetbe juttatni mind kutatási, mind terápiás célokra alacsony citotoxicitással. Bár jelenleg alacsony biológiai hozzáférhetőségük, rövid felezési idejük és specifikusságuk hiánya miatt korlátozott klinikai potenciállal rendelkeznek, nagy ígéretet mutatnak a különböző molekulák, például fehérjék, DNS, antitestek, kontrasztanyagok hordozójaként [6]. Egy tipikus nem-fagocita sejtben az SPP-k által használt fő sejtfelvételi mechanizmusok az endocitózis különböző formái. A SPP-k ezen utakon keresztül történő intracelluláris bejutásának és az általuk szállított molekulák felszabadulásának nyomon követésében a fluoreszcencia kiváló eszköznek bizonyult. Egy fluorofór molekula SPP-hez

való kapcsolásával a felvétel és a citoszolikus lokalizáció olyan módszerekkel vizsgálható, mint a fluoreszcens mikroszkópia, az áramlási citometria vagy a spektrofluorometria. Ebben az értekezésben a SPP-kkel kapcsolatos különböző erőfeszítéseinket fogom feltárni, amelyek célja, hogy azonosítsák és leküzdjék az SPP-k felvétele és potenciális klinikai alkalmazása során felmerülő akadályokat. Konkrétan a penetratin nevezetű sejtpenetráló peptiden végzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok eredményeit szeretném bemutatni.

## 1.2 Ligandumok

A plazmamembrán nem csak egy ellenőrzött, félig átteresztő gátat képez a sejt belseje és a külvilág között, hanem otthont ad a membránfehérjéknek is, amelyek az emberi proteom 25%-át és a jelenlegi gyógyszercélpontok 60%-át teszik ki [7]. Bár a transzmembrán jelátvitelt a ligandumok membránreceptorokhoz való kötődése indítja el, a hagyományos kutatások a membrán intracelluláris oldalán zajló eseményekre, például a foszforilációra összpontosulnak. Bár a kvantitatív biofizikai módszerek kezdik feltárni a ligandumok által indukált és a konstitutív receptor oligomerizáció komplexitását, amelyet fehérje-fehérje kölcsönhatások, membrándomének és a citoskeleton szabályoznak [8], azonban maga a ligandumkötés is figyelemre méltó összetettséget mutat, mivel a receptorok affinitása függ a ligandum típusától [9], valamint a receptor dimer ligandumhoz kötött állapotától, ami a ligandumkötés kooperativitásához vezet [10]. A növekedési faktorok kötődését a plazmamembrán tekervényes és dinamikus jellege is befolyásolhatja [11]. Ezt a jelenséget eddig nagyrészt elhanyagolták, mivel még a kvantitatív vizsgálatok is azon az egyszerűsítő feltételezésen alapulnak, hogy a ligandum, gradiens nélküli óceánja homogén koncentrációt eredményez az extracelluláris térben. A ligandumkötődést befolyásoló membránjelenségek miatt számtalan váratlan jelenséget írtak már le, például a receptor affinitásának látszólagos növekedését a klasztereződés és a disszociált ligandumok újrakötődését elősegítő akadályozott diffúzió révén [12, 13]. Továbbá, a G-fehérje-kapcsolt receptorok előre összeállt klaszterei ultraalacsony, femtomoláris ligandum-koncentrációkra reagáltak, ami több nagyságrenddel alacsonyabb, mint az egyszerű tömeg-hatás elvek által megjósolt küszöbérték [14]. Bizonyos esetekben már azt az alapvető feltételezést is megcáfolták, hogy az extracelluláris térben a ligandum koncentrációja homogén, hiszen egy membránban oldódó adrenoreceptor blokkolóról megállapították, hogy a plazmamembránban és a plazmamembrán közvetlen közelében jelentősen nagyobb koncentrációban van jelen, mint a szabad oldatban [15]. Munkám második

részében azt vizsgáltam, hogy a membrán aktív körforgása és az extracelluláris mátrix hogyan és miért vezet szükségszerűen a ligandumok inhomogén eloszlásához az extracelluláris térben.

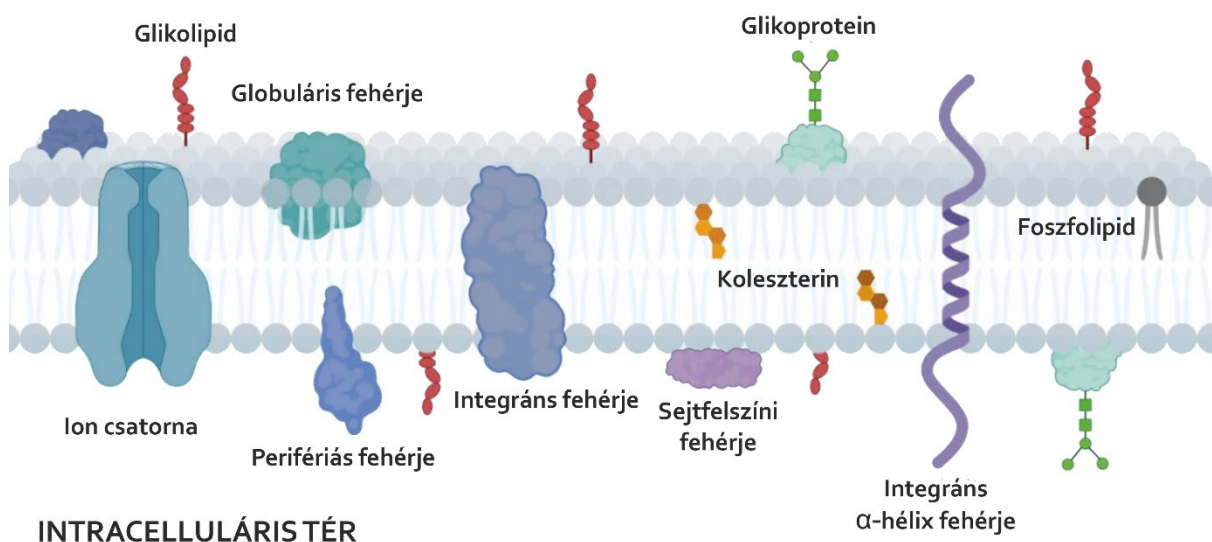
## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1 Membránok**

A biológiai membránok kutatása nem könnyű, egyrészt molekuláris profiljuk és struktúrájuk miatt, másrészt pedig azért, mert működésük széles időbeli skálán zajlik [16]. A sejthártyák funkcionális sokféleségét tükrözi a különböző formák kialakulása, amelyek a nanométeres méretű lipid-fehérje domének helyi szerveződéseitől kezdve a mikrométeres méretű, sík, íves és csőszerű struktúrával rendelkező organellekig terjednek [17]. A sejthártyák alapvető struktúrája egy kettős réteg, amely két rétegből álló amfipatikus lipid molekulákból épül fel, amelyekbe olyan kulcsfontosságú funkciókat ellátó fehérjék, mint az enzimek, receptorok és transzporterek, részben vagy teljesen beágyazódnak (*1.ábra*) [18]. Jelentős anyagcsere-folyamatok zajlanak a membránokon keresztül, például számos enzimrendszer lényegében membránhoz kötött, ezért azok gyakran nem képesek ellátni funkcióikat ezeken a membránokon kívül. A sejthártyák legalapvetőbb összetevői foszfolipidek, amelyek hidrofíl feji részükkel a membrán hidrofíl külső felületét, míg hidrofób farki részükkel a membrán belső terét alakítják ki. Hasonlóan a kétdimenziós rétegeken áthatoló fehérjemolekulákhoz (transzmembrán fehérjék), ezek képezik a biológiai membránok folyékony mozaik szerkezetének alapját, és meghatározzák azok funkcióját. A membránlipidek sokfélesége valamint azok eltérő tartalma szorosan összefügg a membránok szerepének sokoldalúságával [19]. A lipideken kívül a biomembránok (különösen a plazmalemma) fehérjékből, szabad szterolokból és más, nem lipid jellegű elemekből állnak, ezek együtt határozzák meg a membránok biológiai aktivitásainak specifikusságát és széles skáláját. A komponensek közé tartoznak a szénhidrátok is, amelyek azonban nem különálló vegyületek formájában jelennek meg, hanem a glikolipidek vagy fehérjemolekulák részeként találhatóak meg [20, 21]. A biomembránok klasszikus modellje 50 éven keresztül a Singer és Nicolson által kidolgozott „folyékony mozaik modell volt”. Ez azt sugallja, hogy az eukarióta membránok lipid kettős rétege egy rendezetlen, folyékony állapot, amelyet a lipid- és fehérjemolekulák rendezetlen és kaotikus elrendeződése jellemez [22]. A modellt az elkövetkező évtizedekben folyamatosan továbbfejlesztették. Sok áttekintés követi a kulcsfontosságú előrelépések időrendjét ezen a területen [23-26]. Jelentős fejlődésnek indult az eukarióta sejthártyák tanulmányozása, különösen a plazmamembrán vonatkozásában [27, 28]. A Singer és Nicolson modell,

vitathatatlan hasznossága mellett, gyakran akadályt jelentett a további kutatások számára egyrészt azért, mert ezt a modellt próbálták, részben helytelenül, minden más membrán, számos különböző organizmus és organelum membránszerkezetének leírására felhasználni [22, 29]. Másrészt a Singer-Nicolson modell „rendezetlen lipid tenger” koncepciója évtizedeken keresztül befolyásolta a membránokkal kapcsolatos gondolkodásunkat. 2014-ben Nicolson módosította az eredeti modellt, és így a biológiai membrán szerkezete, mint „dinamikus összetett modell” avagy „módosított folyékony mozaik modell” néven jelent meg [23]. A módosított modellben feltételezték, hogy a sejthártyák számos mikrodoménből álló mozaik komplexekből épülnek fel, amelyek különböző fehérje- és lipid klasztereket tartalmaznak. Ezek a vékony membránréteg hatalmas területén helyezkednek el [29-31]. A membránok tanulmányozása nemcsak azok doménjeinek, hanem a domének egyes fajtáinak, nevezetesen a lipiddomén felfedezéséhez is vezetett [20, 32, 33]. 1997-ben Simons és Ikonen [34] a „lipiddomén” fogalmát javasolták a membrán oldalirányban értelmezett rendezetlenségének magyarázatára; a lipiddomén egy kis (10–200 nm), heterogén, rendkívül dinamikus területként írták le, amely gazdag szterolokban, gliko- és foszfo-sztingolipidekben, valamint foszfolipidekben, telített zsírsavakban [35]. A lipiddoménhez tartozó mikrodomén alatt a sejthártya lipid kettős rétegének azon területeit értjük, ahol a lipidmolekulák sűrűsége nagyobb egyes fehérjék körül [36]. A citoszkeleton és a glikokalix funkcióit később az összetettebb membránmodellekben vázolták fel [26]. Összességében elmondható, hogy a membránok mind a felépítésüket, mind a funkcióikat tekintve rendkívül specifikusak és összetettek. Nem véletlenül foglalkoztatja a tudósokat ez a kutatási terület, amely kiugró fejlődésnek indult az utóbbi évtizedekben.

## EXTRACELLULÁRIS TÉR



### **1. ábra: A plazmamembrán felépítése: kettős foszfolipid réteg és annak struktúrája [37]**

A foszfolipidek kétrétegű szerkezetben rendeződnek, úgy, hogy a hidrofób farkak a belső rész felé, míg a hidrofil fejek a külső rész felé néznek a vizes környezetben. A kettős rétegben elhelyezkednek foszfolipidek, amelyek közé beékelődik a koleszterin; ezek szabályozzák a membrán permeabilitását. A lipidek között számos fehérje található: integráns membránfehérjék a lipidréteget szelik át, amelyek transzportot, jelátvitelt és receptorfunkciókat látnak el. A perifériás membránfehérjék lazábban kapcsolódnak a membránhoz, többnyire a sejtvázhoz kötődnek és jelátviteli folyamatokban játszanak szerepet. A membrán külső felszínét szénhidrátok is tarkítják, amelyek glikoproteinekhez vagy glikolipidekhez kapcsolódva vesznek részt a sejt–sejt felismerésben, az immunválaszban és az adhéziós folyamatokban.

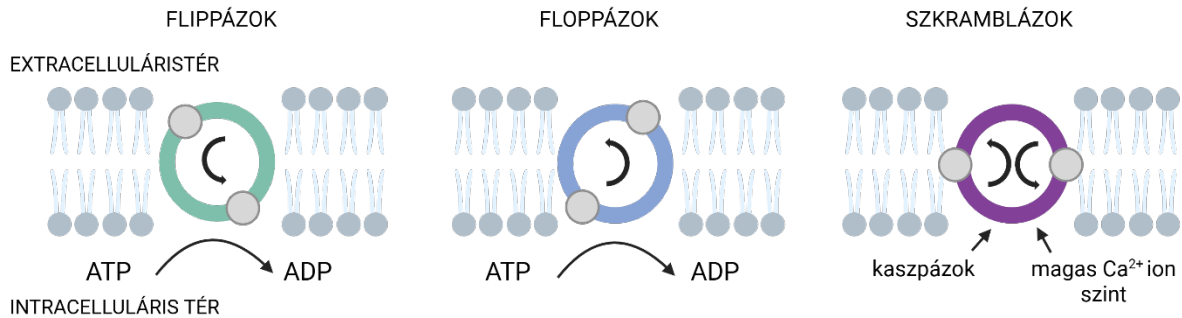
#### **2.1.1 A biológiai membránok felépítése**

Mivel munkám során elsősorban a plazmamembránnal foglalkoztam, az irodalmi áttekintésben a sejtmembrán szerkezetének bemutatását helyezem a középpontba. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a plazmamembrán struktúrája nem szolgál az összes többi membrán szerkezetének standardjaként, például a kloroplasztiszok és a mitokondriumok membránjainak lipidösszetétele, nagy mértékben eltér a plazmamembrán lipidösszetételétől. Az organellek megkülönböztethetőek a membránjaik lipid tartalma alapján: a membrán két rétegének lipid profilja számos organelumban jelentősen eltér, ami aszimmetriát eredményez az egész kettős rétegben. Ezt az állapotot ATP-vezérelt flippázok tartják fenn [38]. A plazmamembrán egy összetett rendszer, amely két rétegből álló lipidekből és fehérjékből épül fel, amelyek aegységei a nanodomének. Bár mindkét réteg aszimmetrikus, az azok közötti kötés rendkívül erős. Ezt olyan kísérletekkel támasztották alá, amelyeket egy lipid-kettős réteggel rendelkező óriás foszfolipid unilamelláris vezikulákkal („giant unilamellar vesicle”) végeztek: arra az eredményre jutottak, hogy a külső rétegben kialakult nanodomének tökéletesen megegyeznek a belső rétegben lévőkkel [39]. A plazmamembrán lipid felépítése jelentősen eltér a különböző organizmusok és sejtípusok esetében: a sejtciklus állapota, valamint a környezeti tényezők is befolyásolják az összetételt. Először vázlatosan áttekintem a membránban található főbb alkotóelemeket, majd ezek szerveződési szintjeit foglalom össze.

A főbb lipidek, amelyek plazmamembránban találhatóak, három osztályba sorolhatók: glicerolipidek, szfingolipidek és szterolok. A glicerolipidek vázát a glicerol alkotja, a szfingolipideké pedig a szfingosin. A szfingoid váz egy hidrofób farkkal is rendelkezik. A szterolok négy gyűrűből állnak, amelyek specifikus molekuláris elrendezést alkotnak, egyik végükön hidroxilcsoporttal, a másik végükön pedig egy rövid szénhidrogén-oldallánccal. A glicerollipidek energia tárolására szolgáló lipidek, például a triacilglicerol (TAG), ahol a glicerolváz mindhárom hidroxilcsoportjához zsírsavak kapcsolódnak. A foszfátot tartalmazó lipidek a foszfolipidek, és ezek képezik a membrán fő lipidjeit a koleszterinnel együtt. Továbbá

a lipidmembrán olyan fehérjéket is hordoz, amelyek alapvető funkciókat látnak el a sejt élettani folyamataiban. Elhelyezkedésük alapján két nagy csoportra oszthatók: integráns membránfehérjék és perifériás membránfehérjék. Az integráns membránfehérjék a foszfolipid kettősrétegbe ágyazódnak, és egy vagy több membránon áthaladó domént (transzmembrán fehérjét) tartalmaznak [40]. A perifériás membránfehérjék (PMP-k) változatos csoportot alkotnak, amelyek közé tartoznak azok a fehérjék, amelyek közvetlenül kapcsolódnak a lipidmembránhoz, és a membrán egyik oldalán helyezkednek el (valódi perifériás membránfehérje), valamint azok, amelyek közvetetten, integráns membránfehérjékkel való kölcsönhatások révén kötődnek (membrán-asszociált fehérjék). A transzmembrán fehérjecsald olyan membránt átszelő fehérjék csoportja, amelyek a plazmamembránban vagy a sejten belüli organellek membránjaiban helyezkednek el. Ide tartoznak például a mitokondriumok, a lizoszómák, az endoszómák, az endoplazmatikus retikulum és a Golgi-membránok fehérjei is [41]. Bizonyos lipidek a membránokban koncentráltan helyezkednek el. Még egy adott membrán kettősrétegében is több szintű szerveződés figyelhető meg: a lipidek aszimmetrikusan oszlanak meg a két réteg között, nem homogén az eloszlásuk, hanem lipid tutajok vagy nanodomének formájába rendeződnek [42]. Ez az aszimmetrikus szerkezet – több anionos lipiddel a citoszolikus oldalon, és többnyire semleges lipidekkel az extracelluláris oldalon – két, elektrosztatikusan nagyon különböző felületet hoz létre. Ez erősen befolyásolja fehérjék membránhoz való kapcsolódását és az integráns membránfehérjék aktivitását [43]. Három fehérjecsoportot írtak le, amelyek a membrán aszimmetria kialakításában fontos szerepet töltenek be: flippázok, floppázok és szkramblázok [44]. A flippázok – amelyek az aszimmetria létrehozásában vesznek részt – a IV-es típusú P-típusú ATPázok (P4-ATPázok), amelyek katalizálják bizonyos foszfolipidek áthelyezését az extracelluláris rétegből a citoszolikusba. A floppázok ABC-transzporterek, amelyek a fordított irányú mozgást végzik. Ezzel szemben a szkramblázok ATP-függetlenek, és a lipideket kétirányúan transzlokálják, kiegyenlítve ezzel a rétegek közötti eloszlást (2.ábra) [45].

A plazmamembránt számos molekula alkotja, azok szerveződése és mechanizmusai rendkívül sokoldalúak. Háromféle membrán-inhomogenitást, vagy membrándomént szeretnék tárgyalni hierarchikus rend alapján.



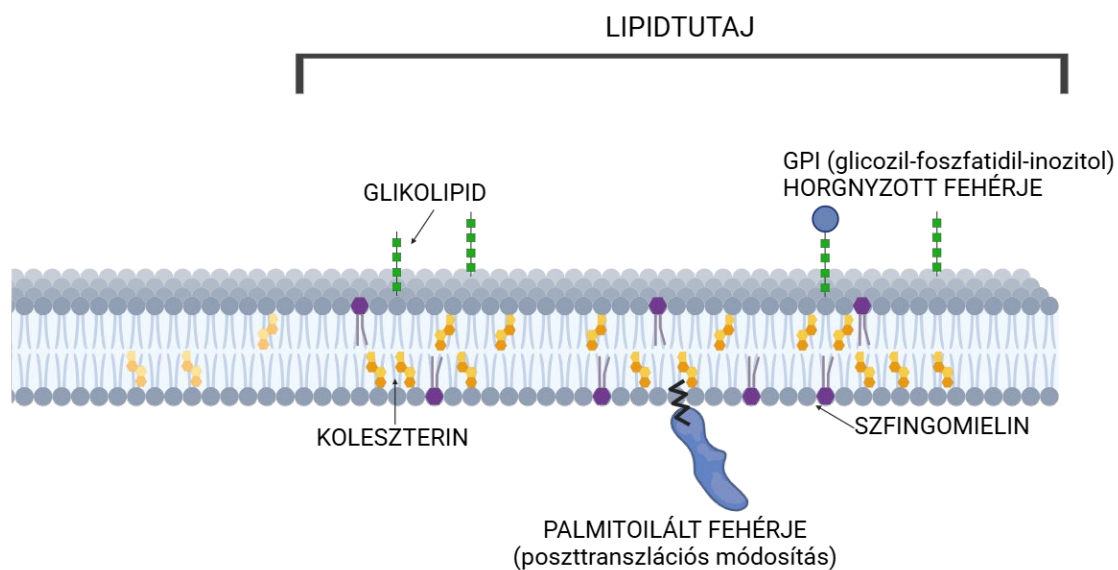
**2. ábra: A plazmamembrán aszimmetriáját kialakító struktúrák: flippázok, floppázok, szkrambulázok**

A flippázok a foszfolipideket a külső membránrétegből a belső, citoplazmatikus oldal felé szállítják. A floppázok ezzel szemben a lipideket a belső rétegből a külső felé mozgatják, fontos szerepet játszva a lipid exportban. A szkrambulázok kétirányú lipidmozgatást végeznek, és általában Ca<sup>2+</sup>-jelzés hatására aktiválódnak. A kaspázok és a szkrambulázok az apoptózis (programozott sejthalál) folyamatában kapcsolódnak össze: kaspázok egyik fontos célpontja a szkrambulázok szabályozó fehérjéi, amelyeket képesek hasítani.

- A legkisebb doménhez a dimer/oligomer és nagyobb komplexek tartoznak [31]. Ezek lehetnek homodimerek (azonos alegységekből) vagy heterodimerek (különböző alegységekből), és gyakran dinamikusan, jel hatására állnak össze vagy esnek szét. Az összetartó kölcsönhatások egyik fő típusa a transzmembrán hélixek közti hidrofób illeszkedés és „packing”, ahol a helikális felszínek egymáshoz komplementer módon simulnak. Gyakoriak a specifikus motívumok is, például a GxxxG-szerű hélix-hélix kapcsolódási mintázatok, amelyek megkönnyítik a szoros érintkezést [46]. Emellett elektrosztatikus kölcsönhatások és hidrogénkötések is stabilizálhatják a kapcsolódást. A membránlipidek sem passzív háttérszereplők: bizonyos lipidek (például koleszterin vagy specifikus foszfolipidek) „ragasztóként” vagy szervező elemként segíthetik az oligomerizációt [47]. Sok receptor esetében a dimerizáció közvetlenül a jelátvitel kapcsolója, mert az alegységek egymáshoz rendelése aktiváló konformációs változást indít. Klasszikus példa erre számos receptor-tirozin-kináz, ahol a dimerizáció előfeltétele a hatékony foszforilációnak és a downstream útvonalak bekapcsolásának.
- Erről részletesebben a 2.3.4.1. alfejezetben írok majd. Az oligomerizáció emellett növelheti a fehérjék stabilitását a membránban, befolyásolhatja a laterális diffúziót, és segítheti a jelátviteli komplexek térbeli szerveződését. Összességében a

membránfehérje dimerek és oligomerek a sejt-kommunikáció, az anyagcsere-áramlás és az adaptív válaszok kulcsfontosságú, finoman szabályozható molekuláris egységei, melyek létrehozásában a közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások játszzák.

- A hierarchiában a második a „tutajdomén”, amelyet lipidek és fehérjék közötti különböző szintű molekuláris affinitások és összeférhetetlenségek, valamint a plazmamembránon belüli kooperatív kondenzációk hoznak létre [31]. A lipidek heterogén eloszlásához járul hozzá a lipid-tutajok (3. ábra) jelenléte a membránban, melynek konszenzusos definícióját a *Journal of Lipid Research* közölte: „A membrán-tutajok kicsi (10–200 nm), heterogén, erősen dinamikus, szterol- és szfingolipid-gazdag domének, amelyek a sejt-folyamatok kompartmentalizálását végzik. A kis tutajok időnként stabilizálódhatnak, és nagyobb platformokká alakulhatnak a fehérje-fehérje és fehérje-lipid kölcsönhatások révén.” [48].



### 3. ábra: A lipidtutajok (lipid rafts)

A plazmamembrán mikrodomainjei, amelyek koleszterinben és szfingolipidekben, például szfingomielinben gazdag, kissé merevebb szerkezetű területek. Funkciójukat tekintve szerepük van a jelátvitelben, endo- és exocitózisban, fehérjék és lipidek szerveződésében. A palmitoilált fehérjék lipidmódosításai elősegítik a fehérje membránhoz rögzülését és a lipidtutajokba való társulását. A GPI-hez horgonyzott fehérjéknek a jelátvitelben van szerepe.

Ezek nem-egyensúlyi struktúrák, különböző összetételűek: koleszterinben és szfingolipidekben gazdagok, kapcsolódhatnak hozzájuk palmitoilált fehérjék (pl.: ankyrin-G) és GPI-hez horgonyzott fehérjék. Eltérő méretben, valamint tér- és idődinamikájú formában létezhetnek egyszerre. Élettartamuk a mikroszekundumoktól

és milliszekundumoktól, akár másodpercekig is terjedhet. Ez a sokoldalúság megerősíti, hogy a lipid tutajok jelentős átrendeződésen mehetnek keresztül különféle biológiai ingerek hatására [49].

- A legmagasabb szerveződési szint már fénymikroszkóppal is detektálható méretű doméneket foglal magába, amelyeket az aktin-alapú membránváz (citoszkeleton) és azzal való kölcsönhatások, valamint a membránvázhoz horgonyzott transzmembrán (TM) fehérjék alkotnak. Az aktin citoszkeleton és a membránhoz kötődő fehérjék szerepe kulcsfontosságú a nanodomének stabilizálásában és méretének szabályozásában. Az aktin hálózat segíti a nanodomének szerveződését, meggátolja túlzott diffúziójukat, és támogatja azok strukturális kohézióját. Az aktin filamentumok hálózata „rácsként” tagolja a membránt, és rekeszekre (kompartmentekre) osztja. Egyes transzmembrán fehérjék rögzítve vannak az aktinhoz, ezáltal fizikai és hidrodinamikai akadályt képeznek, így lassítják a környező lipidmolekulák diffúzióját, és hozzájárulnak a membrán nanodomén-szerveződéséhez [32]. A plazmamembránban található transzmembrán fehérjék citoplazmatikus doménjei ütköznek a citoszkeletonnal. Ez az ütközés ideiglenes befogást okoz: a fehérjék rövid ideig kis „rekeszekben” mozognak, majd „ugrással” lépnek át a szomszédos rekeszbe. Ezt nevezik „hop” diffúciónak [50]. A membránváznak tehát van egy elkülönítő szerepe, amely meghatározza a membránfehérjék és lipidek diffúziós útvonalait. Ezenkívül a rögzített transzmembrán fehérjék is lokális diffúziós gátat hoznak létre ezzel stabilizálva a nanodoméneket [51]. Az aktin-alapú nanodomének lehetővé teszik, hogy receptorok (pl. EGF-, PDGF-, IL-6-receptorok) hosszabb ideig közel maradjanak egymáshoz a rekeszekben. Ez elősegíti a receptorok dimerizációját és autofoszforilációját, ami fokozza a kináz aktivitást, ezáltal hatékonyabb downstream jelátvitelt indítanak el (pl. Src kinázok, STAT faktorok aktiválódása) [52]. Egyszeres membrán-átjutású (single-pass) transzmembrán fehérjék esetében – mint például az epidermális növekedési faktor (EGF), a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF) és az interleukin-6 (IL-6) receptorai (egy másik TM fehérje, a gp130 részvételével) – dimerizáció hatására a két receptor intracelluláris doménje közel kerül egymáshoz. Ezek a domének eredetileg csak gyenge kináz aktivitással rendelkeznek, vagy konstitutívan egy kinázhoz kötődnek. Bár a kezdeti kináz aktivitás alacsony lehet, a tartós egymáshoz közeli pozíció lehetővé teszi, hogy a kinázdomének kölcsönösen foszforilálják egymást, ezáltal fokozva kináz aktivitásukat. Ez a folyamat a downstream

Src család kinázainak vagy transzkripciós faktoroknak az aktivációjához vezet. Emellett a foszforilált domének downstream jelátviteli molekulákat toboroznak, például a Grb2-SOS komplexet, amelyben az SOS (Son of sevenless) egy guaninnukleotid-cserélő faktor (GEF), amely főként a Ras kis GTPáz-t aktiválja, valamint a jelátvivő és transzkripciós aktivátor (STAT) fehérjét [53].

### **2.1.2 A plazmamembrán funkciói**

A sejtet határoló membrán egyrészt elválasztja a sejtet az extracelluláris tértől, másrészt össze is köti azzal. A lipid kettősréteg egy korlátozott diffúzióval rendelkező kétdimenziós és képlékeny szerkezet, így ideális rendszer a jelátviteli és anyagcsere-folyamatok komponenseinek koncentrálására, amely funkcióhoz a komponensek mobilitása elengedhetetlen. A sejtmembrán elhatároló funkciójához egyfajta merevség és stabilitás is szükséges, amit a membránok önmagukban nem képesek biztosítani. Sejtfal hiányában ezt emberi sejtek esetében a membrán alatti, ún. szubkortikális citoszkéletális hálózat biztosítja. A sejtmembrán elválasztó és összekötő funkciója részben összemosódik a membrán szelektív permeabilitásában, amihez mind a lipidek, mind a membránfehérjék hozzájárulnak. A membránfunkció integráns részét képezi az, hogy a sejtmembránok rendkívül dinamikus és alakítható struktúrák; lehetnek görbült, csőszerű vagy lapos formájúak, ami különböző biofizikai tulajdonságokat eredményeznek [54]. A szomszédos organellek membránjai egyedi háromdimenziós szerkezetben kapcsolódnak össze, ezzel funkcionálisan elkülönült mikrodoméneket létrehozva, amelyek lehetővé teszik az organellek közötti kommunikációt [55]. Ilyen kapcsolat például az endoplazmatikus retikulum (ER) és a mitokondriumok közötti kommunikáció: a mitokondriumhoz kapcsolódó membránok (MAM-ok), amelyek a két organellek közötti kontaktust hozzák létre, számos alapvető sejtfunkcióban vesznek részt, mint például a kalciumjel, az apoptózis, az autofágia és a lipidszintézis [56]. Az organellek közötti fizikai kapcsolatot szupramolekuláris fehérjekomplexek biztosítják, amelyek kitöltik a membránok közötti teret, és fehérje–fehérje vagy lipid–fehérje kölcsönhatások révén hoznak létre kötőerőket [55]. A Mitofuzin–GRP75–IP3R komplex az ER–mitokondrium kapcsolatban kiváló példa a fizikai kapcsolatokra. Ez az egyik legismertebb fehérjekomplex, amely stabilizálja az ER és a mitokondriumok közötti kontaktusát [57]. A következő alfejezetekben (2.1.2.1.-2.1.2.2.2.3.) a membránon keresztüli transzportfolyamatokat tekintem át röviden.

### 2.1.2.1 Nem facilitált transzmembrán transzport

A membrán határozza meg, hogy mely anyagok juthatnak be a sejtbe, illetve melyek távoznak onnan. A membránon keresztüli transzportfolyamatokat a membrán lipidjei, fehérjei és szénhidrátjai közötti összetett kölcsönhatások szabályozzák. Azokat a transzportfolyamatokat, melyek fehérje segítsége nélkül történnek, nem facilitált transzportnak nevezzük. A membránok permeábilisak a semleges, apoláris molekulák számára, amelyek így egyszerű diffúzióval képesek átjutni a membránon. Ha egy anyag extra- és intracelluláris koncentrációi különböznek egymástól, akkor nettó transzmembrán diffúzió lép fel. Az anyagáram-sűrűség Fick 1. törvényével írható le:

$$J_m = -D_m \frac{D_c}{D_x} = -D_m \frac{c_{m,2} - c_{m,1}}{d}$$

ahol  $c_{m,1}$  és  $c_{m,2}$  a diffundáló anyag koncentrációja a  $d$  vastagságú membránban a vízzel közös határfelületeknél,  $D_m$  a diffúziós együttható a lipid membránban.

Azonban, ha egy anyag két egymással érintkező, de nem elegyedő hidrofób (pl. lipid membrán) és vizes közegben (pl. az extracelluláris tér vagy a citoplazma) is fel van oldva, egyensúly áll fenn az anyag koncentrációi között a két különféle fázisban, és a koncentrációk aránya állandó lesz. Az állandó neve megoszlási hányados ( $K$ ), ami az adott anyagra és az oldószerekre jellemző.  $K$  értéke kifejezi az anyag relatív oldhatóságát a két közegben. Hidrofób anyagokra  $K > 1$ , a hidrofil anyagokra  $K < 1$ :

$$K = \frac{c_{m,1}}{c_{v,1}} = \frac{c_{m,2}}{c_{v,2}}$$

ahol  $c_{v,1}$  és  $c_{v,2}$  az extracelluláris és intracelluláris vizes fázisban mérhető koncentráció. Ezt összefüggést felhasználva kifejezhetjük a koncentrációgradienst Fick 1. törvényében és az egyenletet a következő formára hozhatjuk:

$$J_m = -D_m \frac{c_{m,2} - c_{m,1}}{d} = D_m \frac{(K_{c_{v,1}} - K_{c_{v,2}})}{d} = \frac{D_m K}{d} (c_{v,1} - c_{v,2}) = p_m (c_{v,1} - c_{v,2})$$

ahol  $p_m$  (egysége: m/s) a membrán permeabilitási állandója az adott anyagra nézve. Értéke függ a diffúziós állandótól a membránban (amit a Stokes egyenlet szerint a méret és az alak szab meg), de fő meghatározója a  $K$  megoszlási hányados. Így egy anyag minél jobban oldódik a lipid fázisban, annál inkább képes áthatolni a membránon egyszerű diffúzióval [58]. Látható, hogy minél hidrofóbbabb egy anyag, azaz minél nagyobb a  $K$  megoszlási hányadosa, annál nagyobb a membránpermeabilitása.

Azonban a plazmamembrán nemcsak hidrofób anyagok számára átjárható, hanem hidrofil molekulák számára is. A hidrofil jelleg növekedésével csökken a permeabilitás mértéke (csökken  $K$ ), és szinten csökkenti a permeabilitási állandó nagyságát a molekulaméret, hiszen ez csökkenti a diffúziós állandót. A viszonylag jelentős membránpermeabilitást mutató anyagok közül kiemelendő a víz, bár megjegyzendő, hogy a víz sejtmembránon keresztüli passzív transzportját igen jelentősen elősegítik az aquaporin vízcsatornák [59]. Az aquaporinok, más néven vízcsatornák, általában specifikusak a vízpermeabilitásra, és kizárják más oldott anyagok áramlását, így egyáltalán nem permeabilisek a töltött anyagokkal szemben [60]. A legtöbb, biológia szempontból fontos oldott anyag (különböző biokémiai anyagok és sók) számára, amelyek a membránt körülvevő oldatban találhatóak, a plazmamembrán nagyon kevésbé átjárható. Ezen koncepció, vagyis a víz és más oldott anyagok közötti egyenlőtlen transzmembrán-eloszlás és az eltérő permeabilitás, Charles Overton nevéhez fűződik az 1890-es évekből [61]. A hidrofil oldott anyagok mozgásának akadályát leginkább a membrán kb. 40 Å vastag hidrofób közepe jelenti. Ezen központi szerepet betöltő réteg átteresztőképessége membránról membránra változhat: minél szorosabban illeszkednek egymáshoz a kettősréteget alkotó lipidek, annál kisebb a membrán átteresztőképessége. A lipid kettősréteg átteresztőképessége nem állandó, a környezeti tényezők befolyásolják.

### **2.1.2.2 Fehérjék segítségével lejátszódó membrántranszport**

Az oldott anyagok membránon keresztüli mozgása gondosan szabályozott folyamat: számos módja van annak, hogy hogyan haladhatnak át a vékony ( $\sim 40$  Å) membrán hidrofób gátján. Azokban az esetekben amikor az oldott anyag számára átjárhatatlan a membrán, valamilyen transzportfehérjére van szükség. A transzportot passzív diffúzióra és aktív transzportra oszthatjuk. A passzív diffúzió (egyszerű és facilitált) kizárólag az oldott anyag elektrokémiai gradiense által biztosított energiát használja, és az anyag membránon keresztüli kiegyenlítéséhez vezet. Ezzel szemben az aktív transzporthoz további energia (pl. ATP) szükséges, és egyensúlytalanságot eredményez, azaz az oldott anyag nettó felhalmozódását. A passzív transzport történhet egyszerű diffúzióval vagy facilitált transzporttal, például ionofórok vagy ioncsatornák segítségével. Az aktív transzport számos, gyakran összetett formában van jelen: elsődleges aktív transzport (uniport), másodlagos aktív transzport (kotranszport, antiport), valamint a csoporttranszlokáció. Az összetett transzportrendszerek mellett az anyagtranszport megvalósulhat réskapcsolatok (gap junctions), receptor-mediált endocitózis,

fagocitózis, pinocitózis, exocitózis, illetve apoptotikus membránhólyagok (membrane blebbing) által is [61].

#### **2.1.2.2.1 Facilitált diffúzió**

A facilitált diffúzió (más néven hordozó-mediált diffúzió), az egyszerű passzív diffúzióhoz hasonlóan, az oldott anyag elektrokémiai gradiensében rejlő energiát hasznosítja. Az oldott anyag transzportjához nincs szükség külső energiaforrásra, és az anyag eloszlása a membrán két oldalán végül egyensúlyba kerül. Ellentétben az egyszerű passzív diffúzióval, a facilitált diffúzió egy nagyon specifikus transzmembrán integráns fehérjét vagy hordozót igényel, amely segíti az oldott anyag átjutását a membránon. Ilyenek például az ionofórok, más néven "ionhordozók". Az ionofórok kis, lipiddékony molekulák, amik feladata, hogy ionokat szállítsanak a membránokon keresztül [62]. Ezek facilitált diffúzióval működő transzporterek, amelyek ionokat szállítanak lefelé az elektro-kémiai gradiensük mentén. Az ionofórokat két alapvető típusba sorolhatjuk: csatornát képzők és mobilis szállító molekulák [63]. A facilitátorok két alapvető típusba sorolhatók: hordozófehérjék és kapuzott ioncsatornák.

##### **2.1.2.2.1.1 Hordozófehérjék általi transzport**

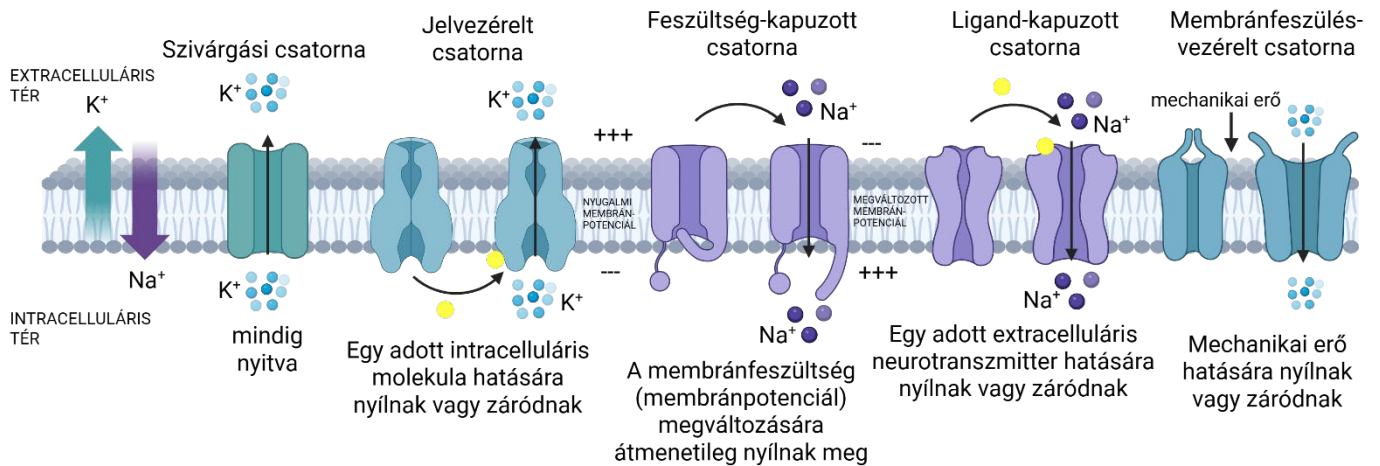
A hordozófehérje által mediált transzportfolyamat egyik jól ismert példája a glükóztranszporter, vagyis a GLUT [64]. A GLUT transzporterek szinte minden sejtben megtalálhatók, és különösen nagy mennyiségben fordulnak elő a vékonybél hámsajtjeiben. A glükóztranszporterek csak egy típust képviselnek a transzport facilitátorok egy nagy szuperfamilájából. A GLUT fehérjék integráns membránfehérjék, amelyet 12  $\alpha$ -hélix alkot a membránon áthaladó szakaszán. A GLUT-ok egy jellegzetes membrántranszport mechanizmuson keresztül működnek [65]: a glükóz a membrán külső felszínén lévő kötőhelyhez kapcsolódik, ami konformációváltozást idéz elő, és lehetővé teszi az anyag membránon való áthaladását. Ezután a glükóz a membrán belső oldalán felszabadul a sejten belüli vizes térbe. Mivel ez „leárnyékolja” a hidrofil glükóz molekulát a hidrofób membránban, a GLUT által mediált glükóztranszport aktiválási energiája 16 kJ/mol-ra csökken a tiszta lipidmembránban mérhető ~90 kJ/mol-ról [66].

##### **2.1.2.2.1.2 Ioncsatornák**

A specifikus makromolekuláris transzportrendszerek, az ioncsatornák és pumpák biztosítják az útvonalakat, amelyek lehetővé teszik és egyben szabályozzák az ionok átjutását a

lipidmembránon. Az ioncsatornák energiafelhasználás szempontjából kedvező átjárót biztosítanak az ionok számára, lehetővé téve, hogy azok gyorsan és passzívan diffundáljanak az elektrokémiai potenciáljuknak megfelelően. Ezzel szemben az ionpumpák az ATP hidrolízisét használják fel, hogy koncentrációgradienst hozzanak létre és tartsanak fenn a sejtmembránon keresztül, az ionokat az elektrokémiai potenciáljukkal ellentétes irányban szállítva. A biológiai membránok csatornái és pumpái egyaránt nagyon szelektívek lehetnek bizonyos ionokra nézve. Az ioncsatornák egyedülálló tulajdonsága azonban a rendkívül nagy transzportráta. A szelektivitás azt jelenti, hogy egy meghatározott csatorna csak bizonyos ionok számára átjárható. Megkülönböztetünk, jelvezérelt csatornákat, ligandum-kapuzott csatornákat, feszültség-kapuzott csatornákat, membránfeszülés vezérelt csatornákat, illetve szivárgási csatornákat, melyek folyton nyitva állnak bizonyos molekulák számára (4.ábra). A szelektív membránpermeabilitás kulcsfontosságú a membránpotenciál fogalmának alátámasztásában: két, különböző koncentrációjú ionoldat között, amelyeket egy féligáteresztő membrán választ el, spontán potenciálkülönbség alakul ki (Nernst-potenciál) [67]. Az ioncsatornákat szelektivitásuk alapján három csoportba sorolhatjuk: nagy szelektivitású csatornák, amelyek 4 alegységből állnak és kizárólag egy meghatározott ion számára átjárhatóak ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). Ide tartoznak továbbá a kis szelektivitású csatornák, amelyek 5 alegységből épülnek fel, kationokra specifikusak tehát bár többféle iont képesek átengedni, azoknak azonos töltéssel kell rendelkezniük, például a nikotinergerg acetilkolin-receptor, amely  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionokra nézve permeabilis. Emellett léteznek nem szelektív ioncsatornák, amelyeket 6 alegység épít fel és kationokat, illetve anionokat egyaránt átengednek, például a réskapcsolat csatorna. A szelekció történhet méret, töltés vagy specifikus kölcsönhatások alapján. Méret alapján történő szelekció esetén például azok az ionok, amelyek nem férnek be a pórusba, nem tudnak átjutni a membránon, például a réskapcsolat csatorna az 1 kDa-nál nagyobb molekulák számára nem átjárható. A nem szelektív csatornák, a réskapcsolatok lehetővé teszik kis oldott anyagok, például ionok, cukrok, aminosavak és nukleotidok transzmembránon való áthaladását, de mindeközben megakadályozzák a sejtszervecskék és nagyobb polimerek, mint például a fehérjék és nukleinsavak vándorlását. A réskapcsolatok két szomszédos sejt citoplazmáját kötik össze. Ezek a kapcsolatok olyan helyeken jönnek létre, ahol a sejtek közötti rés mindössze 2–3 nm, innen ered az elnevezés: „gap junction” (réskapcsolat). A réskapcsolat minden egyes csatornája 12 fehérjéből, a connexinekből épül fel. Hat, hatszög alakban elhelyezkedett connexin kapcsolódik mindkét sejt plazmamembránjához, amelyeket a réskapcsolat összeköt. A hat connexinből álló egységet connexonnak nevezzük, és ez alkotja a réskapcsolat csatorna felét. Így egy teljes réskapcsolat

csatorna két egymással szemben elhelyezkedő connexonból és összesen 12 connexinből áll. A réskapcsolatok biztosítják a folyamatos elektromos és kémiai kapcsolatot a szomszédos sejtek között. Különösen fontos a kis másodlagos hírvivő molekulák – például az inozitol-trifoszfát (IP<sub>3</sub>) és a Ca<sup>2+</sup> – gyors továbbításában. A réskapcsolatok fontos szerepet töltenek be a májban és szívizomban, mivel az összehúzódáshoz szükséges elektromos jelek hatékonyan haladnak át ezeken a csatornákon [68].



#### 4. ábra: Ionok szabályzott átjutása a plazmamembránon: ioncsatornák

Főbb típusai a szivárgási csatornák, jelvezérelt csatornák, feszültség-kapuzott csatornák, ligand-kapuzott csatornák és a membránfeszülés-vezérelt csatornák. Nyitásuk és záródásuk eltérő hatásokra következik be.

#### 2.1.2.2.2 Aktív transzport

A membránok egyik fontos jellemzője, hogy kialakítják majd fenntartják a transzmembrán gradienseket minden oldott anyag esetében: beleértve a sókat, biokémiai anyagokat, makromolekulákat, sőt még a vizet is. Az élő sejtekben a Na<sup>+</sup> és K<sup>+</sup> nagy gradiensei különösen fontosak. Az élő sejtek transzmembrán elektromos potenciálja ( $\Delta\Psi$ )  $-30$  és  $-200$  mV között van, ami az összes ionos oldott anyag, köztük a Na<sup>+</sup> és a K<sup>+</sup> egyenetlen eloszlásának, valamint a membrán szelektív permeabilitásának a következménye. A kémiai és elektromos gradienseket aktív transzportrendszerek sokasága tartja fenn az egyensúlytól távol, melyek energiát (gyakran ATP-t) igényelnek az oldott anyagok elektrokémiai gradienssel ellentétes irányba történő mozgatásához. Az aktív transzport különböző típusainak leírására számos, egymást nem kizáró és átfedő kifejezést használnak: uniport, szimport, antiport.

#### **2.1.2.2.2.1 Elsődlegesen aktív transzport**

Az elsődlegesen aktív transzport más néven direkt aktív transzport. Energia (általában ATP) felhasználásával történik, hogy az oldott anyagot közvetlenül át tudja pumpálni a membránon keresztül az elektrokémiai gradiensevel ellentétes irányba. A primer aktív transzport legjobban tanulmányozott példája a plazmamembrán  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPáz.

#### **2.1.2.2.2.2 $\text{Na}^+$ $\text{K}^+$ ATP-áz**

A legfontosabb aktív transzport fehérje a plazmamembránhoz kötött  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPáz. A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPáz mechanizmusa két konformációs állapot között való ingadozáson alapul, az ENZ-1 és ENZ-2 [69]. Három  $\text{Na}^+$  ion kötődik belülről a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPáz-hoz az ENZ-1 konformációban. Ez ATP segítségével foszforilálódik, ami konformációváltozást okoz, így létrehozva az ENZ-2~P-t. Az ENZ-2~P  $\text{Na}^+$ -t nem, de két  $\text{K}^+$  iont köt. Így három  $\text{Na}^+$  ion szabadul ki, és két  $\text{K}^+$  ion kötődik kívülről, létrehozva az ENZ-2~P ( $2\text{K}^+$ )-t. A ~P hidrolízisével a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPáz (ENZ II) visszatér az eredeti ENZ-1 konformációba, amely két  $\text{K}^+$  iont bocsát ki és három  $\text{Na}^+$  iont köt belülről. Az ouabain, melyet sokáig a szívelégtelenség kezelésére használtak, blokkolja a defoszforilációs lépést.

#### **2.1.2.2.2.3 Másodlagosan aktív transzport**

A másodlagosan aktív transzport (más néven kotranszport) rendszerek két különálló funkciót látnak el. Egy elsődlegesen aktív transzport létrehozza egy ion ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  vagy  $\text{K}^+$ ) elektrokémiai gradiensét. Ezen ion mozgása az elektrokémiai gradiensének mentén lefelé, facilitált diffúzióval történik, és az ennek során felszabaduló energia használódik egy másik oldható anyag elektrokémiai potenciálgradienssel szembeni mozgásához. A két transzport lejátszódhat ugyanabba az irányba (szimport), vagy történhet ellentétes irányba (antiport). Szimport például az SGLT1 (nátrium-glükóz transzportfehérje-1) a bélhámsejtekben [70].

#### **2.1.2.3 Egyéb módok a membránon keresztüli áthaladásra**

Számos egyéb mód ismert, amely lehetővé teszi az oldott anyagok, beleértve a nagy makromolekulák átjutását a membránokon (5.ábra). Ezen módszerek közé tartozik a receptor-mediált endocitózis (RME), a fagocitózis, a pinocitózis, az exocitózis és a membránbimbózás. Ezek a folyamatok a membrán nagyobb szakaszait érintik, amelyek sok lipidet és fehérjét tartalmaznak. Két régóta ismert, hasonló transzportfolyamat a pinocitózis és a fagocitózis [71]. Mindkét esetben a felvétel (endocitózis) nem specifikus: a víz és ionok mellett nagy

makromolekulák átjutása is lehetséges, a fagocitózis esetén akár egész sejteké. A pinocitózis más szóval „sejtívás”, amely során a sejt extracelluláris folyadékot és annak összes komponensét, például vizet, sókat, biokémiai anyagokat, sőt oldott makromolekulákat is bekebelez. A fagocitózis jelentése „sejtévés”: a plazmamembrán nagy, oldhatatlan szilárd anyagokat vesz fel betüremkedés útján. Az eukarióta sejtek rendelkeznek endolizoszómális rendszerrel, amely többféle organelumot foglal magában, amelyek együtt határozzák meg a sejtbe bejutó és a sejten belüli molekulák útját. Az endolizoszómális kompartmenteket funkcionálisan a rakomány válogatásának, újrahasznosításának és lebontásának képessége különbözteti el egymástól, valamint újabban a sejtmag felé történő transzkripció jelátvitel [72]. A plazmamembránból kis endocitotikus tubulo–vezikulák által történő internalizációt követően a korai endoszómák leválasztják a ligandumokat a receptorokról, és válogatják a fehérjéket újrahasznosításra vagy lebontásra [73, 74]. A korai endoszómák érés során késői endoszómákká alakulnak, amelyek fehérjéket szállítanak vissza a transz-Golgi hálózatba és képesek autofagoszómákkal és lizoszómákkal fuzionálni [75, 76]. A késői endoszóma–lizoszóma fúzió hibrid endolizoszómákat hoz létre, amelyekben a lizoszómális hidrolázok lebontják a bekerült anyagokat, így jönnek létre az amorf, sűrű tartalmú lizoszómák. A fúziót követően a membránok visszanyerése révén új lizoszómák képződnek – ezt a folyamatot endocitotikus lizoszóma-reformációnak, vagy ha autofagoszómákkal történt fúzió, autofág lizoszóma-reformációnak nevezik [77]. A kis GTPázok a membránforgalom fő szabályozói, amelyek effektorfehérjékkel együtt közvetítik a fúziót, hasadást, szállítást és jelátvitelt [72]. Például a Rab5 kis GTPáz a frissen képződött endocitotikus vezikulákhoz és korai endoszómákhoz toborzódik, így jelölve az endocitózis korai szakaszait, amelyek az újrahasznosításhoz és válogatáshoz kapcsolódnak [78]. A Rab5-pozitív membránok két alcsoportot hoznak létre különböző effektorfehérjék vonzásával: az APPL1 egy többfunkciós adaptorfehérje, amely különféle jelátviteli fehérjék számára biztosít vázlat [79], és olyan endoszómákat jelöl, amelyek nagy valószínűséggel gyors újrahasznosításra kerülnek [80]. Az EEA1 horgonyfehérje közvetíti a fúziót a Rab5-pozitív endocitotikus vezikulák és a korai endoszómális vakuólumok között, valamint a korai endoszómák közötti homotípusú fúziót is [81]. Az APPL1- és EEA1-endoszómák rakományválogató állomásként működnek. Bár fizikailag elkülönülnek egymástól, tartalmukat gyorsan és kölcsönösen kicserélik [80]. Az endoszómák és lizoszómák morfológiáját évtizedek óta tanulmányozzák különböző elektronmikroszkópos (EM) módszerekkel. Ezek a vizsgálatok alapvető struktúra és funkció közötti összefüggéseket tártak fel nanométeres skálán és egy integrált képet adtak a különböző endolizoszómális kompartmentek és aldóménjeik funkciójáról, molekuláris összetételéről és

morfológiájáról [82]. A legtöbb ligandum a korai endoszómák savas környezetében leválik receptoráról. A levált ligandumok a korai endoszómák lumenében maradnak, miközben azok késői endoszómákká érnek, mikrotubulusok mentén a sejt perinukleáris régiójába vándorolnak, majd végül lizoszómákkal fuzionálnak [73]. A transzmembrán receptorok és a hozzájuk kötődött ligandumok a korai endoszómákban háromféle útvonalon juthatnak tovább:

- a perifériás korai endoszómákból visszakerülnek a sejtfelszínre gyors újrahaznosítással,
- membrántubulusokba csomagolódnak, amelyek a perinukleáris régióba szállítódnak, ott újrahaznosító endoszómákat képeznek, majd lassabb kinetikával térnek vissza a plazmamembránhoz
- vagy intraluminális vezikulákba (ILV-kbe) csomagolódnak, az endoszomális érési folyamat részeként, amely a multivezikuláris testek (MVT-k) kialakulásához vezet [83].

Ezeket a válogatási döntéseket részben a Rab GTPázok szekvenciális toborzása és aktiválása közvetíti, amelyek létrehozzák a szükséges rendszert a rakomány válogatásához és az újrahaznosító vezikulák lefűződéséhez [78]. Az intraluminális vezikulák képződését és a rakomány ezekbe történő válogatását az endoszomális válogató komplexek (ESCRT) közvetítik, amelyek felismerik az ubikvitinnel konjugált receptorokat [84]. A jelátviteli receptorok MVT-kbe csomagolása és azok lizoszómákban történő lebontása a jelátvitel megszűnéséhez vezet, és ezt receptor down-regulációnak nevezzük [85].

#### **2.1.2.3.1 Pinocitózis, fagocitózis, membránbimbózás (blebbing)**

A pinocitózis az endocitózis egy formája, amely során oldott anyagokat tartalmazó folyadékot vesz fel a sejt. Emberben ez a folyamat a vékonybél hámsejtjeiben megy végbe, és elsősorban a zsírcseppek felszívására szolgál. Az endocitózis során a sejt plazmamembránja kinyúlik, majd betüremkedik a kívánt extracelluláris anyag köré, ezáltal egy tasakot képezve, amely leszakad, így egy belső vezikulum (hólyag) jön létre [86].

A fagocitózis az endocitózis egy olyan típusa, amely nagy, szilárd részecskék – gyakran  $>0,5 \mu\text{m}$  – felvételét jelenti [87]. Ezek a fagocitált részecskék lehetnek makromolekulák aggregátumai, más sejtek darabjai vagy akár teljes mikroorganizmusok is. A pinocitózissal ellentétben a fagocitózis során a felszíni fehérjék specifikusan felismerik és megkötik a szilárd részecskéket. Az emberi szervezetben a fagocitózis mechanizmusa kizárólag speciális sejtekre, úgynevezett falósejtekre korlátozódik: ide tartoznak a fehérvérsejtek, például a neutrofilek és

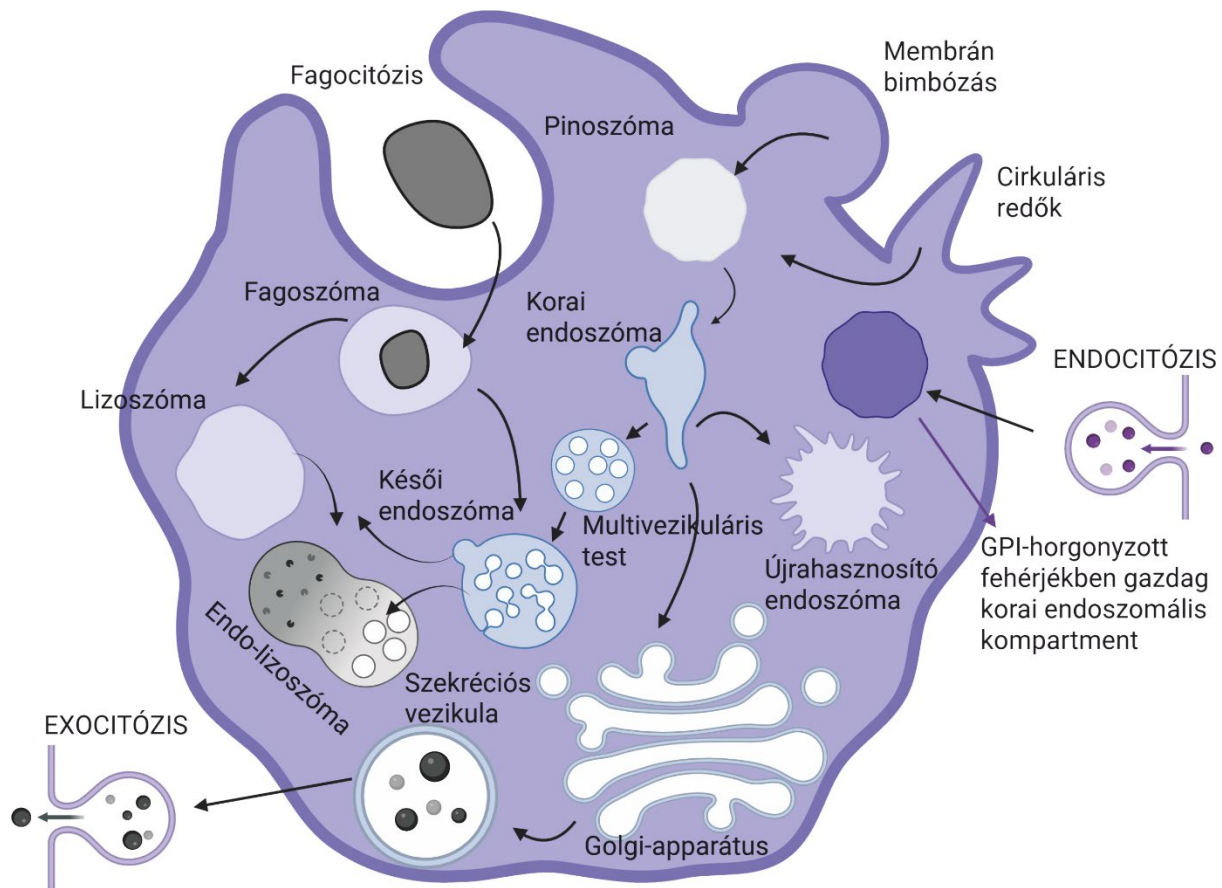
a makrofágok. A pinocitózishoz hasonlóan a fagocitózis során is sejten belüli vezikulumok, fagoszómák képződnek, amelyek elszigetelik a szilárd részecskéket, majd a lizoszómába szállítják őket, ahol megemésztődnek. A fagocitózis az immunrendszer egyik fő mechanizmusa a kórokozók és sejtörmelék eltávolítására.

A plazmamembrán bimbózása (blebbing) azoknak a sejteknek a morfológiai jellemzője, amelyek a programozott sejthalál másnéven az apoptózis késői szakaszában vannak [88]. A bleb egy szabálytalan “dudor” a sejt plazmamembránján, amelyet a citoszkeleton és a plazmamembrán lokális szétkapcsolódása okoz. Ez a kitüremkedés végül leválik az eredeti plazmamembránról, magával víve a citoplazma egy részét. Az apoptotikus sejt plazmamembránja szétesik, és elveszti azt az integritást, amely szükséges az alapvető transzmembrán gradiensek fenntartásához [89]. A blebbing néhány normál sejtfunkcióban is szerepet játszik, például a sejtek mozgásában és osztódásában.

### **2.1.2.3.2 Exocitózis**

Az exocitózis a vezikulák által közvetített transzportfolyamat, amely során az intracelluláris kompartmentekben (például a Golgi-készülékben vagy endoszómákban) képződött membránhólyagok a plazmamembránnal fuzionálnak, és tartalmukat – fehérjéket, hormonokat, neurotranszmittereket vagy más nagy molekulákat – a sejten kívülre juttatják. [90], ezáltal az endocitózis ellentétének tekintjük. Az exocitózis előzményeként szekréción vagy transzportvezikulumoknak nevezett vezikulumok keletkeznek, melyek összeolvadnak a plazmamembránnal, és az általuk bezárt vizes tartalmat a külvilágba engedik, miközben a vezikulum membránjának hidrofób komponensei (főként lipidek és fehérjék) beépülnek a plazmamembránba [90]. A plazmamembrán állandó összetételét és területét az endocitózis és exocitózis közötti egyensúly tartja fent. A vezikulummembrán és a plazmalemma összeolvadása során zajló eseményeinek megértését Rand és Parsegian kutatásai alapozták meg, akik ezt a folyamatot különálló lépésekként kezelték [91]. Azt állították, hogy a legtöbb membrán nem olvad össze, azonban amikor a membránfúzió megtörténik, kivételes, szigorúan szabályozott feltételek szükségesek ahhoz, hogy meghatározott membránpárok összeolvadjanak. A membránfúzió kiváltását az intracelluláris kalciumszint emelkedésével hozták összefüggésbe. A kontaktfúzió a membránok szorosabb funkcionális egyesülését jelentette, szorosabbat, mint a legtöbb membrán által elért stabil appozíció. A fókuszált destabilizációt úgy tekintették, hogy a kontaktusban lévő membránok szerkezetének destabilizálnia kell, és hogy a destabilizációt a kontaktus területére kell korlátozni, hogy a

membránok fúziója „szivárgásmentes” legyen, azaz csak a megfelelő vizes kompartmentumok keveredjenek. Membránkoaleszcencia: a destabilizált szerkezetet úgy tekintették, hogy az a két membránfelület koaleszcenciájához vezet. Újra stabilizálódás: az egyesült membránt úgy tekintették, hogy gyorsan újra stabilizálódik, hogy fenntartsa a membrán és a sejt integritását. Rand és Parsegian megjegyezték, hogy az előbbieken leírt lépések rendkívül gyorsan, mikroszekundumok alatt történnek, még ha az ezeket megelőző események lassúak is. Ez az elképzelés vezette azt a gondolatot, hogy amint a fúziós pórus kialakul, az hirtelen és teljesen ki kell szélesedjen. Ezt a típusú exocitózist gyakran teljes fúzió (irreverzibilis) exocitózisnak nevezik, ami azt jelenti, hogy a vezikulum membránja teljesen integrálódik a plazmamembránnal és beleolvad, majd csak szabályozott endocitózis során kerül vissza a sejtbe. Ezzel szemben a közelmúltbeli adatok kimutatták, hogy a fúziós pórus stabil, dinamikusan szabályozott állapotba is kerülhet, átmérője a subnanométertől több száz nanométerig terjedhet [92]. Ezek a fúziós pórusok visszafordítható szűkülésen/záródáson is átmehetnek, vagy ismét ki tudnak szélesedni, összhangban az eredeti megfigyeléssel, hogy a szinaptikus vezikulumok az axonterminális membránjával fuzionálnak és abból újra kialakulnak a stimuláció során, és az újrafuzionált vezikulumok tárolni és felszabadítani tudják a neurotranszmittert [93]. Ezt az exocitózis típust „csók és futás” (kiss-and-run) exocitózisnak nevezték [94]. Azok az átmenetek, amelyeken a vezikulum a membrán összeolvadása során keresztül megy, a vezikulum méretétől függhetnek, és általánosan elfogadott, hogy ezeket az átmeneteket fehérjék szabályozzák, amelyek a fúziós pórus falát is alkotják [92]. Valószínűsíthető, hogy a fúziós pórust proteolipid keveréke alkotja [95]. A vezikulumok fúziós pórusai többségében teljesen nyitott állapotúak, és csak egy kis részük mutat átmeneti fúziós pórusnyitást. A fúziós pórus nyitása a kalcium trigger után milliszekundumokon belül következik be, és összekapcsolható a SNARE (soluble NSF-attachment protein receptors) fehérjekomplexszel, amelyről úgy vélik, hogy elindítja az exocitotikus membránfúziót [96]. A szabályozott exocitózis egy többlépcsős folyamat. Korábban úgy vélték, hogy a vezikulum exocitózis során bekövetkező állapotai hirtelen, csak meghatározott helyeken következnek be, ezért a folyamatot visszafordíthatatlannak tekintették, amely teljes fúzióval zárul. Az utóbbi idők adatai azt mutatták, hogy a fúziós pórusok figyelemre méltó stabilitást mutatnak: nemcsak akkor, amikor nyitásuk kisebb, mint egy nanométer, hanem több száz nanométeres nyitás esetén is. Ez arra enged következtetni, hogy egyensúly áll fenn a pórust nyitó és záró erők között. A fúziós pórus átmérőjének szabályozását befolyásoló tényezőknek a fehérjéket (különösen a SNARE fehérjéket) tekintik, bizonyíték van arra is, hogy a lipidek, köztük a koleszterin, szerepet játszanak a pre- és post-fúziós mechanizmusokban [97].



**5. ábra: A plazmamembránon való áthaladás formái: pinocitózis, fagocitózis, membránbimbózás, endo- és exocitózis**

Attól függően, hogy a sejt milyen halmazállapotú és méretű molekulákat juttat át a membránon, számos mechanizmust különböztetünk meg: például pinocitózis vagy fagocitózis. A bejutást követően az endoszómák végzik a sejten belüli anyagok szelektálását és irányítását, míg a lizoszómák emésztőenzimeket (proteázok, lipázok, nukleázok) tartalmaznak, amelyek a lebontást végzik. Az endolizoszóma a lebontás köztes állomása a sejten belüli forgalomban: az endoszómákból érkező anyagokat a lizoszóma enzimeivel bontja le, és ezzel biztosítja az anyagok újrahasznosítását.

**2.2 Sejtpenetráló peptidek**

A sejtpenetráló peptidek (SPP-k), ellentétben az eddigiekben tárgyalt molekulákkal, méretük és töltésük ellenére képesek könnyedén átjutni a sejtek membránjának kettős-foszfolipid rétegén. Olyan molekulákat is képesek bejuttatni élő sejtekbe, amelyek egyébként nem jutnak át a sejtmembránon [5, 98]. Az elsőként azonosított SPP-k egyike, amely celluláris transzdukciós aktivitást mutatott, a TAT transzkripciós aktivátor volt, egy peptid, amely a HIV-1 TAT fehérjéből származik [99]. Az elmúlt két évtizedben számos peptidszekvenciáról derült ki, hogy transzdukciós aktivitással rendelkezik. Ezek közé tartozik a penetratin, amely a *Drosophila antennapedia* homeoproteinből származik. Továbbá a VP22 peptid, amely a herpes simplex vírus VP22 fehérjéből ered, a kiméra peptid transportan (TP), valamint a szintetikus

poliarginin peptidek [3, 100]. Más ismert SPP-k közé tartoznak az amfipatikus peptidek, mint például az MPG, Pep-1, MAP és PPTG1 [101]. Kimutatták, hogy a sejtpenetráló peptidek képesek különféle molekulákat, például DNS-t, siRNS-t, fehérjéket, fluoreszcens festékeket és gyógyszereket bejuttatni sejtekbe, mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között [102, 103]. Bizonyos SPP-k, amikor kis szállítandó molekulákhoz vannak kötődve, közvetlenül át tudnak jutni a sejtek plazmamembránján [104]. Azonban, amikor makromolekulákhoz konjugálódnak, vagy alacsony koncentrációban alkalmazzák őket, a sejtpenetráló peptidek endocitózis útján jutnak be a sejtekbe [105]. A SPP-k képesek befolyásolni vagy akár indukálni egy vagy több endocitózis mechanizmust, és ennek eredményeként a SPP-hez kötött molekulák gyorsan felhalmozódnak az endocitotikus organellekben [106]. Számos kutatás megerősítette, hogy a SPP-hez kötött molekulák képesek elhagyni az endocitotikus organelleket, hogy elérjék a sejtek citoszolikus terét [107]. A sejtpenetráló peptidek elősegítik az általuk szállított molekulák endoszómális felszabadulását, és ez az aktivitás esszenciális tényező a sikeres intracelluláris szállításhoz. Azok a molekulák, amelyek az endoszómákban ragadnak, nem képesek biológiai aktivitást kifejteni, mivel nem érik el a citoszolikus célpontjaikat [108]. Továbbá a makromolekulák a késői endoszómákba vagy lizoszómákba kerülnek, és az alacsony pH vagy a hidrolázok hatására degradálódnak [109]. A SPP-k által mediált endocitotikus felvétel jellemzően hatékony, ezzel szemben az endoszómabontó (endoszomolitikus) aktivitásuk nagyon gyenge [110]. Például, ha a SPP-ket kis szerves fluorofórokhoz vagy fluoreszcens fehérjékhez konjugálják, akkor fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva pontszerű eloszlást mutatnak a sejtekben, ami az endoszómás csapdázottságra utal [111]. Gyakran a citoszolikus jel nem figyelhető meg, ami arra utal, hogy a SPP által szállított molekula nem jutott el a citoszolba [112]. Ezt alátámasztja az is, hogy a biológiailag aktív molekulákhoz konjugált SPP-k gyakran nem mutatnak jelentős sejten belüli aktivitást [113]. Jelenleg kihívást jelent a hatékonyabb bejutás és szállítás elérése, amely többek között a sejtpenetráló peptidek endoszomolitikus aktivitásának növelésével valósulhat meg.

### **2.2.1 Felfedezésük: a penetratin**

A rekombináns fehérjék orvosi alkalmazásának kezdete az 1980-as évek elejére nyúlik vissza, amikor az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) először engedélyezte a rekombináns humán inzulint a cukorbetegség kezelésére. Azóta a biológiailag aktív molekulák, például fehérjék, peptidek vagy akár oligonukleotidok alkalmazása jelentősen

kiszélesedett számos terápiás területen. Ezen ágensek számos előnnyel rendelkeznek: általában nagyfokú specificitást mutatnak, jól tolerálhatók az emberi szervezet számára, és könnyebben alkalmazhatók klinikai fejlesztés során, mint a hagyományos kémiai gyógyszerek. Ugyanakkor ezeknek a bioaktív molekuláknak a hidrofil természete gyakran korlátozza terápiás hatékonyságukat, mivel gyenge membránpermeabilitásuk miatt nem jutnak el intracelluláris célpontjaikhoz [114]. A korlátok leküzdésére új lehetőségek nyíltak azáltal, hogy felfedezték bizonyos fehérjék „szállító” (shuttling) tulajdonságait [115]. 1988-ban két független kutatócsoport is beszámolt arról, hogy a HIV-1 vírus transzkripciós aktivátor fehérjéje (TAT) *in vitro* körülmények között hatékonyan bejut a sejtekbe [2, 99]. Néhány évvel később, 1991-ben kimutatták, hogy a *Drosophila melanogaster* egyik homeoproteinjének, az Antennapedia-nak a homeodoménje szintén képes bejutni a sejtekbe [116]. Ezen felismerések széles körű szerkezet–működés vizsgálatokat indítottak annak érdekében, hogy azonosítsák azt a legkisebb aminosav-szekvenciát, amely önállóan is képes belépni a sejtekbe. Derossi és munkatársai leírták egy rövid, 16 aminosavból álló peptid, a pAntp<sub>(43-58)</sub>, más néven penetratin, transzlokációs tulajdonságait, amely megfelel az Antennapedia homeodomén harmadik hélixének [3]. Néhány évvel a TAT és az Antennapedia homeodomén sejtbe való bejutási képességének felfedezése után számos olyan peptidet azonosítottak, amelyek hasonló transzlokációs képességekkel rendelkeznek, ezeket összefoglaló néven SPP-nek (cell-penetrating peptides – sejtpenetráló peptidek) nevezik [117-119]. A SPP-k a peptidek különféle családját alkotják, jellemzően 5–30 aminosavból állnak, és képesek energiát igénylő vagy attól független mechanizmusok révén átjutni szöveti és sejtmembránokon, anélkül hogy specifikus receptorokhoz kötődnének [120]. Felfedezésük óta a sejtpenetráló peptideket egyre szélesebb körben alkalmazzák az alapkutatásban különféle sejttypusok esetén, mint hatékony transzfekciós eszköz, illetve transzlációs kutatásokban is jelen vannak. Ez utóbbi területen a SPP-k kulcsfontosságúnak bizonyultak egyes terápiás módszerekben: gyógyszermolekulák koncentrációjának növekedését eredményezték olyan szöveti és sejt régiókban, amelyek nehezen hozzáférhetőek, ezáltal fokozva a terápiás hatékonyságot. Különböző betegségek esetén alkalmazták őket különböző típusú terápiás szerek sejtekbe juttatására, beleértve az antimikrobiális, gyulladáscsökkentő, daganatellenes és neuroprotektív hatóanyagokat is [121].

### 2.2.2 Klasszifikáció

Többféle szempont alapján javasolták már a SPP-k osztályozását: eredet, szekvencia, funkció vagy felvételi mechanizmus szerint, de jelenleg nem létezik egységes, általánosan elfogadott

rendszerint ezekre a peptidekre. Fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján egyszerűen három fő csoportba sorolhatók: kationos, amfipatikus és hidrofób peptidek.

### **2.2.2.1 Kationos peptidek**

A kationos SPP-k olyan peptideket foglalnak magukban, amelyek fiziológiás pH-n erősen pozitív nettó töltéssel rendelkeznek, és elsősorban arginin- és lizin-alapú, bázikus rövid szekvenciákból származnak. Ebbe az osztályba tartoznak többek között a TAT-származék peptidek, a penetratin, a poliargininek valamint a Diatos peptide vector 1047 (DPV1047) (Vectocell®) [122, 123]. A kationos sejtpenetráló peptidek sejtfelvételéhez szükséges szerkezeti feltételeket számos tanulmányban vizsgálták, elsősorban fluoreszcensen jelölt és rövidített TAT<sub>49-57</sub> analógok, valamint különböző hosszúságú poliargininek (R5–R12) sejtekbe jutási képességének kvantitatív értékelésével [122, 124]. Ezek a vizsgálatok kimutatták, hogy a rövidített analógok sokkal kevésbé képesek bejutni a sejtekbe, mint az arginin nonamer (R9). Ebből következtethetően a peptidszekvencián belüli aminosavak, elsősorban az arginin, száma és sorrendje kulcsszerepet játszik a SPP-k transzdukciós tulajdonságainak meghatározásában. A további elemzések azt is kimutatták, hogy az argininmaradékok nagyobb mértékben járulnak hozzá a sejtfelvételhez, mint a lizin [122, 124]. Ezt annak tulajdonították, hogy az arginin guanidin-csoportja képes kétfogású (bidentát) hidrogénkötéseket kialakítani a sejthártya negatív töltésű karboxil-, szulfát- és foszfátcsoportjaival, elősegítve ezzel a SPP-k sejten belüli felvételét fiziológiás pH mellett [125]. Ezzel szemben a lizin nem tartalmaz guanidin-csoportot, így a plazmamembránon való átjutási képessége alacsonyabb [126].

### **2.2.2.2 Amfipatikus peptidek**

Az amfipatikus sejtpenetráló peptidek olyan peptidek, amelyek aminosavláncaikban egyaránt tartalmaznak poláris (hidrofil) és apoláris (hidrofób) régiókat. A lizin és arginin molekulák a szekvencián belül szétszórtan helyezkednek el. Emellett ezek a peptidek gazdagok hidrofób aminosavakban is, például valinban, leucinban, izoleucinban és alaninban [127]. Az amfipatikus peptideket általában három fő csoportra osztják: primer, szekunder és prolinban gazdag SPP-kre [128]. A primer SPP-k esetén amfipatikus szerkezet már a szekvenciában (aminosavsorrendben) megjelenik. A hidrofób és hidrofil aminosavak váltakozva helyezkednek el, így már a primer struktúra is amfipatikus jelleget mutat. Ezeknél nem szükséges másodlagos szerkezet (pl. alfa-hélix) kialakulása ahhoz, hogy az amfipatikus jelleg megjelenjen. Ezzel ellentétben a szekunder SPP-k amfipatikus jellege csak akkor alakul ki,

amikor a peptid egy másodlagos szerkezetet vesz fel (például alfa-hélixet vagy béta-lemezt) [129]. A szekunder amfipatikus sejtpenetráló peptidek általában egyedi szerkezeti jellemzőkkel rendelkeznek, leggyakrabban  $\alpha$ -hélix konformációt vesznek fel, amelyben a hidrofób és hidrofób aminosavak a hélix ellentétes oldalaira rendeződnek. Alternatív megoldásként ezek a peptidek képesek  $\beta$ -lemez ( $\beta$ -sheet) szerkezetet felvenni, amikor foszfolipid membránnal lépnek kölcsönhatásba. Hasonlóan az  $\alpha$ -hélix szerkezetű sejtpenetráló peptidekhez, az amfipatikus  $\beta$ -lemezes peptidek egy hidrofób és egy hidrofób aminosav-szekvenciát tartalmaznak. Ezzel a szerkezettel rendelkeznek például a VT5 peptid. A peptidek  $\beta$ -lemez szerkezetet létrehozó képessége kulcsfontosságú a sejtinternalizációhoz, mivel már egyetlen aminosav mutáció is elegendő lehet ahhoz, hogy ez a képesség redukálódjon, ezáltal a sejtek általi felvételük is csökken [130].

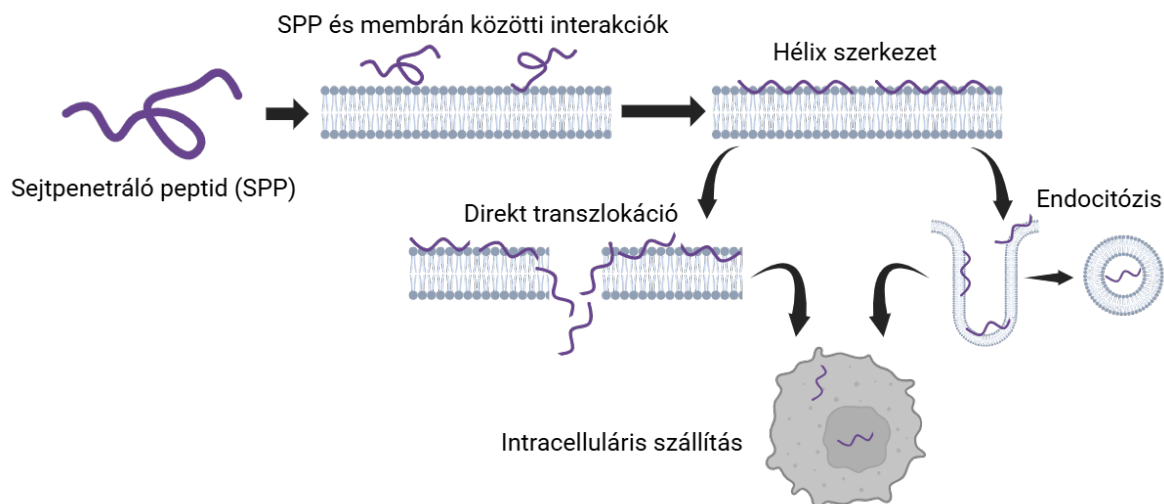
### 2.2.2.3 Hidrofób peptidek

A hidrofób SPP-k főként apoláris oldalláncokat tartalmaznak, ami alacsony nettó töltést eredményez. A hidrofób részek, valamint a sejtthártya hidrofób doménjeihez való nagy affinitásuk nagyban hozzájárul a sejtbejutás folyamatához. Eddig csak korlátozott számú hidrofób peptidet fedeztek fel, és ezek internalizációs mechanizmusairól kevés információt írtak le, a kationos és amfipatikus osztályokkal ellentétben. Ugyanakkor felmerült az az elképzelés, hogy ez a peptidcsalád képes lehet spontán módon, energiafüggetlen mechanizmussal áthaladni a membránokon, így viselkedésük eltérhet más peptid-osztályoktól [131]. A hidrofób SPP-k közé tartozik a C105Y peptid és annak PFVYLI C-terminális szakasza [132], valamint a Pep-7 peptid [133]. A természetes aminosavakon alapuló SPP-ken kívül a hidrofób osztályba tartoznak kémiaiailag módosított peptidek is [134]. A peptidmódosításokat különféle stratégiákkal lehet elérni, például  $\alpha$ -hélix stabilizálására szolgáló peptidkapcsolással („peptide stapling”) [135], prenilálással a membránnal való kölcsönhatás elősegítésére [136], illetve „pepducin” technológiával a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok jelátviteli folyamatainak módosítására [137].

### 2.2.3 Sejtbejutási mechanizmusok

A SPP-k sejt internalizációs mechanizmusait intenzív kutatások övezik, azonban a folyamatban részt vevő utak nincsenek teljesen feltárva. A peptidek sejtbe történő bejutásának során felmerülő nehézségek elsősorban az eltérő fizikai és kémiai tulajdonságoknak tulajdoníthatók, mint például a különböző SPP-k és/vagy SPP-hez kötött konjugátum komplexek mérete és

koncentrációja. Ezek a tulajdonságok jelentős hatással lehetnek a sejtekbe történő bejutás hatékonyságára [138]. Mindazonáltal világossá vált, hogy egyetlen SPP is különböző útvonalakon juthat be a sejtbe, és ezek az utak időnként párhuzamosan is működhetnek, a kísérleti körülményektől függően (6. ábra). Ezen belépési útvonalak két nagy csoportra oszthatók: az energiafüggetlen, közvetlen membránpenetráció és az energiafüggő endocitózis. A közvetlen transzlokáció főként a peptid magas koncentrációja esetén dominál [139], de általánosan elfogadott, hogy a legtöbb SPP és SPP konjugált komplex sejtekbe való bejutása endocitózis útján történik alacsonyabb koncentrációk esetén [140].



### 6. ábra: A sejtpenetráló peptidek bejutási mechanizmusai

Az SPP-k kötődnek a membránhoz elektrosztatikus kölcsönhatás révén, mivel pozitív töltésűek, a membránfoszfolipidek pedig negatívak. Ezután konformációváltozáson mennek keresztül (hélix szerkezet), és ennek köszönhetően a membránba integrálódnak. Internalizációjuk történhet endocitózissal vagy direkt transzlokáció révén. A bejutást követően biztosítják az intracelluláris célhoz jutást: a peptidok elérik a citoplazmát, magot vagy egyéb intracelluláris célorganelleket, és a szállított molekulát is célba juttatják.

#### 2.2.3.1 Direkt penetráció

A közvetlen penetráció, másnéven membrán transzdukció egy egyedülálló folyamat, mivel nemcsak energiafüggetlen, hanem alacsony hőmérsékleten és endocitózis gátló anyagok jelenlétében is végbe mehet. Többféle belépési útvonalat foglal magába, amelyek a pozitív töltésű SPP-k és a negatív töltésű membránkomponensek, valamint a foszfolipid kettősréteg közötti kölcsönhatáson alapulnak. Ezt az interakciót a peptid bejutása követi különböző mechanizmusokon keresztül, amelyeket átmeneti pórusképződésnek vagy membrán destabilizációnak írtak le. A javasolt átmeneti pórusképző modellekben arról számoltak be, hogy a SPP-k „toroidális pórusokat”, vagy „hordó-nyílású pórusokat” alakítanak ki a

plazmamembránban. A toroidális pórusok esetében a SPP-k felhalmozódnak a foszfolipid kettős rétegének külső felszínén, torzítva a membránt, ezáltal átmeneti pórus képződést eredményeznek [141]. A kationos sejtpenetráló peptidek bejutási mechanizmusait vizsgáló kutatások egy új internalizációs folyamatot írtak le, amely a guanidínium csoportok, zsírsavak és a plazmamembrán pH-gradiense közötti konzisztens kölcsönhatáson alapul. Pontosabban, azt javasolták, hogy az extracelluláris tér enyhén magasabb pH értékén a zsírsavak az extracelluláris SPP-k guanidínium csoportjait kötik meg, ezáltal egy átmeneti toroidális pórusképződést mediálnak plazmamembránon keresztül. A citoszol alacsonyabb pH-jával érintkezve a sejtmembrán zsírsavai bejuttatják a SPP-eket a sejtekbe, és a tranziens pórus bezárul [142]. A hordó-nyílású pórusmodell szerint a peptidek a membránban  $\alpha$ -hélix szerkezetet vesznek fel, amelynek hidrophil oldalláncai a pórus belső felszínét alkotják. Ez teszi lehetővé a SPP-k hidrophil elemeinek bejutását [143]. Emellett több közvetlen transzlokációs mechanizmust is leírtak, amelyek a membrán destabilizációjának révén mennek végbe. Az egyik mechanizmus az úgynevezett „szőnyegszerű” modell, miszerint a SPP-k pozitívan töltött aminosavainak kölcsönhatása a membránfelszín negatív töltéseivel, átmeneti membrán fluiditás növekedést eredményez [144, 145]. Az „inverz micella” mechanizmus a foszfolipid kettős réteg befelé történő betüremkedésén alapul, és inverz micellák képződését eredményezi, amelyek a peptidet körbezárják [146]. A SPP-k sejthártyán keresztüli transzlokációja ezekben a micellákban történik, amelyek a sejtbe jutást követően, a peptidet inverzió révén a citoszolba juttatják. A kutatások előrehaladtával tovább bővült a rendelkezésre álló fontos információk tárháza, amely ezen mechanizmusokat taglalja. Kimutatták, hogy a SPP-k és a foszfolipid kettős réteg közötti elektrosztatikus kölcsönhatások konformációs változásokat idézhetnek elő a peptidben, amit a lipid kettős rétegbe való beépülés, végül pedig a membrán fizikai tulajdonságainak megváltozása követ [147].

### **2.2.3.2 Endocitózis**

Kezdetben a direkt membránpenetrációt tartották a SPP-k sejt internalizációjának fő mechanizmusaként [3, 148]. Később azonban nyilvánvalóvá vált, hogy ez több esetben bizonyos kísérleti eljárások, például a sejtek fixálásának mellékterméke, hiszen ezen eljárások a sejtben belüli SPP-k újbóli eloszlását, pl. endoszómákból való kiszabadulásukat eredményezhetik. Ezáltal újra értékelődött a SPP-k felvételi mechanizmusainak alapja, és a későbbi vizsgálatokból származó adatok arra utalnak, hogy a legtöbb SPP és SPP konjugált komplex esetében a fő belépési útvonal az endocitózis [110]. Az endocitózis természetes,

energiafüggő folyamat, amely minden sejtben végbemegy. Többféle útvonalon keresztül történhet: makropinocitózis, klatrin- vagy kaveolin-mediált endocitózis, valamint klatrin-/kaveolin-független endocitózis [149]. Az, hogy melyik útvonal dominál, nagyrészt a szállított molekula méretétől és fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ [150]. Míg a SPP-k a nem endocitikus utakon történő transzlokáció után közvetlenül a citoszolba lokalizálódhatnak, a peptidek az endocitózis során az endoszómákban rekednek [151], hacsak nem szabadulnak ki az endoszómákból a citoszolba, hogy elkerüljék a lizoszómális lebomlást. Az endolizoszómális kiszabadulás („endolysosomal escape”) szükséges ahhoz, hogy elérjék célhelyüket, és kifejtsék biológiai hatásukat. Úgy tűnik, hogy a funkcionális makromolekulák hatékony intracelluláris szállításának legfőbb korlátozó tényezője endocitikus vezikulákból való felszabadulás [152]. Az endoszómális kijutás pontos mechanizmusa továbbra is tisztázatlan, bár több hipotézist is felállítottak a folyamat magyarázatára. Az egyik modell például azt feltételezi, hogy a SPP-k pozitív töltései kölcsönhatásba lépnek az endoszómális membrán negatív töltésű komponenseivel. Ez a kötődés a membrán fluiditásának elvesztéséhez vezet, ami a membrán szakadását és a vezikula tartalmának felszabadulását eredményezi [153]. Egy másik paradigma az endoszómális membrán pH-gradiensének fontosságát hangsúlyozza, mivel a savas pH fokozza a SPP-k membránnal való kölcsönhatását, ezáltal a transzdukción. Egy harmadik modell szerint a vezikulák tartalmát képző anyagok koncentrációjának növekedése fokozhatja az endoszómális felszabadulást. Több adat is arra utal, hogy ezek a modellek inkább a nagy makromolekuláris anyagok esetén alkalmazhatóak, ellenben a nagy méretű, kationos SPP-kkel, amelyek kovalensen kötött rakományokkal rendelkeznek, és valószínűleg az endocitikus vezikulákban csapdázódnak [152]. Ezen probléma megoldására különféle ágenseket fejlesztettek ki annak érdekében, hogy javítsák a SPP-rakomány komplexek endoszómális felszabadulásának hatékonyságát, beleértve az endoszomolítikus peptideket és polimereket [154]. Az egyik ígéretesnek bizonyuló megközelítés azon alapul, hogy a peptidszekvenciába pH-érzékeny doméneket építenek be, amelyek az endoszómák savas pH-ján destabilizálják a lipidmembránokat, így elősegítve a SPP-k kijutását az endocitikus vezikulákból [155]. Egy másik, hasonló módszer azon alapul, hogy hisztidin-csoportokat építenek be a SPP-kbe, amelyek protont vesznek fel endoszómális pH-n, ezáltal növelik az ozmotikus nyomást az endoszómális vezikulában. Ez a membrán felszakadásához és a tartalom felszabadulásához vezet, ez az úgynevezett „proton-szivacs hatás” [156].

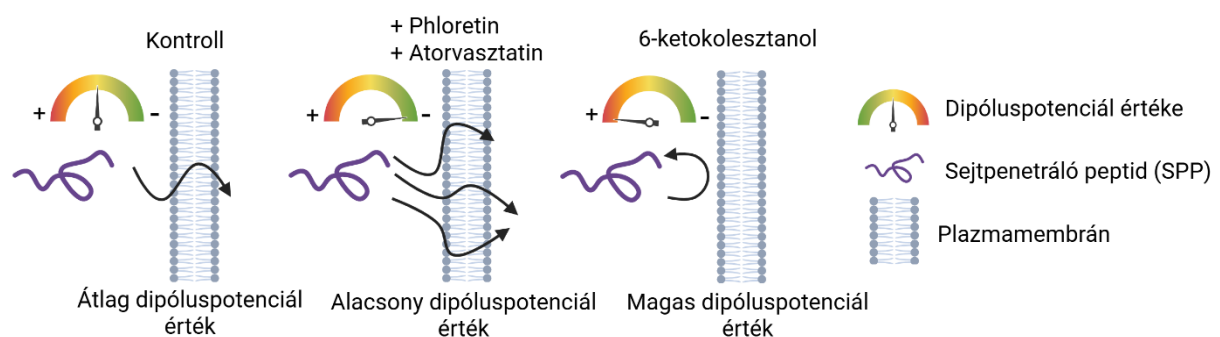
## 2.2.4 Bejutást befolyásoló tényezők

Számos megközelítést alkalmaztak annak érdekében, hogy növeljék a sejtpenetráló-peptidek sejtekbe történő bejutását: a peptid gerincének ciklizálása, nem természetes aminosavak beépítése, pegiláció (PEG-molekulák kapcsolása) és acilezés (zsírsavláncok kapcsolását) is befolyásolja a bejutási hatékonyságot [157]. Más stratégiák azon a felismerésen alapulnak, hogy a SPP-nek, függetlenül attól, milyen mechanizmussal jut be, membránt kell átszelnie. A közvetlen transzlokáció a plazmamembrán átlépésével történik, míg az endocitikus útvonal során a SPP az endolizoszómális rendszer membránjain keresztül jut tovább. Töltésük miatt a SPP-k elektrosztatikus kölcsönhatásokat alakítanak ki az anionos foszfolipidekkel és a heparán-szulfát proteoglikánokkal, amelyek a közvetlen transzlokációban, illetve az endocitózisban is szerepet játszanak [158].

### 2.2.4.1 Dipóluspotenciál

A töltéssel rendelkező anyagok transzportját a plazmamembránon keresztül háromféle membránpotenciál befolyásolja: a transzmembrán potenciál, a felszíni potenciál és a dipóluspotenciál [159]. A dipóluspotenciál egy elektromos potenciál a lipidmembránok belsejében, amely a lipidek dipólussal rendelkező karbonilcsoportjainak és/vagy a vízmolekulák dipólusainak rendeződése révén alakul ki a vizes fázis és a membrán szénhidrogén jellegű belseje közötti régióban [160, 161]. A lipidek és a vízmolekulák preferenciális orientációja által létrejött dipóluspotenciál nagysága körülbelül 200–300 mV, ami legalább négyszer-öttször nagyobb, mint a jól ismert transzmembrán potenciál [162]. Mivel a dipóluspotenciálhoz kapcsolódó elektromos tér a membrán felszínére korlátozódik, annak erőssége elérheti a  $10^8$ – $10^9$  V/m értéket, ami 1–2 nagyságrenddel nagyobb, mint a transzmembrán potenciálé. A dipóluspotenciál ezért jelentős hatást gyakorol a transzmembrán fehérjék konformációjára [163, 164], a molekulák membránkötődésére [165] és transzmembrán transzportjára [166]. A dipóluspotenciál egyik leginkább meghatározó tényezője a membrán szteroltartalma. A koleszterin közvetlenül – saját dipólusmomentuma révén –, illetve közvetetten is növeli a membrán dipóluspotenciálját, mivel növeli a lipidek és a vízmolekulák rendeződését, valamint megváltoztatja a membrán dielektromos állandóját [164, 167]. Ennek megfelelően a dipóluspotenciál magasabb a sejtmembránok raft-szerű doménjeiben [168]. Felfedezték, hogy ha koleszterint építenek be egy szintetikus lipidmembránba, a dipóluspotenciál jelentősen megnő. Szabó [169] kimutatta, hogy a koleszterin hozzáadása egy monolein kettősréteghez akár 100 mV-tal is növelheti a

dipóluspotenciált. Arra a következtetésre jutott, hogy a dipóluspotenciál változása a molekuláris dipólusok orientációjának, erősségének és térkitöltésének változásából ered a membrán felszínén, bár nem fejtette ki, hogy mely molekuláris dipólusok felelősek ezért a változásért. A sztatinok – a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-koenzim-A (HMG-CoA) reduktáz gátlói – csökkentik a sejtek koleszterinszintjét kísérletes és klinikai körülmények között, és kimutatták, hogy csökkentik a plazmamembrán dipóluspotenciálját [167, 170]. A sztatinok a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek a hiperkoleszterinémia kezelésére, mivel jótékony hatással vannak a szív- és érrendszeri megbetegedések, valamint a halálozás csökkentésére [171]. Bár a sztatinokkal kapcsolatban beszámoltak mellékhatásokról – például izombántalomról, májkárosodásról és 2-es típusú diabéteszről –, ezek általában jól tolerálhatók, és gyakran sikeresen alkalmazzák őket kombinált terápiákban is [172]. Bár minden sztatin azonos elsődleges hatásmechanizmussal rendelkezik, hatékonyságukban és biológiai hasznosulásukban jelentős különbségek vannak [172]. Az atorvasztatin hatékonyabb más sztatinoknál, mivel kisebb dózisban is képes ugyanazt az LDL-koleszterin-csökkentő hatást elérni [173]. Ellentétben a szimvasztatinnal és a lovasztatinnal, amelyek előgyógyszerek, az atorvasztatin aktív formában van jelen, így nincs szüksége enzimatis aktiválásra – ez a tulajdonság különösen fontos *in vitro* alkalmazások során [174]. Az előzőekben ismertetett elvekkel összhangban feltételezhető, hogy a membránpotenciálok befolyásolják a penetratin sejt felvételét, mivel ez a peptid töltéssel rendelkezik (7. ábra). Ennek ellenére csak korlátozott számú olyan tanulmány áll rendelkezésre, amely az elektrosztatikus potenciálok a sejtpenetráló peptid felvételével hozza összefüggésbe. Kimutatták, hogy a transzmembrán potenciál nem fiziológias megszüntetése gátolja a pozitív töltésű sejtpenetráló peptid sejtbe jutását [175].



### 7. ábra: A membrán SPP-permeabilitását befolyásoló tényezők: a dipóluspotenciál

A dipóluspotenciál a lipid kettősrétegen belüli lokális elektromos potenciálkülönbség, amely különböző anyagok hatására megváltozik. A floretin csökkenti a dipóluspotenciált, mivel módosítja a lipidfejek orientációját és a lipidfej-dipólusok sűrűségét. Az atorvasztatin csökkenti a koleszterinszintet, így módosítja a membrán lipidösszetételét, és ezáltal a dipóluspotenciált. A 6-ketokolesztanol növeli a dipóluspotenciált, mivel a koleszterin-származék, ennek köszönhetően a membrán permeabilitása is csökken.

## **2.3 Plazmamembrán által indukált helyi ligandum kötődés**

### **2.3.1 Ligandumok**

A ligandum olyan molekula, amely specifikusan kötődik egy receptorhoz vagy más biomolekulához, és ezzel biológiai hatást vált ki. A ligandum lehet fehérje, hormon, gyógyszer, neurotransmitter vagy akár kisebb molekula, amely a receptorhoz való kötődés révén módosítja a receptor konformációját, és így aktiválhatja vagy gátolhatja annak működését, illetve közvetetten befolyásolhatja a sejt működést. A ligandum-receptor kötődés általában reverzibilis, és különféle intermolekuláris erők (pl. ionos kötések, hidrogénkötések, Van der Waals-erők) révén jön létre. A ligandumok lehetnek intracellulárisak (a sejten belüli receptorokhoz kötődnek, például az ösztrogén) vagy extracellulárisak (a sejt felszíni receptorokhoz kötődnek, például az inzulin vagy neurotransmitterek). Számos kémiai és biológiai folyamat során lépnek a ligandumok kölcsönhatásba molekuláris célpontjaikkal. Az ilyen kölcsönhatásokat szabályozó mechanizmusok iránti érdeklődés már több mint egy évszázada meghatározza az elméleti és kísérleti vizsgálatokat. Molekuláris megközelítés és értelmezés fejlődésnek indult: a ligandum és a célpont egyszerű merevtest-asszociációjától elmozdult a konformációs átmenetek kulcsszerepének felismerése felé [176].

### **2.3.2 Szerkezetük meghatározása**

A ligandumok kiindulási szerkezetei különböző forrásokból származhatnak, akár manuális rajzolás révén, akár vegyület-adatbázisokból letölthetőek. A rendelkezésre álló ligandumszerkezetek formátuma lehet 1D (pl. SMILES), 2D (.mol), vagy 3D (mol2, .sdf, .pdb stb.). Néhány ingyenesen elérhető szoftver – kizárólag oktatási célra – a kémiai szerkezetek generálására: OpenBabel [177], ChemAxon és az Avogadro grafikus felületű program [178]. Adatbázisok, mint a ZincDB, ChemBank és PubChem, nagyszámú vegyületet tárolnak. A ligandum geometriai szerkezetén túl fontos az atomtípusok pontos definiálása is, mivel néhány dokkolóprogram az ismeretlen vagy ritka atomtípusokat „álatomokra” (dummy atoms) cseréli, ami pontatlan pontszámokhoz és energiákhoz vezethet [179]. A ligandum és a receptor közötti nemkötő kölcsönhatások minősége a ligandum és a receptor leírásának pontosságától függ. A van der Waals- és elektrosztatikus kölcsönhatásokat az egyes atomok ionrádiusza és töltése alapján lehet pontosan leírni. A különböző kémiai elemek ionrádiuszait a szabványos erőtermodellek (force field) határozzák meg, és ezek az atomtípusok besorolása alapján kerülnek hozzárendelésre. A ligandum töltésének meghatározása azonban bonyolult feladat a ligandumok kémiai sokfélesége miatt. A ligandum formális töltése a benne található kémiai csoportoktól függ, míg az egyes atomokon található részleges töltések (partial charges) a

molekulán belüli polarizációs hatásoktól. Más szóval, a részleges töltések azt mutatják meg, hogyan oszlik el az elektronfelhő a molekulán belül az atomok között [180]. A ligandum atomjainak részleges töltéseit többféle módszerrel lehet meghatározni, például kvantummechanikai (QM) eljárásokkal [181], félempirikus módszerekkel [182], erőter-alapú megközelítéssel [183], vagy teljesen empirikus módszerekkel [184]. A kvantummechanikai és félempirikus módszerek a legpontosabbak, de sok számítást igényelnek. Az erőter-alapú vagy empirikus módszerek gyorsabbak, és a legtöbb gyógyszerjelölt molekula esetén elfogadható eredményeket adnak, de nem alkalmasak szervesetlen vegyületek vagy fémionokat koordináló molekulák esetében. A hibás töltéshalmazok alkalmazása helytelen töltéspárosítást eredményezhet a ligandum és a receptor között, ami hamis negatív eredményekhez vezethet.

### **2.3.3 Receptorok**

#### **2.3.3.1 Sejtfelszíni receptorok**

A sejtfelszíni receptorok olyan membránba ágyazott fehérjék, amelyek a sejt külső felszínén helyezkednek el, és a sejten kívüli, hidrofil ligandumokat vagy egyéb jelzőmolekulákat specifikusan megkötik. A sejtfelszíni receptorokat funkciójuk és működési mechanizmusuk alapján négy fő csoportba sorolhatjuk: ioncsatorna-kapcsolt receptorok (ligand-gated ion channels), G-fehérje-kapcsolt receptorok (GPCR – G protein-coupled receptors), enzimkapcsolt receptorok (enzyme-linked receptors) és az adhézións receptorok (vagy szabályozott intracelluláris jelátvitelű receptorok).

A ligandum által vezérelt ioncsatornák olyan membránba ágyazott fehérjék, amelyek egy pórust tartalmaznak és az lehetővé teszi bizonyos ionok szabályozott áramlását a plazmamembránon keresztül. Az ionáramlás passzív, és a permeábilis ionokra jellemző elektrokémiai gradiens hajtja. A ligandum által vezérelt ioncsatornákhöz (LGIC-khez) hagyományosan a következő receptorokat sorolják: nikotinos acetilkolin receptor [185], 5-HT<sub>3</sub> (szerotonin) receptor [186], ionotrop glutamát receptor [187], P2X receptor [188], amelyek serkentő (excitátoros), kation-szelektív receptorok. Gátló (inhibitoros), anion-szelektív receptorok: GABA<sub>A</sub> receptor [189], glicin receptor [190].

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok családja a legnagyobb és legsokoldalúbb sejtfelszíni receptorcsoport, amely képes számos kémiai jel rendkívül szelektív érzékelésére, majd a ligandum–receptor kölcsönhatásból származó jelet sejten belüli válasszá alakítja. A GPCR-nek három alapvető része van: extracelluláris szakasz (az N-terminális vég), intracelluláris szakasz (a C-terminális vég) és egy középső szakasz, amely hét transzmembrán domént tartalmaz.

Amikor a GPCR ligandumhoz kötődik, a ligandum konformációváltozást idéz elő a receptor hétszeres transzmembrán régiójában. Ez a változás aktiválja a C-terminálist, amely ezután olyan anyagot toboroz, amely aktiválja a GPCR-hez kapcsolódó G-fehérjét [191].

Az enzimkapcsolt receptorok, hasonlóan a G-fehérjéhez kapcsolt receptorokhoz, transzmembrán fehérjék, amelyek ligandumkötő doménje a plazmamembrán külső felszínén helyezkedik el. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorokkal ellentétben azonban a citoszolikus doménjük vagy saját enzimaktivitással rendelkeznek, vagy közvetlenül kapcsolódik egy enzimhez. Ezen receptorok minden alegysége általában csak egyetlen transzmembrán szegmással rendelkezik. A sejtek növekedését, osztódását, differenciálódását vagy túlélését elősegítő extracelluláris ligandumokra adott válaszreakciókban betöltött szerepük alapján ismerték fel őket. Jelenleg 6 osztályát azonosították az enzimkapcsolt receptoroknak: receptor tirozin-kinázok, tirozin-kináz asszociált receptorok, receptorszerű tirozin-foszfátázok, receptor szerin/treonin kinázok, receptor guanilil-ciklázok és a hisztidin-kináz asszociált receptorok, amelyek mindegyike széleskörű funkciókat lát el. Ezek közül a legnépesebbek a receptor-tirozin-kinázok, amelyek az ATP felhasználásával katalizálják a célfehérjék kiválasztott tirozin oldalláncainak foszforilációját [192]. A tirozin-kináz asszociált receptorok olyan intracelluláris fehérjékhez kapcsolódnak, amelyek tirozin-kináz aktivitással rendelkeznek (maguknak a receptoroknak nincs enzimikus aktivitásuk, de olyan fehérjékhez kötődnek, amelyeknek van). A receptor-tirozin-kinázokkal ellentétben a receptorszerű tirozin-foszfátázok foszfátcsoportokat távolítanak el meghatározott intracelluláris jelátviteli fehérjék tirozin aminosavairól. A receptor szerin/treonin kinázok foszforilálnak meghatározott szerin vagy treonin aminosavakat tartalmazó, nyugalomban lévő (latens) génszabályozó fehérjéken. A receptor guanilil-ciklázok közvetlenül katalizálják a ciklikus GMP (cGMP) képződését a citoszolban. Végül a hisztidin-kináz asszociált receptorok egy úgynevezett „kétkomponensű” jelátviteli útvonalat aktiválnak, amely során a kináz először saját magát foszforilálja egy hisztidin aminosavon, majd az így keletkezett foszfátot azonnal áthelyezi egy másik intracelluláris jelátviteli fehérjére [193].

A sejtek adhéziója kritikus szerepet játszik a szövetek háromdimenziós szerkezetének kialakulásában és fenntartásában, valamint a szövetek fiziológiai működésében. Az adhéziót közvetítő biokémiai elemek többfehérjés komplexek, amelyek három fő makromolekulacsoportból állnak: az adhéziós receptorokból, az extracelluláris mátrix molekulákból és az adhéziós plakkfehérjékből [194]. Az adhéziós receptorok tipikusan transzmembrán glikoproteinek, amelyek az extracelluláris mátrix (ECM) molekulákhoz vagy más sejtek ellenreceptoraihoz kötődnek. Ezek a molekulák határozzák meg a sejt-sejt vagy sejt-ECM

kölcsönhatás specifikusságát. Az ECM fehérjék általában fibrilláris természetűek, és egy összetett szerkezeti és funkcionális hálózatot biztosítanak, amely egyszerre képes több sejtfelszíni receptorral kölcsönhatásba lépni. Továbbá, a sejtadhéziós komplexek működését pontosan szabályozzák a sejten belüli biokémiai események. Így a sejtadhéziós receptorok egyfajta csomópontot képeznek a kétirányú jelátvitelben a sejt és a külső környezete között [195]. A sejtadhéziós receptorok 4 csoportba sorolhatók: integrinek, kadherineknél, immunglobulin (Ig) sejtadhéziós szupercsalád és a szelektinek.

### **2.3.3.2 Tirozin-kináz receptorok**

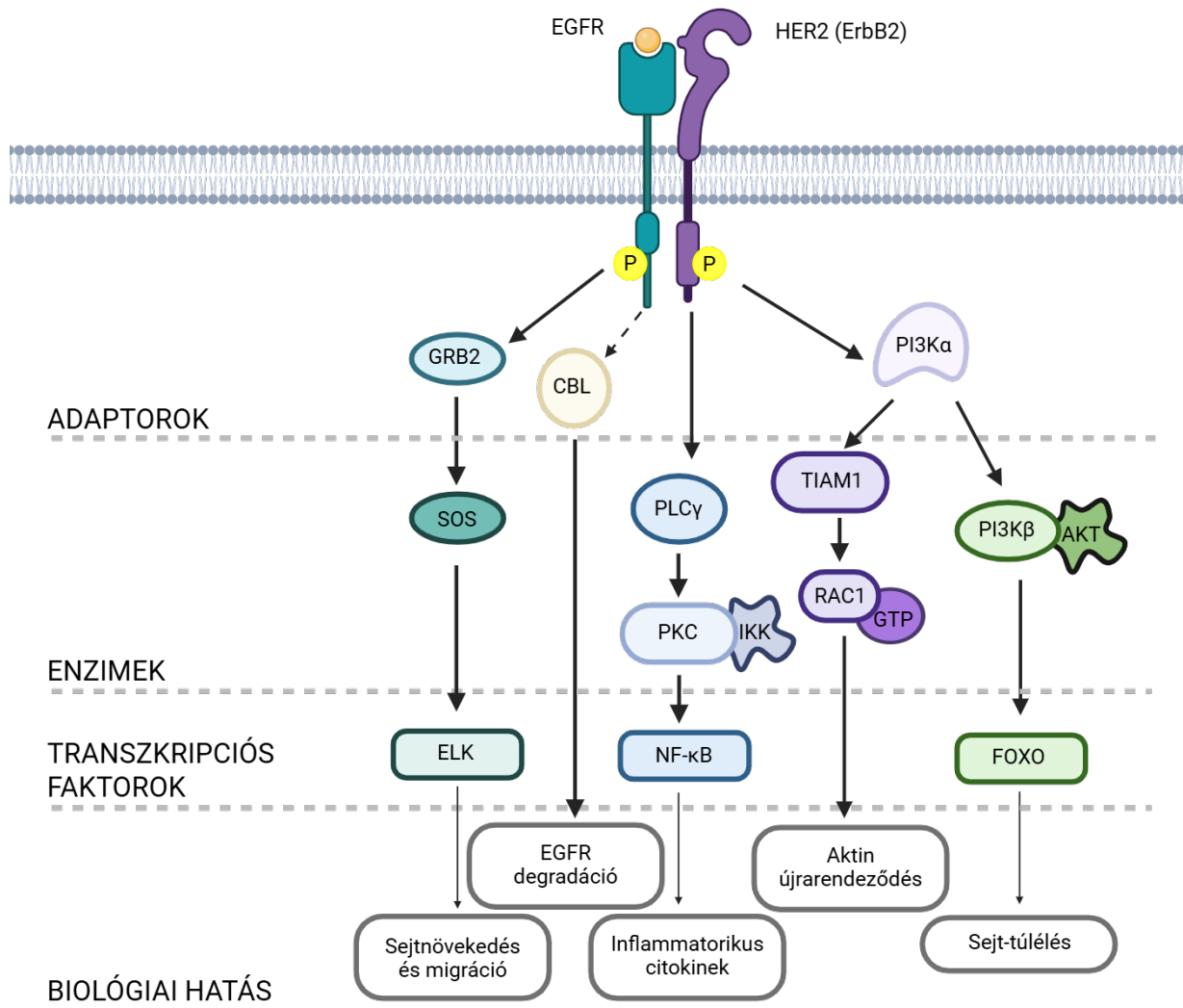
Ahogy korábbiakban is olvashattuk tirozin-kinázok olyan enzimek, amelyek szelektíven foszforilálnak tirozin oldalláncokat különböző szubsztrátfehérjéken. A EGFR, az első azonosított receptor tirozin-kináz, és az a felfedezés, hogy az Src onkogén rendelkezik transzformáló hatású, nem receptor tirozin-kináz típusú aktivitással [196], megnyitotta az utat a tirozin-kinázok szerepének és jelentőségének feltárásához a daganatok kialakulásában [197]. A Humán Genom Projekt feltérképezésével több mint 90 különböző tirozin-kinázt azonosítottak. Minél mélyebben tárja fel a tudomány a sejten belüli jelátvitel bonyolult mechanizmusait, annál világosabbá válik, hogy a tirozin-kinázok számos olyan sejtes jelátviteli hálózatban vesznek részt, amelyek közvetlenül hozzájárulnak a rák kialakulásához. Az összes ismert onkoprotein jelentős részét a tirozin-kinázok teszik ki, és számos daganattípusban transzformáló avagy daganatkeltő szerepet játszanak. Azon terápiás szerek azonosítása és kifejlesztése, amelyek a tirozin-kinázok rendellenes aktivációját (túlzott expresszió, mutáció vagy autokrin stimuláció következtében) és a következményes kóros onkogén jelátvitelt hivatottak gátolni, központi szerepet kaptak a rákterápiás célpontok kutatásában [198, 199]. A receptor tirozin-kinázok akkor aktiválódnak, amikor a ligandum kötődik a receptor extracelluláris doménjéhez. A ligandumok extracelluláris szignálmolekulák, például EGF, PDGF stb., amelyek receptor-dimerizációt váltanak ki. A különböző ligandumok eltérő mechanizmusokkal érik el a stabil dimer konformáció kialakulását: egyes esetekben egy ligandum két receptorhoz kötődik, így 1:2 arányú ligandum:receptor komplexet hoz létre, például a növekedési hormon és a hozzá tartozó receptor esetén. Más esetekben két ligandum molekula egyidejűleg kötődik két receptorhoz, így 2:2 arányú ligandum:receptor komplex alakul ki, és ez a legegyszerűbb módja a receptor-dimerizációnak, például VEGF és VEGFR esetén. A receptor-dimerizációt továbbá receptor–receptor kölcsönhatások is stabilizálhatják. A ligandum kötődése az extracelluláris doménhez stabilizálja az aktív dimerek kialakulását, ami végül a tirozin-kináz enzimaktivitás aktiválódásához vezet [192]. A tirozin-kinázokat

elsősorban két fő csoportba sorolják: receptor tirozin-kinázok (RTK), például az EGFR, PDGFR, FGFR, inzulinreceptor (IR) és a nem-receptortípusú tirozin-kinázok (NRTK) mint például a Src, Abl, Fak, Janus kináz. A receptor tirozin-kinázok nemcsak sejtfelszíni transzmembrán receptorok, hanem enzimek is, amelyek kináz aktivitással rendelkeznek. A receptor tirozin-kináz szerkezete a következő elemekből áll: egy több doménből álló extracelluláris ligandumkötő régió, amely a ligandumspecificitást biztosítja, egy egyszeres (single-pass) transzmembrán hidrofób hélix, valamint egy citoplazmatikus rész, amely tirozin-kináz domént tartalmaz. A kináz domén szabályozó szekvenciákat tartalmaz mind az N-terminális, mind a C-terminális végén [52, 200]. A receptor tirozin-kinázok aktivációja során a ligandum az extracelluláris doménhez kötődik, ezt követi a receptorok dimerizációja, amely lehetővé teszi a citoplazmatikus domén transz-foszforilációját. Mivel munkám során az EGF receptorcsaláddal foglalkoztam, ezeket a receptorokat mutatom be részletesen a következő fejezetben.

#### **2.3.3.2.1 Epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és az ErbB2**

Az epidermális növekedési faktor receptor az ErbB receptorcsalád tagja, amely a receptor tirozin-kináz szupercsaláddhoz tartozik. Az ErbB receptorcsalád négy tagból áll: EGFR (más néven ErbB1 vagy HER1), ErbB2 (Neu vagy HER2), ErbB3 (HER3) és ErbB4 (HER4) [201]. Az EGFR egyetlen transzmembrán doménnel rendelkező fehérje, amely a következő részekből áll: extracelluláris domén (ligandumkötő rész), transzmembrán domén, juxtamembrán (JM) szegmens, kináz domén, és egy C-terminális szabályozó „farok” [202]. Az EGFR 20 tirozin oldalláncot tartalmaz, amelyek közül 12 foszforilálódhat [203]. Ezek a foszforilált tirozinmaradékok különféle oldható vagy membránhoz horgonyzott effektorfehérjékhez kötődnek, amelyek a receptor aktivációja után kerülnek toborzásra [53, 204]. Az EGFR több jelátviteli útvonalat is aktivál: Ras/Raf/MAP kináz útvonal, foszfoinozítid-3-kináz (PI3K)/Akt útvonal, foszfolipáz C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) útvonal [205]. A receptor akkor aktiválódik, amikor különféle ligandumok kötődnek hozzá, például: epidermális növekedési faktor (EGF), transzformáló növekedési faktor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), amfiregulin (AREG), epigen,  $\beta$ -celulin, heparin-kötő EGF (HB-EGF), epiregulin [206]. A membránban található EGFR és HER2/ErbB2 receptorok ligandumkötése, dimerizációja és foszforilációja (P) aktiválja a receptorok tirozinkináz aktivitását. Az adaptor fehérjék GRB2, CBL, PI3K $\alpha$ , TIAM1 kapcsolják a receptorokat a sejten belüli jelátviteli fehérjékhez. Az SOS enzimatikus jelátvitel aktiválja ELK transzkripciósi faktort (RAS-MAPK útvonal). PLC $\gamma$   $\rightarrow$  PKC  $\rightarrow$  IKK  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B útvonal a gyulladáso

citokinek expressziójához vezet. A RAC1-GTP útvonal az aktin újrendeződését idézi elő. A PI3K $\beta$   $\rightarrow$  AKT útvonal gátolja a FOXO-t, elősegítve a sejt túlélését. A transzkripciós faktorok, mint ELK, NF- $\kappa$ B, FOXO a receptoraktivitás hatására szabályozzák a gének expresszióját. Ezek különböző biológiai hatásokat fejtenek ki, mint például sejtnövekedés és migráció (ELK), gyulladáscitokinek termelése (NF- $\kappa$ B), aktin citoskeleton újrendeződése (RAC1) és sejt túlélés (AKT/FOXO). Az útvonal végződik EGFR degradációval amikor a receptor internalizálódik és lebomlik, így negatív visszacsatolást biztosít. (8. ábra)



### 8. ábra: Az EGFR-HER2 receptorok jelátviteli útvonalai

Ez az ábra a HER2/EGFR (ErbB2/EGFR) jelátviteli útvonalakat mutatja be, a membránreceptorok aktivációjától a biológiai hatásokig.

Az epidermális növekedési faktor receptor volt az egyik első olyan receptor, amelynél a ligandum-indukált dimerizációt tekintették a transzmembrán jelátvitel molekuláris kulcsmechanizmusaként [207]. Az epidermális növekedési faktor egy 53 aminosavból álló polipeptid [208], amely az egyik legfontosabb tagja azon növekedési faktor családnak, amelyek

hatásukat egyetlen, 170 kDa tömegű plazmamembrán-receptoron keresztül fejtik ki. A szöveti EGF- és EGF-receptor-koncentrációkat a pajzsmirigyhormonok, az ösztrogén, a tesztoszteron és a növekedési hormon modulálják, ami arra utal, hogy a pajzsmirigy- és szteroid hormonok kiválasztott növekedési és fejlődési hatásait az EGF mediálhatja [209].

Fluoreszcens mikroszkópiával vagy más fluoreszcencia-alapú módszerekkel való vizsgálatok során gyakran használnak fluoreszcensen jelölt ligandumokat. A TAMRA-EGF egy fluoreszcensen jelölt epidermális növekedési faktor, amelyet a TAMRA (tetrametilrhodamin) nevű fluoreszcens festékkel jelölnek meg. Ez a molekula az EGF receptorhoz kötődik: az EGF fehérjét egy speciális, helyspecifikus módon beépített TAMRA nevű fluoreszcens aminosavval jelölik meg, ami lehetővé teszi a pontos fluoreszcens jelölést ezáltal az EGFR vizsgálatát [10].

Az ErbB2 egy transzmembrán tirozin-kináz, amelynek sejtfelszíni túlzott expressziója összefüggésben áll a tumorgenezissel és a rossz prognózissal emlőrákos betegek esetén. Az ErbB2 önmagában nem köt ligandumot, hanem a ligandum által aktivált testvér-receptorok preferált heterodimerizációs partnereként működik, hogy felerősítse a mitogén jelátvitelt. Az ErbB2 ezen sajátos tulajdonságai szerkezetileg az extracelluláris domén „nyitott” konformációjával magyarázhatók, amely az EGFR aktivált, ligandumhoz kötött állapotát utánozza [210]. Az ErbB2 endocitózisának magyarázatára két, egymással ellentétes modell alakult ki, amelyek egyaránt számot adnak annak túlzott mértékű sejtfelszíni kifejeződéséről és az EGFR-lebontás elleni protektív hatásáról. Az egyik modell szerint az ErbB2 hatékonyan recirkulál a bazális endocitózist követően, és az aktivált heterodimer EGFR-t is hasonló sorsra tereli [211]. A másik modell szerint az ErbB2-t tartalmazó dimerek a sejtfelszínen maradnak, és kizáródnak az endocitózisból [212]. Mindkét modell arra utal, hogy az ErbB2 endocitikus forgalma kulcsfontosságú a normál működés és esetleg a túlzott expresszió által kiváltott onkogenezis szempontjából, mégis egymásnak ellentmondó következtetéseket vonnak le arra vonatkozólag, miként csökkentheti a felszíni ErbB2 mennyiségét egy terápiás antitest vagy a geldanamycin (GA). Az első modell azt sugallja, hogy elegendő lehet az endoszomális szortírozás módosítása, míg a második modell szerint az endocitózis blokkját kell feloldani. Az azonban még nem tisztázott, hogy az antitestek vagy a GA az ErbB2 újraelosztását és lebontását fokozott endocitózis, a lizoszomális útvonal felé irányuló endoszomális szortírozás erősítése, vagy mindkettő révén idézik-e elő [213]. Bár az ErbB2 endocitózisának nagy jelentősége van a rákterápiában, keveset tudunk róla. Antitestvizsgálatok arra utaltak, hogy az ErbB2 hasonló módon képes indukálható endocitikus degradációra, mint az EGF által stimulált EGFR, azonban későbbi kiméra receptorokon végzett vizsgálatok kimutatták, hogy ebben az

értelemben az EGFR egyedülálló, és hogy minden más ErbB receptor – beleértve az ErbB2-t is – nem rendelkezik ilyen tulajdonsággal [214]. Bebizonyították, hogy az ErbB2 felszíni készlete nem statikus, hanem dinamikus: alap endocitózison megy keresztül, amit gyors és hatékony recirkuláció követ. Emellett funkcionálisan és ultrastrukturálisan is azonosították a GA hatásának helyét az ErbB2 endocitikus forgalmában, és kimutatták, hogy a GA kizárólag az endoszómából történő lizoszómális szortírozás javítása révén hat, anélkül, hogy befolyásolná a sejtfelszínről történő endocitózis sebességét [213].

#### 2.3.4 Ligandum kötődés

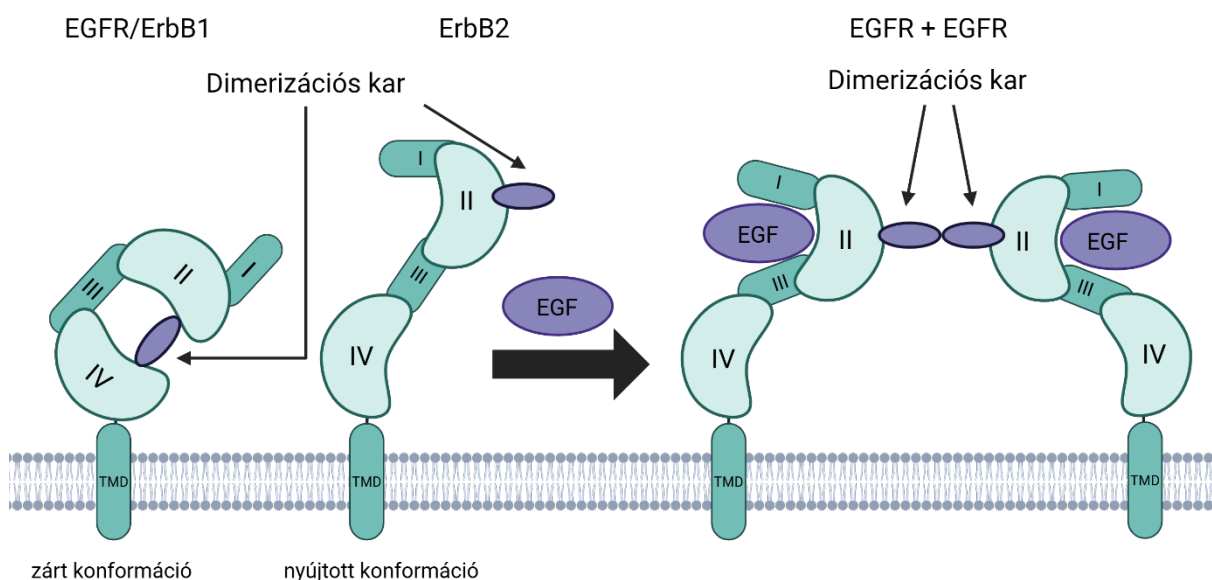
Két alapvetően eltérő megközelítés nagy hatást gyakorolt a ligandumkötés mechanizmusainak megértésére. Az első megközelítés az ún. indukált illeszkedés (induced fit), amely szerint a konformációs változások a kezdeti kötődést követően történnek meg, hogy optimalizálják a ligandum és célpont közti komplexet. A második megközelítés a konformációs szelekció (conformational selection), amely szerint a szabad célmolekula többféle konformációban létezik egyensúlyban, és a ligandum ezek közül választja ki a számára legmegfelelőbbet a kötődéshez [176]. A ligandum és egy biológiai makromolekula reverzibilis találkozásának és komplexképződésének magyarázatára tett első kísérlet Fischer [215] nevéhez fűződik, aki 1894-ben javasolta a „zár–kulcs” mechanizmust, amelyben a ligandum és a kötőhely szinte tökéletes alakbeli komplementaritást mutat. Ebben a modellben a ligandum és célpontja szerkezeti merevsége határozza meg a specificitás szabályait, és ez magyarázza meg, hogy miért változik a kötődési affinitás különböző ligandumok esetén ugyanazon célponthoz, vagy ugyanazon ligandum esetén különböző célpontokhoz való kötődéskor. Fischer eredeti elképzelése ma is releváns a gyógyszertervezésben, ahol a farmakológiai kiindulóvegyületeket fokozatosan merevítik, hogy elősegítsék a célfehérjével való alak-komplementaritást [216], és szintén ez az alapja a dokkolásnak is, amelyben egy flexibilis ligandumot kötnek *in silico* egy merev receptorhoz. Évtizedekkel később a tudományos közösség felismerte, hogy a biológiai makromolekulák természetüknél fogva rugalmasak, és a kötőhely alakjának megváltoztatásával befolyásolhatják a ligandumfelismerés energetikáját. 1951-ben Wyman és Allen radikálisan új magyarázatot javasolt a hemoglobin Bohr-effektusára, vagyis a pH és az oxigénkötő képesség kapcsolatára azáltal, hogy különböző, a fehérje számára hozzáférhető konformációkat vettek alapul [217]. Később Koshland kibővítette a zár–kulcs modellt oly módon, hogy figyelembe vette a kezdeti találkozás után bekövetkező konformációs változásokat, amely stabilabb komplexet eredményez. Ezt a mechanizmust nevezte el „indukált illeszkedésnek” (induced fit) [218]. Az allosztéria fogalmának kidolgozása [219, 220]

hamarosan a híres Monod–Wyman–Changeux-modell kialakulásához vezetett, amely eltérő ligandumkötő affinitással rendelkező alternatív konformációk közötti egyensúlyán alapul [221]. Ezen modell eleganciája a funkcionális viselkedés és a kooperativitás komplexitásából ered, amelyet a ligandumkötés és a konformációs átmenetek között létrejött egyszerű kapcsolat tesz lehetővé. A röntgenkrisztallográfia és a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) megjelenése szilárd alapokra helyezte a biológiai makromolekulák konformációs plaszticitását [222], valamint ennek relevanciáját a gyógyszertervezésben [223]. Az eredeti allosztérikus elmélet elismerésre méltó tartalmakkal bővült [224, 225], és ma már a fehérjekonformációk dinamikusságát is magába foglalja, amelyet a feltekeredés (folding) és ligandumkötődés (binding) során kialakuló állapotok sokasága hoz létre [222, 226].

#### **2.3.4.1 Ligandum indukált EGF-receptor dimerizációja és aktiválása**

Ahogy minden receptor-tirozinkináz, az EGFR-család tagjai is egy extracelluláris ligandumkötő doménből, egyetlen transzmembrán doménből, valamint egy citoplazmatikus doménből állnak, amely egy konzervált protein-tirozinkináz (PTK) magot tartalmaz, szabályozó szekvenciákkal körülvéve. Az EGFR-család extracelluláris doménje négy alegységből áll, amelyeket I., II., III. és IV. doménként, vagy más elnevezéssel L1, S1, L2 és S2 doménként jelölnek. Feltételezések szerint az I. és III. domén alkotja az EGFR ligandumkötő helyét, míg az extracelluláris domén más részei a receptor dimerizációját és más membránfehérjékkel való kölcsönhatásait segítik elő [227]. Az EGFR dimerizációjához két monomer EGF-molekula kötődése szükséges két EGFR-molekulához, így alakul ki a 2:2 arányú EGF:EGFR komplex, amely stabil 1:1 EGF:EGFR köztes komplexekből jön létre [228]. Korábban két modell is született arra, hogyan váltja ki az EGF a receptor dimerizációját. Az egyik modell szerint az EGFR dimerizációját az EGF kétkötőhelyes (bivalens) jellege közvetíti az EGFR felé, azaz az EGF két különböző EGFR-molekulához kötődik, ezzel hozva létre a dimert [229]. Ez alapján azt feltételezték, hogy az EGFR homodimerizációját, valamint az ErbB3 és ErbB4 heterodimerizációját az EGFR-család többi tagjával szintén az EGF bivalenciája közvetíti. Azonban az említett [228] tanulmányban bemutatott kristályszerkezetek, amelyek az EGFR-t EGF- vagy TGF $\alpha$ -komplexben mutatják, kizárják ezt a mechanizmust. Mindkét szerkezet szerint minden egyes ligandum (EGF vagy TGF $\alpha$ ) kizárólag egyetlen EGFR-molekulához kötődik, és a dimerizáció teljes mértékben a receptorok közötti kölcsönhatások révén valósul meg. A kristályszerkezetek inkább a „receptor-mediált” dimerizációs mechanizmust támasztják alá [228], mely szerint az EGF kötődése olyan konformációváltozást idéz elő az EGFR-ben, amely felfedi a receptor-receptor kölcsönhatási

helyet az extracelluláris doménen belül. Az ErbB extracelluláris régióinak különböző aktivációs állapotokban készült röntgenkristallográfiás szerkezetei jelentősen hozzájárultak annak megértéséhez, hogyan segíti elő a ligandumkötés a receptor dimerképződését és aktivációját [230]. A dimerképződést teljes mértékben receptor–receptor kölcsönhatások hajtják, ahol a ciszteinben gazdag II-es doménben található kritikus „dimerképző kar” biztosítja az interfész érintkezéseinek nagy részét [231, 232]. Ligandum hiányában, azaz monomer receptor esetén, ez a dimerképző kar egy intramolekuláris „horgonyban” rejtve marad, mivel a IV-es doménnel lép kölcsönhatásba ugyanazon molekulán belül [233, 234], így a receptor dimerképződését „autoinhibíció” akadályozza [235]. Az aktiváló ligandumok két különálló kötőhelyet hidálnak át a receptoron (az I-es és a III-as doménen), és jelentős doménátrendeződést váltanak ki a receptor extracelluláris régiójában (9. ábra). Ennek egyik kulcskövetkezménye az autoinhibitorikus intramolekuláris horgony megszakítása és a dimerképző kar felszabadítása. Bár a dimerképző kar felszínre kerülése kétségtelenül kritikus része az ErbB-receptor aktivációs mechanizmusának, önmagában nem elegendő. Azok a mutációk, amelyek megszakítják a II-es és IV-es domének közötti intramolekuláris horgonyt, nem aktiválják az EGFR-t [234].



### 9. ábra: Az EGFR dimerizációja

Az ErbB család ábrán szereplő két tagja azonos doménszerveződést követ zárt és nyújtott szerkezetben. A bal oldalon látható monomer EGFR a ligand hiányában lévő receptor szerkezetét mutatja, amelyben a dimerizációs kar a fehérjén belül van eltemetve, és intramolekuláris hidat képez a II. és IV. domén között. Amikor a ligandumok az I. és III. doménhez kötődnek, kialakul a ligandkötő zseb és felszabadul a dimerizációs kar, amely így készen áll arra, hogy intermolekuláris hidat képezzen egy másik EGFR-rel, amelynek extracelluláris doménje szintén ezt a nyújtott konformációt veszi fel (a jobb oldali dimer struktúra).

Továbbá a IV-es domén eltávolítása. és ezáltal a dimerképző kar szabaddá tétele nem okoz ligandumfüggetlen dimerképződést az EGFR extracelluláris régiójában [236]. Ezért szükség van további, ligandum által kiváltott változásokra, amelyek elősegítik és stabilizálják a receptor dimerképződését. Két, EGF által elfoglalt EGFR-monomer képes dimerizálódni. Ismert, hogy az EGFR, EGF-stimulációjának hatására heterodimerizációra képes az ErbB2, ErbB3 vagy ErbB4 receptorokkal, ami ezek tirozin-foszforilációjához vezet. [237].

Az EGFR dimerizációjának receptor-mediált mechanizmusa egyszerű modellként írja le az EGFR család homodimerjeinek és heterodimerjeinek kialakulását. A dimerizációs hurok elsődleges szerkezetének vizsgálata azt mutatja, hogy ez a szakasz erősen konzervált az EGFR család minden tagjában. Továbbá, a dimerizációs hurkok kulcsfontosságú aminosavainak konzerváltsága az egyes ErbB receptorok között arra utal, hogy ez az interakció kellően „promiszkuitásra képes” lehet, vagyis lehetővé teszi heterodimer kialakulását a különböző ErbB receptorcsalád-tagok között. Arra a következtetésre jutottak, hogy az ErbB2 preferált partnere a heterodimerizációnak az EGFR család minden tagja esetében [237]. Ez a jelenség egyik lehetséges magyarázata az, hogy az ErbB2 úgy fejlődött, mint egy ligandum nélküli RTK (receptor-tirozinkináz), amelynek dimerizációs hurokja állandóan nyitott, aktív konformációban van jelen. Ez lehetővé tenné az ErbB2 ligandum nélküli homodimerizációját, illetve heterodimerizációját az EGFR család más tagjaival, miután azok ligandumkötés hatására konformációs változást szenvednek el a saját dimerizációs hurokjukban. Ez a mechanizmus okozhatja az ErbB2 magas aktivitását azokban a humán ráksejtekben, amelyek túlexpresszálják az ErbB2-fehérjét. Az aktivációs hurok aktív konformációja miatt a dimerizáció már pusztán az ErbB2 magas koncentrációja révén is létrejöhet, még ligandumkötés nélkül is, ami a PTK aktivitás fokozódását és a sejtek transzformációját (rákos átalakulását) eredményezheti [238]. A dimerizációs hurok által közvetített dimerizációs mechanizmus kulcsszerepet játszhat az EGFR és más családtagok PTK aktivitásának szabályozásában. Ennek megfelelően az EGF által kiváltott receptor-mediált dimerizáció elősegíti az intermolekuláris autofoszforilációt, ami a PTK domént aktív állapotban tartja. Ez a mechanizmus magyarázatot adhat arra is, hogy az ErbB2 túlzott expressziója miért vált ki erőteljes PTK aktivációt: mivel az ErbB2 dimerizációs hurokja állandóan aktív konformációban van, túlzott expresszió esetén a receptor spontán módon dimerizálódik, ami transz-autofoszforilációt és további PTK aktivitásfokozást eredményez [238].

### **2.3.5 Koncentráció gradiens kialakulása**

Az alapvető egyenletek, amelyek a farmakológiai paraméterek, például egy ligandum célreceptorhoz való kötődési affinitásának meghatározására szolgálnak, azt feltételezik, hogy a ligandum szabadon diffundál és homogén eloszlású, vagyis a receptor közvetlen közelében a koncentráció megegyezik a tömeges (bulk) vizes fázis koncentrációjával. Ugyanakkor ismert, hogy a gyógyszerek képesek közvetlenül kölcsönhatásba lépni a plazmamembránnal, ami potenciálisan növelheti a helyi ligandum-koncentrációt a receptor körül [239]. Továbbá azokról a ligandumokról, amelyek képesek beépülni a lipid kettős rétegbe, felvetették, hogy magasabb helyi ligandum-koncentrációt okozhatnak a membránban [240]. A ligandum membránbeli „raktárakból” való diffúziója, valamint a ligandum-membrán/víz határon történő kölcsönhatások szintén hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a ligandum koncentrációja a membrán közvetlen közelében magasabb legyen, mint a tömeges vizes fázisban, bár ilyen meghatározott helyi koncentrációkat csak egy-két tanulmány vizsgált az eddigiek során. Közéjük tartozik Karolina Gherbi kutatása [241], ahol azt a hipotézist vizsgálták, miszerint a helyi gyógyszerkoncentrációk magasabbak lehetnek, és kvantitatív módon mérték a fluoreszcens propranolol-származék, a BODIPY630/650-PEG8-S-propranolol (BY-propranolol) koncentrációját közvetlenül a sejthártya felett, valamint a tömeges vizes fázisban, fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópia (FCS) segítségével. Az FCS a fluoreszcens részecskék, egy kis (~0,25 fL) konfokális térfogaton keresztüli diffúziója közben fellépő fluoreszcencia-intenzitás ingadozásait detektálja időben, és ezeknek az ingadozásoknak az autokorrelációs elemzése lehetővé teszi a vizsgált fluoreszcens molekulák koncentrációjának és diffúziós együtthatójának meghatározását. Arra az eredményre jutottak, hogy az egyedi CHO sejtek membránja közvetlen közelében a BY-propranolol koncentrációja lényegesen magasabb, mint a tömeges oldatban, és hogy ezek a koncentrációk a  $\beta$ 2-adrenoceptor jelenlététől is függenek.

## **2.4 Biofizikai módszerek a membránvizsgálatokban**

### **2.4.1 Fluoreszcens mikroszkópia: konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia (CLSM)**

A festetlen biológiai minták hagyományos fénymikroszkópos vizsgálata sem a specificitás, sem a kontraszt tekintetében nem ad kielégítő eredményt. A hagyományos szövettani (pl. hematoxilín-eozin) vagy az immunhisztokémiai festések jelentősen javítják a fénymikroszkópos technika teljesítményét, de mind a specificitás, mind az elérhető biológiai feloldóképesség tekintetében a fluoreszcens mikroszkópia bevezetése hozott lényegi változást.

A fluoreszcens mikroszkópia azon alapul, hogy a fluorofórokat egy meghatározott hullámhosszúságú fény gerjeszti, amelynek hatására hosszabb hullámhosszon bocsátanak ki fényt. Sávszűrők segítségével kiszűrhető a gerjesztő fény a látómezőből, így a fluoreszcens minták által kibocsátott fény célzottan észlelhető a detektor által. A fluoreszcens mikroszkópiában a specifikus jelölést fluoreszcens fehérjék vagy fluoreszcens jelzett specifikus jelölőanyagok (pl. antitestek) használatával érik el.

Ellentétben a hagyományos széles látómezejű fény-mikroszkópiával, ahol az egész preparátum egyenletes megvilágítást kap, a CLSM esetében egyszerre csak a minta egy kis része kerül megvilágításra. A CLSM egy lézersugarat használ fényforrásként, amelyet egy diffrakció limitált pontra fókuszálnak a mintában. Bár a megvilágító fény egy adott pontra fókuszált, a fókusz sík fölötti és alatti síkok is megvilágításra kerülnek kisebb intenzitással. A fókusz síkban levő fluorofórok által kibocsátott fény egy konjugált képsíkra fókuszálódik vissza a mikroszkóp pásztázó fejében, ahol a tűszúrásnyi lyuk („pinhole”) helyezkedik el. A konfokális pozícióban elhelyezett tűszúrásnyi lyuk („pinhole”) segítségével a mikroszkóp blokkolja a fókusz síkon kívülről érkező fénysugarakat, így csak a minta egyetlen vékony optikai szeletéből, a fókusz síkból gyűjti össze a fényt, ami növeli a kontrasztot és csökkenti az elmosódottságot. A pinhole-on átjutott fénysugarak egy fotodetektorba (PMT, fotonelektron-sokszorozó) jutnak, amely a fotonokat elektromos jellé alakítja, és így meghatározza a detektált fény intenzitását. Egy kétdimenziós kép létrehozásához a gerjesztési pontot végigpásztázzák a mintán, és a kibocsátott fényt soronként, pontonként észlelik. Minden pont egy pixelt képvisel a végső képen, és minden pixelhez tartozik egy intenzitásérték. Az intenzitásokat különböző szürkeárnyalatokkal (vagy ál-színekkel) lehet megjeleníteni, így szemmel látható minőségi információt adnak. A konfokális mikroszkóppal készült képek nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív információkat is nyújthatnak, mivel a kép valójában egy intenzitásértékekből álló mátrix vizuális megjelenítése [242]. A CLSM technikák számos biológiai és biomedicinális kutatási területen áttörést jelentettek: specifikus fluoreszcens próbák alkalmazása révén, lehetővé teszik az egyes komponensek, sejtalkotók vagy akár bizonyos folyamatok jelenlétének, állapotának és térbeli elrendeződésének egyidejű leképezését. A konfokális mikroszkópok több lézerrel, ill. többvonalas lézerekkel vannak felszerelve, amelyek lehetővé teszik a gerjesztő hullámhosszok széles skálájának alkalmazását. Emellett a mikroszkópok többféle emissziós szűrővel is rendelkeznek, amelyek különböző fluorofórokhoz illeszkednek. Ezek a szűrők vagy szűk hullámhossztartományt engednek át növelve ezzel a specificitást, vagy szélesebb tartományokat, ami növelheti a detektálás érzékenységét. Egy mintát egyszerre többféle fluoreszcens festékkel is megjelölhetünk, amely rendkívül hatékony módszer, fontos

kritérium, hogy az egyes fluoreszcens jelek egyértelműen megkülönböztethetők legyenek egymástól. A fényút konfigurációja négy fő komponensből áll: az objektív, a lézervonalból, a dikroikus tükörből és az emissziós sávszűrőből vagy a detektált emissziós hullámhossztartományból. A dikroikus tükröt arra használják, hogy a gerjesztőfényt visszaverje, és az objektív felé irányítsa, ugyanakkor a hosszabb hullámhosszú emittált fényt átengedje, hogy az elérje a detektorokat. Ezért a kísérleti elrendezéstől függően a megfelelő dikroikus tükröt kell kiválasztani, amely illeszkedik a kiválasztott lézervonal(ak)hoz. Emellett az emissziós sávszűrőket vagy a detektált emissziós hullámhossztartományt is gondosan kell kiválasztani, mivel ezek határozzák meg, hogy a kibocsátott fény mely hullámhossztartományai jutnak el a detektorhoz, azaz a képalkotáshoz. Fontos szempont a fókuszszík kiválasztása a képalkotáshoz. Az egyik legjelentősebb paraméter a lézer intenzitása: a lehető legalacsonyabbnak kell lennie annak érdekében, hogy minimalizáljuk a fotoelhalványítást (photobleaching) és a fluorofórok telítődését, miközben elegendő jel-zaj arányt biztosítunk a képelemzéshez. Ha növeljük a lézerteljesítményt, akkor azzal a fluoreszcens mintát érő energiát is növeljük, azonban ez azzal a hátránnyal jár, hogy fokozódik a fotoelhalványítás. Ez különösen nagy problémát okozhat a kvantitatív elemzéseknél, mivel a jel intenzitása folyamatosan csökkenhet a képalkotás során. Kvantitatív elemzés esetén elengedhetetlen, hogy a lézerteljesítmény konstans maradjon a teljes mérés során, mivel a lézer intenzitása közvetlenül befolyásolja a fluorofórok által kibocsátott fény mennyiségét.

Egy másik meghatározó paraméter, amely a konfokális mikroszkópia alapja: a pinhole mérete. Csökkentése élesebb képet eredményez, mivel kevesebb fókuszon kívüli fény jut el a detektorhoz, viszont ezzel csökken a jel intenzitása. A javasolt beállítás általában 1 *AU* (Airy unit), mivel ez jó kompromisszumot nyújt a kizárt fókuszon kívüli fény mennyisége és a detektorba jutó jel erőssége között. A pinhole átmérőjét Airy-egységekben (*AU*) adják meg. Az 1 Airy egység definíciója a következő:

$$1 \text{ AU} = \frac{0.61 \lambda M}{NA}$$

ahol  $\lambda$  a fény hullámhossza,  $M$  a teljes nagyítás,  $NA$  az objektív numerikus apertúrája [243]. A pinhole mérete 1 *AU* fölé is növelhető, hogy több fény jusson a detektorhoz, azonban a kép kevésbé lesz éles, mivel több fókuszon kívüli fény is bekerül. A lézerpasztázó konfokális mikroszkópia számos biológiai minta elemzéséhez kínál vizsgálati módszereket, továbbá nagyfelbontású, háromdimenziós képek készíthetők, ezáltal ideális a precíz, kvantitatív elemzésekhez is.

### 2.4.2 Förster féle rezonancia energiatranszfer (FRET)

A Förster típusú rezonancia energiatranszfer (FRET) egy távolságfüggő fizikai folyamat, amely során az energiát sugárzásmentesen egy gerjesztett fluorofór, a donor, átadja egy másik fluorofórnak, az akceptornak intermolekuláris, hosszú távú dipól–dipól kölcsönhatás révén. A FRET lejátszódásához az alábbi feltételek teljesülése kulcsfontosságú:

- a donornak magas kvantumhatásfokkal kell rendelkeznie,
- a donor emissziós spektruma fedjen át az akceptor abszorpciós spektrumával (minél nagyobb az átfedés, annál nagyobb a FRET mértéke). Ezt az ún. átfedési integrállal ( $J$ ) jellemezzük. Ökölszabályként elmondható, hogy a donor kibocsátási spektruma legalább 30%-ban át kell fedjen az akceptor gerjesztési spektrumával a hatékony energiaátvitel érdekében.
- a donor elektromos mezője és az akceptor abszorpciós dipólus vektora közel párhuzamosan helyezkedjen el. Ezt az orientációs faktorial ( $\kappa^2$ ) jellemezzük, melynek értéke 0-4 között változik. A FRET hatékonyság akkor a legnagyobb, amikor a két vektor párhuzamos egymással ( $\kappa^2 = 4$ ). A transzfer mértéke csökken, ha a két vektor közötti szög növekszik. Ha a két vektor közötti szög  $90^\circ$ , a FRET akkor sem fog lejátszódni, ha a többi feltétel egyébként teljesül.
- feltétel továbbá, hogy a donor és akceptor közötti távolságnak 1-10 nm között kell lennie [244].

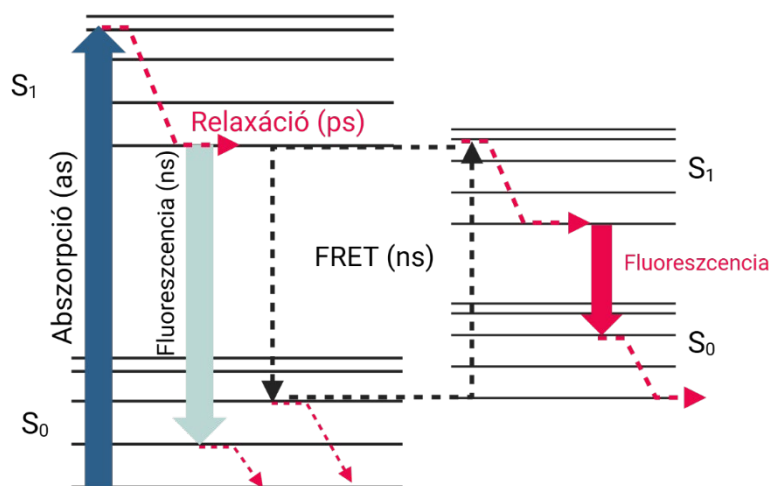
A FRET vizsgálatokban rendkívül sokféle donor-akceptor párt használnak. A fluorofórok kiválasztásánál fontos szempontok közé tartozik, hogy a gerjesztési spektrumok megfelelően elkülönüljenek a donor szelektív gerjesztése érdekében. Az emissziós spektrumoknak is megfelelően el kell térniük egymástól, hogy az egyes fluorofórok fluoreszcenciája külön-külön mérhető legyen. A hagyományos heterotranszfer FRET vagy a hetero-FRET jelenség akkor következik be, amikor egy gerjesztett donor kromofórjának emissziós spektruma átfedésben van egy kémiaiilag és spektroszkópiailag eltérő akceptor kromofór abszorpciós spektrumával. Gyakran előforduló tévhit, hogy a FRET kialakulásához a két fluorofórnek spektroszkópiailag el kell térnie egymástól. A FRET spektroszkópiailag azonos molekulák között is lejátszódhat, bár feltételekhez szabott: kis mértékű Stokes-eltolódással kell rendelkezniük, vagyis kis eltolódásnak kell létrejönnie az excitációs és emissziós csúcsok között. Ezt a folyamatot homo-FRET-nek nevezzük.

Számos fotofizikai megnyilvánulása miatt több kísérleti technika is rendelkezésre áll a FRET hatékonyságának kimutatására:

- szenitizált emisszió: a donor gerjesztési hullámhosszán történő gerjesztést követően az akceptor emittál
- donor kioltás: a FRET miatt csökken a donor fluoreszcencia intenzitása és fluoreszcencia élettartama
- a donor fluoreszcencia polarizációjának változása: a csökkent donor fluoreszcencia élettartam miatt növekszik a donor fluoreszcencia anizotrópiája
- lassúbb donor fotoelhalványítás: ennek oka az, a FRET miatt csökken a gerjesztett állapotban levő donorok száma, és így a gerjesztett állapotból induló fotoelhalványítás sebessége is.

Homo-FRET esetében a donor és az akceptor spektroszkópiailag megkülönböztethetetlen, így az anizotrópia mérése az egyetlen alkalmazható módszer kimutatására [245].

A donor és akceptor gerjesztésének szempontjából a FRET lefolyásának leegyszerűsített modelljét a Jablonski diagram (10. ábra) foglalja össze.



### 10. ábra: Jablonski diagram

A diagram az elektronok energiaszintjeinek és a szintek közötti átmenetek folyamatát mutatja be. Az energiaátadási folyamatot úgy szemlélteti, hogy a donor fluorofór gerjesztett állapotából egy sugárzásmentes, de irányított energiaátmenetet rajzol az akceptor fluorofór gerjesztett állapotába. Így az akceptor képes fluoreszcenciát kibocsátani, miközben a donor fluoreszcenciája csökken. Egy fluorofór gerjesztés során foton nyel el, aminek hatására az elektron egy magasabb energiájú, gerjesztett állapotba kerül. Innen az elektron különböző módokon térhet vissza az alapállapotba: történhet sugárzásmentes relaxáció, fluoreszcencia emisszió, vagy a FRET esetében az energia közvetlenül egy közeli akceptor fluorofórra adódik át dipólus-dipólus kölcsönhatás révén.

A FRET hatékonyság jellemzésére az energiatranszfer hatásfokot ( $E$ ) használjuk, amely leírja a FRET által relaxálódott donorok arányát az összes gerjesztett donor molekulához képest. Ez függ a donor és akceptor közötti távolság ( $R$ ) negatív hatodik hatványától, amit a Förster-egyenlet egyenlet ír le:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

ahol  $R_0$  az a távolság, ahol az  $E=0,5$ . Ha a donor-akceptor távolság  $R_0$ -al egyenlő, akkor 50% az esélye annak, hogy a gerjesztett donor energiája átadódik egy akceptornak. Ez a távolság általában 3-6 nm között van. Ahogy a távolság nő a donor és az akceptor között, az energiatranszfer hatásfokának értéke csökken [244, 246]. Förster elmélete szerint a FRET sebességi állandója ( $k_{FRET}$ ) és hatásfoka ( $E$ ) az alábbi képletekkel írhatók le:

$$k_{FRET} = const J n^{-4} R^{-6} \kappa^2$$

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_{f(D)} + k_{nf(D)}}$$

ahol a  $k_{f(D)}$  a donor fluoreszcencia emisszió sebességi állandója és a  $k_{nf(D)}$  a donor egyéb, nem fluoreszcens sebességi állandóinak összege. Az  $R$  a donor és akceptor molekulák közötti távolság, és a  $\kappa^2$  az orientációs faktor, amit a donor emissziós dipólusa és az akceptor abszorpciós dipólusa által bezárt szög határoz meg. További paraméter még az  $n$ , ami a közeg törésmutatóját adja meg, és a  $J$  átfedési integrál, amit a donor emissziós spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma határoz meg [247].

A FRET pontosan mérheti a molekulák közötti távolságot angström nagyságrendben (10–100 Å), ami érzékennyé teszi a technikát különféle biológiai jelenségek vizsgálatára, amelyek molekuláris közelség változását eredményezik [248]. A fénymikroszkópos képalkotás technológiai fejlődése, valamint a genetikai úton kódolt fluoreszcens fehérjék elérhetősége lehetővé teszi a fehérjék térbeli és időbeli eloszlásának megfigyelését élő sejtekben [249]. A FRET számtalan mérőműszerrel vizsgálható, melyek közül biológiai szempontból kiemelendő a mikroszkópos képalkotás és az áramlási citometria. Az áramlási citometriás FRET (FCET) mérések előnye az, hogy rövid idő alatt nagy sejtpopulációt tudunk megvizsgálni, addig a mikroszkópos megközelítés lehetőséget ad arra, hogy sejten belüli részleteket megfigyeljünk, illetve pixelenkénti elemzéssel FRET értékeket hasonlíthassunk össze más fluoreszcensen jelölt biológiai információval [250].

### 2.4.3 Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS) a fluktuáció-disszipáció tételén alapul. Információt nyújt a fluoreszcens molekulák kinetikai és termodinamikai tulajdonságairól oldatban. A mért fluoreszcencia fluktuációk időbeli relaxációja a kinetikai, míg a fluktuációk amplitúdója a termodinamikai jellemzőket tárja fel. Korábban ezeket a paramétereket a relaxációs technikákkal lehetett leírni, amelyeket Manfred Eigen fejlesztett ki [251]. A relaxációs technikák esetében a rendszer hőmérsékletét, nyomását vagy elektromos mezejét tekintve változáson esik át és az egyensúlyi állapotba való visszatérés folyamata ad információt a rendszer reakciókinetikájáról. Ezzel szemben az FCS ezeket az együtthatókat olyan rendszerekben határozza meg, amelyek állandósult állapotban vannak akár egyensúlyi vagy nem-egyensúlyi állapotról legyen szó. Bár ezekben a rendszerekben az átlagos koncentráció térben és időben hosszú ideig állandó marad, a rendszer egyes helyein spontán fluktuációk lépnek fel a Brown-mozgás (térbeli mozgás) és a kémiai reakciók (Poisson-folyamat) következtében. A molekulák tehát folyamatosan be- és kiáramlanak a rendszer egy adott kis térfogatából, ezáltal fluktuációkat okozva a helyi koncentrációjukban, és fluoreszcens molekulák esetén, fluktuációt idéznek elő az adott térfogatrészből mért fluoreszcencia jelben is. Egy kémiai reakciórendszer reaktánsainak koncentrációi is fluktuálnak az egyensúlyi értékük körül, és ha a reakció fluoreszcencia változással jár, ez szintén fluoreszcencia fluktuációkhoz vezet. Ezek a fluktuációk sztochasztikusak, és időben és térben egyediek, vagyis nem ismétlődnek pontosan. Emiatt nem lehet pontosan meghatározni például egy transzport-együtthatót vagy egy kémiai reakciósebességi állandót egyetlen fluktuáció megfigyelésével. Ennek ellenére a fluktuációk lecsengési sebességét átlagosan ugyanazok a fenomenológiai transzport-együtthatók és reakciósebességi állandók határozzák meg, amelyek a makroszkopikus dinamikai folyamatokat is vezérlik [252]. Az együtthatók meghatározásához statisztikai elemzésre van szükség: a fluoreszcenciafluktuációs autokorrelációs függvény,  $G(\tau)$ , írja le azt, hogy a fluoreszcens jel mennyire korrelál saját magával egy adott  $\tau$  időeltolás esetében:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle \langle F(t) \rangle} - 1$$

A  $F(t)$  a  $t$  időpillanatban/mérési időintervallumban detektált fluoreszcencia intenzitás,  $\langle \rangle$  az időbeni átlagolást jelöli egy hosszú (elvileg végtelen) időtartamon, így képlet számlálója azt mutatja, hogy az egy adott időben mérhető intenzitás és a  $\tau$  idővel később mérhető intenzitás szorzatának mennyi az átlaga. Minél rövidebb a  $\tau$  időtartam, annál jobban korrelál a két

intenzitás egymással, és annál nagyobb lesz az autokorrelációs függvény értéke. A  $\tau$  időtartam növekedésével egyre nagyobb a valószínűsége, hogy a  $\tau$  időtartam alatt a fluoreszcens molekulával történt valami olyan, ami a fluoreszcencia intenzitást befolyásolja (pl. a molekula kitudfundált a konfokális térfogatból vagy fizikokémiai átalakulás során sötét állapotba került). Így a  $\tau$  növekedésével az autokorreláció mértéke csökken. Matematikai megfontolásokból következik, hogy nagy  $\tau$  értékek esetében a  $G(\tau)$  értéke nem nullához, hanem egyhez tart, míg  $\tau=0$  esetében értéke

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N}$$

ahol  $N$  a konfokális térfogatban levő fluoreszcens molekulák átlagos száma. Azt, hogy a  $\tau=0$  és  $\tau=\infty$  között az autokorrelációs függvény, hogy viselkedik, az határozza meg, hogy milyen folyamat okozza az autokorreláció csökkenését. Munkám során kétféle folyamatot vettem figyelembe: egykomponensű szabad diffúzió és triplet állapot. Ezen két jelenség esetében az autokorrelációs függvényt az alábbi egyenlet adja meg:

$$G(\tau) = \left(1 - T + T e^{-\tau/\tau_{triplet}}\right) (N(1 - T))^{-1} \left(1 + \tau/\tau_d\right)^{-1}$$

ahol  $N$  a fluoreszcens részecskék átlagos száma a konfokális detektálási térfogatban,  $T$  a triplett állapotban lévő fluorofórok aránya,  $\tau_{triplet}$  a triplett korrelációs idő és  $\tau_d$  a diffúziós korrelációs idő. A fenti egyenlet illesztéséből a kísérletek értelmezése szempontjából a két legfontosabb paraméter a részecskeszám ( $N$ ) és a diffúziós korrelációs idő. A részecskék konfokális térfogatra jutó számát moláris koncentrációkra számoltuk át, a konfokális térfogatra ( $V_C$ ) vonatkozó, alábbi kifejezéssel:

$$V_C = \pi^{3/2} \kappa \omega^3$$

Ahol  $\kappa$  az axiális és radiális sugár aránya,  $\omega$  a laterális sugár.

A diffúziós együtthatót ( $D$ ) a diffúziós korrelációs időből határoztuk meg a következő egyenlet alapján:

$$D = \frac{\omega^2}{4\tau_d} \quad (1)$$

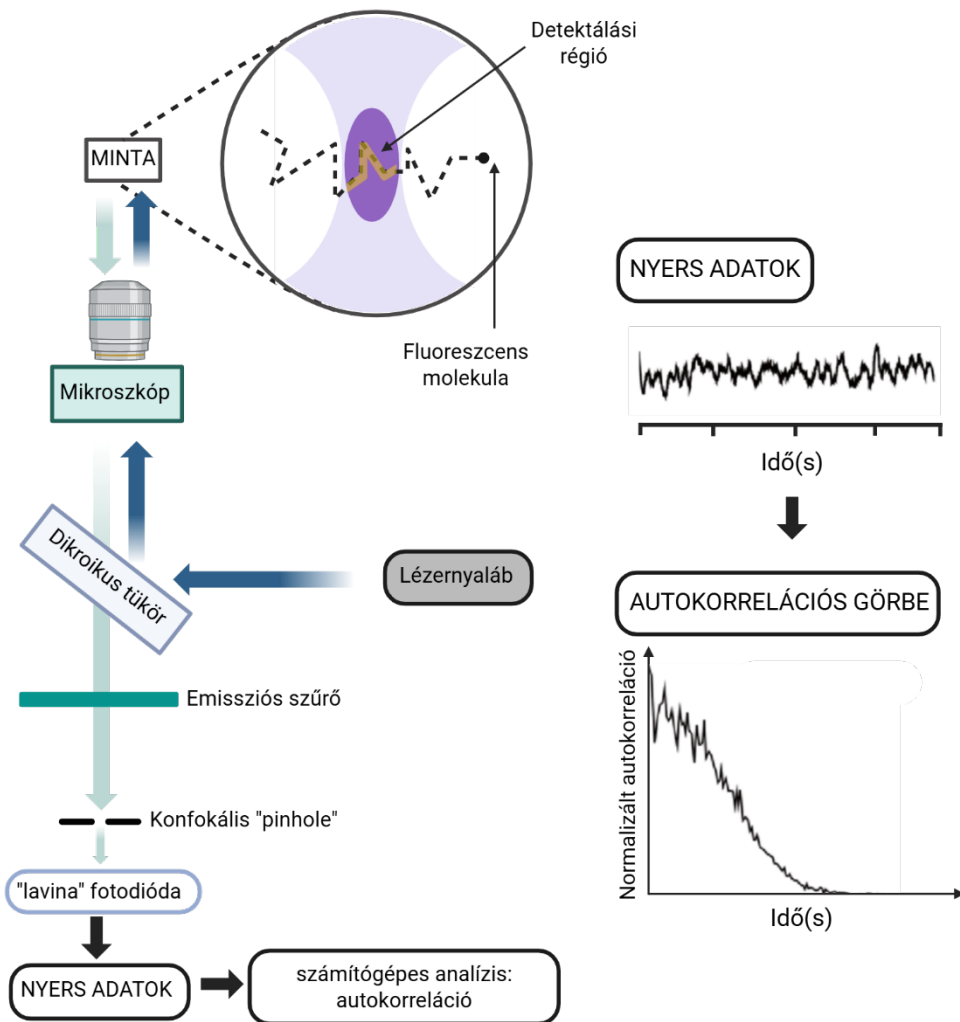
ahol  $\omega$  a sugár középpontja és az a pont közötti távolság, ahol a lézer optikai intenzitásának maximuma  $e^{-2}$  értékre csökken. A sugárnyaláb rádiuszát a szabad AlexaFluor546

autokorrelációs görbéjének mérésével határoztuk meg: az AlexaFluor546 ismert diffúziós együtthatóját ( $341 \mu\text{m}^2/\text{s}$   $25^\circ\text{C}$ -on) [253] beírva az (1) egyenletbe, és a  $\omega$ -t illesztett paraméterként alkalmaztuk. Az autokorrelációs görbéket a QuickFit 3 (Jan Wolfgang Krieger, Jörg Langowski, German Cancer Research Center, Heidelberg, Németország) programmal illesztettük. A dolgozatban szereplő FCS-eredmények legalább tíz görbe kiértékelésén alapulnak.

Az FCS működési elve (11.ábra) azon alapszik, hogy fluoreszcensen jelölt molekulák a gerjesztő lézer hatására fluoreszcencia-fotonokat bocsátanak ki. Ezek a fotonok visszajutnak a mikroszkóp objektívjén keresztül, amely összegyűjti és továbbítja őket az optikai rendszerbe. A visszaérkező fény még tartalmazza a lézer gerjesztő sugarát is, amit egy dikroikus tükör választ szét: a gerjesztő fényt eltereli, míg a hosszabb hullámhosszú emissziós fényt átengedi. Ezután a fény egy emissziós szűrőn halad át, amely eltávolítja a maradék gerjesztő fényt és a nem kívánt spektrális komponenseket, így csak a fluoreszcencia jut tovább. A jel belép a konfokális rendszer tűlyukán (pinhole), amely kizárja a fókuszsíkján kívülről érkező fotonokat, biztosítva ezzel a femtoliteres detekciós régiót. Végül a fény eléri a nagy érzékenységű lavina fotodiódát (APD), amely az egyes fotonokat elektromos jellé alakítja, és így a molekulák számából és mozgásából származó intenzitásfluktuációk rögzíthetők. A módszer kulcsa a rendkívül kicsi, jól definiált detekciós régió, amelyet a konfokális optika hoz létre. A mért intenzitásjel azonban zajos és időben fluktuáló, ezért a nyers adatokból autokorrelációs görbét számolnak, amelyből kiolvasható a molekulák száma, diffúziós ideje, illetve a különböző kölcsönhatásokra vagy állapotokra (például triplet-állapot) utaló paraméterek.

Összefoglalva, egy általános FCS kísérlet során először az észlelt fluoreszcencia autokorrelációs függvényét számítják ki különböző késleltetési időkre. Ezután a kapott függvényt egy megfelelő elméleti modellel illesztik, hogy meghatározzák a fluktuáló jel által közvetített fizikai paramétereket [254]. A konfokális mikroszkópia széleskörű elterjedése, illetve fejlődése és maga a fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópia, alkalmassá tette ezt a

módszert különféle fizikai és kémiai jelenségek tanulmányozására a sejtbiológia és a fejlődésbiológia területén [255].



### 11. ábra: A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia működési elve

A fluoreszcensen jelölt minták fluoreszcencia-fotonokat bocsátanak ki. Ezeket a fotonokat a mikroszkóp objektíve összegyűjti és továbbítja őket az optikai rendszerbe. A fényt a dikroikus tükör választja szét: a gerjesztő fényt eltereli, míg a hosszabb hullámhosszú emissziós fényt átengedi. Ezután az emissziós szűrőn eltávolítja a maradék gerjesztő fényt. A jel áthalad a pinhole-on, amely kizárja a fókusz síkján kívülről érkező fotonokat. Végül a lavina fotodióda (APD), az egyes fotonokat elektromos jellé alakítja, és így a molekulák számából és mozgásából származó intenzitásfluktuációk rögzíthetők.

#### 2.4.4 Idő-korrelált egyfoton-számlálás (TCSPC)

A fluoreszcencia-élettartam ( $\tau$ ) meghatározásának leggyakrabban alkalmazott módszere az idő-korrelált egyfoton-számlálás [256]. A TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting) képalkotó technika elve a következő (12.ábra): több fotoelektron-sokszorozó (PMT) érzékeli a minta által kibocsátott fluoreszcencia egyedi fotonjait. A PMT-k egy irányító blokkhoz csatlakoznak, amely minden egyes foton esetében egy időzítési impulzust és egy digitális csatornaszám jelet generál, ez mutatja meg, hogy melyik PMT-ben észlelték a foton. Az időmérő csatorna a szokásos TCSPC építőelemeket tartalmazza. Két konstans frakciós diszkriminátor (CFD) kapja a detektorból érkező egyes foton impulzusokat, valamint a lézer referenciapulzusait. Az idő–amplitúdó konverter (TAC) méri az időt a foton és a következő lézerpulzus észlelése között. Ez a „fordított start-stop” elv kulcsfontosságú a magas lézerméltési sebességek feldolgozásában [257]. Amikor egy foton észlelnek, a TCSPC eszköz meghatározza az időt,  $t$ , a fluoreszcencia lecsengési görbén belül, valamint a lézertölt helyzetét a pásztázási területen,  $x$  és  $y$  koordinátákban. A detektor csatornaszámával,  $n$ , együtt ezek az értékek szolgálnak a hisztogram-memória címzésére. Ennek következtében a memóriában felépül a fotonok eloszlása  $t$ ,  $x$ ,  $y$  és  $n$  függvényében. Az eredmény úgy értelmezhető, hogy minden egyes detektorra vonatkozóan egy adatblokk jön létre, amely egy pixelekből álló tömb, és tartalmazza a teljes fluoreszcencia lecsengési függvényt. A detektorok tipikusan különböző hullámhossz-intervallumokban érzékelnek, ezért  $n$  a detektált foton hullámhosszát jelenti. Fontos kiemelni, hogy a többdetektoros TCSPC képalkotás nem használ időkapuzást vagy hullámhossz-szkennelést. Amíg a fotonok jel-feldolgozási ideje (az úgynevezett „holtidő”) kicsi az átlagos fotonok közötti időhöz képest, a TCSPC technika közel tökéletes számlálási hatékonyságot és maximális jel-zaj arányt biztosít egy adott mérési időre. Magasabb számlálási rátánál azonban egyre több foton vész el a holtidő miatt. A rögzített számlálási ráta  $r$  egy detektor esetében, amelynek detektor számlálási rátája  $r_d$  a következőképpen adható meg:

$$r \approx \frac{r_d}{1 + r_d \times t_d}$$

ahol  $t_d$  a holtidő. A számlálási hatékonyság  $E$  a rögzített és az észlelt ráta arányaként adható meg:

$$E = \frac{1}{1 + r_d t_d}$$

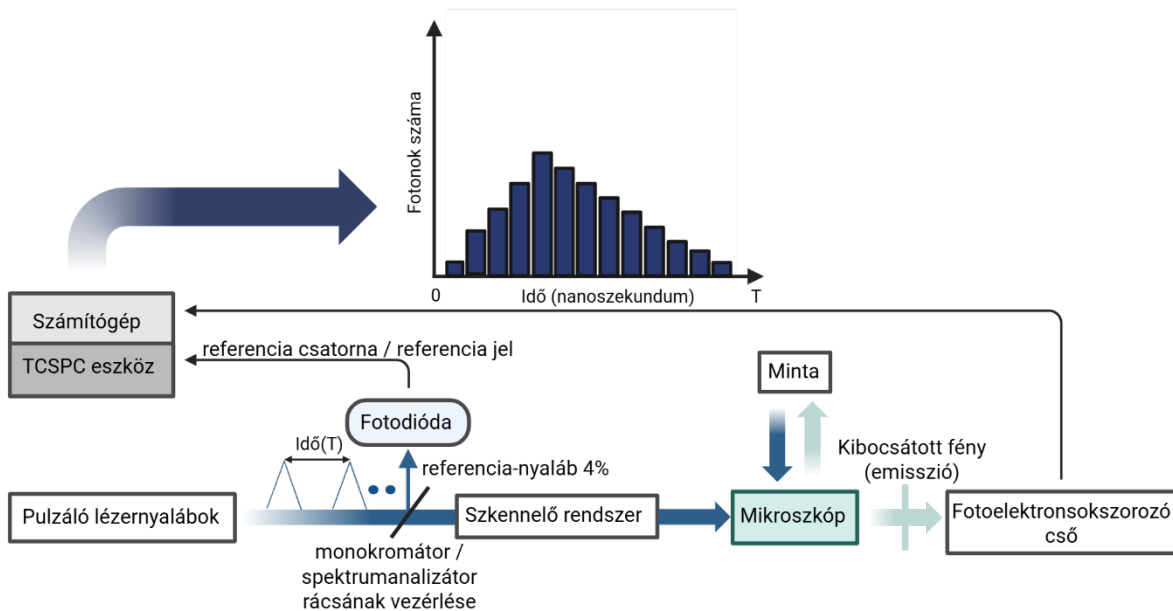
Az élettartam-mérések minőségét gyakran a „Figure of Merit” ( $F$ ) jellemzi [258, 259]. Ez a mutató összehasonlítja az ideális eszközzel mért jel-zaj arányt (SNR) a ténylegesen elért élettartam SNR-rel egy adott fotonszám mellett.

Mivel az SNR a rögzített fotonok négyzetgyökével arányos,  $F$  a számlálási hatékonyság reciprok négyzetgyökével változik:

$$F = E^{-1/2}$$

A gyakorlatban a TCSPC rendszerek hatékonysága akár 0,89, a figure of merit értéke pedig 1,06 lehet 1 MHz detektorszámlálási rátáig, ami felülmúlja a többi fluoreszcencia-élettartam képalkotó technikát. Nagyobb fotonszámú vagy stabil fluorofórokot tartalmazó minták esetén a számlálási ráták tovább növelhetők, azonban élő sejtek esetén a photobleaching vagyis a kiégés korlátozza az optimális fotonszámot (~100 000 foton/s) [260]. A TCSPC tehát nagy időfelbontású, nagy hatékonyságú és többdetektoros fluoreszcencia-képalkotást tesz lehetővé, ideális eszköze a molekuláris és sejt szintű dinamika vizsgálatának, beleértve a fluoreszcens ligandumok, fehérjék és lipid-interakciók tér- és időbeli elemzését.

A TCSPC mérés során (12.ábra) a gerjesztő impulzuslézer fénye egy optikai osztón keresztül két útra válik szét: az egyik a minta felé halad, a másik pedig a referencia nyálábként szolgál, amely a lézerpulzusok időzítését rögzíti az elektronikai rendszerben. Amikor a minta fluoreszcens molekulái gerjesztődnek, a kibocsátott fotonokat a mikroszkóp objektívje (vagy spektroszkópiában a gyűjtőoptika) összegyűjti, majd a jel a monokromátorba kerül. A monokromátor kiválasztja a kívánt hullámhossz-tartományt, hogy csak a vizsgált emissziós fény jusson tovább. Ezután a szeparált fotonokat a fotodetektor (tipikusan egy nagy érzékenységgű elektroncsokszorozó cső, PMT) érzékeli, amely az egyedi fotonokat elektromos impulzussá alakítja. A detektor jelei az elektronikai feldolgozó egységbe kerülnek, ahol a beérkező foton időpontját összevetik a referencia nyáláb által meghatározott gerjesztési időponttal. Így minden egyes fotonhoz hozzárendelhető egy pontos időkülönbség a gerjesztéshez képest. Sok ilyen esemény statisztikus összegzésével áll elő a fluoreszcencia élettartamot leíró görbe.



## 12. ábra: Az idő-korrelált fotonszámolás módszer elve

A gerjesztő impulzuszórával két útra válik szét: az egyik a minta felé halad, a másik pedig a referencia nyálábaként van jelen. A fluoreszcens molekula által kibocsátott fotonokat a mikroszkóp objektívje összegyűjti, majd a jel a monokromátorba halad tovább. A monokromátornak köszönhetően csak a vizsgált emissziós fény jut tovább. Ezután a fotonokat a fotodetektor elektromos impulzussá alakítja. A detektor jeleit az elektronikai feldolgozó egység dolgozza fel: a beérkező foton időpontját összeveti a referencia nyáláb által meghatározott gerjesztési időponttal.

### 2.4.5 Áramlási citometria

Az áramlási citometria (flow cytometry) széles körben alkalmazott technika egyedi sejtek különböző szempontok szerinti vizsgálatára. A citometria elve azon alapul, hogy a sejtek egy kapillárison keresztül haladnak át, ahol egy fénysugár világítja meg őket. A sejtuszpenzió a lamináris áramlásnak köszönhetően egyetlen sejtoszlopot alkot, amely lehetővé teszi a sejtek egyenkénti áthaladását a vizsgálati ponton. A vizsgálati ponton egy monokromatikus fénysugár, ami általában lézer, metszi a sejteket. A kibocsátott fény minden irányban terjed, és optikai elemek gyűjtik össze, amelyek szűrőkön és dikroikus tükrökön keresztül irányítják tovább a fényt, elkülönítve a különböző hullámhosszokat. A fényjelet fotodetektorok érzékelik és digitalizálják számítógépes elemzéshez. Ezek a detektorok mérik az emittált vagy szórt fényt, lehetővé téve a sejtek morfológiai és funkcionális elemzését. A több ezer elérhető fluoreszcens festék alkalmazásával az eszköz igen rugalmasan használható kvantitatív mérések végrehajtására [261]. Fluoreszcens festékek képesek különféle sejt komponensekhez, például DNS-hez vagy RNS-hez kötődni vagy interkalálódni. Emellett fluoreszcens festékekkel jelölt ellenanyagok képesek specifikusan fehérjékhez kötődni, akár a sejtthártyán, akár a sejten belül.

Több különböző fluorokróm használata lehetővé teszi, hogy több sejtulajdonságot egyszerre mérjünk, amennyiben a festékek vagy gerjesztési, vagy emissziós hullámhosszaik eltérőek. Gyakran használt festékek például a propidium-jodid, a fikocianin és a fluoreszcein, de sok más festék is elérhető [262]. A sejtszeparálás, amit fluoreszcencia-alapú sejtszeparálásnak, azaz FACS-nak is neveznek, az áramlási citometria egy fontos kiterjesztése. A „sorterek” vagy sejtszeparátorok, különböző mechanizmusokat alkalmaznak, például elektrosztatikus eltérítés, mikrofluidikai szeparálás, magnetikus szeparálás vagy dielektroforézis révén gyorsan és pontosan képesek szétválasztani bármely populációt, amit áramlási citometriával meghatároztak. Ez lehetővé teszi a sejtek igen összetett fenotípusos adatok alapján történő szétválasztását.

## **2.4.6 Fluoreszcens jelölések**

### **2.4.6.1 Penetratinok fluoreszcens jelölése az intracelluláris lokalizáció meghatározására**

A kutatások során gyakran használnak több, eltérő fluoreszcens festéket a sejtekben lejátszódó folyamatok pontosabb megértése érdekében. A fluoreszcens festékek eltérő tulajdonságai lehetővé teszik, hogy megkülönböztethető legyen például, hogy egy molekula endolizoszómákban rekedt-e, vagy ténylegesen kiszabadult a citoszolba. A fluoreszcens festékek tulajdonságait tekintve fontos szempont a környezet pH-ja. Az endolizoszómák savas pH-ján bizonyos fluorofórok (pl. FITC, naftofluoreszcein) elhalványulnak vagy más spektrumon fluoreszkálnak, míg a citoszol semleges pH-ján erős jelet adnak. Más fluorofórok (pl. rodamin, Alexa Fluorok) stabilabbak savas közegben is, így azok az endoszomális közeg vizsgálatát teszik lehetővé. A kettős jelölés kiválóan alkalmas a kompartment-specifikus detektálásra.

### **2.4.6.2 Antitestek jelölése fluorofórokkal**

Az ellenanyagok jelölése alapvető kutatási eszköz a biológiai tudományokban. A kísérletekben használhatók jelölt elsődleges (primer) ellenanyagok, jelölt másodlagos (szekunder) ellenanyagok, vagy ezek kombinációja. Kiemelten fontos, hogy az ellenanyag jelölése vagy keresztkötése jelentősen csökkentheti annak antigénkötő aktivitását. Az ellenanyagok jelölésére szolgáló legtöbb stratégia négyféle kötődési mód egyikét használja a fluoreszcens festék ellenanyaghoz történő kapcsolásához:

- amino-csoportokon
- szénhidrátcsoportokon

- ciszteinben található szulfhidrilcsoportokon
- valamint tirozinmaradványokon.

Az ellenanyagok vagy más biomolekulák jelölésére a külső felszínen elhelyezkedő aminosavak szolgálnak. A primer aminok gyakori célpontjai a kémiai kötés kialakításnak, mivel bőségesen megtalálhatók, széles körben eloszlának, és könnyen módosíthatók, mivel erősen reaktívak.

Fehérjék esetében az  $\alpha$ -aminok (N-terminális) és a lizin oldallánc  $\epsilon$ -aminjai a fő célpontok. A N-hidroxiszukcinimid (NHS) észter az egyik leggyakoribb aktiváló vegyület a reaktív acilező ágensek létrehozására. Az  $\text{NH}_2$ -csoportok jelölésére szolgáló NHS-észterek módszere azon alapul, hogy a karboxilát-csoportokat N-hidroxiszukcinimid (NHS) vagy szulfo-NHS észterrel alakítják karbodiimid (például DCC vagy EDC) jelenlétében. A szulfo-NHS-észter előnyös tulajdonsága, hogy vízben oldódik, hosszabb ideig stabil, és lassabban hidrolizál. Az így képződött NHS-észter nukleofil csoportokkal, elsősorban aminokkal reagál, miközben az NHS kilépő csoport felszabadul, és stabil amid- vagy imidkötést hoz létre. Az NHS-észterek azonban képesek más funkciós csoportokkal, például tirozin, szerin és treonin –OH csoportjaival is reagálni, különösen akkor, ha a polipeptidláncban hisztidin található. Ilyenkor a hisztidin gyorsan reagál az NHS-észterrel, és a képződő instabil acil-imidazol köztes termék végül a közeli –OH csoporttal észterkötést alakít ki. A tiol- és hidroxilcsoportokkal létrejövő kötések azonban instabilak vizes közegben, illetve aminok jelenlétében amidkötéssé alakulhatnak [263].

Az antitestekkel történő jelölésnek két fő módszere létezik: direkt és indirekt jelölés. A kettő közötti nagy különbség, hogy a direkt jelölés alkalmazható *in vivo* képalkotáshoz, míg az indirekt jelölést főként *in vitro* kísérletekben használják, például ELISA-ban vagy fluoreszcens mikroszkópiában. A fluoreszcens jelet minden esetben a fluorofór biztosítja, egy adott hullámhosszúságú fény általi gerjesztés hatására. Direkt jelöléskor a fluorofór közvetlenül az antitesthez van kapcsolva, ezzel szemben indirekt jelölés esetén a fluorofór egy másodlagos ellenanyaghoz van kötve, amely az elsődleges antitestet ismeri fel. A direkt antitest jelölés előnyei közé tartozik a gyors és kevés lépésből álló protokoll, a kisebb hibalehetőség, a jelzőmolekula leválásának csökkent kockázata, a magas jelölési hatékonyság, a kötőképesség minimális befolyásolása, valamint az alkalmazhatóság kutatásban, diagnosztikában és képvezérelt sebészetben. Az indirekt antitest jelölés során a jelölő nem a primer, hanem egy vagy több szekunder ellenanyaghoz kapcsolódik. Ezáltal érzékenyebb és sokoldalúbb módszer, mivel a szekunder ellenanyag erősítőként működik. Több különböző primer ellenanyaghoz is használható, nincs szükség a célzott elsődleges ellenanyag jelölésére. Széles körben elérhető

kereskedelmi forgalomban jelölt szekunder antitestek, és lehetőség van multiplex detektálásra is, különböző jelölésű másodlagos ellenanyagokkal. Számos fluoreszcens festék használható antitestek jelölésére, sőt, többszínű (multicolor) kísérletek is végezhetők velük. Ez lehetővé teszi több célmolekula egyidejű vizsgálatát például áramlási citometriával vagy epifluoreszcens mikroszkópiával. Az ilyen jelölt antitestek alkalmazhatók *in vivo*, *ex vivo* és *in vitro* kísérletekben is, mint például ELISA, áramlási citometria vagy fluoreszcens mikroszkópia [264].

### **3. Problémafelvetés**

Az irodalmi áttekintésben bemutatott elvekből következik, hogy a plazmamembrán kémiai, fizikai és biológiai tulajdonságai jelentősen befolyásolják a membránokon keresztüli transzportfolyamatokat és a transzmembrán jelátvitelt. A membrán egyrészt egy passzív, szelektív permeabilitású barrier. Mivel azonban a lipid kettősrétég fizokémiai tulajdonságai az élő sejtben változnak, ill. ezek kísérletesen változtathatók, még a membrán passzív barrier szerepének, ill. ennek változásának is vannak biológiai szempontból jelentős aspektusai. Ezenkívül a membrán rendkívül aktív körforgása, az egymást követő endo- és exocitotikus folyamatok nyilvánvalóan részt vesznek endogén anyagok és potenciális, elsősorban makromolekuláris gyógyszerek felvételében, de feltételezhető, hogy a membránkörforgalom hatással van a membránnal kölcsönhatást kialakító anyagok eloszlására és koncentrációjára is. Munkámban ezek alapján azt a problémát vizsgáltam, hogy a plazmamembrán biofizikai tulajdonságai és aktív körforgása hogyan használhatóak sejtpenetráló peptidek felvételének és az EGF membránkölcönhatásainak magyarázatára, ill. ezen folyamatok számunkra kedvező befolyásolására.

#### 4. Célkitűzés

A membránjelenségek, a membrán biofizikai tulajdonságainak és körforgásának sejtpenetráló peptidek felvételére kifejtett hatásával kapcsolatban az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- A dipóluspotenciál, mint fontos membrán-potenciál tényező, hogyan befolyásolja a sejtpenetráló peptidek sejtbe történő bejutását?
- Mi az atorvasztatin hatása a sejtpenetrációra és az endoszómális felszabadulásra?
- Mi az endocitózis, mint bejutási mechanizmus, szerepe az SPP-k penetrációjában?
- Mekkora a fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidek lizoszómális degradációjának mértéke, a sejtbe történő bejutást követően?
- Milyen hatékonysággal jut be a módosított „ $\beta$ ”-penetratin a sejtekbe? Hasonlóságot mutat-e a bejutási hatékonyságának vizsgálati eredménye az  $\alpha$  penetratinnal végzett vizsgálatok eredményeivel?
- Fennáll-e a „ $\beta$ ”-penetratin „önkioltó” tulajdonságának lehetősége?
- A „ $\beta$ ”-penetratin sejtbe történő bejutása koncentrációfüggő folyamat-e?
- Milyen módszerekkel határozható meg a penetratin aggregációs képessége? A FRET mérés alkalmas erre a célra?
- Az aggregációs képesség hogyan befolyásolja a sejtpenetráló peptidek bejutási hatékonyságát?

Munkám második fázisában azt vizsgáltam, hogy egy látszólag teljesen passzív és biológiai jelenségeket nem mutató folyamatban, egy membrán-impermeabilis ligandum, az EGF, receptorokhoz való kötődésében, a membránjelenségek hogyan befolyásolják az extracelluláris térben kialakuló ligandumkoncentrációt:

- Ligandum koncentrációjának meghatározása, a plazmamembrántól mért távolság függvényében, fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópiával (FCS)
- Extracelluláris mátrix emésztésének hatása a membránforgalomra és a ligandumkoncentrációra
- Hogyan befolyásolják az ioncsatornák a membránforgalmat, ezáltal a tapasztalt membrán közeli ligandum koncentráció csúcsot?
- TAMRA-EGF koncentrációs gradiensének vizsgálata: megegyezik-e sejtek, illetve óriás plazma-membrán vezikulumok esetén?
- Viskozitás mérése BODIPY-alapú molekuláris rotorral

## **5. Anyagok és módszerek**

### **5.1 A sejtpenetráló peptidok sejtekbe történő bejutásának vizsgálata**

#### **5.1.1 Sejtvonalak**

Kísérleteinket MDA-MB 231 és SKBR-3 sejtvonalakon végeztük, amelyeket az American Type Culture Collections cégtől (ATCC, Manassas, VA) vásároltunk meg. Az MDA-MB-231 egy humán emlőrák sejtvonal, amely a tripla-negatív emlőrák (triple-negative breast cancer, TNBC) modellezésére alkalmas. A TNBC olyan emlőrák típus, amelyben nem fejeződik ki az ösztrogén receptor, a progeszteron receptor és a HER2 receptor, tehát nem reagál a hormonális terápiákra, illetve a HER2-targetált kezelésekre. Az SKBR-3 sejtvonal egy humán emlőrák sejtvonal, amely a HER2-pozitív emlőrák kutatásában jelentős szerepet játszik. Ez a sejtvonal a HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) gén túlzott expresszióját mutatja, ami jellemző a HER2-pozitív emlőrákokra. Mindkét sejtvonal tenyésztéséhez 10% fetális borjú szérumot (FBS), 50 µg/ml koncentrációjú gentamicint és 2 mM koncentrációjú L-glutamint tartalmazó DMEM médiumot használtunk, specifikációjuknak megfelelően. A tenyészeteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében, ezen környezet kialakítására képes termosztátban, sejtenyésztő flasksokban tartottuk, és a sejtek konfluenciájától függően 2-3 naponta passzáltuk. Mikroszkópos mérések esetén a sejteket 8 lyukú kamrában növesztettük (IBIDI, Martinsried, Németország) 80%-os konfluencia eléréséig. Áramlási citométerrel végzett kísérletek esetén a sejteket T-25 és T-75 méretű sejtenyésztő flasksokban növesztettük, a vizsgálathoz szükséges sejtszámtól függően. Ebben az esetben a mérést sejt-szuszpenzóban végeztük, amelyhez tripszin-EDTA-PBS (0,05% tripszin, 0,02% EDTA) oldatot használtunk a sejtek letapadásának megszüntetésére, eltávolításukra a flaska aljáról.

#### **5.1.2 Sejtpenetráló peptidok**

A penetratint (RQIKIWFQNRRMKWKK-amid, MW 2245,75 g·mol<sup>-1</sup>) kollaborációs partnerünk, Mándity István (Semmelweis Egyetem, Budapest) szintetizálta TentaGel R RAM gyantán (Rapp Polymere, Tübingen, Németország), amely egy alacsony keresztmolekulatömegű polisztirol-PEG kopolimer (helyettesítési arány: 0,2 mmol·g<sup>-1</sup>). Ezt Merrifield-féle szilárd fázisú módszerrel, standard Fmoc kémiával hajtották végre. Minden aminosav-analóg az Iris Biotech-től (Marktredwitz, Németország) származott. Az utolsó, N-terminális aminosav kapcsolása után a lánchoz egy 6 szénatomos kapcsolót (Fmoc-6-aminohexánsav, Iris Biotech) adtunk. Ezt a kapcsolót a fluoreszcens festékek penetratinra gyakorolt potenciális hatásának csökkentésére használtuk. Az Fmoc védőcsoport eltávolítása után a penetratin felét, amely még a gyantán volt, 1,5 ekvivalens AlexaFluor532 N-hidroxiszukcinimidil-észterrel (MW 723,77

$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , Fluoroprobes, Scottsdale, AZ, katalógusszám: 1041) és 1,5 ekvivalens diizopropil-etil-amin (DIPEA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) jelenlétében dimetil-formamidban (DMF, Sigma-Aldrich) egy éjszakán át kezeltük. A penetratin másik felét 1,5 ekvivalens 5(6)-karboxinaftofluoreszcein N-szukcinimidil-észterrel ( $\text{MW } 573,51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , Setareh, Eugene, OR, katalógusszám: 6964) reagáltattuk DIPEA jelenlétében DMF-ben. A jelölt peptideket deprotektáltuk és eltávolítottuk a gyantáról, majd szűrést és kicsapást végeztünk. A durva termékeket preparatív reverz fázisú HPLC-vel (JASCO, Victoria, Kanada) tisztítottuk C18-os oszlopon, majd fagyasztva szárítottuk. A termékek tisztaságát (>95%) reverz fázisú HPLC-vel ellenőriztük analitikai C18 oszloppal. Minden peptid hitelességét Bruker elektropray ionizációs tömegspektrometriával igazoltuk. Az AlexaFluor532-penetratin (M+H)<sup>+</sup> formájának előre jelzett és mért molekulatömege 2983,59 és 2983,548 volt, míg az NF-penetratin (M+H)<sup>+</sup> változatának előre jelzett és mért molekulatömege 2833,33 és 2832,5 volt. Lehetőségünk nyílt a penetratin egy módosított változatával folytatni a vizsgálatainkat. A módosított peptidre  $\beta$ -penetratinként fogok utalni a dolgozatban, szerkezete tervezett szabadalombenyújtás miatt nem publikálható.

### **5.1.3 Penetratin bejutási hatékonyságára irányuló vizsgálatok**

Sejtvonalak előkészítése minden kísérlet esetében ugyanúgy zajlott: a kísérletet megelőző 3. napon az MDA-MB231 és SKBR-3 sejteket, 500.000-es sejtszámmal, T75-ös méretszámú flaskába helyeztük. A legalább 80%-os konfluenciával rendelkező sejteket 0.05%-os koncentrációjú 2 ml térfogatú tripszin hozzáadásával elválasztottuk a flaska aljáról. A már úszó sejteken 6 ml médiummal (DMEM) állítottuk le a tripszin általi emésztést, majd a gondosan összegyűjtött sejteket 15ml-es centrifugacsőbe helyeztük. Ezután centrifuga segítségével, az 5 percen keresztül 1200 rpm (RCF~160xg) fordulathatására a sejtek a centrifugacső aljára ülepedtek. A sejtszámláláshoz szükséges első hígítást a keletkező pellettől függően alkalmaztuk. Átlagosan 3-5 ml PBS hozzáadásával értük el a számoláshoz optimális sejtkoncentrációt. A sejtszámot Bürker-kamra segítségével határoztuk meg. A megközelítőleges sejtszám ismeretében további hígításokat alkalmaztunk, hogy elérjük az áramlási citométerrel illetve a mikroszkóppal való mérésekhez szükséges optimális sejtszámot.

### **5.1.4 Dipóluspotenciál szintjének megváltoztatására irányuló kísérletek**

A kísérlet során különböző anyagok a membrán dipóluspotenciáljára gyakorolt hatását vizsgáltuk: a floretin (phloretin) csökkenti a dipóluspotenciált a membránban. Ellenben a 6-

ketocholestanol növeli a membrán szterin tartalmát ezáltal a dipóluspotenciált is. Mindezek mellett a Pluronic-sav segíti a hidrofób molekulák szolubilizációját. Az élő, illetve halott sejtek arányának feltérképezésére DAPI-t (4',6-diamidino-2-fenilindol) alkalmaztunk. A mérést áramlási citométer segítségével végeztük, amelyhez az optimális sejtszám esetünkben 300.000-500.000 sejt/minta volt. A megfelelő koncentrációjú sejtszuspenziót sorter csövekbe helyeztük a kísérlethez szükséges mintaszám alapján. 4 mintát vizsgáltunk: csak Pluronic savat, Pluronic savat és floretint, Pluronic savat és 6-ketocholestanolt tartalmazó kezeléseket kapott sejtek, illetve kezelés nélküli sejtek. A sejteket először a dipóluspotenciál-módosító anyagokkal inkubáltuk 10 percig, majd hozzáadtuk a DAPI-t tartalmazó oldatot 5 percre szobahőmérsékleten. A DAPI esetén 1 µg/ml végkoncentrációval dolgoztunk. Továbbá 2 különböző fluoreszcens festékkel jelölt penetratint használtunk, az AlexaFluor 532-vel és Naftofluoreszeinnel jelölt penetratint. Ezek törzsoldatának koncentrációja 20 mM, amelyet PBS használatával kihígítottunk és a mérések során 5 µM-os koncentrációt alkalmaztunk. Az inkubáció 37°C-on ment végbe 20 percig, így már a kezelőoldatok hőmérsékletét is növeltük az alkalmazásukat megelőzően. Mosási lépést kihagyva hajtottuk végre a mérést BD FACS Aria III áramlási citométer segítségével. A naftofluoreszein festék excitációs hullámhossza 599 nm, emissziós hullámhossza 674 nm, ezért az azzal jelölt penetratint a 633 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük, detektálható tartománya 650–700 nm. Az AlexaFluor 532 fluoreszcens festék excitációs hullámhossza 534 nm, emissziós hullámhossza 553 nm, ezért az azzal jelölt penetratint a 514 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük, detektálható tartománya 540–570 nm. A DAPI excitációs hullámhossza 359 nm, emissziós hullámhossza 457 nm, ezért az azzal jelölt penetratint a 405 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük, detektálható tartománya 450–470 nm.

### **5.1.5 Az atorvasztatin hatása a dipóluspotenciálra**

Az atorvasztatin csökkenti a membrán koleszterol tartalmát, ezáltal csökkenti azok dipóluspotenciálját is. A MDA-MB231 és SKBR-3 sejtek flaskába helyezése után 24 órával, a nagy számban letapadó sejteket statin kezelés alá vetettük. 4 koncentrációban alkalmaztuk az atorvasztatint: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 10 µM, 48-72 órás inkubációs idővel. A kezeléseket követően a megszokott módon elválasztottuk a sejteket a flaska aljáról, megszámloltuk őket, majd a megfelelő hígításokkal elértük az optimális sejtkoncentrációt az áramlási citométerrel való méréshez, amely esetünkben 300.000-500.000 sejt/minta volt. A megfelelő koncentrációjú sejtszuspenziót sorter csövekbe helyeztük a kísérlethez szükséges mintaszám

alapján, 200 µl/cső térfogatban. Az atorvasztatinnal kezelt sejtekhez a már korábban említett koncentrációban beadott DAPI oldatot adtuk. A DAPI-t kétszeres koncentrációval oldottuk be, hogy a sejtekhez adást követően megfelelő legyen a végkoncentráció. A vizsgálathoz szintén az AlexaFluor 532-vel és a naftofluoreszcinnel jelölt penetratint használtuk, 5 µM-os koncentrációban. Az inkubáció 37°C-on 20 percet vett igénybe. Mosási lépést mellőzve hajtottuk végre a mérést, az előző kísérletekben leírtaknak megfelelően, azonos gerjesztési és detektálási körülményekkel.

### **5.1.6 Sejtek endocitózis gátlása**

Az endocitózis gátlás kivitelezéséhez dyngo4a dinamin inhibitor alkalmaztunk, amely gátolja a dinamin függő endocitózist, melynek hatására a fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidek csak endocitózis független, direkt membránpenetrációval tudnak a sejtekbe bejutni. Ezen kísérlet eredményeként meg tudtuk határozni milyen arányban jutnak be a sejtpenetráló peptidek a sejtekbe endocitózissal. Az eddigi áramlási citométerrel való mérésekhez használt sejtmennyiségen nem változtattunk. Első lépésben az endocitózis gátlására szolgáló dinamin inhibitor optimális koncentrációját határoztuk meg, amely alkalmazható az általunk használt sejteken. A dyngo4a nevű anyagot 4 különböző koncentrációban vizsgáltuk: 5 µM, 10 µM, 20 µM és 40 µM. A dyngo4a törzsoldata 20 mM-os koncentrációjú, így hígítások szükségesek az említett koncentrációk eléréséhez. A dinamin inhibitor működését a transferrin AFDye 647 anyaggal követtük nyomon, amelyet minden esetben 50 µg/ml hígításban alkalmaztunk. A kontroll csövek kivételével minden minta esetén 15 perces inkubációs időt alkalmaztunk 100 µl dyngo4a oldat/minta mennyiségben, időben eltolva, így fenntartva a folyamatos mérést. Az inkubációs idő elteltével mintához egyesével hozzáadtuk a 200 µl transferrin AFDye647 oldatot, majd azonnal megkezdjük a mérést a FACS Aria áramlási citométer segítségével. 5 mérési pontot alkalmaztunk, 0. (kezdő) perc, 5 perc elteltével, 10 perc elteltével, 15 perc elteltével és 20 perc elteltével. A kísérlet kiértékelései alapján a 40 µM-os koncentrációjú dyngo4a oldat bizonyult a leghatékonyabbnak, így ezzel a koncentrációval folytattuk további vizsgálatainkat. Ezt követően a fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidek dinamin függő endocitózis gátlását vizsgáltuk, a már előzőekben leghatékonyabbnak bizonyult koncentrációval. Az AlexaFluor532-vel és a naftofluoreszcinnel jelölt penetratin koncentrációján és az alkalmazott térfogatokon nem változtattunk. Tartottuk a 15 perces inkubációs időt és a 100 µl dyngo4a oldatmennyiséget az adott minták esetén. Időben eltolva adtuk a sejtekhez a kezelőanyagot, így fenntartva a folyamatos mérést. A SPP-t és DAPI-t

tartalmazó oldatot közvetlenül a mérés előtt adtuk a 100 µl sejtszuszpenzióhoz, 900 µl/minta mennyiségben. Ezt követően a FACS Aria áramlási citométer segítségével kezdetben 5 mérési pontot detektáltunk, a későbbiekben ezt a mérési módszert folyamatos mérésre cseréltük, amikor a citométer a fluoreszcencia és fényszórási paraméterek mellett a mérési időt is elraktározta, így a kiértékelés során folyamatos időfüggő felvételt tudtunk vizsgálni. A mérést az előző kísérletekben leírtaknak megfelelően, azonos gerjesztési és detektálási körülményekkel hajtottuk végre.

### **5.1.7 Fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidok lizoszómális degradációjának vizsgálata a sejtbe történő bejutást követően**

A sejtpenetráló peptidok lizoszómális degradációjának vizsgálata során arra voltunk kíváncsiak, hogy a fluoreszcensen jelzett penetratinnal történő inkubáció során a fluoreszcencia citoplazmában történő megjelenése az intakt, fluoreszcensen jelzett sejtpenetráló peptid kiszabadulását jelenti az endolizoszómális rendszerből, vagy esetleg a lizoszómákban a sejtpenetráló peptid lebomlik, és a szabaddá váló fluorofórok jutnak csak át az endolizoszómális rendszer membránján. A kísérletben a E-64d nevű cisztein proteáz inhibitorát alkalmaztuk. A már ismertetett módon előkészítettük a sejteket az áramlási citométeres vizsgálatra, majd 10 nM koncentrációjú atorvasztatinnal kezeltük őket 48 óráig. Emellett, floretines kezelést is alkalmaztunk a sejteken melynek inkubációs ideje 10 perc volt, szobahőmérsékleten, 100-szoros hígításban. 6 mintát vizsgáltunk:

- kezeletlen sejtek,
- kezeletlen sejtek, amelyekhez hozzáadtuk a proteáz inhibitorát,
- floretinnel kezelt sejteket tartalmazó minta,
- floretinnel kezelt sejteket és proteáz inhibitorát tartalmazó minta
- atorvasztatinnal kezelt sejteket tartalmazó minta
- illetve atorvasztatinnal kezelt sejteket és proteáz inhibitorát tartalmazó minta.

A megfelelő kezeléseket követően az adott mintákhoz hozzáadtuk a proteáz inhibitorát 10 mM-os koncentrációban. 5 perces inkubációs idő elteltével hozzáadtuk a fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidokat és DAPI-t tartalmazó oldatot a sejtekhez, majd azonnal elindítottuk a mérést az áramlási citométeren. A mérést az előző kísérletekben leírtaknak megfelelően, azonos gerjesztési és detektálási körülményekkel hajtottuk végre.

### **5.1.8 Módosított $\beta$ -penetratin sejtbe történő bejutásának feltérképezése**

A sejtek előkészítése az eddig alkalmazott módszernek megfelelően zajlott.

#### **5.1.8.1 Sejtpenetráló peptidek felvételének vizsgálata Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal**

A sejtszámlálást követően a sejteket 40.000 sejt/well koncentrációban 8-lyukú IBIDI kamrába (IBIDI, Martinsried, Németország) helyeztük, majd 24 óra elteltével végeztük a kísérletet, mivel a sejteknek időre van szüksége a letapadáshoz. A kísérlethez két különböző fluoreszcens festékkel jelölt penetratint használtunk, az AlexaFluor 532-vel és naftofluoreszeinnel jelölt penetratint. Ezek törzsoldatának koncentrációja 20 mM, amelyből PBS használatával a mérések során 5  $\mu$ M-os koncentrációt alkalmaztunk. Az inkubáció 37°C-on ment végbe így már a kezelőoldatok hőmérsékletét is növeltük az alkalmazásukat megelőzően. A penetratin-oldattal való inkubáció 20 percet, míg a DAPI-val való kezelés 5 percet vett igénybe, azután PBS segítségével kimostuk a felesleges oldatot a kamrák welljeiből, majd a Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével készítettünk képeket a fluoreszcens jelet mutató sejtekről. A naftofluoreszein festék excitációs hullámhossza 599 nm, emissziós hullámhossza 674 nm, ezért az azzal jelölt penetratint a 633 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük, detektálási tartománya 650–700 nm volt. Az AlexaFluor532 fluoreszcens festék excitációs hullámhossza 534 nm, emissziós hullámhossza 553 nm, ezért az azzal jelölt penetratint a 514 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük, detektálási tartománya 540–570 nm volt. A DAPI excitációs hullámhossza 359 nm, emissziós hullámhossza 457 nm, ezért az azzal jelölt mintáinkat a 405 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük, a DAPI emisszióját 450–470 nm között detektáltuk. A fluoreszcens képeket 40X (NA=1,2), vízimmerziós objektív segítségével készítettük. A felvételek rögzítése több látómezőről, azonos intenzitással történt. A mérések során 8,24  $\mu$ s pixelidőt (dwell time), és 1 Airy egységnyi pinhole méretet alkalmaztunk.

#### **5.1.8.2 Penetratin felvételének vizsgálata FACS Aria áramlási citométerrel**

A sejtszám meghatározása után további hígításokat alkalmaztunk, hogy elérjük az áramlási citométerrel való méréshez optimális sejtszámot, amely esetünkben 300.000-500.000 sejt/minta volt. A megfelelő koncentrációjú sejtszuszpenziót sorter csövekbe helyeztük a kísérlethez szükséges mintaszám alapján. Ebben az esetben, hasonlóan a mikroszkópos mérésekhez, két penetratin oldatot használtunk. 37°C-on történő 5 és 20 perc inkubációs idő

elteltével a csövekben lévő sejteket lecentrifugáltuk 1200 rpm fordulatszámmal 5 percen keresztül, majd 200  $\mu$ l PBS hozzáadásával értük el a méréshez szükséges térfogatot. Az alkalmazott lézerek ugyanazok voltak, mint a mikroszkópos mérés esetében.

#### **5.1.8.3 A „ $\beta$ ”-penetratin „önkioltó” tulajdonságának vizsgálata**

A naftofluoreszcenccel jelölt penetratinról kapott eredmények, mind az áramlási citométerrel, mind a mikroszkóppal végzett vizsgálatok esetén jelentősen eltérnek az AlexaFluor532-vel jelölt penetratinhoz képest. Ezen eltérések lehetséges magyarázatául szolgál a „self-quenching” jelensége. Ennek alátámasztására két különböző közegben végeztük a méréseinket: PBS-ben, mint hidrophil, trifluoretanolban (TFE), mint hidrophób közeg. Mindkét fluoreszcens festékből 3-3 mintát alkalmaztunk: szabad naftofluoreszcein festékből, naftofluoreszcein-konjugált penetratinból és naftofluoreszcenccel konjugált  $\beta$ -penetratinból illetve szabad AlexaFluor532 festékből, AlexaFluor532 -konjugált penetratinból és AlexaFluor532 -konjugált  $\beta$ -penetratinból álló mintákat alkalmaztunk. Öt különböző koncentrációjú oldatot készítettünk az említett mintákból: 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M. A megfelelő oldatok elkészítését követően, 200  $\mu$ l térfogattal végeztük el a méréseket a Yobin Yvon Fluorolog spektrofluoriméter segítségével. A naftofluoreszcein festék gerjesztési maximuma 599 nm, emissziós maximuma 674 nm, ezért az azzal jelölt penetratint 594 nm-en gerjesztettük, emisszióját pedig 650 és 700 nm között detektáltuk. Az AlexaFluor 532 fluoreszcens festék excitációs maximuma 534 nm, emissziós maximuma 553 nm, ezért az azzal jelölt penetratint 535 nm-en gerjesztettük, emisszióját pedig 550 és 650 nm között detektáltuk.

#### **5.1.8.4 A penetratin celluláris felvétele koncentrációfüggésének vizsgálata**

A kísérlet során azt a legkisebb koncentrációt szerettük volna meghatározni, amellyel a fluoreszcensen jelölt penetratin képes bejutni a sejtekbe. A sejteket az áramlási citométerrel való mérésnek megfelelően készítettük elő. A minták 300.000 sejtet tartalmaztak 200  $\mu$ l PBS-ben. Hat különböző koncentrációban vizsgáltuk a penetratin felvételét: 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M és 10  $\mu$ M. Az  $\alpha$  penetratin és a  $\beta$ -penetratin AlexaFluor532-vel és naftofluoreszcenccel jelölt formáját használtuk. Inkubációs idő nélkül, a sejtekhez adást követően indítottuk a mérést a FACS Aria áramlási citométerrel, és időkorrelált módon rögzítettük a fluoreszcencia intenzitásokat az 5.1.1.4.2. részben leírtaknak megfelelően.

### 5.1.8.5 A penetratin aggregációs képességének meghatározása FRET méréssel

A FRET mérésekhez két fluoroforra van szükség, amely esetünkben az AlexaFluor532-vel jelölt és a Cy5-tel jelölt penetratin volt. Sem a Cy5, sem az AlexaFluor532 festék nem pH szenzitív, és az excitációs és emissziós hullámhosszaik optimális donor-akceptor párrá teszik őket. A méréseket Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal végeztük. Az AlexaFluor532-vel jelölt penetratin képezte a donor molekulát, amelyet 543 nm-es hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettünk, az emisszió detektálása pedig 547-629 nm között történt. A Cy5-tel jelölt penetratin mint akceptor volt jelen, amelyet 633 nm-es hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettünk, az emisszió detektálása pedig 637-759 nm között valósult meg. A FRET csatornában a donor molekulát, tehát az AlexaFluor532-vel jelölt penetratint gerjesztettük 543 nm-es hullámhosszúságú lézernyalábbal, az emissziót pedig 637-759 nm között mértük. A FRET hatásfokának meghatározását MDA-MB231 sejteken végeztük. A fluoreszcens képeket 40X (NA=1,2) vízimmerziós objektívvel készítettük. A felvételek rögzítése egy adott látómezőről, növekvő intenzitás (1-5-10-15%) mellett zajlott. A mérések során alkalmazott pixelidő (dwell time) 8,24  $\mu$ s volt, a pinhole méret pedig 1 Airy egység. A donor, akceptor és FRET csatornában mért intenzitások alapján a FRET hatásfokot az rFRET program segítségével számítottuk ki. Az rFRET program egy grafikus felhasználói felülettel vezérelt Matlab-alkalmazás a ratiometrikus, intenzitásalapú mikroszkópos FRET-mérések értékelésére. Ez a módszer közvetlenül gerjesztett donor és akceptor fluoreszcencia-intenzitásokat a szenzitizált akceptor-emisszióval együtt rögzíti [265]. Felhasznált paraméterek:

- $S_1$  – a donor emissziójának átvilágítása a FRET csatornába
- $S_2$  – az akceptor emissziójának átvilágítása a FRET csatornába
- $S_3$  – a donor emissziójának átvilágítása az akceptor csatornába
- $S_4$  – az akceptor emissziójának átvilágítása a donor csatornába
- $\alpha$  – a gerjesztett akceptor intenzitásának aránya, amelyet a FRET csatornában mérnek a gerjesztett donor intenzitásához képest a donor csatornában
- $\epsilon_{\lambda D}^D$  – a donor moláris abszorpciós együtthatója a donor gerjesztési hullámhosszán
- $\epsilon_{\lambda D}^A$  – az akceptor moláris abszorpciós együtthatója a donor gerjesztési hullámhosszán
- $\epsilon_{\lambda A}^D$  – a donor moláris abszorpciós együtthatója az akceptor gerjesztési hullámhosszán
- $\epsilon_{\lambda A}^A$  – az akceptor moláris abszorpciós együtthatója az akceptor gerjesztési hullámhosszán

- $I_1$  – intenzitás a donor csatornában
- $I_2$  – intenzitás a FRET csatornában
- $I_3$  – intenzitás az akceptor csatornában
- $I_D$  – a nem kioltott donor intenzitása (a donor intenzitása az akceptor hiányában, azaz amikor  $E=0$ )
- $I_A$  – a közvetlenül gerjesztett akceptor intenzitása
- $E$  – a FRET hatékonyság

Intenzitás-alapú, ratiometrikus FRET-mérés során egy donor–akceptor kettősen jelölt minta fluoreszcenciaintenzitását három csatornában rögzítik:

1. **Donor csatorna ( $I_1$ ):** a donor abszorpciós és emissziós hullámhosszán gerjesztve és detektálva.
2. **FRET csatorna ( $I_2$ ):** a donor abszorpciós hullámhosszán gerjesztve, de az akceptor emissziós hullámhosszán detektálva, ami az akceptor szenitizált emisszióját jellemzi.
3. **Akceptor csatorna ( $I_3$ ):** az akceptor abszorpciós és emissziós hullámhosszainak megfelelően, ami az akceptor közvetlen emisszióját jellemzi.

A mért intenzitások  $I_1, I_2, I_3$  a következő egyenletekkel írhatók le (háttérkorrekciót feltételezve):

$$I_1 = I_D(1 - E) + I_A S_4 + I_D E \alpha \frac{S_4}{S_2}$$

$$I_2 = I_D(1 - E) S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha$$

$$I_3 = I_D(1 - E) S_3 + I_A + I_D E \alpha \frac{1}{S_1} \frac{\epsilon_{\lambda A}^D \epsilon_{\lambda D}^A}{\epsilon_{\lambda D}^D \epsilon_{\lambda A}^A}$$

Az átvilágítási intenzitások (overspill) értékei a meghatározhatóak a donor és akceptor intenzitás értékekből.  $S_1$  és  $S_3$  a donor átvilágítási faktorai a donor csatornából a FRET és az akceptor csatornába, amelyet csak a donorral jelölt mintából számolhatunk ki:

$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D}; S_3 = \frac{I_3^D}{I_1^D}$$

Az  $S_2$  és  $S_4$  értékek a kizárólag akceptorral jelölt mintából határozhatóak meg és megmutatják az akceptor átvilágítását a FRET, illetve a donor csatornába:

$$S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A}; S_4 = \frac{I_1^A}{I_3^A}$$

$\alpha$  a gerjesztett akceptor molekula intenzitását viszonyítja a FRET csatornában a donor intenzitásához, a donor csatornában:

$$\alpha = \frac{Q_A \eta_{A,2}}{Q_D \eta_{D,1}}$$

ahol  $Q_A$  és  $Q_D$  az akceptor és a donor fluoreszcencia kvantumhatékonysága,  $\eta_{A,2}$  és  $\eta_{D,1}$  pedig az akceptor foton detektálási hatékonysága a FRET csatornában, illetve a donor foton detektálási hatékonysága a donor csatornában.

## 5.2 Plazmamembrán által indukált helyi ligandum-koncentrációs gradiensek kialakulásának vizsgálata

### 5.2.1 Sejtvonalak

Az F1-4 egy CHO sejtvonal (American Type Culture Collection, Manassas, VA), amelyet stabil transzfekcióval módosítottak, hogy expresszálja az EGF receptorát, amely enhanced green fluorescent protein (EGFP) jelzőmolekulával rendelkezik a C-terminális végén [266]. Az F1-4 sejteket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tápfolyadékban növesztettük, amely 10% fetális borjúsérumot és 50 µg/ml gentamicint is tartalmaz. A kísérleteink során használt sejtek passzázs-száma soha nem haladta meg a 15-öt. Az F1-4 sejtek EGFR expressziójának szintje körülbelül ~6·10<sup>5</sup>receptor/sejt volt, amelyet áramlási citometriával és Qifikkal (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) határoztunk meg. A mikroszkópos kísérletekhez a sejteket µ-slide 8-well méretű fedőlemez aljú kamrában (IBIDI, Martinsried, Németország) növesztettük, és szükség esetén, transzfekáltuk ErbB2-ECFP-vel (ErbB2-cyan fluorescent protein konstrukció egy pECFP-N1 plazmidban, Donna J. Arndt-Jovin, Max Planck Institute for Multidisciplinary Sciences, Göttingen, Németország, jóvoltából). Az ErbB2-ECFP-vel transziensen transzfektált F1-4 sejteket F1-4\_ErbB2-nek neveztük el. A transzfekciót Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) használatával végeztük a gyártó előírásait követve.

### **5.2.2 Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia**

Az FCS-méréseket egy Plan Apo 60× vízimmerziós objektívvel (NA=1,27) felszerelt Nikon A1 Eclipse Ti2 konfokális lézerpásztázó mikroszkópon (Nikon, Tokió, Japán) végeztük, amely egy PicoQuant-TCSPC-FCS upgrade kittel lett bővítve (PicoQuant, Berlin, Németország). A TAMRA-t 561 nm-es lézerrel gerjesztettük, és emisszióját 594 nm-es felüáteresztő szűrőn keresztül egy egyfoton-számláló detektorral (PicoQuant, Berlin, Németország) detektáltuk. A fluoreszcencia intenzitását 10 alkalommal, 8 s-os sorozatban rögzítettük 1-100 µm távolságban a sejtek plazmamembránja felett, és a SymPhoTime64 szoftverrel (PicoQuant, Berlin, Németország) autokorrelációs görbéket számoltunk 200 időpontban, 300 ns-től 1 s-ig terjedő, kvázi logaritmikus időskálával. A 10 autokorrelációs görbe átlagolása után a kísérleti adatokra a 2.4.3. fejezet 2. egyenletét illesztettük.

### **5.2.3 A sejtmembrán körforgásának gátlása**

Ezen kísérletek során szeretnénk volna a sejtmembrán transzport funkcióit, azaz az endocitózis és az exocitózis gyors váltakozását gátolni anélkül, hogy veszélyeztetnénk a sejtek életképességét. Ezt egy háromkomponensű koktéllal értük el, amely latrunculin B-t, para-amino blebbistatint és mirisztoilált dinamin inhibitor peptidet (DIP) tartalmazott, amelyek az aktin polimerizációt, a miozin és a dinaminnal kapcsolatos aktivitást gátolták. A latrunculin B (L5288, Sigma-Aldrich, Burlington, MA), amely az aktin polimerizációt gátolja, a para-amino-blebbistatin (katalógus szám: 22699, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), amely egy myosin inhibitor, és a mirisztoilált dinamin inhibitor peptid (DIP, katalógus szám: 1775, Tocris-BioTechne, Minneapolis, MN) 5 µM, 50 µM és 50 µM koncentrációban kerültek felhasználásra a membránforgalom gátlására. A sejteket ezekkel az anyagokkal 60 percig inkubáltuk 37°C-on, és az egész kísérlet alatt az említett koncentrációban voltak jelen. A sejteket tetrametilrodamin-konjugált EGF (TAMRA-EGF, E3481, Thermo Fisher Scientific) segítségével fluoreszcensen jelöltük annak érdekében, hogy a megmérjük a növekedési faktor koncentrációját a plazmamembrán környezetében. A méréseket FCS technika révén valósítottuk meg. A mikroszkóppal készített képek esetén az ErbB1-GFP transzfektált sejtek fluoreszcens jelét 488 nm-es hullámhosszúságú lézernyalábban gerjesztettünk, az emisszióját pedig 510 nm hullámhosszon detektáltuk. A TAMRA-EGF-el jelölt mintáinkat 561 nm-es hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettünk, az emittált fény detektálása pedig 595 nm hullámhosszon valósult meg. Az FCS mérést csak a TAMRA-EGF-nek megfelelő beállításokkal végeztük.

#### **5.2.4 Extracelluláris mátrix emésztése**

Az extracelluláris mátrix emésztéséhez a sejteket 20 µg/mL *Clostridium histolyticum* eredetű kollagenázzal (C8176, Sigma-Aldrich) és 20 U/mL *Streptomyces hyalurolyticus*ból származó hialuronidázzal (H1136, Sigma-Aldrich) kezeltük 90 percig 37°C-on. Majd az EGFR-t és ErbB2-t is kifejező F1-4\_ErbB2 sejteket 10 nM TAMRA-EGF-fel inkubáltuk. A TAMRA-EGF diffúziós együtthatóját és konfokális térfogategységenkénti számát (N) FCS segítségével mértük. A mérés a membrántól kezdődően 100 µm-ig terjedt. 20 µm-en keresztül minden mikrométeren, majd 100 µm-ig 10 µm-enként készült felvétel a plazmamembrán felett. A méréshez a korábbiakban használt beállításokat eszközöltük.

#### **5.2.5 Ioncsatornák blokkolása**

A sejtmembrán a folyamatos endocitózis és exocitózis révén az endocitózissal létrejött vezikulákat potenciálisan vissza is juttatja sejtmembránba, így fenntartva a membrán konstans felületét. Az endoszómák vagy makropinocitózist végző vezikulák zsugorodása és a koncentrált endoszómák folyamatos exocitózisa okozhatja a membránközeli EGF koncentrációcsúcs kialakulását [267-269]. A vezikulumok éréséért és az endoszómák zsugorodásáért a kétpórusú ioncsatornákat tartják felelősnek [270, 271]. A kétpórusú ioncsatorna 2 (TPC2) aktivitásának gátlására [272] a sejteket naringeninnel (N5893, Sigma-Aldrich) kezeltük 1 mM koncentrációban 30 percig 37°C-on, és az inhibitor az FCS mérés teljes időtartama alatt jelen volt. Az FCS mérés az eddigiekben leírtak alapján zajlott.

#### **5.2.6 A TAMRA-EGF koncentrációs gradiensének vizsgálata a GPMV-k környezetében**

A hatalmas plazmamembrán vezikulumok (giant plasma membrane vesicles, GPMV) kiváló modellek a plazmamembrán tanulmányozására, mivel összetételük nagy mértékben megegyezik a plazmamembránéval, de nem esnek át membránforgalmon. A GPMV-eket ozmotikus vezikulációval állítottuk elő [273, 274]. A sejteket kétszer átmostuk hipotóniás mosópufferrel (desztillált vízzel 30%-ra hígított PBS), majd 12 órás inkubációt alkalmaztunk 37°C-on, hipertóniás vezikulációs pufferrel (200 mM NaCl, 0,75 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM bicin, pH 8,5). A plazmamembránból származó vezikulák felszabadulását a flaska enyhe kopogtatásával segítettük elő. A GPMV-eket tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük, és 150 µl-t adtunk egy 8 lyukú kamra egy-egy lyukába, amelyet poli-L-lizinnel (0,1 % (w/v) (P1399, Sigma-Aldrich), 3 óra) előkezeltünk, hogy elősegítsük a

vezikulák üvegfelülethez való rögzülését. A vezikulumokat 10 nM TAMRA-EGF-vel inkubáltuk, és a konfokális térfogatban lévő részecskeszámot (N) valamint a diffúziós együtthatót FCS segítségével határoztuk meg, az eddigiekben leírtakat alkalmazva.

### 5.2.7 A viszkozitás mérése BODIPY-alapú molekuláris rotorral

A molekuláris rotorok olyan fluoreszcens riporterek, amelyekben a kémiai kötések forgási szabadsága nagy viszkozitású környezetben korlátozott, ami a fluoreszcencia élettartamának növekedését eredményezi. Tehát a moláris rotormolekulák fluoreszcens élettartama a viszkozus környezetekben megnő. [275, 276]. 8-Phenyl-BODIPY 505/515-t adtunk az F1-4\_ErbB2 sejtekhez, és a festék fluoreszcencia-élettartamát mértük TCSPC (idő-korrelált egyedi fotonszámlálás) módszerrel a sejtek feletti extracelluláris közegben. Ehhez egy Nikon A1 Eclipse Ti2 konfokális lézerpásztázó mikroszkópot (Nikon, Tokió) használtunk, amely egy Plan-Apochromat 60x vízimmerziós objektívvel (NA=1,27) és egy TCSPC eszközzel (PicoQuant, Berlin, Németország) volt felszerelve. Az impulzusgerjesztést egy közel 1,5 pikoszekundumos impulzusokat kibocsátó lézerrel valósítottuk meg 485 nm-en, 10-40 MHz-es ismétlési frekvenciával. A fluoreszcencia emissziót egy PMA hybrid 40 fotonszámláló fotomultiplierrel (PicoQuant) mértük, amely az emissziót 535 nm-en rögzítette. Az időfüggő fluoreszcencia-lecsengési görbékre kettős exponenciális egyenletet illesztettünk a SymPhoTime programban (PicoQuant), amely megadja a két komponens élettartamát ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) és amplitúdóját ( $A_1$ ,  $A_2$ ), amelyből az intenzitással súlyozott élettartamot ( $\tau_{eff}$ ) számoltuk ki a következő egyenlet szerint:

$$\tau_{eff} = \frac{\sum_i A_i \tau_i^2}{\sum_i A_i \tau_i}$$

A méréseket kollagenázzal és hialuronidázzal kezelt sejteken is elvégeztük.

### 5.3 Alkalmazott statisztikai analízisek

Többszörös összehasonlításokat végeztünk ANOVA-val. Ha egy kísérletben sok hipotézist tesztelünk, például sok mintacsoport között végzünk statisztikai próbát, akkor a téves pozitív eredmény (elsőfajú hiba avagy fals felfedezés, „false discovery”) valószínűsége felhalmozódik. Ennek kiküszöbölésére, ha a csoportok közötti különbségek szignifikánsnak bizonyultak ( $p < 0,05$ ) és nem volt szignifikáns variancia-heterogenitás, utólagos összehasonlításokat végeztünk Tukey HSD-tesztjével vagy a Holm-Sidak-teszttel. A Tukey teszt konzervatív, tehát kicsi az esélye a hamis pozitív eredménynek, ezzel szemben a

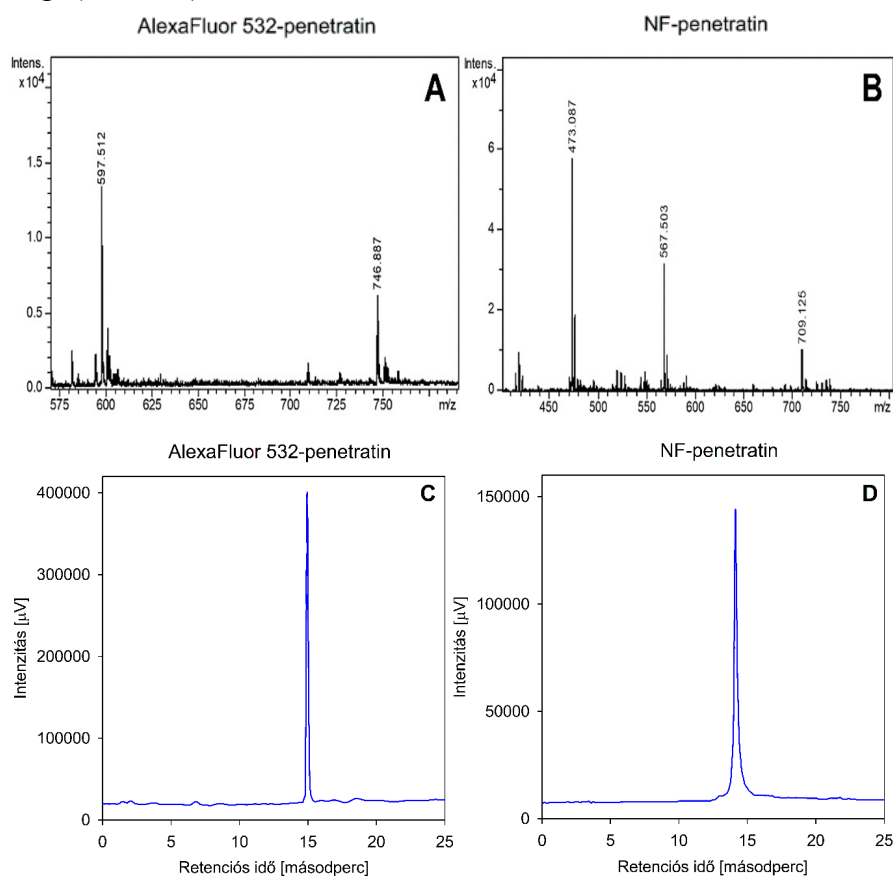
Holm-Sidak teszt kevésbé konzervatív, ezáltal minimálisan nagyobb esélye van a téves pozitív eredmények előfordulásának, de több valódi szignifikáns eltérést tár fel. Mindkét eljárás biztosítja, hogy a „családon belüli hibaráta” (familywise error rate) nem növekszik a többszörös összehasonlítások számának növekedésével. A statisztikai számításokat GraphPad Prism segítségével végeztük.

## 6. Eredmények

### 6.1 A sejtpenetráló peptidokkal való vizsgálatok eredményei

#### 6.1.1 A szintetizált penetratin tömegspektroszkópiás és HPLC-s analízise

Az 5.1.1.2. bekezdésben leírtaknak megfelelően a jelöletlen és a fluoreszcensen jelölt penetratin szintézise Merrifield-féle szilárd fázisú módszerrel, standard Fmoc kémiával zajlott. A termékek tisztaságát (>95%) tömegspektrometriával és reverz fázisú HPLC-vel ellenőriztük analitikai C18 oszloppal. Az elektropray ionizációs tömegspektrometriát Bruker micrOTOF készülékkel végeztük, a mintát 0,01 mg/mL koncentrációban metanolban oldva. A fordított fázisú kromatográfiát 1 mL/perc áramlási sebességgel végeztük, 20  $\mu$ L befecskendezett térfogattal egy analitikai oszlopon (C18, 250 $\times$ 4,6 mm, részecskeméret: 5  $\mu$ m, pórusméret: 100 Å, Phenomenex Luna, 00G-4252-E0). Elúciós körülmények: lineáris AB gradiens, ahol A 0,1% TFA/víz, B pedig 80% acetonitril/0,1% TFA/20% víz. A B frakció arányát 5%-ról 80%-ra növeltük 25 perc alatt. Az eluált komponenseket mennyiségét UV-abszorpcióval (220 nm) határoztuk meg. (13. ábra).

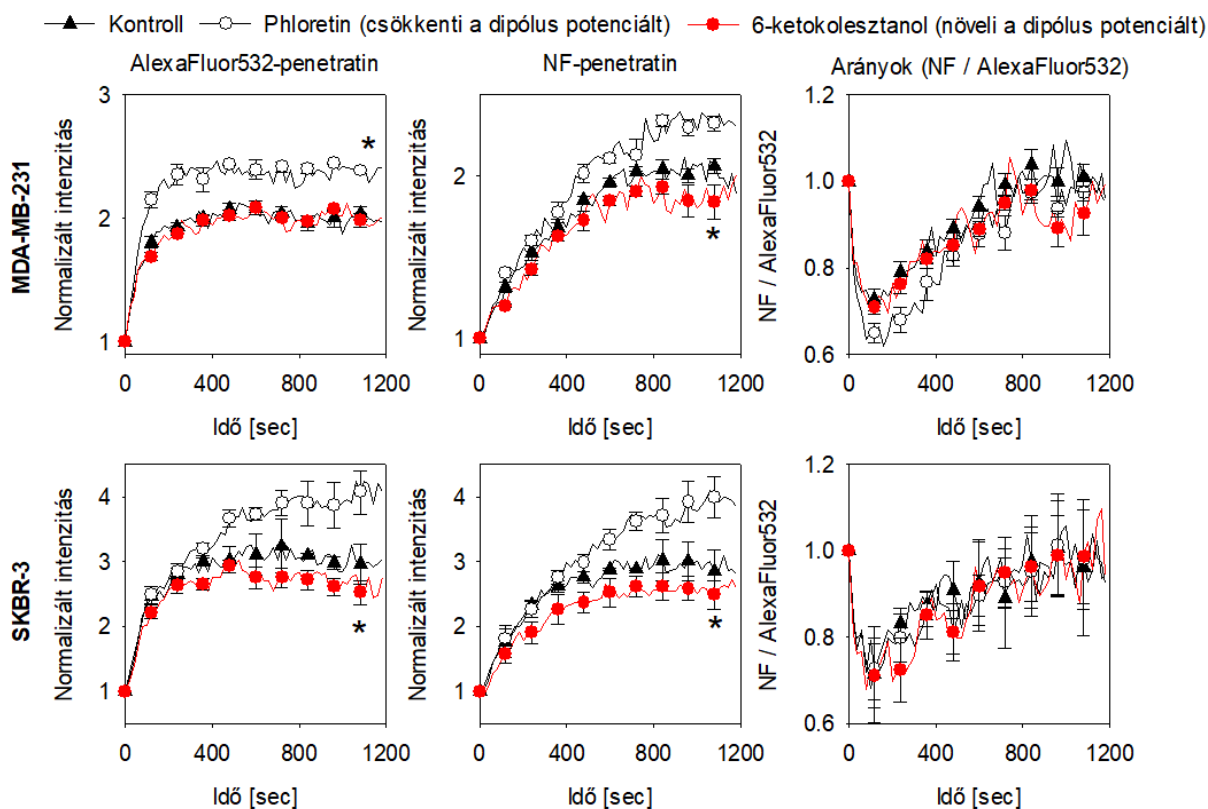


### 13. ábra: Fluoreszcensen jelölt penetratin származékok tömegspektrometriás és HPLC-analízise

AlexaFluor532-vel vagy naphthofluoresceinnel (NF) jelölt penetratint tömegspektrometriával (A,B) és HPLC-vel (C,D) elemeztük. Az A ábrán látható két fő csúcs az NF-penetratin négyszeres és ötszörös ionizált kationjának felel meg, míg a B ábrán látható három fő csúcs az AlexaFluor532-penetratin +4, +5 és +6 töltésű kationjainak felel meg.

### **6.1.2 Penetratin bejutási hatékonyságát befolyásoló tényező, a dipóluspotenciál vizsgálata floretin és 6-ketokolesztanol alkalmazásával**

Korábbi megállapításokra alapozva, miszerint a floretin, a 6-ketokolesztanol és az atorvasztatin kezelések az elvárásoknak megfelelően módosítják a dipóluspotenciált (*1. kiegészítő ábra*), arra törekedtünk, hogy leírjuk a megváltozott dipóluspotenciálnak a penetratin felvételére gyakorolt hatását. A csökkent dipóluspotenciál szignifikánsan fokozta mind a penetratin teljes sejtfelvételét, mind pedig annak koncentrációját a nem savas kompartmentekben, mind a SKBR-3, mind az MDA-MB-231 sejtekben (*14. ábra*). Mivel mindkét folyamat fokozódott a floretinnel elért alacsonyabb dipóluspotenciál mellett, az NF és az AlexaFluor532 intenzitások aránya, amely a savas kompartmentekből való részleges felszabadulást jellemzi, változatlan maradt. Ami a penetratin felvételének legfontosabb mutatóját, a citoszolban mért koncentrációját (az NF-penetratin intenzitás alapján) illeti, a floretin körülbelül 50%-os növekedést eredményezett ebben a paraméterben. Ezzel szemben a 6-ketokolesztanol, amely szignifikánsan növelte a dipóluspotenciált, statisztikailag nem szignifikáns hatást gyakorolt mind a penetratin teljes sejtfelvitelére, mind az endo-lizoszómális felszabadulására (*14. ábra*). A kontrollmintákban, illetve a megváltoztatott dipóluspotenciál mellett kezelt mintákban a penetratin felvételi kinetikája és a felvételt jellemző paraméterek, azaz a kezdeti csökkenés az NF-penetratin/AlexaFluor532-penetratin intenzitás arányában, valamint az NF-penetratin fluoreszcencia elnyújtott telítődése hasonló volt. Ez azt sugallja, hogy a penetratin felvételi mechanizmusa – amelyhez jelentősen hozzájárul az endocitózis – egyik kezelés hatására sem változott meg.



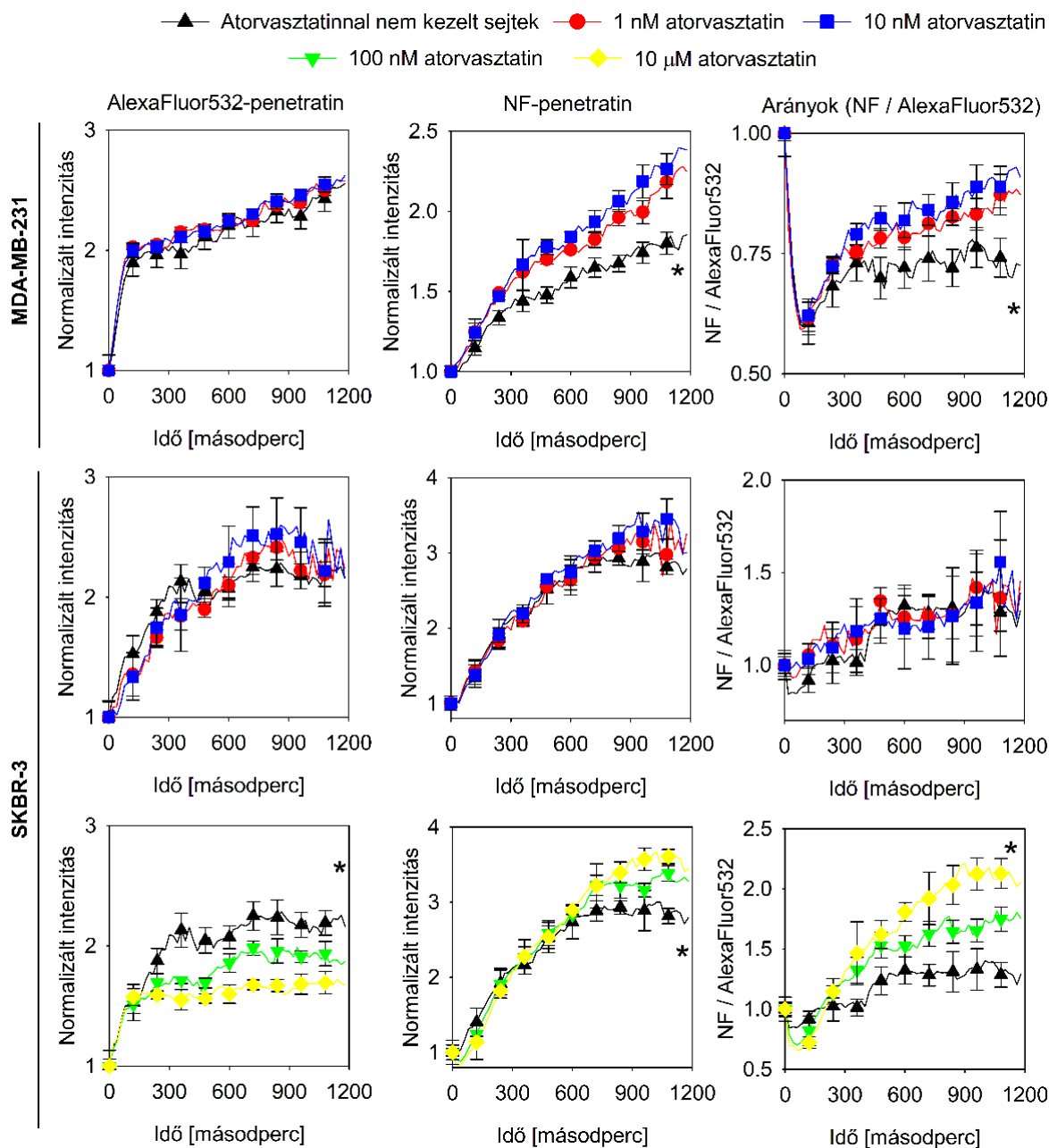
**14. ábra: A csökkentett dipóluspotenciál fokozza a penetratin sejtfelvételét és az endo-lizoszómális kiszabadulását.**

A sejteket (SKBR-3, MDA-MB-231; a bal oldalon látható) AlexaFluor532-penetratin és NF-penetratin keverékével kezeltük 37 °C-on, majd fluoreszcencia-intenzitásukat áramlási citometriával mértük. A sejtek membrán-dipóluspotenciálját floretinnel (phloretin) való előkezelés csökkentette, míg 6-ketokolesztannal növelte. Az időfüggő intenzitásukat és azok arányát a törmelék és az elhalt sejtek kizárása után határoztuk meg. A hibásávok az öt biológiai ismétlésből származó 12–14 mintából számított SEM-et (átlag standard hibája) mutatják. A csillagok a floretinnel (phloretin) kezelt minták és a kontroll között, a 20. percnél mért szignifikáns különbséget jelölik ( $P < 0,05$ ).

**6.1.3 A sztatínok fokozzák a penetratin endo-lizoszómális felszabadulását a dipóluspotenciál csökkenése révén**

Az MDA-MB-231 sejtek atorvasztatinnal való kezelése 1 nM, 10 nM, 100 nM és 10  $\mu$ M koncentrációtartományban szignifikánsan fokozta a penetratin endo-lizoszómális felszabadulását, miközben a teljes sejtfelvételre csak csekély hatást gyakorolt (15. ábra). Ezzel szemben az atorvasztatin SKBR-3 sejtekre gyakorolt hatása kisebb volt, és a kisebb koncentrációk esetében (1 nM, 10 nM) nem érte el a statisztikai szignifikanciát. Mivel kiderült, hogy a sejtvonal koleszterintartalmának csökkenése kisebb mértékű volt (1.kiegészítő ábra), mint az MDA-MB-231 esetében. Magasabb atorvasztatin-koncentrációkat is teszteltünk: 100

nM és 10  $\mu$ M atorvasztatin szignifikánsan csökkentette a penetratin teljes sejt felvételét az SKBR-3 sejtekben. Ezt az eredményt vagy a sztatín kezelés által gátolt endocitózissnak [277, 278], vagy a sejtek életképességének csökkenésének tulajdonítjuk, noha azokat a sejteket, amelyeknél a membrán permeabilitása fokozott volt (DAPI-pozitív sejtek), kizártuk az elemzésből. Ugyanakkor a penetratin endo-lizoszómális kompartmentből való kilépésének mértéke szignifikánsan magasabb volt ezekben a magas atorvasztatin-koncentrációkkal kezelt sejtekben, még akkor is, ha a teljes sejt felvétel alacsonyabb volt (15. ábra). Ezt a megfigyelést alátámasztja az NF/AlexaFluor532 intenzitásarány majdnem kétszeres növekedése, amely a penetratin endoszómákból való kiszabadulásának mértékét jellemzi. A citoszolban elért penetratin-koncentráció növekedése sztatín kezelés hatására (10 nM az MDA-MB-231 és 10  $\mu$ M az SKBR-3 esetében) körülbelül 50%, illetve 30% volt. Egyik atorvasztatin-koncentráció sem változtatott azon a tényen, hogy az AlexaFluor532-penetratin fluoreszcenciaintenzitása sokkal hamarabb telítődött, mint az NF-penetratiné, ami arra utal, hogy az endocitózis továbbra is jelentős mértékben hozzájárult a penetratin felvételéhez.

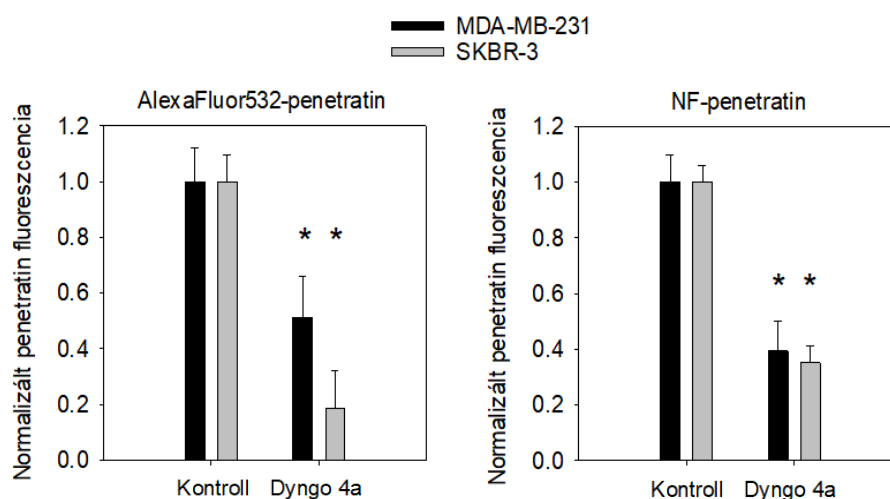


**15. ábra: Az atorvasztatin fokozza a penetratin teljes felvételét vagy endo-lizoszómális kiszabadulását.**

Két különböző sejtípust előkezeltünk a megadott koncentrációjú atorvasztatinnal 72 órán át, majd az AlexaFluor532-penetratin és az NF-penetratin felvételét áramlási citometriával követtük nyomon. Az időfüggő intenzitásokat és azok arányát a sejtörmelék és az elhalt sejtek kizárása után határoztuk meg. A hibásávok az öt biológiai ismétlésből származó 13–15 mintából számított SEM-et (átlag standard hibája) mutatják. A csillagok az ábrán a legmagasabb atorvasztatin-koncentrációval kezelt minta és a kontroll között, a 20. percnél mért szignifikáns különbséget jelzik ( $P < 0,05$ ).

#### 6.1.4 A penetratin endocitózis révén megvalósuló sejtbe történő bejutása

Annak érdekében, hogy feltárjuk az endocitózis hozzájárulását a penetratin felvételéhez, kísérleteket végeztünk Dyngo4a jelenlétében is, amely a dinamin inhibitora [279]. A kezeltetlen sejtekhez viszonyítva az inhibitor szignifikánsan, 50%–80%-kal csökkentette a fluoreszcens penetratinok teljes sejttartalmát és citoplazmatikus koncentrációját (16. ábra). Bár a dinamin gátlása nem feltétlenül blokkolja az endocitotikus folyamatok minden típusát, ezek a kísérletek az endocitózis domináns szerepére utalnak a penetratin felvételében.

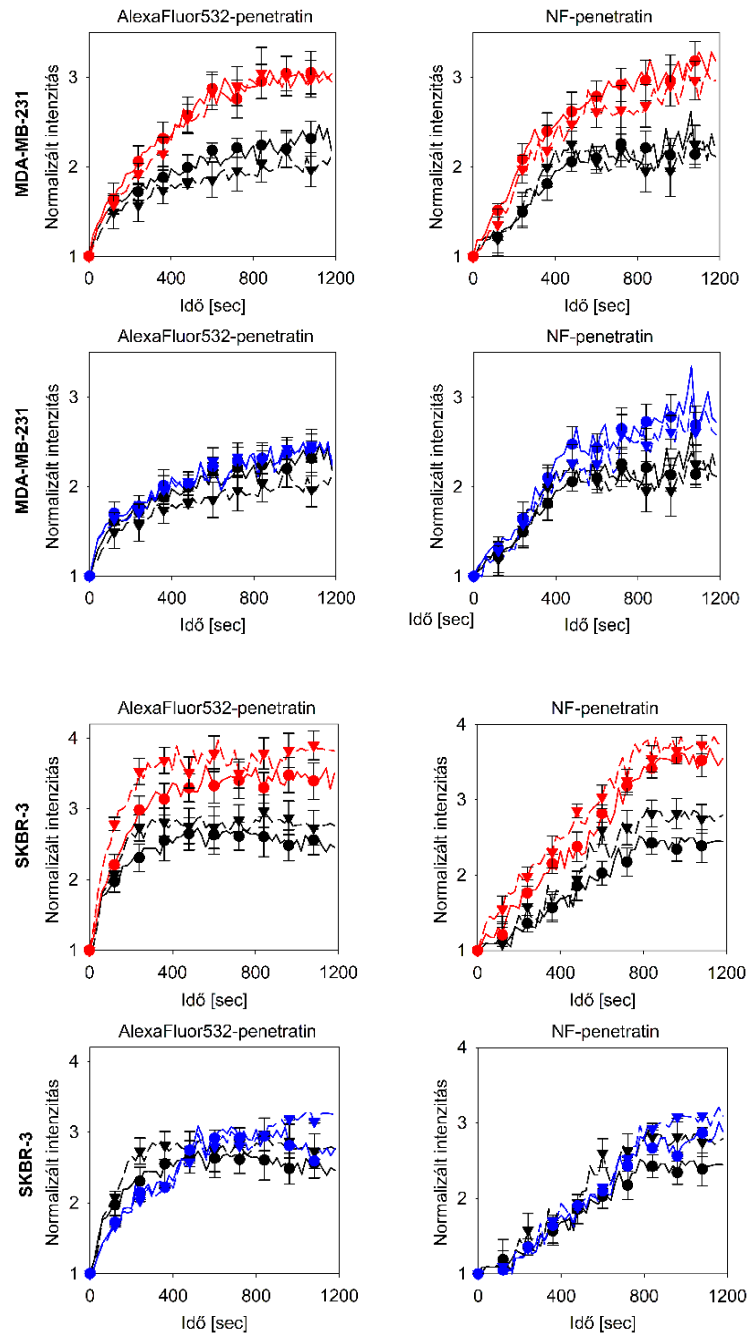
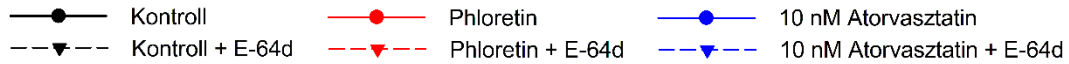


#### 16. ábra: Az endocitózis jelentős szerepet játszik a penetratin sejtbe jutásában.

A sejteket előkezeltük 40  $\mu$ M Dyngo4a-val, amely a dinamin inhibitora, majd 5  $\mu$ M AlexaFluor532-penetratin és 5  $\mu$ M NF-penetratin egyenlő moláris keverékével inkubáltuk. A teljes sejtes penetratin mennyiséget az AlexaFluor532-penetratin fluoreszcenciája, míg a penetratin semleges kompartmentekben mért koncentrációját az NF-penetratin fluoreszcenciája jellemezte, amelyeket áramlási citometriával határoztunk meg. Az ábrák a penetratin fluoreszcenciáit mutatják, a kontrollminták átlagára normalizálva, 20 percnél. A hibaszívek az öt biológiai ismétlésből számított átlag standard hibáját jelzik. A csillagok a kontrollhoz képest szignifikáns különbséget mutatnak, amelyet kétutas ANOVA és Tukey-féle HSD teszt igazolt ( $p < 0,05$ ).

### **6.1.5 A penetratin lizoszómális degradációja a megváltoztatott dipóluspotenciál esetében**

Az endocitotikus felvétel és a penetratin jelenléte az endo-lizoszómális kompartmentben magában hordozza a degradáció kockázatát [280], noha a penetratin hatékonyan ki is szabadul ebből a kompartmentből. Attól tartottunk azonban, hogy a penetratin citoszolikus felhalmozódásának látszata, amelyet a naftofluoreszcein fluoreszcenciájának növekedése alapján figyelhetünk meg, valójában a szabad festék vagy penetratin fragmentumok citoplazmában való megnövekedett koncentrációjának tudható be. Bár a szabad AlexaFluor532 nem képes átjutni a plazmamembránon, a szabad naftofluoreszcein anionos és neutrális izomerjeinek permeabilitása a plazmamembránon viszonylag magas. Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a szabad naftofluoreszcein valóban képes lehet kiszabadulni az endo-lizoszómális kompartmentből, ha jelentős mennyiségben keletkezik – ez pedig megnehezítené az eredmények értelmezését. Annak megállapítása érdekében, hogy a lizoszómális degradáció milyen mértékben járul hozzá a naftofluoreszcein-fluoreszcencia növekedéséhez, a penetratin felvételi kísérleteket aloxistan (E-64d), a lizoszómális cisztein-proteázok inhibitora jelenlétében végeztük el. A kísérletek azt mutatták, hogy a penetratin degradációja nem játszik jelentős szerepet az általunk megfigyelt fluoreszcenciaintenzitás-változásokban a 20 perces mérési időablakon belül (17. ábra). Úgy véljük, hogy a jelentős mértékű lizoszómális degradációhoz a sejtekbe jutó peptidek esetében hosszabb inkubációs idő szükséges, amint azt más tanulmányokban (pl. [280]– 2 órás inkubáció mellett) leírták. Megállapítottuk tehát, hogy a penetratin lizoszómális degradációjának hozzájárulása a citoszolban történő felhalmozódásához elhanyagolható, az atorvasztatin és floretin kezelés hatására megváltoztatott dipóluspotenciál körülményei között is (17. ábra).

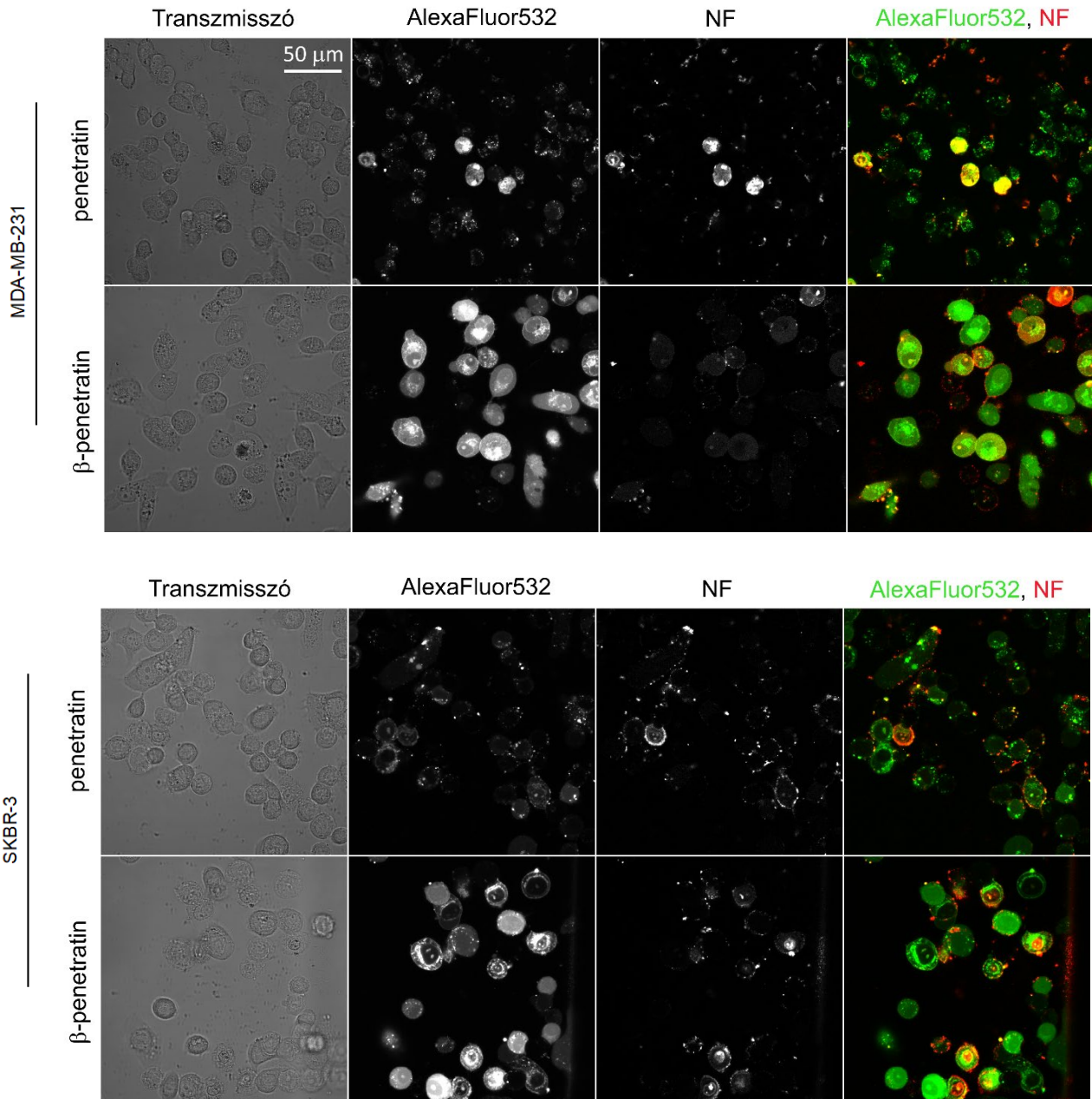


**17. ábra: Az liozómális degradáció mértéke nem nő a dipólpotenciál értékének megváltoztatásával sem.**

Két különböző sejttípust előkezeltünk floretinrel (phloretin) és 10 nM atorvasztatinnal, majd E-64d liozómális cisztein-proteázok inhibitorát alkalmaztuk. A kezelést követően AlexaFluor532-vel és NF-el jelölt penetratint adtunk a sejtekhez majd 20 percen keresztül detektáltuk azok fluoreszcens intenzitását áramlási citometria segítségével. A proteáz-inhibitorot tartalmazó mintákat jelölő szaggatott vonal nem tér el szignifikánsan az azzal nem kezelt mintákat jelölő folytonos vonaltól, ami arra enged következtetni, hogy a liozómális degradáció mértéke elhanyagolható. Szignifikáns különbség sem a különböző sejtvonalak esetén, sem a dipóluspotenciál megváltoztatására használt kezelőanyagok esetén sem látható.

### 6.1.6 Az $\alpha$ -penetratin és a $\beta$ -penetratin felvételének vizsgálata Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal

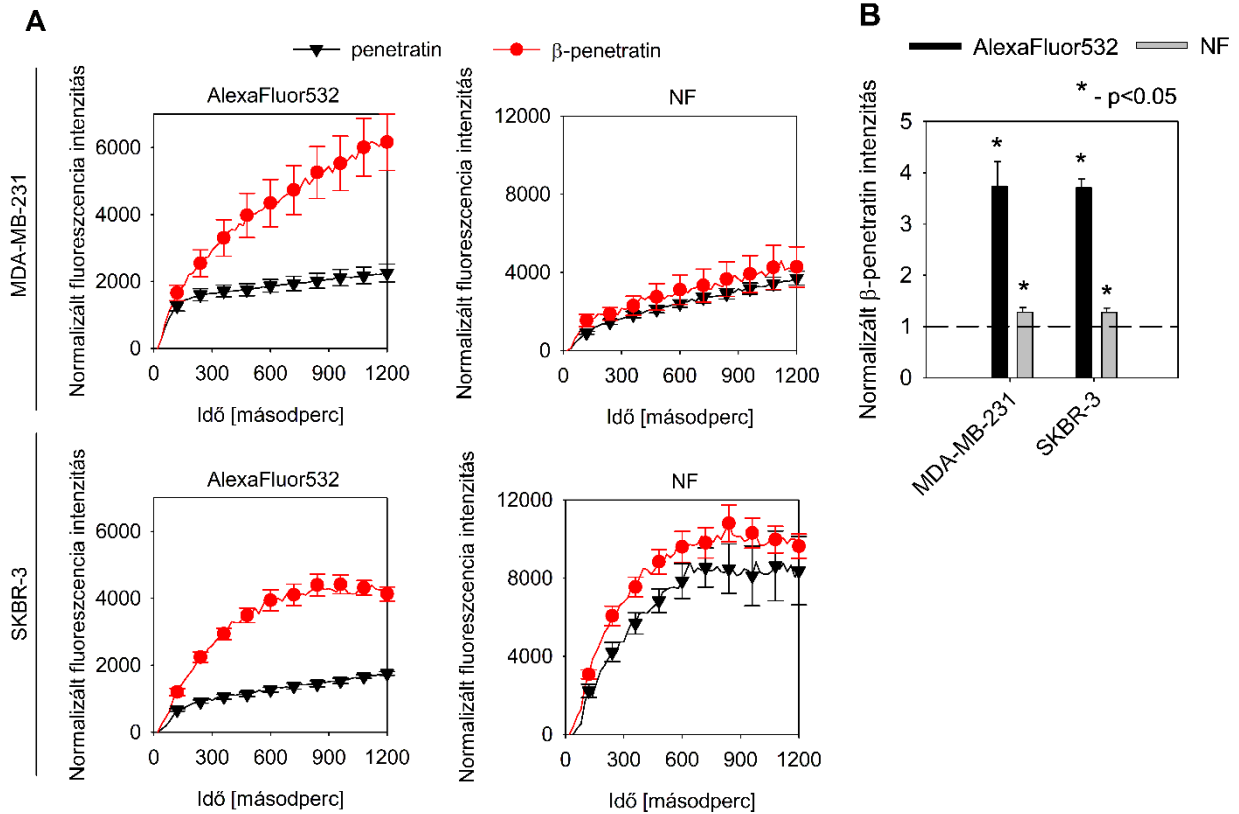
A fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidok sejten belüli vizsgálata kulcsfontosságú a hatékony intracelluláris célba juttatást szolgáló szállítási rendszerek fejlesztésében. A fluoreszcens penetratin-származékok eloszlásának konfokális mikroszkópos vizsgálata korábban feltárta, hogy az AlexaFluor532-penetratin erős fluoreszcenciát mutat még azokban az endoszómákban is, ahol az NF fluoreszcenciája kioltódik, és hogy az NF sejthez kötött fluoreszcenciája az endo-lizoszómális kompartmenten kívülről származik (2. kiegészítő ábra). Azt feltételezzük tehát, hogy az AlexaFluor532-penetratin és NF-penetratin fluoreszcenciaintenzitása valóban a teljes sejtes penetratin-felvételt, illetve a sejten belüli, endoszómán kívüli mennyiséget tükrözi. Ezt az eredményt szeretnénk volna összevetni a  $\beta$ -penetratinnal végzett kísérletek eredményeivel is (18. ábra), illetve áramlási citométeres mérésekkel is alátámasztani (19. ábra). Az AlexaFluor546-tal jelölt vad típusú,  $\alpha$ -penetratint felveszik mind az MDA-MB-231, mind az SKBR3 sejtek, de a módosított,  $\beta$ -penetratin felvétele sokkal nagyobb mértékű a konfokális mikroszkópos vizsgálatok szerint (18. ábra). Az AlexaFluor532 fluoreszcenciája egyenletes, citoplazmatikus eloszlást mutat a  $\beta$ -penetratin felvételekor mindkét sejtvonal esetében, ami arra utal, hogy a sejtpenetráló peptid kijutott az endoszómákból, még hozzá nagyobb mennyiségben, mint az  $\alpha$ -penetratin. Ennek ellenére a sejtpenetráló peptidok citoplazmatikus felhalmozódását mutató NF fluoreszcencia mértéke nem volt jelentősen nagyobb  $\beta$ -penetratin esetében, mint az  $\alpha$ -penetratinnál. Ennek lehetséges magyarázatára a 6.1.8. fejezetben fogok visszatérni.



**18. ábra: A  $\beta$ -penetratin hatékonyabb bejutást eredményez I.** Két különböző sejtípuson alkalmaztuk az  $\alpha$  illetve a módosított  $\beta$ -penetratin fluoreszcensen jelölt változatát 20 percen keresztül 37°C-on. Az Alexa Fluor532-penetratin és az NF-penetratin felvételét Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. Jól látható, hogy a  $\beta$ -penetratin mindkét sejtvonalon esetén több sejtben mutat homogén eloszlást, ami arra enged következtetni, hogy a hatékonyabb bejutás mellett, az endolizoszómális rendszerből is kijut. Ez különösen az AlexaFluor532-vel jelölt penetratin esetén figyelhető meg. Az NF-el jelölt penetratin endolizoszómákból való kijutását nem támasztja alá ez az eredmény.

### 6.1.7 Az $\alpha$ és a $\beta$ -penetratin felvételének vizsgálata FACS Aria áramlási citométerrel

A fluoreszcensen jelölt SPP-k intracelluláris vizsgálatára szintén alkalmas módszer az áramlási citometria, amely kiemelkedő a mennyiségi elemzésében. Ez a mérés a sejt-asszociált fluoreszcens jeleket detektálja, így lehetővé teszi a fluoreszcensen jelölt penetratinok sejtfelvételének és endo-lizoszómális felszabadulásának elkülönített vizsgálatát és azok mértékének meghatározását. Az AlexaFluor532-penetratin jele, amely a penetratin teljes sejtartalmának felel meg, két különböző sejtvonalon 100 másodpercnél ugrásszerű növekedésnek indult a  $\beta$ -penetratin esetén mindkét sejtvonalon. Ez jelentősen meghaladja az  $\alpha$ -penetratin fluoreszcencia intenzitás növekedését (19A. ábra). A mikroszkópos eredményekkel összhangban, a pH-érzékeny NF-penetratin fluoreszcenciáját tekintve, a  $\beta$ -penetratin fluoreszcencia intenzitása nem tér el lényegesen az  $\alpha$ -penetratin által mutatottól. Ezt alátámasztják a normalizált fluoreszcencia intenzitás értékek is. Ezek alapját a  $\beta$ -penetratin fokozott felvételét mutató, AlexaFluor532 intenzitások alapján kapott értékek, illetve ennek sokkal kisebb mértékét mutató, NF intenzitásokból származó értékek képezik (19B. ábra). Ezen fluoreszcencia intenzitás különbségek (18.-19. ábra) lehetséges magyarázatát a 6.1.8. bekezdésben kívánom tárgyalni.



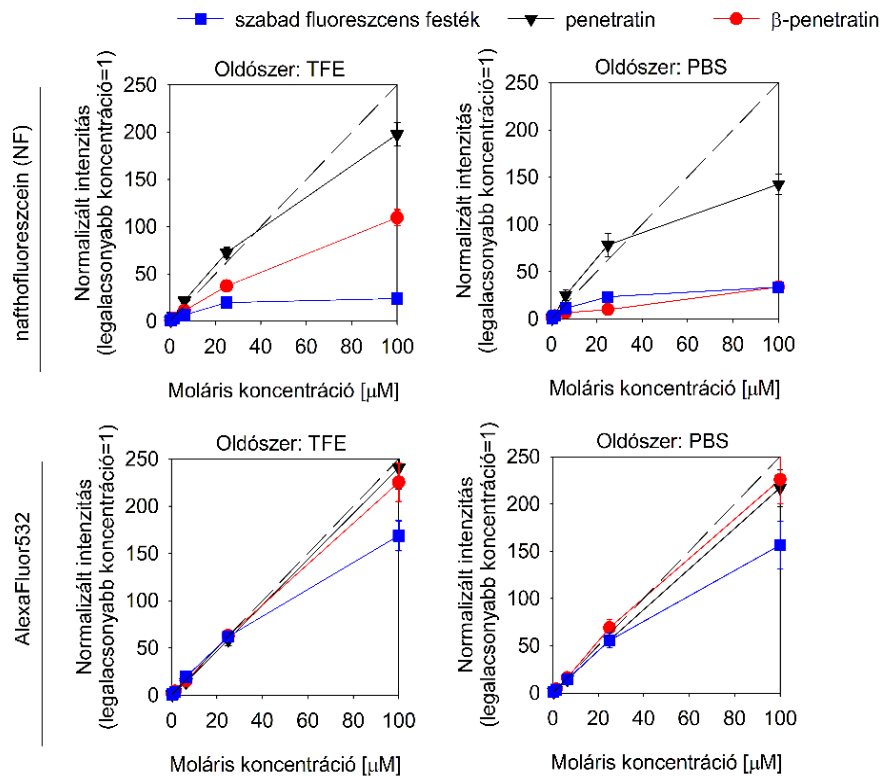
### 19. ábra: $\beta$ -penetratin hatékonyabb bejutást eredményez II.

Két különböző sejttípuson alkalmaztuk az  $\alpha$  illetve a módosított  $\beta$ -penetratin fluoreszcensen jelölt változatát 20 percen keresztül 37°C-on. Az Alexa Fluor532-penetratin és az NF-penetratin felvételét áramlási citometriával vizsgáltuk. Az A panel tükrözi a fluoreszcencia intenzitásból következtetett bejutási hatékonyság eredményét: a  $\beta$ -penetratin körülbelül négyszer akkora intenzitás értékeket vesz fel mint az  $\alpha$ -penetratin az AlexaFluor532-vel jelölt mintákat tekintve, mindkét sejtvonal esetén. A B panel azt az eredményt mutatja, hogy a AlexaFluor532-vel jelölt  $\beta$ -penetratin fluoreszcencia intenzitása, amelyek az  $\alpha$ -penetratin fluoreszcencia intenzitásához lettek normalizálva (szaggatott vonal), szintén négyszer akkora értékeket vesz fel. A csillagok a kontrollhoz/ $\alpha$ -penetratinhoz képest szignifikáns különbséget mutatnak, amelyet kétutas ANOVA és Tukey-féle HSD teszt igazolt ( $p < 0,05$ ).

#### 6.1.8 A „ $\beta$ ”-penetratin „önkioltó” tulajdonságának vizsgálata

A korábbiakban szemléltetett eredmények, kérdéseket vetnek fel a naftofluoresceinnel jelölt penetratint illetően. Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal (18. ábra) és a FACS Aria áramlási citométerrel (19. ábra) kapott eredmények esetén is jelentős eltérés van a két fluoreszcens festékkel jelölt penetratin között. Egy lehetséges magyarázat erre a self-quenching, vagyis az önkioltás jelensége. Ez akkor lép fel, amikor ugyanazokból a fluorofór molekulákból túl nagy koncentráció van egy adott térfogatban, és emiatt a fluoreszcencia intenzitása a koncentráció növekedésével nem tovább nő, hanem csökken. Ha a fluorofórok túl

közel kerülnek egymáshoz (általában  $<10$  nm), akkor a gerjesztett fluorofór átadhatja az energiát egy másik, nem gerjesztett azonos molekulának. Ez az energiaátadás nem fénykibocsátással, hanem rezonancia, dipólus–dipólus kölcsönhatás révén megy végbe, ami csökkentheti a fluoreszcenciát. Továbbá magas koncentráció esetén a fluorofórok aggregátumokat képezhetnek (pl.  $\pi$ – $\pi$  kölcsönhatások révén), ami változtatja a gerjesztett állapot energiaátmeneteit. Ezek az aggregátumok gyakran nem fluoreszkálnak, sokkal inkább elnyelik a jelet. Mivel ezen folyamatok esetében a koncentráció és a fluoreszcencia intenzitás közötti lineáris összefüggés nem érvényes, kíváncsiak voltunk arra, hogy a fluoreszcensen jelzett penetratin, elsősorban a naftofluoreszceinnel jelölt penetratin esetében kimutatható-e ez a jelenség. Ezért fluorimetriával megmértük különböző koncentrációjú szabad festék és festékkel jelölt penetratin, ill.  $\beta$ -penetratin oldat fluoreszcenciáját, és ábrázoltuk a koncentráció függvényében (20. ábra). Az eredmények arra utalnak, hogy a két festék közül a naftofluoreszcein mutatja az önkioltás jelenségét, hiszen fluoreszcencia intenzitása mind vizes közegben (PBS), mind hidrofób közegben (TFE) elmarad a lineáris összefüggés esetén várható értéktől. A penetratinnal való konjugáció a naftofluoreszcein önkioltó jellegét csökkentette (valószínűleg az önaggregációs hajlam csökkentésén keresztül), de a  $\beta$ -penetratinnal konjugált naftofluoreszcein esetében ismét jelentős mértékű önkioltás volt észlelhető. Ez arra utal, hogy a  $\beta$ -penetratin valószínűleg nagyobb aggregációs hajlamot mutat, mint a vad típusú penetratin. Az AlexaFluor532 nem mutatott jelentős önkioltást sem szabad formában, sem penetratinhoz konjugálva (valószínűleg az önaggregáció hiánya miatt), azonban az aggregációs hajlam felerősítése miatt a  $\beta$ -penetratinnal konjugált AlexaFluor532 már mind vizes, mind hidrofób közegben enyhe önkioltást mutatott.

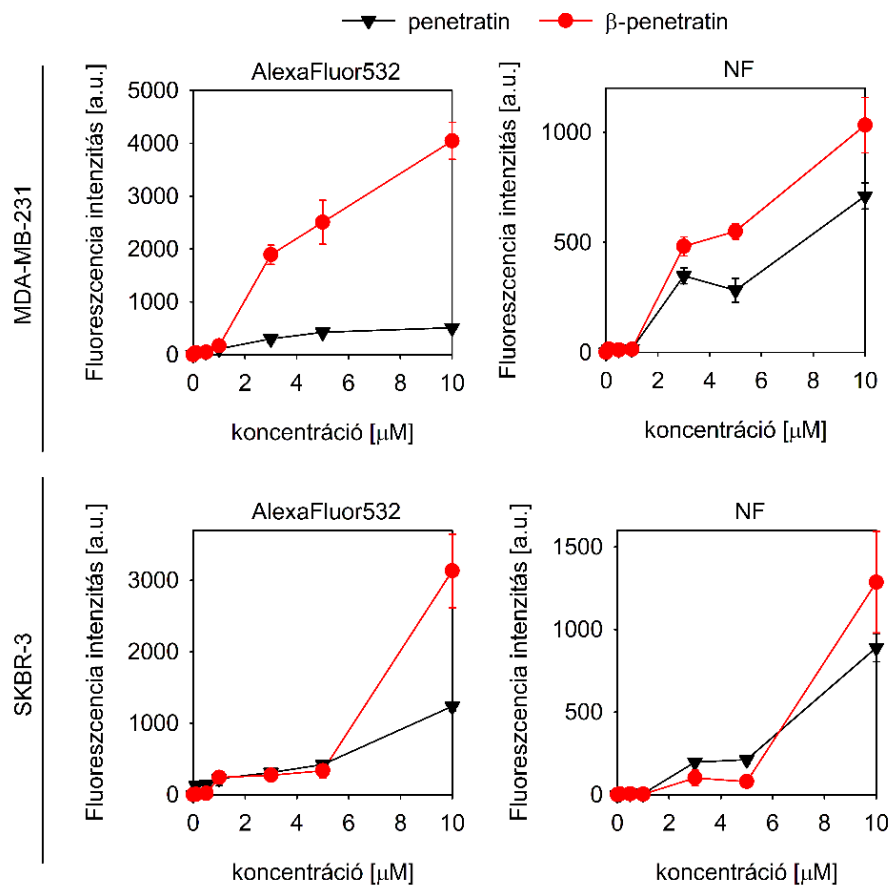


**20. ábra: A fluoreszcensen jelölt penetratin önkilító képessége valós jelenség.** Két különböző oldószerben (TFE és PBS) alkalmaztuk az  $\alpha$  illetve a módosított  $\beta$ -penetratin fluoreszcensen jelölt változatát. Az Alexa Fluor532-penetratin és az NF-penetratin fluoreszcencia intenzitását a koncentráció függvényében vizsgáltuk fluorimetriával. A naftofluoreszceinnel jelölt minták esetén a leírt görbék jóval eltérnek a szaggatott vonaltól, amely az egyenes arányosságot jelöli a fluoreszcencia intenzitás és a moláris koncentráció között.

### 6.1.9 A penetratin celluláris felvételének koncentrációfüggésének vizsgálata

Ha egy molekula monomer formában, egyszerű diffúzióval jut be a sejtbe, akkor a bejutás lineárisan függ a koncentrációtól. Azonban, ha a bejutás koncentrációfüggő, akkor az vagy transzporter függő transzportfolyamatra vagy endocitózisra utal, vagy arra, hogy a membránon való keresztüljutás valami olyan intermedieren keresztül történik, amelynek kialakulása nem lineárisan függ a koncentrációtól, pl. csak egy küszöb felett következik be. Az AlexaFluor532-penetratin és NF-penetratin fluoreszcencia intenzitásának mérésére alapozva határoztuk meg a sejtbe történő felvétel küszöbkoncentrációját. A 21. ábrán látható eredmények azt mutatják, hogy a penetratin celluláris felvétele koncentrációfüggő folyamat, amelyre 5  $\mu\text{M}$ -os peptidkoncentrációs határérték jellemző. Az 5  $\mu\text{M}$ -os küszöbkoncentráció eléréséig az intenzitás jelentősen nem változik, de a küszöbérték elérése után a folyamat robbanásszerűen aktiválódik, amelyet több tényező okozhat: akár a membránon való átjutáshoz, akár az endocitózis beindításához elegendő mennyiségű peptidnek kell lennie a sejtmembránban. E két

jelenség akár erősítheti is egymást, ami elősegíti a kooperativitást mutató koncentrációfüggés megjelenését.



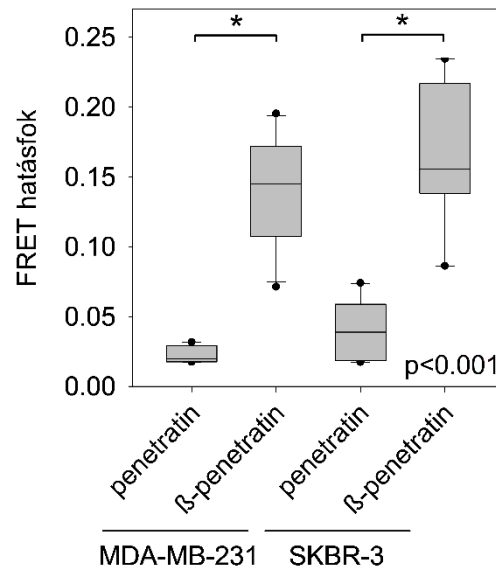
### 21. ábra: A penetratin celluláris felvétele függ a koncentrációtól.

Két különböző sejttípuson alkalmaztuk az  $\alpha$  illetve a módosított  $\beta$ -penetratin fluoreszcensen jelölt változatát 20 percen keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. Az Alexa Fluor532-penetratin és az NF-penetratin felvételét áramlási citometriával vizsgáltuk. Az időfüggő intenzitásokat és azok arányát a sejttörmelék és az elhalt sejtek kizárása után határoztuk meg.

### 6.1.10 A penetratin aggregációs képességének meghatározása FRET méréssel

A fluoreszcensen jelölt penetratinok aggregációs képességének, ezáltal a bejutási hatékonyságának háttérben lévő lehetséges magyarázat feltérképezése céljából konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével végeztünk FRET méréseket (22. ábra). A FRET a molekulák közötti nanométeres szintű interakciókat jelzi, ezért az aggregáció FRET-méréssel kimutatható. Konfokális mikroszkóppal mértük az AlexaFluor532-penetratin és a Cy5-penetratin között lejátszódó FRET jelenséget mind  $\alpha$ -penetratinnal, mind  $\beta$ -penetratinnal jelölt sejtek esetében (22. ábra). A FRET határfok kvantitatív kiértékelése arra utalt, hogy mindkét

penetratin mutat homoaggregációt, azonban a  $\beta$ -penetratin homoaggregációjának mértéke sokkal nagyobb mértékű, mint a vad típusú penetratiné. Mivel a FRET csak akkor játszódik le, ha a donor és az akceptor molekuláris közelségben vannak egymáshoz, ezen eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy a penetratin molekuláris klasztereket hoz létre a sejtekben, és azt, hogy ennek mértéke a  $\beta$ -penetratin esetében jelentősebb.



**22. ábra: A  $\beta$ -penetratin magasabb aggregációs képességének alátámasztása FRET-mérésekkel**  
Két különböző sejttípuson mértük a penetratin aggregációs képességét úgy, hogy 20 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk őket 5  $\mu$ M donorral (AlexaFluor532) jelölt és 5  $\mu$ M akceptorral (Cy5) jelölt módosítatlan ( $\alpha$ ) vagy módosított  $\beta$ -penetratinnal. A  $\beta$ -penetratin FRET hatásfok értékei közel négyszer magasabb értékeket vesznek fel mint az  $\alpha$ -penetratiné. Ebből arra következtethetünk, hogy a  $\beta$ -penetratin aggregációs képessége jóval nagyobb, mint az  $\alpha$ -penetratiné. A statisztikai összehasonlítás kétutas ANOVA-t követő Holm-Sidak teszttel történt, és az  $\alpha$  valamint a  $\beta$ -penetratin közötti különbség p értéke 0,001-nél kisebb volt.

## 6.2 Plazmamembrán által indukált helyi ligandum-koncentrációs gradiensek kialakulásának vizsgálata

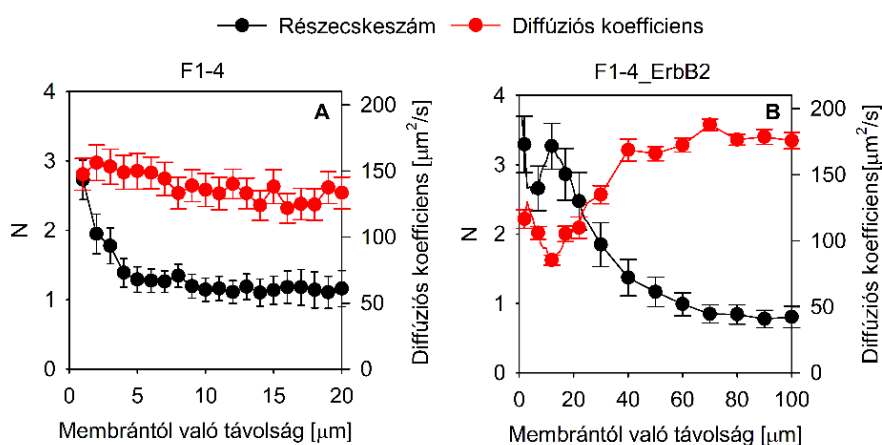
A sejbiológiai kísérleteket végző tudósok magától értetődőnek veszik, hogy a ligandum szabad oldatban mérhető koncentrációja megegyezik a plazmamembrán-receptorok közvetlen közelében lévő koncentrációval, különösen hidrofíl ligandumok esetében, amelyek nem oszlanak meg a lipid kettősrétegben. A plazmamembrán dinamikus és bonyolult jellege miatt azonban megvizsgáltuk ezt a feltevést az EGF esetében, amelynek plazmamembrán közeli koncentrációja fontos következményekkel járhat a receptor–ligandum kölcsönhatások affinitásának és kooperativitásának értelmezésében. A kísérletekhez két sejtvonalat

használtunk, mindkettőt olyan CHO sejtekből hoztuk létre, amelyek endogén módon nem expresszáltak ErbB fehérjéket. Az F1-4 sejtvonal stabilan GFP-vel jelölt EGFR-t expresszál, és ezt alkalmaztuk az EGFR-specifikus hatások jellemzésére más ErbB fehérjék befolyása nélkül. Az F1-4\_ErbB2 sejtvonalat az F1-4 sejtek tranziens transzfektálásával hoztuk létre CFP-vel jelölt ErbB2-vel, és ezt az ErbB2 együttes expressziójának esetleges hatásának vizsgálatára használtuk.

### **6.2.1 Fluoreszcens EGF koncentrációjának és diffúziós állandójának meghatározása a sejtmembrán közelében fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával**

A ligandum koncentrációját a plazmamembrántól mért távolság függvényében fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópiával (FCS) határoztuk meg. Az F1-4 sejteket 10 nM fluoreszcensen jelölt TAMRA-EGF jelenlétében inkubáltuk, és a peptid növekedési faktor koncentrációját a plazmamembrántól 100  $\mu\text{m}$  távolságig mértük: a membrántól számított minden 1  $\mu\text{m}$ -es távolságban 20  $\mu\text{m}$ -ig, majd minden 10  $\mu\text{m}$ -nél egészen 100  $\mu\text{m}$ -ig. Mivel nagyobb távolságoknál nem mutatkozott jellegzetes eltérés, az F1-4 sejtek görbéit csak 20  $\mu\text{m}$ -ig ábráztuk. Az EGF koncentrációja a membrán közvetlen közelében egy csúcsot mutatott, amely kb. 5  $\mu\text{m}$ -re terjedt ki a membrántól, és amelynek maximális koncentrációja háromszorosa volt a szabad oldatban mérhető koncentrációnak (23/A ábra). Bár ez a membrán-közeli csúcs az F1-4\_ErbB2 sejtekben is jelen volt, ezekben a sejtekben egy második, távolabbi EGF-csúcs is megjelent, amelynek nagysága hasonló volt a membrán-közeli csúcshoz, és a membrántól kb. 10–20  $\mu\text{m}$ -re helyezkedett el (23/B ábra). Az FCS görbék illesztéséből nemcsak a konfokális térfogatban levő részecskeszámot, hanem a diffúziós állandót is meghatároztuk. Ezek szerint a membránhoz közel elhelyezkedő EGF koncentrációcsúcs nem mutatott összefüggést a diffúziós állandóval, míg az ErbB2-t koexpresszáló sejtek esetében megjelenő membrántól távoli EGF koncentrációcsúcs egybeesett az EGF diffúziós állandójának lokális minimumával. Számítások azt mutatták (4. kiegészítő ábra), hogy a diffúziós állandó tapasztalt mértékű lokális csökkenése elegendő a mért EGF koncentrációcsúcs kialakításához. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a membrántól távoli

EGF csúcs a lokálisan korlátozott diffúzió miatt jön létre, azonban a membránhoz közeli koncentrációcsúcs nem függ össze a korlátozott diffúzióval.



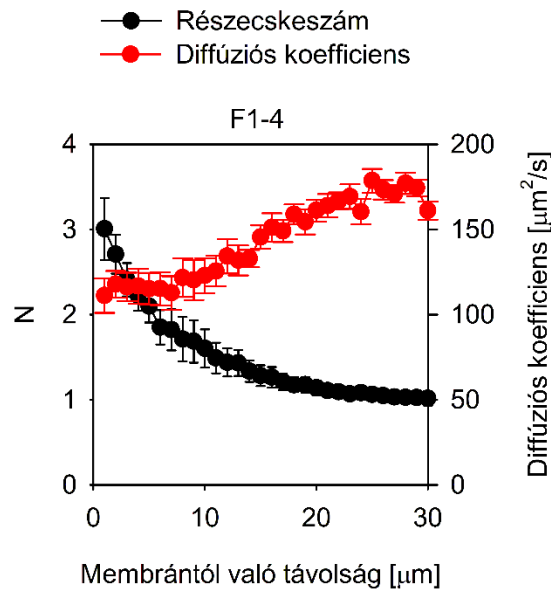
### 23. ábra: Az EGF koncentrációgradiensei a plazmamembrán közvetlen közelében

EGFR-t expresszáló F1-4 sejtek (A), valamint EGFR-t és ErbB2-t koexpresszáló F1-4\_ErbB2 sejtek (B) 10 nM TAMRA-EGF jelenlétében lettek inkubálva. A transzfektált sejtek EGFR- és ErbB2-expresszióját a megfelelő konstrukció GFP- illetve CFP-fluoreszcenciája alapján azonosították. Az F1-4 sejtek körül nem volt kimutatható diffúziós gradiens (A ábra), viszont az F1-4\_ErbB2 sejtekben a membrántól távolabb megjelenő koncentrációcsúcs egybeesett a diffúziós együttható lokális minimumával (B ábra). A diffúzió és a koncentráció közötti korreláció hiánya kizárja a térben változó diffúziós együtthatót a membránközeli EGF-csúcs magyarázataként, de a kizárólag F1-4\_ErbB2 sejtekben megfigyelt, membrántól távolabbi EGF-koncentrációcsúcs lokálisan gátolt diffúzió következménye lehet. A hibásávok a szórás (standard deviation) jelölik.

### 6.2.2 A sejtmembrán körforgásának gátlása

A membránközeli ligandum-koncentrációs csúcs okának mélyebb vizsgálata érdekében megpróbáltuk gátolni a membránforgalmat anélkül, hogy a sejtek életképességét veszélyeztettük volna. Korábbi eredményekkel összhangban az egyes inhibitorok önmagukban nem bizonyultak elegendőnek a membránforgalom kellő mértékű gátlásához. Végül egy háromkomponensű koktélt alkalmaztunk, amely latrunculin B-t, para-amino blebbistatint és mirisztoilezett dinamin növekedést gátló peptidet (DIP) tartalmazott, amelyek rendre az aktin polimerizációt, a miozin- és a dinamin-aktivitást gátolják. Az F1-4 sejtek ezzel a kombinációval történő kezelése megszüntette a membránközeli csúcsot, de egy másikat hozott létre helyette (24. ábra). Az utal arra, hogy ez az új membránközeli koncentrációcsúcs más, mint az 5. kiegészítő ábrán bemutatott, hogy az új koncentrációcsúcs kiterjedése nagyobb (kb. 5-10  $\mu\text{m}$ -re is észlelhető a membrántól), illetve a diffúziós együtthatóval negatívan korrelál (24. ábra). Ez utóbbi megfigyelés egy diffúziós gát kialakulására utal, amelynek lehetséges eredetét a „Diskusszió” részben tárgyalom.

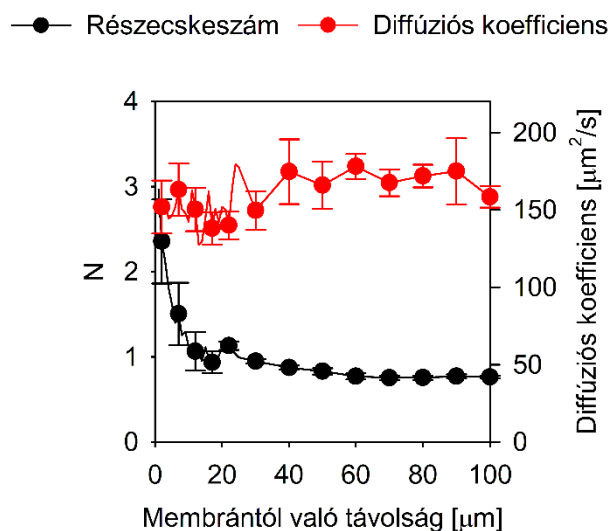
Az EGF térbeli változó diffúziós együtthatóját hatványfüggvénnyel modelleztük, majd a Fokker–Planck egyenlet megoldásával határoztuk meg az EGF egyensúlyi koncentrácioprofilját (5. kiegészítő ábra), amely meglepően hasonló a 24.ábrán látható kísérletileg megfigyelt görbéhez.



**24. ábra: A membránforgalom gátlásának hatása az EGF koncentrációs profiljára**  
 Az F1-4 sejteket előkezeltük egy 5  $\mu\text{M}$  latrunculin B-t, 50  $\mu\text{M}$  para-amino blebbistatint és 50  $\mu\text{M}$  mirisztoilezett dinamin-gátló peptidet tartalmazó koktéllal 37 °C-on 1 órán keresztül, majd 10 nM TAMRA-EGF-fel inkubáltuk. Az inhibitorok a kísérlet teljes időtartama alatt jelen voltak. Az FCS-t az EGF-molekulák konfokális térfogatra (N) eső számának és a diffúziós együtthatónak a meghatározására használtuk, amelyeket a membrántól való távolság függvényében ábrázoltunk. A hibasávok a SEM szórást mutatják.

### 6.2.3 Ioncsatornák blokkolása

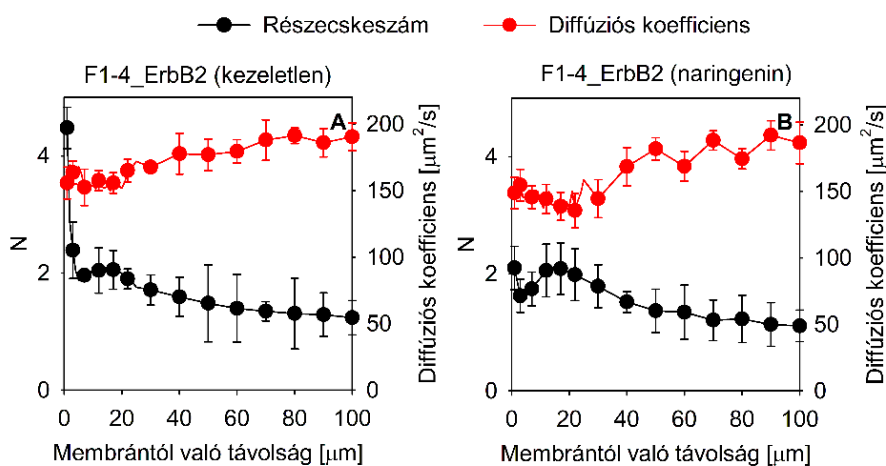
A membránközele EGF-koncentrációs csúcs eltűnése latrunculin, para-amino blebbistatin és mirisztoilezett dinamin-gátló peptidet tartalmazó koktéllal történő kezelés után arra utal, hogy e csúcs kialakulásában a membránkörforgalom szerepet játszik. Bár ez a folyamat szükségszerűen magában foglalja az exocitózist, a Golgiból származó és a reciklizáló vezikulák exocitózisának széles körben használt inhibitora, a monensin [281-283], nem tudta megszüntetni a membránközele ligandumkoncentrációs csúcsot (25. ábra).



### 25. ábra: A monensin hatása a membránközeleli ligandumkoncentrációs csúcsra

F1-4\_ErbB2 sejtek 10 nM TAMRA-EGF jelenlétében lettek inkubálva, majd monensinnel lettek kezelve 30 percen keresztül, 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban. Az FCS módszerével meghatároztuk a ligandumok számát konfokális térfogatonként (N), illetve a TAMRA-EGF diffúziós együtthatóját. A görbékről leolvasható, hogy a hagyományos exocitikus útvonalak gátlóként alkalmazott monensin hatása nem szünteti meg a membránközeleli ligandumkoncentrációs csúcsot.

Egy lehetséges magyarázat arra, hogyan vezethet a membránforgalom – azaz az endocitózis és exocitózis nagyon gyors egymástutánja – membránközeleli ligandumkoncentrációs csúcs kialakulásához: az endocitált tartalom azonnali vissza-exocitózisa révén lehet, miután az endoszómák zsugorodása miatt koncentrációdott. Felvetették, hogy a kétpórusú ioncsatornák szerepet játszanak ebben a folyamatban [270, 271]. Az F1-4\_ErbB2 sejtek naringeninrel – egy nemrégiben leírt kétpórusú ioncsatorna-gátlóval [272]– történő kezelése szignifikánsan csökkentette a membránközeleli csúcs nagyságát, miközben nem befolyásolta a membrántávoli csúcsot (26. ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy a membrántávoli csúcs alakja ezekben a kísérletekben némileg eltér az 23. ábrán láthatótól. Feltételezzük, hogy az extracelluláris diffúziós gát, amelyet a sejtek felépítettek, kissé különbözött az itt bemutatott kísérletekben az 23. ábrán látottól, ami kevésbé kifejezett membrántávoli csúcsot eredményezett. Tekintettel a jelenségekhez vezető folyamatok összetettségére, úgy véljük, hogy ezek a különbségek bőven az elfogadható biológiai variabilitás határain belül vannak.

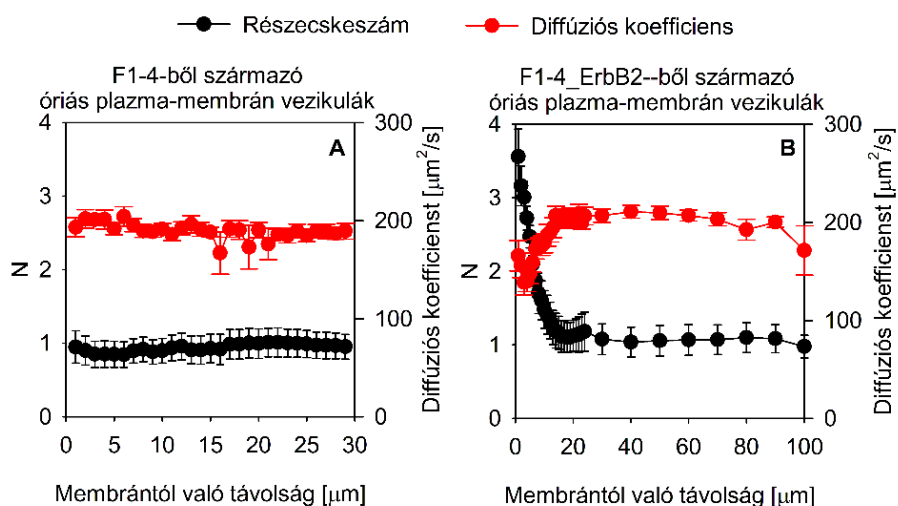


**26. ábra: A TPC2 kétpórusú ionszűrő hatására a plazmamembrán közvetlen közelében kialakuló ligandumgradiensek**

F1-4\_ErbB2 sejtek (A), valamint naringeninnel előkezelt F1-4\_ErbB2 sejtek (B) 10 nM TAMRA-EGF jelenlétében lettek inkubálva, majd az FCS módszerrel meghatároztuk a ligandumok számát konfokális térfogatonként (N), illetve a TAMRA-EGF diffúziós együtthatóját. A naringenin szignifikánsan csökkentette a membránközelbeli csúcs nagyságát, de nem befolyásolta a membrántávolsági csúcsot.

#### 6.2.4 A TAMRA-EGF koncentrációs gradiensek vizsgálata a GPMV-k környezetében

Feltételeztük, hogy az aktív membránforgalom állhat az EGF-koncentrációs csúcs kialakulásának hátterében, amely a plazmamembrán közvetlen közelében figyelhető meg. Az óriás plazmamembrán vezikulák (GPMV-k) hasznos eszközök a membránforgalom biológiai jelenségekhez való hozzájárulásának tisztázására, mivel összetételük nagyrészt hasonlít a plazmamembránéhoz, ugyanakkor nem mennek keresztül membránforgalmon [273]. Az F1-4 sejtekből előállított GPMV-k körül a ligandumkoncentráció teljesen homogénnek bizonyult, míg az F1-4\_ErbB2 sejtek esetében membránközelbeli csúcs jelent meg (27. ábra). Mivel ez a koncentrációs csúcs fordítottan korrelált a diffúziós együtthatóval (27./B ábra), ezért helyileg gátolt diffúzió hozhatta létre, amely pl. a vezikulák képződése során a felszínükre rakódó extracelluláris mátrixkomponensekből állhat. Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a membránközelbeli EGF-koncentrációs csúcs létrejöttéhez aktív membránforgalmat mutató élő sejthártya szükséges.

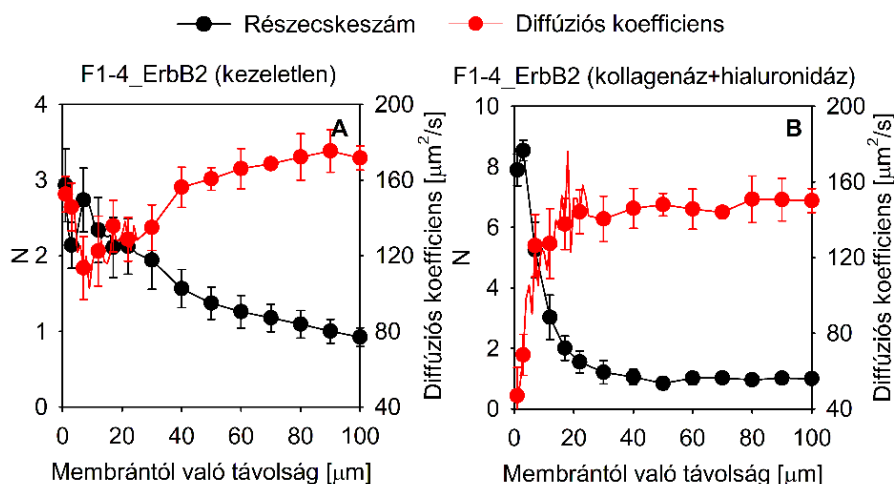


**27. ábra: A TAMRA-EGF koncentrációgradiens a GPMV-k környezetében**

GPMV-eket készítettünk F1-4 (A) és F1-4\_ErbB2 sejtekből (B), majd poli-L-lizin bevonatú fedőlemezekre ültettük őket. A vezikulumokat 10 nM TAMRA-EGF jelenlétében inkubáltuk, és a részecskék számát konfokális térfogatonként (N), valamint a TAMRA-EGF diffúziós együtthatóját FCS segítségével határoztuk meg. A hibásávok a szórást (standard deviációt) jelzik.

**6.2.5 Extracelluláris mátrix emésztése**

A diffuzivitás lokális minimumának kézenfekvő magyarázata a viszkozitás lokális maximuma lehet, amelyet az extracelluláris mátrix komponenseinek szekréciója okoz. Ezért megmértük a diffúziós együttható és az EGF koncentráció korrelációját olyan F1-4\_ErbB2 sejtekben, amelyeket kollagenáz és hialuronidáz keverékével kezeltünk. Bár a kezelés megszüntette a membrántól távolabbi csúcsot, egy nagyon erős ligandumkoncentráció-csúcsot eredményezett közvetlenül a membrán felett (28. ábra). Ez a nagymértékű koncentrációcsúcs szorosan egybeesett a diffúziós együttható jelentős csökkenésével, ami arra utal, hogy az előbbit az utóbbi okozhatta. Ezt a jelenséget az extracelluláris mátrix enzimatis lebontásának és fragmentumainak plazmamembránon való lerakódásának tulajdonítjuk.



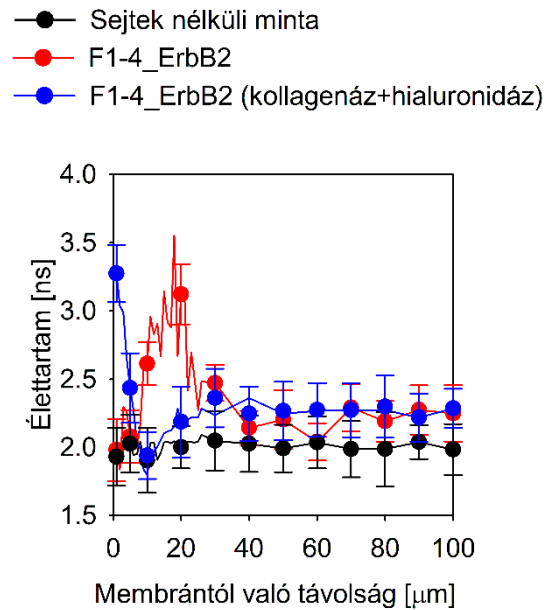
**28. ábra: Az extracelluláris mátrix és a lokális mikroviszkozitás-változások szerepe a membrántól távolabbi EGF-koncentrációcsúcs kialakulásában**

Az EGFR-t és ErbB2-t egyaránt expresszáló F1-4\_ErbB2 sejteket 10 nM TAMRA-EGF-fel inkubáltuk (A). Egy másik sejtminőt 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kollagenázzal és 20 U/mL hialuronidázzal előkezeltünk 37 °C-on 90 percig, mielőtt 10 nM TAMRA-EGF-et adtunk volna hozzá (B). Az FCS segítségével minden mikrométeren a membrántól 20  $\mu\text{m}$ -ig, majd minden 10  $\mu\text{m}$ -en a plazmamembrántól 100  $\mu\text{m}$  távolságig meghatároztuk a ligandum részecskék számát konfokális térfogategységként (N), valamint a TAMRA-EGF diffúziós együtthatóját.

**6.2.6 A viszkozitás mérése BODIPY-alapú molekuláris rotorral**

A membrántól távoli EGF koncentrációcsúcs diffúziós állandóval való negatív korrelációja egyértelműen arra utalt, hogy ezt a csúcsot egy diffúziós gát, másnéven barrier hozta létre. Sajnos számtalan próbálkozásunk, amellyel a feltételezhetően itt lerakódott extracelluláris mátrixkomponenseket ki szeretnénk mutatni, nem járt sikerrel. Ennek valószínű oka az lehet, hogy a CHO sejtek által kiválasztott extracelluláris mátrix összetétele nem ismert, és a hörcsög fehérjék (CHO=kínai hörcsög ovárium) elleni antitestek egyébként is nagyon nehezen elérhetőek. Ezért indirekt, de az eddigiektől független bizonyítékot próbáltunk szerezni arra, hogy a membrántól távoli koncentrációcsúcs valóban diffúziós barrier által okozott. Ehhez egy BODIPY-alapú molekuláris rotort alkalmaztunk, amelynek fluoreszcencia-élettartama a lokális mikroviszkozitást jelzi [275, 276]. Sejtek hiányában a szenzor élettartama állandó volt a közegben, míg F1-4\_ErbB2 sejtek membránja fölött 10–20  $\mu\text{m}$ -rel maximumot mutatott, jelezve a lokális mikroviszkozitás növekedését (29. ábra). Kollagenáz és hialuronidáz kombinációval kezelt sejtek esetében ez a magas viszkozitású régió a membrán közelébe helyeződött át (29. ábra), ugyanúgy, ahogy a diffúziós együttható lokális minimuma közvetlenül a membrán fölött volt a emésztőenzimokkal kezelt sejtekben (28./B ábra).

Következésképpen elmondható, hogy F1-4\_ErbB2 sejtekben a membrántól 10–20  $\mu\text{m}$ -re lévő ligandumkoncentrációs csúcsot a lokális viszkozitás maximuma okozza, ami valószínűleg az extracelluláris mátrix komponenseinek jelenlétéből ered.



**29. ábra: Lokális mikroviszkózitás vizsgálata BODIPY-alapú molekuláris rotorral**

Egy molekuláris rotor, a 8-fenil-BODIPY, fluoreszcencia-élettartamának mérésével megbecsültük a közeg mikroviszkózitását. A méréseket sejtek nélküli közegben, kezeletlen és 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kollagenázzal és 20 U/mL hialuronidázzal kezelt F1-4\_ErbB2 sejtek felett végeztük el. Az élettartam értékek a sejtek membránja fölött 10–20  $\mu\text{m}$ -rel maximumot mutatnak, amelyből a lokális mikroviszkózitás növekedésére lehet következtetni. Kollagenáz és hialuronidáz kezelés hatására ez a magas viszkozitású régió a membrán közelébe helyeződött át.

## 7. **Diszkusszió**

Számtalan sejtbiológiai folyamat első lépése a sejtmembránon keresztül történik. Munkám során két olyan jelenséget választottam ki, amelyek szabályozásában a membránfolyamatok fontos szerepet töltenek be. Először a SPP-k celluláris felvételét vizsgáltam. Bár az alapmegfigyelés, azaz a SPP-k membránpenetrációs képessége már évtizedek óta ismert, a folyamat hatékonysága, amit elsősorban az endolizoszómális kiszabadulás elmaradása korlátoz, jelentős javításra szorul. Ezért a SPP-ekkel foglalkozó alprojekt első részében plazmamembrán biofizikai tulajdonságait és olyan jelenségeket vizsgáltam, amelyek a SPP-k celluláris felvételének hatékonyságának meghatározásában vesznek részt.

A pozitív membrán dipóluspotenciál gátolja a penetratin teljes sejt felvételét és annak felszabadulását a savas endo-lizoszómális rendszerből. Ez a következtetés az AlexaFluor532-jelölt és NF-jelölt penetratin sejtes intenzitásának időbeli mérésén, ill. ennek dipóluspotenciált módosító kezelés során bekövetkező változásán alapul. A dipóluspotenciál hatása a penetratin endo-lizoszómális kompartmentből való kijutására legvalószínűbben azon keresztül valósul meg, hogy a sejten átjutó peptid beépül a membránba. Mivel a penetratin pozitív töltésű, a szintén pozitív dipóluspotenciál gátolja. Ezen megfigyelésünk összhangban van azzal, hogy peptidok és kis hidrofób molekulák membránba való beépülése és penetrációja függ a dipóluspotenciáltól [165]. Bár a dipóluspotenciál hatása az endocitózissal felvett penetratin mennyiségét, mivel a peptid membránhoz való kötődése, amelyből az endocitotikus vezikulák keletkeznek, változik.

A dipóluspotenciál mellett a membrán viszkozitása és hidratációja is fontos paraméterként szolgál a membrán rendezettségének leírásában. A munkacsoportunk által végzett kiegészítő mérések szerint – amelyek szorosan kapcsolódnak a bemutatott kutatási projekthez, de jelen értekezés nem taglalja őket – a kezelések nemcsak a dipóluspotenciált, hanem mindhárom vizsgált paramétert (dipóluspotenciál, viszkozitás és hidratáció) befolyásolták [284]. Ezek közül a dipóluspotenciál mutatta a legszorosabb korrelációt a penetratin felvételével és az endolizoszómális felszabadulással. Ez az összefüggés mind a floretinnel, mind az atorvasztatinnal kezelt minták esetében megfigyelhető volt. Elmondható tehát, hogy a membrán további biofizikai tulajdonságainak és a penetratin felvételének korrelációját elemezve kiderült, hogy a dipóluspotenciál az egyetlen olyan jellemző, amely elég prediktív erővel rendelkezik a penetratin felvételének megjósolására. Az a tény, hogy a penetratin pozitívan töltött peptid, nemcsak nyilvánvaló magyarázatot ad arra, hogy a pozitív

intramembrán dipóluspotenciál miatt jelent akadályt ennek a peptidnek a membránon való átjutásához, hanem azt is sugallja, hogy ezek az elvek más kationos sejtpenetráló peptidekre is érvényesek lehetnek.

A floretin- és atorvasztatin-kezelés csökkentette a membrán dipóluspotenciálját, és jelentősen fokozta a penetratin citoplazmatikus koncentrációját. Mivel a felhasznált nanomoláris atorvasztatin-koncentráció megegyezik a klinikai alkalmazásban használt dózissal, a statinnal fokozott penetratin-felvétel potenciális orvosi jelentőséggel bír.

Különösen érdekes, hogy bár az atorvasztatin jelentősebben csökkentette a dipóluspotenciált, csupán a savas endo-lizoszómákból való kijutást fokozta, ezzel szemben a floretin növelte a penetratin teljes sejtfelvételét. Az a tény, hogy a floretin nem növeli a penetratin endo-lizoszómális felszabadulását, azzal magyarázható, hogy ez a vegyület valószínűleg nem éri el a szükséges koncentrációt az intracelluláris membránokban a rövid, 10 perces inkubáció alatt, így ezeknek a kompartmenteknek a dipóluspotenciálja többnyire változatlan marad. Ezzel szemben az atorvasztatinnal végzett 3 napos kezelés elegendően hosszú ahhoz, hogy jelentős csökkenés következzen be a koleszterintartalomban, és ennek következtében az endo-lizoszómális membránok dipóluspotenciálja is csökkenjen. A floretin által indukált minimális dipóluspotenciál-csökkenés és a penetratin felvételének jelentősen megnövekedett szintjének kettőssége szintén magyarázatra szorul. Feltételezzük, hogy a fizioiógias dipóluspotenciál már eleve korlátozza a penetratin felvételét a lehető legnagyobb mértékben. Ezt alátámasztja, hogy a 6-ketocholesztanol kezelés után jelentősen fokozott dipóluspotenciál szinte nem befolyásolta a penetratin felvétel jellemzőit. Másrészt a dipóluspotenciál viszonylag kis mértékű csökkenése, amelyet floretin okozott, már elég lehet a penetratin felvételének elősegítésére.

Bár az atorvasztatin által elért dipóluspotenciál-csökkenés lényegesen nagyobb, mint a floretin okozta változás, az atorvasztatin nem befolyásolta a penetratin teljes sejtkoncentrációját. Az AlexaFluor532-penetratin intenzitásának hirtelen emelkedése és az NF-penetratin intenzitásának elnyújtott növekedése arra utal, hogy a kezdeti felvételt endocitózis mediálja, amelyet egyik kezelés sem változtatott meg. Ezért az atorvasztatin hatására nem növekedett a penetratin teljes felvétele, ami arra utal, hogy az endocitózist akadályozza az atorvasztatin-kezelés. Ez pl. az endocitózisban részt vevő G fehérjék prenilációjának gátlásán keresztül valósulhat meg [278]. Ez azért jelentős, mert a tumorsejtek membránfluiditása általában alacsonyabb, mint az egészséges sejteké, részben a telített és telítetlen zsírsavak arányának növekedése és a koleszterinszint emelkedése miatt. Ezen jellemzők alapján feltételezhető – bár ez még nem került kísérletileg igazolásra –, hogy a tumorsejtek membránjainak dipóluspotenciálja magasabb, mint az egészséges sejteké, így várhatóan csökkentett felvételt

mutatnának a sejtpenetráló peptidek esetében is. Következésképpen a dipóluspotenciál atorvasztatinnal történő csökkentése ebben az összefüggésben is előnyös lehet, potenciálisan növelve a sztatinok terápiás relevanciáját tumorok esetében, hiszen szelektíven növelhetik a sejtpenetráló peptidek felvételét daganatsejtekben, amihez hozzáadódik tumorsejtek szaporodását gátló hatásuk [285].

Az endocitózist követően a molekulák az endolizoszómális kompartmentekbe kerülnek, ahol fennáll a lizoszómális degradáció lehetősége, ami annak a veszélyét hordozza magában, hogy a molekulák nem szabadulnak ki az endo-lizoszómákból, hanem degradálódnak, így nem érik el a célhelyet. Ezért is különösen fontos az, hogy az atorvasztatin fokozza a lizoszómális kiszabadulást. Eredményeink azt mutatják, hogy a lizoszómális degradáció mértéke elhanyagolható a fluoreszcensen jelölt penetratinok esetében, megváltozott dipóluspotenciál értékek mellett is, így elmondható, hogy a citoszólba való kijutásban a lizoszómális degradáció nem játszik szerepet. A munkacsoportunk más eredményei alapján más dipóluspotenciált csökkentő kezelések is fokozzák az SPP felvételt [163, 168].

A membránok különböző biofizikai tulajdonságait megváltoztató kezelések mellett más kísérleteket is tettünk az SPP-k hatékonyabb felvételének elérése érdekében. Ezt egy strukturálisan módosított sejtpenetráló peptiddel kívántuk elérni, amelyet kollaborációs partnerünk, a Semmelweis Egyetem, Szerves Vegytani Intézetének kutatócsoportja szintetizált, azonban ennek részletei nem hozhatók nyilvánosságra. Vizsgálataink során kiderült, hogy a módosított változat, a  $\beta$ -penetratin önmagában, dipóluspotenciált befolyásoló kezelések nélkül is jelentősen hatékonyabban jut be a sejtekbe, ezzel párhuzamosan jobban aggregálódik (FRET és önkioztási mérések). A homogén fényes festődés arra utal, hogy könnyedén kijut az endolizoszómális-rendszerből és eljut a citoplazmába, amely alátámasztja az SPP-k orvosi relevanciáját, mert a terápiák során hordozóként alkalmazott peptideknek is ezekkel a tulajdonságokkal és hatékonysággal kell rendelkezniük. Azonban a  $\beta$ -penetratin esetében nem lehet meghatározni, hogy a megnövekedett FRET-hatásfok, mint ok vagy mint következmény tapasztalható. Egyrészt a  $\beta$ -penetratin nagyobb aggregációs potenciálja elősegítheti a hatékonyabb membránpenetrációt. Másrészt a fokozott membránpenetráció önmagában is hozzájárul a helyi peptidkoncentráció-növekedéséhez, ezáltal elősegítve az aggregációt, ami magasabb FRET-hatásfok értékeket eredményez. Érdeemes megjegyezni, hogy kollaborációs partnerünk által végzett NMR-mérések kimutatták (az eredmények szintén nem képezik részét az értekezésnek, és a tervben lévő szabadalmi eljárás miatt nem is hozzáférhetőek), hogy a  $\beta$ -penetratin azonos koncentrációban hidrofób oldószerben (TFE) erősebb homoaggregációt

mutat, mint az  $\alpha$ -penetratin. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a  $\beta$ -penetratin fokozott aggregációja a módosításnak köszönhető tulajdonság, és nem csupán a magasabb helyi koncentráció következménye.

A ligandumkötést mindenki egyszerű egyensúlyi folyamatnak tartja, de eredményeinknek köszönhetően a plazmamembránról alkotott képünk, amelyet egy statikus határfelület jellemzett, megváltozott: egy térben és időben is dinamikus rendszerré alakult át. Jelen dolgozatban nemcsak bizonyítékokat mutattam be arra, hogy ez a dinamizmus hogyan változtatja meg a ligandumok koncentrációját a sejtmembrán közvetlen környezetében, hanem a jelenség lehetséges következményeit is számba vesszük.

Amennyiben az eredményeket sejtbioológiai jelenségek összefüggésében kívánjuk értelmezni, meg kell vizsgálnunk, milyen folyamatok képesek stabil koncentrációgradiensek létrehozására. Fizikai elvek és korábbi kísérleti adatok azt mutatják, hogy koncentrációgradiensek vagy (1) a diffúzió lokális változásai (azaz a diffúziós együttható térbeli eltérései), vagy (2) a ligandumok folyamatos, lokális termelése révén keletkezhetnek – ez utóbbi jól ismert mechanizmus a morfogének koncentrációgradienseinek kialakításában [286]. A diffúzió, amely a gradienseket elsimítja, nyilvánvalóan nem képes önmagában gradienst létrehozni. A diffúzió lokális változása a diffúziós együttható térben és időben stabil mintázatát jelenti, amely képes gradienst létrehozni. A diffúziós együttható időben és térben stabil mintázatát előidézhetik: (1) térben szabályozott konformációs változások [287]; (2) lokális viszkozitás-gradiensek; vagy (3) a diffúziós állandó méretfüggő változásai a membránfelszín közelében – ezek mind bizonyítottan képesek koncentrációgradiensek létrehozására [288]. Az utóbbi mechanizmust kizárhatjuk, mivel ez a hatás csak az EGF-nél jóval nagyobb molekulák esetében szignifikáns, és csak nanométeres léptékben figyelhető meg, miközben az itt bemutatott koncentrációgradiensek mikrométerekre is kimutathatók a plazmamembrántól. Bár önmagukban nem generálnak koncentrációgradienst vagy diffúziós együttható-változást, egy fluktuáló membrán közelsége okozhatja az autokorrelációs függvény megváltozását. Ezt a lehetőséget szintén kizárhatjuk, mivel a membrán fluktuáló megjelenése a konfokális térfogatban az autokorrelációs függvény eltérését okozta volna az egykomponensű, 3D diffúziót leíró egyenlettől, ami azonban nem történt meg. A térben szabályozott konformációs változások szintén valószínűtlenek, mivel az EGF esetében nincsenek ismert konformációváltozások, amelyek befolyásolnák a diffúziós együtthatóját. Ami a membránhoz közeli EGF-koncentrációs csúcsot illeti, a lokális viszkozitás-gradienseket is kizárhatjuk, mivel ez az EGF-gradiens nem korrelált a diffúziós állandóval. Ebből a

gondolatmenetből következik, hogy a helyi forrás (lokális termelés) marad az egyetlen lehetséges magyarázat a membránhoz közeli EGF-koncentrációs csúcsra. Fontos megjegyezni, hogy a membránreceptorokhoz vagy a lipid kettősréteghez való reverzibilis, egyensúlyi kötődés önmagában nem okozhat stabil koncentrációgradienst, mivel koncentrációgradiens – diffuzivitásváltozás hiányában – áramlást hoz létre, amely lecsökkenti a koncentrációcsúcsot. Ezért szükség van egy állandó forrásra, amely pótolja az áramlás által kimerített koncentrációcsúcsot. Ha szigorúan biofizikai szempontból vizsgáljuk a membránhoz közeli ligandum-koncentrációs gradienst, az alábbiak mondhatóak el:

- passzívan nem jöhet létre, mivel egy kémiai potenciálgradiens spontán felépülése sértené a termodinamika 2. főtételeit; ezért
- mindenképpen valamilyen aktív biológiai folyamatnak kell lennie (amit az is alátámaszt, hogy GPMV-k esetén nem jelentkezik); ugyanakkor
- olyan folyamatról kell szó legyen, amely biológiai egyensúlyhoz vezet, mivel a koncentrációgradiens időben stabil.

Munkánk során arra a biológiai folyamatra próbáltunk rávilágítani, amely képes létrehozni az időben stabil, membránközeli ligandum-koncentrációs csúcsot. A sejtek kezelése olyan inhibitoroktól, amelyek blokkolják az aktin polimerizációt, a miozin- és a dinamin-aktivitást, és ezzel együtt a membránforgalmat is, megszüntette a membránközeli ligandum-koncentrációs csúcsot, ugyanakkor egy másikkal helyettesítette azt. Bár ez a kísérleti eredmény azt sugallja, hogy a membránforgalom részt vesz a membránközeli ligandum-koncentrációs csúcs kialakításában, az újonnan megjelenő csúcs magyarázatra szorul. Miért hisszük, hogy ez a két ligandum-koncentrációs csúcs eltérő jellegű? Kezeletlen F1-4 sejtekben a csúcs 5  $\mu\text{m}$ -en belül helyezkedik el a plazmamembrántól, és nincs korrelációban a diffúziós együtthatóval, míg a kóktállal kezelt sejtekben  $\sim 10 \mu\text{m}$ -ig terjed, és fordított korrelációt mutat a diffúziós együtthatóval. Ez utóbbi megfigyelés magyarázható a latrunculin B exocitózist kiváltó hatásával, amely a szekréciós vezikulák gyors felszabadulását idézi elő [90]. Bár nem ismerjük azoknak a vezikuláknak a tartalmát, amelyek felszabadulását a latrunculin B indukálja, a diffúziós együttható és a részecskeszám közötti fordított korreláció egyértelműen arra utal, hogy a sejtek közötti térben diffúziós gát keletkezett.

Ahhoz, hogy az állandó gradiens fennmaradjon, feltételeznünk kell, hogy a membránforgalom, vagyis az endocitózissal bejuttatott anyag újra-excitózisa áll a membránközeli EGF-csúcs mögött. Szimulációk azt mutatták, hogy mind a ligandumhoz kötött receptorok, mind a szabad ligandumok megjelenése képes biztosítani a koncentrációgradiens fenntartásához szükséges

forrást [289]. Emellett a monenzin, a hagyományos exocitikus útvonalak inhibitora, nem mutatott hatást [281-283], ami alátámasztja, hogy a membránközeli EGF-koncentrációs csúcsot a membrán dinamikája és forgalma okozhatja, amelyet különbözőképpen „kiss-and-run”, „open and closed” vagy „flicker” exocitózisnak neveznek. Ezen folyamatok során nem teljes vezikulák képződnek, illetve nem teljes egészükben kerülnek exocitózisra. Ilyen mechanizmust írtak le például a vérlemezke–endotél sejt adhéziós molekulánál (PECAM), amelyet bár nem kerül endocitózisra, de funkcionálisan elhatárolódik a sejtfelszíntől, de ugyanakkor nagyon gyorsan újra elérhetővé válhat a plazmamembránon [290]. Ezek a mechanizmusok együtt valószínűleg képesek előidézni azt a nagyságrendű membránforgalmat, amely a membránközeli EGF-csúcs kialakulásához szükséges.

Felmerül a kérdés, hogy hogyan jöhet létre ligandumforrás anélkül, hogy folyamatosan termelődné a ligandum. Mivel egy endocitikus vezikula konvektív módon telik meg a környezetében levő anyagokkal [291], az endocitózis nem csökkenti a lokális ligandumkoncentrációt. Ezt gyors visszaexocitózis követi, amely állandó membránfelszín biztosít. A membránfeszülés szerepe ebben jól dokumentált: ezt az endo- és exocitózis ellentétes irányban befolyásolja [292].

Azt javasoljuk, hogy az endoszómák vagy makropinoszómák zsugorodása, és a koncentrált endoszómák ezt követő exocitózisa lehet a membránközeli EGF-koncentrációs csúcs kialakulásának oka. A kétpórusú ioncsatornákat már összefüggésbe hozták a vezikulumok érésével és az endoszómák zsugorodásával. Az a tény, hogy a naringenin (a kétpórusú ioncsatornák blokkolója) szignifikánsan csökkentette a membránközeli EGF-csúcsot, szintén alátámasztja ezt a feltételezést.

A lokálisan megemelkedett ligandumkoncentráció a membrán közelében nem pusztán érdekes jelenség, hanem fontos biológiai következményekkel jár. Amint bemutattuk, jelentősen módosíthatja a receptoraktiváció koncentrációfüggését, látszólag növelve az affinitást és csökkentve a kooperativitást [289]. Ennek megfelelően a ligand-indukált sejtválaszok (pl. jelátvitel, receptor-klasztereződés) koncentrációfüggése eltérhet olyan rendszerekben, amelyekben a jelenség fennáll, és amelyekben nem. Fontos hangsúlyozni, hogy a receptor látszólagos affinitása és kooperativitása változik meg, ha kiszámításukhoz a tömeges (bulk) koncentrációt vesszük figyelembe a valós, helyi koncentráció helyett. A látszólagos affinitás növekedése úgy racionalizálható, hogy a membránközeli koncentráció magasabb, mint a tömeges. Ha ez a hatás a disszociációs állandó körüli tartományban jelentős, megnő a receptor telítettsége, így úgy tűnik, mintha a receptor nagyobb affinitású lenne. A kooperativitás csökkenése pedig abból adódik, hogy a membránközeli és a tömeges koncentráció közötti

különbség nagyobb koncentrációknál csökken, így a telítettség 10–90%-os tartománya (tömeges koncentráció függvényében) kiszélesedik, és ezen érték a kooperativitás csökkenésének felel meg [293]. Emellett az ultra-alacsony ligandumkoncentrációkra adott receptorválaszok – amelyeket gyakran előre kialakult jelátviteli komplexeknek tulajdonítanak – részben szintén erre a membránközeli koncentrációcsúcsra lehetnek visszavezethetők [14].

A membrán közvetlen közelében megfigyelt ligandumkoncentrációs csúcs mellett egy másikat is azonosítottunk, amely távolabb helyezkedik el a membrántól. Ez az EGF-koncentrációs csúcs egyértelműen a helyi viszkozitás növekedésének tudható be, mivel fordítottan korrelált az EGF lokális diffúziós együtthatójával. Ezt a következtetést alátámasztották azok a számítások is, amelyek kimutatták, hogy az EGF diffúziós együtthatójának a megfigyelt lokális csökkenése elegendő a ligandumkoncentrációs csúcs kialakulásához. A molekuláris rotor megnövekedett élettartama ezen a térbeli tartományban szintén megerősíti, hogy a membrántól távolabbi ligandumkoncentrációs csúcsban a lassult diffúziót a magasabb helyi mikroviszkozitás okozza (28.ábra). Bár egyértelműen nem tudtuk kimutatni a fokozott mikroviszkozitás eredetét, az a tény, hogy ezt a koncentrációs csúcsot kollagenáz és hialuronidáz koktél eltolta az F1-4\_ErbB2 sejtekben, azt sugallja, hogy az extracelluláris mátrixhoz köthető. CHO-eredetű sejtvonalainkban ez az EGF-koncentrációs csúcs csak az ErbB2-t expresszáló sejtekben volt jelen, más sejtípusokban azonban előfordulhat ErbB2-függetlenül is.

A membrántól távolabb eső EGF-koncentrációs csúcs szintén biológiai jelentőséggel bírhat. Kísérleteinkben ez a csúcs a membránközeli csúcsra rakódott, így befolyásolta a membránnál érvényesülő koncentrációt. Az extracelluláris mátrix, sűrűségétől függően, mint diffúziós akadály és potenciális ligandum-raktár, módosíthatja a ligandumkoncentrációk mértékét és időbeli lefutását, aminek hatása még jobban érvényesülhet *in vivo* körülmények között.

Összességében tehát bebizonyítottuk, hogy egy peptid jellegű növekedési faktor eloszlása a plazmamembrán közelében nem homogén. Két különböző eredetű csúcsot azonosítottunk: az egyik az aktív membránforgalomhoz, a másik a lokálisan gátolt diffúzióhoz kapcsolódik. Ezek a koncentrációs csúcsok jelentősen megváltoztatják a plazmamembránnál mérhető ligandumkoncentrációt a tömegkoncentrációhoz képest, ezáltal módosítva a dózisfüggő válaszokat. Meggyőződésünk, hogy a bemutatott eredmények messzemenő következményeit nem szabad figyelmen kívül hagyni, amikor olyan kvantitatív sejtbiológiai kísérleteket értelmezünk, amelyek transzmembrán receptorok stimulációját vizsgálják.

A jelen tanulmányban bemutatott kísérletek és elméleti modellek a ligandumkoncentrációk kifejezetten nem homogén eloszlását tárják fel a plazmamembrán közelében. Bár a jelenségek

és a mögöttes elvek elvileg bármely biológiai rendszerben érvényesülhetnek az egysejtűektől a komplex szervezetekig, a koncentrációgradiensek fennállását minden rendszeren belül külön meg kell vizsgálni. A feltételezett molekuláris magyarázatok sem feltétlenül általánosíthatók. Tekintettel a mérések komplex jellegére, valószínűtlen, hogy a membránközeli ligandumkoncentráció rutinszerű meghatározása általános gyakorlattá váljon. Ugyanakkor a bemutatott jelenségek következményeit szem előtt kell tartani minden olyan kísérleti eredmény értelmezésekor, amely receptor–ligandum kölcsönhatások kvantitatív elemzésén alapul.

## 8. Összefoglalás

A sejtpenetráló peptidekkel való kutatás alapjául annak a problémának az áthidalása szolgált, hogy a legtöbb molekula számára a sejtmembrán kettős foszfolipid rétege szinte áthatolhatatlan. A sejtpenetráló peptidek (SPP-k) olyan oligopeptidek, amelyek képesek bejutni és emellett a sejtmembránon egyébként át nem jutó molekulákat bejuttatni a sejtekbe. Az értekezés a penetratin nevű peptidet helyezi a vizsgálatok középpontjába, amely a *Drosophila Antennapedia Homeotic* transzkripciós faktorából származik. Az SPP-k bejutásának vizsgálata feltárta, hogy a penetratin elsősorban endocitózis útján jut be a sejtbe az alkalmazott 5  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban. A felvételét a membrán dipóluspotenciáljának változása befolyásolja. Az atorvasztatin például a dipóluspotenciál csökkentésével növeli a penetratin endo-lizoszómális felszabadulását, ezzel szemben a 6-ketokolesztanol növeli a membrán szterin tartalmát, ezáltal annak merevségét is, így a penetratin felvétele csökkent. A bejutást követően az endolizoszómális rendszerben fennáll a penetratin degradációjának lehetősége. Ez a jelenség, eredményeink szerint, nem játszik jelentős szerepet a penetratin citoszólikus felhalmozódásában. A  $\beta$ -penetratinnak nevezett módosított penetratinszármazék jelentősen jobb celluláris felvételt mutat, amely párhuzamba állítható magasabb aggregációs képességével.

Az eddig ismert hagyományos modellek homogén ligandum eloszlást feltételeznek az extracelluláris térben. Ezzel ellentétben ezen kutatási eredmények szerint az epidermális növekedési faktor (EGF) nem egyenletesen oszlik el a plazmamembrán körül, hanem két különböző eredetű és jelentőségű koncentrációs csúcsot képez. A membránhoz közeli csúcs, amely néhány mikrométerre található a membrántól, nem magyarázható passzív diffúzióval, receptor kötődéssel vagy viszkozitásváltozásokkal. Az aktin, a miozin és a dinamín egyidejű gátlása azt mutatja, hogy ez a csúcs az aktív membránforgalomtól függ. A szimulációk megerősítik, hogy az endocitózis és a re-exocitózis gyors ciklusai elegendő ligandummal kötött receptort vagy szabad ligandumot biztosítanak ennek a gradiensnek a fenntartásához. A membrántól távolabb található disztális csúcs a helyileg gátolt diffúzióval hozható kapcsolatba. Nagysága korrelál az EGF csökkent diffúziós együtthatóival és a megnövekedett mikroviszkozitással, emellett ECM-emésztő enzimek által eltolható, ami arra utal, hogy az extracelluláris mátrix diffúziós gátat képez. Ezek a koncentrációs csúcsok jelentősen megváltoztatják a sejtfelszíni receptorok által érzékelt ligandumszinteket. Az eredmények rávilágítanak arra, hogy a kvantitatív receptor-ligandum interakciók értelmezésekor fontos figyelembe venni a ligandumok helyi mikrokörnyezetét.

## 9. Summary

Research into cell-penetrating peptides was motivated by the problem that the double phospholipid layer of the cell membrane is virtually impenetrable for most molecules. Cell-penetrating peptides (CPPs) are oligopeptides that are able to enter cells and also transport molecules that would otherwise not be able to pass through the cell membrane. The thesis focuses on a peptide called penetratin, which is derived from the *Drosophila Antennapedia* Homeotic transcription factor. Studies of CPP entry have revealed that penetratin enters cells primarily by endocytosis at the concentration of 5  $\mu\text{M}$  used in the study. Its uptake is influenced by changes in the membrane dipole potential. For example, atorvastatin increases the endolysosomal release of penetratin by reducing the dipole potential, whereas 6-ketocholestanol increases the sterol content of the membrane, thereby increasing its rigidity and reducing the uptake of penetratin. After entry, there is a possibility of penetratin degradation in the endolysosomal system. According to our results, this phenomenon does not play a significant role in the cytosolic accumulation of penetratin. A modified penetratin derivative called  $\beta$ -penetratin shows significantly better cellular uptake, which can be compared to its higher aggregation capacity.

Traditional models assume homogeneous ligand distribution in the extracellular space. In contrast, according to these research results, epidermal growth factor (EGF) is not evenly distributed around the plasma membrane, but forms two concentration peaks of different origin and significance. The peak close to the membrane, located a few micrometers from the membrane, cannot be explained by passive diffusion, receptor binding, or viscosity changes. Simultaneous inhibition of actin, myosin, and dynamin shows that this peak depends on active membrane traffic. Simulations confirm that rapid cycles of endocytosis and re-exocytosis provide sufficient ligand-bound receptors or free ligands to maintain this gradient. The distal peak, located further from the membrane, can be linked to locally inhibited diffusion. Its magnitude correlates with reduced EGF diffusion coefficients and increased microviscosity, and it can be shifted by ECM-degrading enzymes, suggesting that the extracellular matrix forms a diffusion barrier. These concentration peaks significantly alter the ligand levels perceived by cell surface receptors. The results highlight the importance of considering the local microenvironment of ligands when interpreting quantitative receptor-ligand interactions.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném kifejezni legmélyebb hálámat témavezetőimnek, Dr. Batta Gyulának és Prof. Dr. Nagy Péternek, akik folyamatos támogatásukkal, szakmai útmutatásukkal és értékes tanácsaikkal láttak el kutatásom során. Önzetlen segítségük mellett az inspiráló szakmai háttérük jelentősen hozzájárultak a szakmai fejlődésemhez és a sikereimhez. Köszönettel tartozom nekik, amiért bármilyen problémával fordulhattam hozzájuk, amelyet megértéssel és türelemmel kezeltek, és igyekeztek a legjobb megoldással szolgálni.

Külön köszönet illeti a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetet és jelenlegi vezetőjét Prof. Dr. Panyi Györgyöt, aki lehetőséget nyújtott arra, hogy a kutatásomat ebben az intézetben végezzem. Köszönöm, hogy biztosította a munkámhoz szükséges eszközöket és támogató környezetet, amelyek nagyban elősegítették a kutatásom és személyes előrehaladásomat a tudományos pályán.

Hálás vagyok kollégáimnak, Vágóné Toldi Hajnalkának, Utasi-Szabó Ritának és Szilágyi Anikónak, a hasznos tanácsokért és beszélgetésekért, a közös problémamegoldásokért, valamint a barátságos és támogató munkakörnyezetért. Segítségük és tapasztalataik nélkülözhetetlenek voltak munkám során.

Köszönettel tartozom a munkacsoportunk összes tagjának, akik szakmai tanácsaikkal és hozzáértésükkel nagyban előrelendítették a kutatásomat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak és férjemnek, akik a kezdetektől fogva mellettem álltak. Támogatásuk és megértésük nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

## 11. Irodalomjegyzék

1. Bretscher, M.S., *Membrane structure: some general principles*. Science, 1973. **181**(4100): p. 622-9.
2. Frankel, A.D. and C.O. Pabo, *Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus*. Cell, 1988. **55**(6): p. 1189-93.
3. Derossi, D., et al., *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10444-50.
4. Oba, M., *Cell-Penetrating Peptide Foldamers: Drug-Delivery Tools*. Chembiochem, 2019. **20**(16): p. 2041-2045.
5. Heitz, F., M.C. Morris, and G. Divita, *Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 195-206.
6. Kotadiya, D.D., P. Patel, and H.D. Patel, *Cell-Penetrating Peptides: A Powerful Tool for Targeted Drug Delivery*. Curr Drug Deliv, 2024. **21**(3): p. 368-388.
7. Yin, H. and A.D. Flynn, *Drugging Membrane Protein Interactions*. Annu Rev Biomed Eng, 2016. **18**: p. 51-76.
8. Bethani, I., et al., *Spatial organization of transmembrane receptor signalling*. EMBO J, 2010. **29**(16): p. 2677-88.
9. Freed, D.M., et al., *EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics*. Cell, 2017. **171**(3): p. 683-695 e18.
10. Hajdu, T., et al., *Comprehensive Model for Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Binding Involving Conformational States of the Extracellular and the Kinase Domains*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 776.
11. Schmick, M. and P.I.H. Bastiaens, *The interdependence of membrane shape and cellular signal processing*. Cell, 2014. **156**(6): p. 1132-1138.
12. Care, B.R. and H.A. Soula, *Receptor clustering affects signal transduction at the membrane level in the reaction-limited regime*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2013. **87**(1): p. 012720.
13. Vauquelin, G. and S.J. Charlton, *Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong in vivo drug action*. Br J Pharmacol, 2010. **161**(3): p. 488-508.
14. Civciristov, S., et al., *Preassembled GPCR signaling complexes mediate distinct cellular responses to ultralow ligand concentrations*. Sci Signal, 2018. **11**(551).
15. Gherbi, K., S.J. Briddon, and S.J. Charlton, *Micro-pharmacokinetics: Quantifying local drug concentration at live cell membranes*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3479.
16. Enkavi, G., et al., *Multiscale Simulations of Biological Membranes: The Challenge To Understand Biological Phenomena in a Living Substance*. Chem Rev, 2019. **119**(9): p. 5607-5774.
17. Zhukov, A. and V. Popov *Eukaryotic Cell Membranes: Structure, Composition, Research Methods and Computational Modelling*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**, DOI: 10.3390/ijms241311226.
18. Engelman, D.M., *Membranes are more mosaic than fluid*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 578-80.
19. Epand, R.M., *Introduction to Membrane Lipids*, in *Methods in Membrane Lipids*, D.M. Owen, Editor. 2015, Springer New York: New York, NY. p. 1-6.
20. Efremov, R.G. *Dynamic "Molecular Portraits" of Biomembranes Drawn by Their Lateral Nanoscale Inhomogeneities*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**, DOI: 10.3390/ijms22126250.
21. Watson, H., *Biological membranes*. Essays Biochem, 2015. **59**: p. 43-69.
22. Gil, T., et al., *Theoretical analysis of protein organization in lipid membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1998. **1376**(3): p. 245-266.

23. Nicolson, G.L., *The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2014. **1838**(6): p. 1451-1466.
24. Bagatolli, L.A. and O.G. Mouritsen, *Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing?* 2013. **4**.
25. Honigsmann, A., et al., *A lipid bound actin meshwork organizes liquid phase separation in model membranes*. Elife, 2014. **3**: p. e01671.
26. Piao, J., W. Yuan, and Y. Dong, *Recent Progress of DNA Nanostructures on Amphiphilic Membranes*. Macromol Biosci, 2021. **21**(5): p. e2000440.
27. Klotzsch, E. and G.J. Schutz, *A critical survey of methods to detect plasma membrane rafts*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1611): p. 20120033.
28. Sibold, J., et al., *Synthesis of Gb(3) Glycosphingolipids with Labeled Head Groups: Distribution in Phase-Separated Giant Unilamellar Vesicles*. Angew Chem Int Ed Engl, 2019. **58**(49): p. 17805-17813.
29. Diaz, M.L., *Membrane physiology and biophysics in the next decade: an open balcony to multiple scenarios*. Front Physiol, 2010. **1**: p. 23.
30. Gronnier, J., et al., *Mechanisms governing subcompartmentalization of biological membranes*. Current Opinion in Plant Biology, 2019. **52**: p. 114-123.
31. Kusumi, A., et al., *Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(11): p. 604-15.
32. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle*. Science, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
33. Regen, S.L., *The Origin of Lipid Rafts*. Biochemistry, 2020. **59**(49): p. 4617-4621.
34. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-572.
35. Tsai, Y.-T., et al., *Bringing rafts to life: Lessons learned from lipid organization across diverse biological membranes*. Chemistry and Physics of Lipids, 2020. **233**: p. 104984.
36. Ozolina, N.V., et al., *Non-detergent Isolation of Membrane Structures from Beet Plasmalemma and Tonoplast Having Lipid Composition Characteristic of Rafts*. The Journal of Membrane Biology, 2020. **253**(5): p. 479-489.
37. Karki, P., *Phospholipid Bilayer- Structure, Types, Properties, Functions*.

Microbe Notes, 2023.

38. Yu, L., et al., *Mechanisms and functions of membrane lipid remodeling in plants*. Plant J, 2021. **107**(1): p. 37-53.
39. Sarmiento, M.J., M. Hof, and R. Šachl, *Interleaflet Coupling of Lipid Nanodomains – Insights From in vitro Systems*. 2020. **Volume 8 - 2020**.
40. Boes, D.M., A. Godoy-Hernandez, and D.G.G. McMillan, *Peripheral Membrane Proteins: Promising Therapeutic Targets across Domains of Life*. Membranes (Basel), 2021. **11**(5).
41. Schmit, K. and C. Michiels, *TMEM Proteins in Cancer: A Review*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1345.
42. Malinska, K., et al., *Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(11): p. 4427-36.
43. Kay, J.G. and S. Grinstein, *Phosphatidylserine-mediated cellular signaling*. Adv Exp Med Biol, 2013. **991**: p. 177-93.
44. Daleke, D.L., *Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry*. J Lipid Res, 2003. **44**(2): p. 233-42.
45. Hankins, H.M., et al., *Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution*. Traffic, 2015. **16**(1): p. 35-47.

46. Fink, A., et al., *Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: principles, advances and challenges*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(4): p. 974-83.
47. Sengupta, D. and A. Chattopadhyay, *Molecular dynamics simulations of GPCR-cholesterol interaction: An emerging paradigm*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(9): p. 1775-82.
48. Pike, L.J., *The challenge of lipid rafts*. Journal of Lipid Research, 2009. **50**: p. S323-S328.
49. Grassi, S., et al., *Lipid rafts and neurodegeneration: structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts*. Journal of Lipid Research, 2020. **61**(5): p. 636-654.
50. Kusumi, A., et al., *Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules*. Seminars in Immunology, 2005. **17**(1): p. 3-21.
51. Murase, K., et al., *Ultrafine Membrane Compartments for Molecular Diffusion as Revealed by Single Molecule Techniques*. Biophysical Journal, 2004. **86**(6): p. 4075-4093.
52. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
53. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
54. G. Mouritsen, O., *Physical Chemistry of Curvature and Curvature Stress in Membranes*. Current Physical Chemistry, 2013. **3**(1): p. 17-26.
55. Rosado, A. and E.M. Bayer, *Geometry and cellular function of organelle membrane interfaces*. Plant Physiology, 2020. **185**(3): p. 650-662.
56. Barazzuol, L., F. Giamogante, and T. Cali, *Mitochondria Associated Membranes (MAMs): Architecture and physiopathological role*. Cell Calcium, 2021. **94**: p. 102343.
57. Seidlmayer, L.K., et al., *Mitofusin 2 Is Essential for IP(3)-Mediated SR/Mitochondria Metabolic Feedback in Ventricular Myocytes*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 733.
58. <16\_HUN\_REV1\_Biológiai membránok és membrán transzport\_végleges.pdf>.
59. Takata, K., T. Matsuzaki, and Y. Tajika, *Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane*. Prog Histochem Cytochem, 2004. **39**(1): p. 1-83.
60. Noda, Y., et al., *Aquaporins in kidney pathophysiology*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(3): p. 168-78.
61. Stillwell, W., *Chapter 19 - Membrane Transport, in An Introduction to Biological Membranes (Second Edition)*, W. Stillwell, Editor. 2016, Elsevier. p. 423-451.
62. Szabo, G., *Structural aspects of ionophore function*. Fed Proc, 1981. **40**(8): p. 2196-201.
63. Schultz, S.G., *Basic principles of membrane transport*. IUPAB biophysics series. 1980, Cambridge Eng. ; New York: Cambridge University Press. xii, 144 p.
64. Huang, S. and M.P. Czech, *The GLUT4 glucose transporter*. Cell Metab, 2007. **5**(4): p. 237-52.
65. Martin, S., et al., *The glucose transporter (GLUT-4) and vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP-2) are segregated from recycling endosomes in insulin-sensitive cells*. J Cell Biol, 1996. **134**(3): p. 625-35.
66. Nicholas, A.R., et al., *Effect of grafted polyethylene glycol (PEG) on the size, encapsulation efficiency and permeability of vesicles*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1463**(1): p. 167-78.
67. Nernst, W., *Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen*. 1889. **4U**(1): p. 129-181.
68. Jongsma, H.J. and R. Wilders, *Gap junctions in cardiovascular disease*. Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1193-7.
69. Lopina, O.D., *Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: structure, mechanism, and regulation*. Membr Cell Biol, 2000. **13**(6): p. 721-44.
70. Wright, E.M., *Renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(1): p. F10-8.
71. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
72. Ballabio, A. and J.S.J.N.R.M.C.B. Bonifacino, *Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis*. 2019. **21**: p. 101 - 118.

73. Huotari, J. and A.J.T.E.J. Helenius, *Endosome maturation*. 2011. **30**.
74. Cullen, P.J. and F.J.N.R.M.C.B. Steinberg, *To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling*. 2018. **19**: p. 679 - 696.
75. Bright, N.A., L. Davis, and J.P.J.C.B. Luzio, *Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity*. 2016. **26**: p. 2233 - 2245.
76. Luzio, J.P., S.R. Gray, and N.A.J.B.S.t. Bright, *Endosome-lysosome fusion*. 2010. **38 6**: p. 1413-6.
77. Yang, C. and X.J.T.J.o.C.B. Wang, *Lysosome biogenesis: Regulation and functions*. 2021. **220**.
78. Langemeyer, L., F. Fröhlich, and C. Ungermann, *Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis*. Trends in Cell Biology, 2018. **28(11)**: p. 957-970.
79. Diggins, N.L. and D.J.J.B.S.t. Webb, *APPL1 is a multifunctional endosomal signaling adaptor protein*. 2017. **45 3**: p. 771-779.
80. Kalaidzidis, I.V., et al., *APPL endosomes are not obligatory endocytic intermediates but act as stable cargo-sorting compartments*. 2015. **211**: p. 123 - 144.
81. Murray, D.H., et al., *An endosomal tether undergoes an entropic collapse to bring vesicles together*. 2016. **537**: p. 107 - 111.
82. Klumperman, J. and G.J.C.S.H.p.i.b. Raposo, *The complex ultrastructure of the endolysosomal system*. 2014. **6 10**: p. a016857.
83. Hsu, V.W., M. Bai, and J.J.N.R.M.C.B. Li, *Getting active: protein sorting in endocytic recycling*. 2012. **13**: p. 323-328.
84. van der Beek, J., et al., *Quantitative correlative microscopy reveals the ultrastructural distribution of endogenous endosomal proteins*. 2021. **221**.
85. Eden, E.R., I.J. White, and C.E.J.B.S.t. Futter, *Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies*. 2009. **37 Pt 1**: p. 173-7.
86. Besterman, J.M., et al., *Pinocytosis and intracellular degradation of exogenous protein: modulation by amino acids*. J Cell Biol, 1983. **96(6)**: p. 1586-91.
87. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 825-52.
88. Coleman, M.L., et al., *Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I*. Nat Cell Biol, 2001. **3(4)**: p. 339-45.
89. Walker, N.I., et al., *Patterns of cell death*. Methods Achiev Exp Pathol, 1988. **13**: p. 18-54.
90. Li, L. and L.S. Chin, *The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60(5)**: p. 942-60.
91. Rand, R.P. and V.A. Parsegian, *Mimicry and mechanism in phospholipid models of membrane fusion*. Annu Rev Physiol, 1986. **48**: p. 201-12.
92. Shin, W., et al., *Visualization of Membrane Pore in Live Cells Reveals a Dynamic-Pore Theory Governing Fusion and Endocytosis*. 2018. **173**: p. 934-945.e12.
93. Ceccarelli, B., W.P. Hurlbut, and A.J.T.J.o.C.B. Mauro, *TURNOVER OF TRANSMITTER AND SYNAPTIC VESICLES AT THE FROG NEUROMUSCULAR JUNCTION*. 1973. **57**: p. 499 - 524.
94. Fesce, R., et al., *Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'?* 1994. **4 1**: p. 1-4.
95. Gasman, S. and N.J.B.o.t.C. Vitale, *Lipid remodelling in neuroendocrine secretion*. 2017. **109**.
96. Brose, N., et al., *Synaptic vesicle fusion: today and beyond*. 2019. **26**: p. 663 - 668.
97. Chowdhury, H.H. and R.J.C.S. Zorec, *Exocytotic fusion pore under stress*. 2020. **4**: p. 218 - 226.
98. Brooks, H., B. Lebleu, and E. Vives, *Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57(4)**: p. 559-77.
99. Green, M. and P.M. Loewenstein, *Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein*. Cell, 1988. **55(6)**: p. 1179-88.
100. Nishikawa, M., et al., *Induction of tumor-specific immune response by gene transfer of Hsp70-cell-penetrating peptide fusion protein to tumors in mice*. Mol Ther, 2010. **18(2)**: p. 421-8.

101. Deshayes, S., et al., *Interactions of amphipathic CPPs with model membranes*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(3): p. 328-35.
102. Jones, S.W., et al., *Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(8): p. 1093-102.
103. Eguchi, A. and S.F. Dowdy, *siRNA delivery using peptide transduction domains*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(7): p. 341-5.
104. Rydstrom, A., et al., *Direct translocation as major cellular uptake for CADY self-assembling peptide-based nanoparticles*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25924.
105. Madani, F., et al., *Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides*. J Biophys, 2011. **2011**: p. 414729.
106. Jones, A.T., *Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(4): p. 670-84.
107. Korabel'shchikova, M.A., *[Diagnostic value of indices of allergic changes of leukocytes in vitro in torpid rheumocarditis]*. Vrach Delo, 1978(4): p. 66-8.
108. Hayashi, Y., et al., *Cell penetrating peptide-mediated systemic siRNA delivery to the liver*. Int J Pharm, 2011. **419**(1-2): p. 308-13.
109. Lee, Y.J., S. Datta, and J.P. Pellois, *Real-time fluorescence detection of protein transduction into live cells*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(8): p. 2398-9.
110. Richard, J.P., et al., *Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 585-90.
111. Nishi, K. and K. Saigo, *Cellular internalization of green fluorescent protein fused with herpes simplex virus protein VP22 via a lipid raft-mediated endocytic pathway independent of caveolae and Rho family GTPases but dependent on dynamin and Arf6*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 27503-27517.
112. Gillmeister, M.P., M.J. Betenbaugh, and P.S. Fishman, *Cellular trafficking and photochemical internalization of cell penetrating peptide linked cargo proteins: a dual fluorescent labeling study*. Bioconjug Chem, 2011. **22**(4): p. 556-66.
113. Turner, J.J., A.A. Arzumanov, and M.J. Gait, *Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(1): p. 27-42.
114. Guidotti, G., L. Brambilla, and D. Rossi, *Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics*. Trends in Pharmacological Sciences, 2017. **38**(4): p. 406-424.
115. Langel, U.I., *Cell-penetrating peptides : methods and protocols*. Second edition. ed. Methods in molecular biology,. 2015, New York: Humana Press. xvi, 472 pages.
116. Joliot, A., et al., *Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 1864-8.
117. Pooga, M., et al., *Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 857-61.
118. Oehlke, J., et al., *Cellular uptake of an  $\alpha$ -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1998. **1414**(1): p. 127-139.
119. Ramsey, J.D. and N.H. Flynn, *Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells*. Pharmacology & Therapeutics, 2015. **154**: p. 78-86.
120. Raucher, D. and J.S. Ryu, *Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment*. Trends in Molecular Medicine, 2015. **21**(9): p. 560-570.
121. Morris, M.C., et al., *Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics*. Biology of the Cell, 2008. **100**(4): p. 201-217.
122. Wang, L., et al., *CD44 antibody-targeted liposomal nanoparticles for molecular imaging and therapy of hepatocellular carcinoma*. Biomaterials, 2012. **33**(20): p. 5107-5114.
123. Aina, O.H., et al., *Therapeutic cancer targeting peptides*. Biopolymers - Peptide Science Section, 2002. **66**(3): p. 184-199.

124. Endoh, T. and T. Ohtsuki, *Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009. **61**(9): p. 704-709.
125. Moktan, S., et al., *A thermally responsive biopolymer conjugated to an acid-sensitive derivative of paclitaxel stabilizes microtubules, arrests cell cycle, and induces apoptosis*. *Investigational New Drugs*, 2012. **30**(1): p. 236-248.
126. Dreher, M.R., et al., *Evaluation of an elastin-like polypeptide–doxorubicin conjugate for cancer therapy*. *Journal of Controlled Release*, 2003. **91**(1): p. 31-43.
127. Leriche, G., L. Chisholm, and A. Wagner, *Cleavable linkers in chemical biology*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012. **20**(2): p. 571-582.
128. Alves, I.D., et al., *A proapoptotic peptide conjugated to penetratin selectively inhibits tumor cell growth*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2014. **1838**(8): p. 2087-2098.
129. Kalafatovic, D. and E. Giralt, *Cell-Penetrating Peptides: Design Strategies beyond Primary Structure and Amphipathicity*. *Molecules*, 2017. **22**(11).
130. Oehlke, J., et al., *Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic  $\beta$ -sheet forming peptide*. *FEBS Letters*, 1997. **415**(2): p. 196-199.
131. Marks, J.R., et al., *Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-Throughput Screening*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(23): p. 8995-9004.
132. Rhee, M. and P. Davis, *Mechanism of Uptake of C105Y, a Novel Cell-penetrating Peptide\**. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(2): p. 1233-1240.
133. Gao, C., et al., *A cell-penetrating peptide from a novel pVII–pIX phage-displayed random peptide library*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002. **10**(12): p. 4057-4065.
134. Milletti, F., *Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape*. *Drug Discovery Today*, 2012. **17**(15): p. 850-860.
135. Schafmeister, C.E., J. Po, and G.L. Verdine, *An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides [8]*. *Journal of the American Chemical Society*, 2000. **122**(24): p. 5891-5892.
136. Ochocki, J.D., et al., *Evaluation of Prenylated Peptides for Use in Cellular Imaging and Biochemical Analysis*, in *Therapeutic Peptides: Methods and Protocols*, A.E. Nixon, Editor. 2014, Humana Press: Totowa, NJ. p. 213-223.
137. O'Callaghan, K., A. Kuliopulos, and L. Covic, *Turning Receptors On and Off with Intracellular Pepducins: New Insights into G-protein-coupled Receptor Drug Development\**. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(16): p. 12787-12796.
138. Mueller, J., et al., *Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines*. *Bioconjug Chem*, 2008. **19**(12): p. 2363-74.
139. Kosuge, M., et al., *Cellular Internalization and Distribution of Arginine-Rich Peptides as a Function of Extracellular Peptide Concentration, Serum, and Plasma Membrane Associated Proteoglycans*. *Bioconjugate Chemistry*, 2008. **19**(3): p. 656-664.
140. Palm-Apergi, C., P. Lönn, and S.F. Dowdy, *Do Cell-Penetrating Peptides Actually "Penetrate" Cellular Membranes?* *Molecular Therapy*, 2012. **20**(4): p. 695-697.
141. Herce, H.D., et al., *Arginine-Rich Peptides Destabilize the Plasma Membrane, Consistent with a Pore Formation Translocation Mechanism of Cell-Penetrating Peptides*. *Biophysical Journal*, 2009. **97**(7): p. 1917-1925.
142. Herce, H.D., A.E. Garcia, and M.C. Cardoso, *Fundamental Molecular Mechanism for the Cellular Uptake of Guanidinium-Rich Molecules*. *Journal of the American Chemical Society*, 2014. **136**(50): p. 17459-17467.
143. Järver, P., I. Mäger, and Ü. Langel, *In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2010. **31**(11): p. 528-535.
144. Pouny, Y., et al., *Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes*. *Biochemistry*, 1992. **31**(49): p. 12416-12423.

145. Thennarasu, S., et al., *Antimicrobial and Membrane Disrupting Activities of a Peptide Derived from the Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL37*. *Biophysical Journal*, 2010. **98**(2): p. 248-257.
146. Alves, I.D., et al., *Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2008. **1780**(7): p. 948-959.
147. Cardoso, A.M.S., et al., *S4(13)-PV cell-penetrating peptide induces physical and morphological changes in membrane-mimetic lipid systems and cell membranes: Implications for cell internalization*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2012. **1818**(3): p. 877-888.
148. Vivès, E., P. Brodin, and B. Lebleu, *A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus\**. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(25): p. 16010-16017.
149. Koren, E. and V.P. Torchilin, *Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side*. *Trends in Molecular Medicine*, 2012. **18**(7): p. 385-393.
150. Maiolo, J.R., M. Ferrer, and E.A. Ottinger, *Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2005. **1712**(2): p. 161-172.
151. Vasconcelos, L., P. Kalle, and Ü. and Langel, *Therapeutic Potential of cell-penetrating Peptides*. *Therapeutic Delivery*, 2013. **4**(5): p. 573-591.
152. van den Berg, A. and S.F. Dowdy, *Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011. **22**(6): p. 888-893.
153. Hitz, T., et al., *Interaction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Oligoarginine-Acids and Amides with Anionic Lipid Vesicles: A Mechanistic and Thermodynamic Study*. *Biochemistry*, 2006. **45**(18): p. 5817-5829.
154. Lundberg, P., et al., *Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides*. *FASEB J*, 2007. **21**(11): p. 2664-71.
155. Wadia, J.S., R.V. Stan, and S.F. Dowdy, *Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis*. *Nature Medicine*, 2004. **10**(3): p. 310-315.
156. Lo, S.L. and S. Wang, *An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection*. *Biomaterials*, 2008. **29**(15): p. 2408-2414.
157. Najjar, K., et al., *An l- to d-Amino Acid Conversion in an Endosomolytic Analog of the Cell-penetrating Peptide TAT Influences Proteolytic Stability, Endocytic Uptake, and Endosomal Escape*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(3): p. 847-861.
158. Poon, G.M. and J. Garipey, *Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells*. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 4): p. 788-93.
159. O'Shea, P., *Intermolecular interactions with/within cell membranes and the trinity of membrane potentials: kinetics and imaging*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 5): p. 990-6.
160. Brockman, H., *Dipole potential of lipid membranes*. *Chem Phys Lipids*, 1994. **73**(1-2): p. 57-79.
161. Peterson, U., et al., *Origin of membrane dipole potential: contribution of the phospholipid fatty acid chains*. *Chem Phys Lipids*, 2002. **117**(1-2): p. 19-27.
162. Wang, L., *Measurements and implications of the membrane dipole potential*. *Annu Rev Biochem*, 2012. **81**: p. 615-35.
163. Kovacs, T., et al., *The Dipole Potential Modifies the Clustering and Ligand Binding Affinity of ErbB Proteins and Their Signaling Efficiency*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 35850.
164. Zakany, F., et al., *Direct and indirect cholesterol effects on membrane proteins with special focus on potassium channels*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020. **1865**(8): p. 158706.

165. Cladera, J. and P. O'Shea, *Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide*. Biophys J, 1998. **74**(5): p. 2434-42.
166. Flewelling, R.F. and W.L. Hubbell, *The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes*. Biophys J, 1986. **49**(2): p. 541-52.
167. Sarkar, P., H. Chakraborty, and A. Chattopadhyay, *Differential Membrane Dipolar Orientation Induced by Acute and Chronic Cholesterol Depletion*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4484.
168. Kovacs, T., et al., *The dipole potential correlates with lipid raft markers in the plasma membrane of living cells*. J Lipid Res, 2017. **58**(8): p. 1681-1691.
169. Szabo, G., *Dual mechanism for the action of cholesterol on membrane permeability*. Nature, 1974. **252**(5478): p. 47-9.
170. Bjorkhem-Bergman, L., J.D. Lindh, and P. Bergman, *What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects?* Br J Clin Pharmacol, 2011. **72**(1): p. 164-5.
171. Crismaru, I., et al., *Low-density lipoprotein cholesterol lowering treatment: the current approach*. Lipids Health Dis, 2020. **19**(1): p. 85.
172. Schachter, M., *Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update*. Fundam Clin Pharmacol, 2005. **19**(1): p. 117-25.
173. Jones, P., et al., *Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study)*. Am J Cardiol, 1998. **81**(5): p. 582-7.
174. Corsini, A., F.M. Maggi, and A.L. Catapano, *Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase*. Pharmacol Res, 1995. **31**(1): p. 9-27.
175. Rothbard, J.B., T.C. Jessop, and P.A. Wender, *Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(4): p. 495-504.
176. Di Cera, E., *Mechanisms of ligand binding*. Biophys Rev (Melville), 2020. **1**(1): p. 011303.
177. O'Boyle, N.M., et al., *Open Babel: An open chemical toolbox*. J Cheminform, 2011. **3**: p. 33.
178. Hanwell, M.D., et al., *Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform*. Journal of Cheminformatics, 2012. **4**(1): p. 17.
179. Mary, A., • Anitha Mary.X L.Sivakumar , " A Reduced Order Transfer Function Models for Alstom Gasifier using Genetic Algorithm " International Journal of Computer Applications (0975 – 8887) , 46(5), (2012), 1-6. International Journal of Computer Applications, 2012. **46**.
180. Ramaswamy, A., S. Balasubramanian, and M. Rajagopalan, *Chapter 12 - Biomolecular Talks—Part 2: Applications and Challenges of Molecular Docking Approaches*, in *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*, M.S. Coumar, Editor. 2021, Academic Press. p. 245-269.
181. Jones, T.A., et al., *Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models*. Acta Crystallogr A, 1991. **47 ( Pt 2)**: p. 110-9.
182. Gregory, P.D., et al., *Absence of Gcn5 HAT Activity Defines a Novel State in the Opening of Chromatin at the PHO5 Promoter in Yeast*. Molecular Cell, 1998. **1**(4): p. 495-505.
183. Jorgensen, W.L. and J. Tirado-Rives, *The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin*. J Am Chem Soc, 1988. **110**(6): p. 1657-66.
184. Gasteiger, J. and M. Marsili, *Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges*. Tetrahedron, 1980. **36**(22): p. 3219-3228.
185. Millar, N.S. and C. Gotti, *Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors*. Neuropharmacology, 2009. **56**(1): p. 237-246.
186. Walstab, J., G. Rappold, and B. Niesler, *5-HT(3) receptors: role in disease and target of drugs*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 146-69.
187. Traynelis, S.F., et al., *Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 405-96.

188. Surprenant, A. and R.A. North, *Signaling at purinergic P2X receptors*. *Annu Rev Physiol*, 2009. **71**: p. 333-59.
189. Belelli, D., et al., *Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function*. *J Neurosci*, 2009. **29**(41): p. 12757-63.
190. Yevenes, G.E. and H.U. Zeilhofer, *Allosteric modulation of glycine receptors*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(2): p. 224-36.
191. Rehman, S., N. Rahimi, and M. Dimri, *Biochemistry, G Protein Coupled Receptors*, in *StatPearls*. 2025: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Nader Rahimi declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Manjari Dimri declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
192. Paul, M.K. and A.K. Mukhopadhyay, *Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer*. *Int J Med Sci*, 2004. **1**(2): p. 101-115.
193. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. xxxiv, 1548 p.
194. Gumbiner, B.M., *Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis*. *Cell*, 1996. **84**(3): p. 345-357.
195. Aplin, A., et al., *Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins*. *Pharmacological reviews*, 1998. **50**: p. 197-263.
196. Hunter, T. and J.A. Cooper, *Protein-tyrosine kinases*. *Annu Rev Biochem*, 1985. **54**: p. 897-930.
197. Carpenter, G., L. King, Jr., and S. Cohen, *Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro*. *Nature*, 1978. **276**(5686): p. 409-10.
198. Workman, P., *Paul Workman on the challenges of cancer drug development. Interview by Katharine E. Pestell*. *Drug Discov Today*, 2003. **8**(17): p. 775-7.
199. Sawyers, C.L., *Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets*. *Curr Opin Genet Dev*, 2002. **12**(1): p. 111-5.
200. Hunter, T., *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 225-36.
201. Purba, E.R., E.I. Saita, and I.N. Maruyama, *Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model"*. *Cells*, 2017. **6**(2).
202. Maruyama, I.N., *Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers*. *Cells*, 2014. **3**(2): p. 304-30.
203. Wilson, K.J., et al., *Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer*. *Pharmacol Ther*, 2009. **122**(1): p. 1-8.
204. Pawson, T., *Regulation and targets of receptor tyrosine kinases*. *Eur J Cancer*, 2002. **38 Suppl 5**: p. S3-10.
205. Jones, S. and J.Z. Rappoport, *Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. **51**: p. 23-8.
206. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(5): p. 341-54.
207. Boni-Schnetzler, M. and P.F. Pilch, *Mechanism of epidermal growth factor receptor autophosphorylation and high-affinity binding*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(22): p. 7832-6.
208. Hu, Q., et al. *Pituitary Actions of EGF on Gonadotropins, Growth Hormone, Prolactin and Somatolactins in Grass Carp*. *Biology*, 2020. **9**, DOI: 10.3390/biology9090279.
209. Fisher, D.A., *Hormone Epidermal Growth Factor Interactions in Development*. *Hormone Research*, 2008. **33**(2-4): p. 69-75.
210. Garrett, T.P., et al., *The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors*. *Mol Cell*, 2003. **11**(2): p. 495-505.

211. Hendriks, B.S., et al., *Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects*. *Cancer Res*, 2003. **63**(5): p. 1130-7.
212. Hommelgaard, A.M., M. Lerdrup, and B. van Deurs, *Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(4): p. 1557-67.
213. Austin, C.D., et al., *Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(12): p. 5268-82.
214. Baulida, J., et al., *All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(9): p. 5251-7.
215. Fischer, E.J.B.d.d.c.G., *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. 1894. **27**(3): p. 2985-2993.
216. Lawson, A.D.G., M. MacCoss, and J.P. Heer, *Importance of Rigidity in Designing Small Molecule Drugs To Tackle Protein-Protein Interactions (PPIs) through Stabilization of Desired Conformers*. *J Med Chem*, 2018. **61**(10): p. 4283-4289.
217. Wyman Jr, J. and D.W.J.J.o.p.s. Allen, *The problem of the heme interactions in hemoglobin and the basis of the Bohr effect*. 1951. **7**(5): p. 499-518.
218. Koshland, D.E., *Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1958. **44**(2): p. 98-104.
219. Jacob, F. and J. Monod, *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. *J Mol Biol*, 1961. **3**: p. 318-56.
220. Monod, J., J.P. Changeux, and F. Jacob, *Allosteric proteins and cellular control systems*. *J Mol Biol*, 1963. **6**: p. 306-29.
221. Monod, J., J. Wyman, and J.P. Changeux, *On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model*. *J Mol Biol*, 1965. **12**: p. 88-118.
222. Frauenfelder, H., S.G. Sligar, and P.G. Wolynes, *The energy landscapes and motions of proteins*. *Science*, 1991. **254**(5038): p. 1598-603.
223. Feixas, F., et al., *Exploring the role of receptor flexibility in structure-based drug discovery*. *Biophys Chem*, 2014. **186**: p. 31-45.
224. Eigen, M., *New looks and outlooks on physical enzymology*. *Q Rev Biophys*, 1968. **1**(1): p. 3-33.
225. Kuriyan, J. and D. Eisenberg, *The origin of protein interactions and allostery in colocalization*. *Nature*, 2007. **450**(7172): p. 983-90.
226. Popovych, N., et al., *Dynamically driven protein allostery*. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. **13**(9): p. 831-8.
227. Lax, I., et al., *Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules*. *EMBO Journal*, 1989. **8**(2): p. 421-427.
228. Lemmon, M.A., et al., *Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer*. *EMBO Journal*, 1997. **16**(2): p. 281-294.
229. Gullick, W.J., *A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two*. *European Journal of Cancer*, 1994. **30**(14): p. 2186.
230. Burgess, A.W., et al., *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors*. *Mol Cell*, 2003. **12**(3): p. 541-52.
231. Garrett, T.P., et al., *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 763-73.
232. Ogiso, H., et al., *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 775-87.
233. Cho, H.S. and D.J. Leahy, *Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether*. *Science*, 2002. **297**(5585): p. 1330-3.
234. Ferguson, K.M., et al., *EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization*. *Mol Cell*, 2003. **11**(2): p. 507-17.

235. Schlessinger, J., *Signal transduction. Autoinhibition control*. Science, 2003. **300**(5620): p. 750-2.
236. Elleman, T.C., et al., *Identification of a determinant of epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using a truncated, high-affinity form of the ectodomain*. Biochemistry, 2001. **40**(30): p. 8930-9.
237. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. EMBO Journal, 1997. **16**(7): p. 1647-1655.
238. Schlessinger, J., *Ligand-Induced, Receptor-Mediated Dimerization and Activation of EGF Receptor*. Cell, 2002. **110**(6): p. 669-672.
239. Sykes, D.A., et al., *Observed drug-receptor association rates are governed by membrane affinity: the importance of establishing "micro-pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships" at the beta2-adrenoceptor*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(4): p. 608-17.
240. Vauquelin, G. and A. Packeu, *Ligands, their receptors and ... plasma membranes*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **311**(1-2): p. 1-10.
241. Gherbi, K., S.J. Briddon, and S.J. Charlton, *Micro-pharmacokinetics: Quantifying local drug concentration at live cell membranes*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 3479.
242. Shihan, M.H., et al., *A simple method for quantitating confocal fluorescent images*. Biochem Biophys Rep, 2021. **25**: p. 100916.
243. Toomre, D.K.L., Matthias F.; Davidson, Michael W. *Introduction to Spinning Disk Confocal Microscopy*. [cited 2025 June 12]; Available from: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/print/spinningdisk/introduction-print.html>.
244. Ujlaky-Nagy, L., et al., *Flow Cytometric FRET Analysis of Protein Interactions*. 2018. p. 393-419.
245. Lidke, D.S., et al., *Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET)*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 5): p. 1020-7.
246. Nagy, P., et al., *Novel calibration method for flow cytometric fluorescence resonance energy transfer measurements between visible fluorescent proteins*. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology, 2005. **67**: p. 86-96.
247. Szollosi, J., S. Damjanovich, and L. Matyus, *Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research*. Cytometry, 1998. **34**(4): p. 159-79.
248. dos Remedios, C.G., M. Miki, and J.A. Barden, *Fluorescence resonance energy transfer measurements of distances in actin and myosin. A critical evaluation*. J Muscle Res Cell Motil, 1987. **8**(2): p. 97-117.
249. Elangovan, M., R.N. Day, and A. Periasamy, *Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell*. J Microsc, 2002. **205**(Pt 1): p. 3-14.
250. Roszik, J., J. Szöllösi, and G. Vereb, *AccPbFRET: An ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**(1): p. 346.
251. Rigler, R. and J. Widengren, *Fluorescence-based monitoring of electronic state and ion exchange kinetics with FCS and related techniques: from T-jump measurements to fluorescence fluctuations*. Eur Biophys J, 2018. **47**(4): p. 479-492.
252. Onsager, L.J.P.r., *Reciprocal relations in irreversible processes. I*. 1931. **37**(4): p. 405.
253. Petrasek, Z. and P. Schwille, *Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys J, 2008. **94**(4): p. 1437-48.
254. Wohland, T., S. Maiti, and R. Machan, *An Introduction to Fluorescence Correlation Spectroscopy*. 2020.
255. Veerapathiran, S. and T. Wohland, *Fluorescence techniques in developmental biology*. J Biosci, 2018. **43**(3): p. 541-553.
256. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006: Springer.

257. Phillips, D., et al., *Time Correlated Single-Photon Counting (Tcspc) Using Laser Excitation*. Instrumentation Science & Technology - INSTRUM SCI TECHNOL, 1985. **14**: p. 267-292.
258. Ballew, R.M. and J.N. Demas, *An error analysis of the rapid lifetime determination method for the evaluation of single exponential decays*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(1): p. 30-33.
259. Philip, J. and K. Carlsson, *Theoretical investigation of the signal-to-noise ratio in fluorescence lifetime imaging*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2003. **20**(2): p. 368-79.
260. Becker, W., et al., *Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting*. 2004. **63**.
261. Bajgelman, M.C., *Chapter 8 - Principles and applications of flow cytometry*, in *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, G. Misra, Editor. 2019, Academic Press. p. 119-124.
262. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. Clinical Chemistry, 2000. **46**(8): p. 1221-1229.
263. Hermanson, G., *Bioconjugate Techniques: Third Edition*. Bioconjugate Techniques: Third Edition, 2013: p. 1-1146.
264. Bauer, C.R., *Labeling and use of monoclonal antibodies in immunofluorescence: protocols for cytoskeletal and nuclear antigens*. Methods Mol Biol, 2014. **1131**: p. 543-8.
265. Nagy, P., et al., *Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy*. Eur Biophys J, 1998. **27**(4): p. 377-89.
266. Brock, R., I.H. Hamelers, and T.M. Jovin, *Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor*. Cytometry, 1999. **35**(4): p. 353-62.
267. Buckley, C.M. and J.S. King, *Drinking problems: mechanisms of macropinosome formation and maturation*. FEBS J, 2017. **284**(22): p. 3778-3790.
268. Podinovskaia, M., et al., *A novel live-cell imaging assay reveals regulation of endosome maturation*. Elife, 2021. **10**.
269. Chadwick, S.R., J.Z. Wu, and S.A. Freeman, *Solute Transport Controls Membrane Tension and Organellar Volume*. Cell Physiol Biochem, 2021. **55**(S1): p. 1-24.
270. Freeman, S.A., et al., *Lipid-gated monovalent ion fluxes regulate endocytic traffic and support immune surveillance*. Science, 2020. **367**(6475): p. 301-305.
271. Wang, X., et al., *TPC proteins are phosphoinositide-activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes*. Cell, 2012. **151**(2): p. 372-83.
272. Pafumi, I., et al., *Naringenin Impairs Two-Pore Channel 2 Activity And Inhibits VEGF-Induced Angiogenesis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 5121.
273. Sarabipour, S., et al., *Analytical characterization of plasma membrane-derived vesicles produced via osmotic and chemical vesiculation*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(7): p. 1591-8.
274. Del Piccolo, N., et al., *Production of plasma membrane vesicles with chloride salts and their utility as a cell membrane mimetic for biophysical characterization of membrane protein interactions*. Anal Chem, 2012. **84**(20): p. 8650-5.
275. Michels, L., et al., *Complete microviscosity maps of living plant cells and tissues with a toolbox of targeting mechanoprobes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(30): p. 18110-18118.
276. Vysniauskas, A., et al., *Exploring viscosity, polarity and temperature sensitivity of BODIPY-based molecular rotors*. Phys Chem Chem Phys, 2017. **19**(37): p. 25252-25259.
277. Sidaway, J.E., et al., *Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase reduce receptor-mediated endocytosis in opossum kidney cells*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(9): p. 2258-65.
278. Yilmaz, A., et al., *Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(3): p. 529-38.
279. McCluskey, A., et al., *Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis*. Traffic, 2013. **14**(12): p. 1272-89.

280. Fischer, R., H. Hufnagel, and R. Brock, *A doubly labeled penetratin analogue as a ratiometric sensor for intracellular proteolytic stability*. *Bioconjug Chem*, 2010. **21**(1): p. 64-73.
281. Stein, B.S., K.G. Bensch, and H.H. Sussman, *Complete inhibition of transferrin recycling by monensin in K562 cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1984. **259**(23): p. 14762-14772.
282. Basu, S.K., et al., *Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts*. *Cell*, 1981. **24**(2): p. 493-502.
283. Mollenhauer, H.H., D. James Morr e, and L.D. Rowe, *Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1990. **1031**(2): p. 225-246.
284. Zakany, F., et al., *Effect of the Lipid Landscape on the Efficacy of Cell-Penetrating Peptides*. *Cells*, 2023. **12**(13).
285. Muddather, H.F., et al. *In Vitro Investigation of the Antiproliferative and Antimetastatic Effects of Atorvastatin: A Focus on Cervical and Head and Neck Cancers*. *Pharmaceutics*, 2025. **17**, 1253 DOI: 10.3390/pharmaceutics17101253.
286. Staporwongkul, K.S. and J.P. Vincent, *Generation of extracellular morphogen gradients: the case for diffusion*. *Nat Rev Genet*, 2021. **22**(6): p. 393-411.
287. Wu, Y., et al., *Rapid diffusion-state switching underlies stable cytoplasmic gradients in the *Caenorhabditis elegans* zygote*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(36): p. E8440-E8449.
288. Pero, J.K., E.M. Haas, and N.L. Thompson, *Size dependence of protein diffusion very close to membrane surfaces: measurement by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy*. *J Phys Chem B*, 2006. **110**(22): p. 10910-8.
289. Szabo, A., et al., *Local ligand concentration gradients induced by the plasma membrane*. *iScience*, 2025. **28**(7): p. 112954.
290. Maxfield, F.R. and T.E. McGraw, *Endocytic recycling*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004. **5**(2): p. 121-132.
291. Lowengrub, J., J. Allard, and S. Aland, *Numerical simulation of endocytosis: Viscous flow driven by membranes with non-uniformly distributed curvature-inducing molecules*. *Journal of Computational Physics*, 2016. **309**: p. 112-128.
292. Smith, S.M., R. Renden, and H. von Gersdorff, *Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval*. *Trends in Neurosciences*, 2008. **31**(11): p. 559-568.
293. Cattoni, D.I., et al., *Cooperativity in Binding Processes: New Insights from Phenomenological Modeling*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0146043.
294. Batta, G., et al., *Statin-boosted cellular uptake and endosomal escape of penetratin due to reduced membrane dipole potential*. *British Journal of Pharmacology*, 2021. **178**(18): p. 3667-3681.

## 12. Tárgyszavak

Sejtmembrán

Dipóluspotenciál

Sejtpenetráló peptidek

Endocitózis

FRET

Fluoreszcencia-mikroszkópia

Áramlási citometria

Sejtfelszíni receptorok

Ligandumok

Membránforgalom

EGFR-ErbB2

FCS

### **13. Keywords**

Cell membrane

Dipole potential

Cell-penetrating peptides (CPPs)

Endocytosis

FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

Fluorescence-microscopy

Flow cytometry

Cell-surface receptors

Ligands

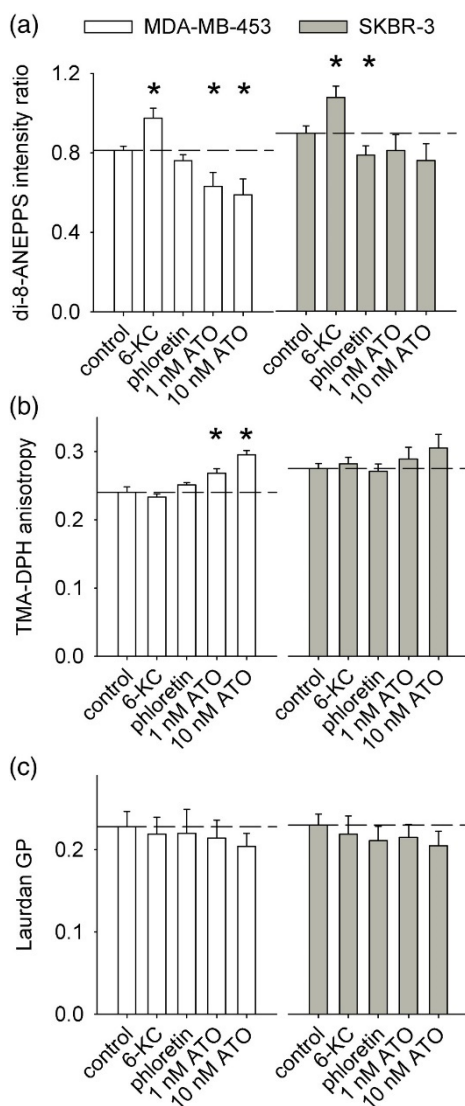
Membrane turnover

EGFR–ErbB2

FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)

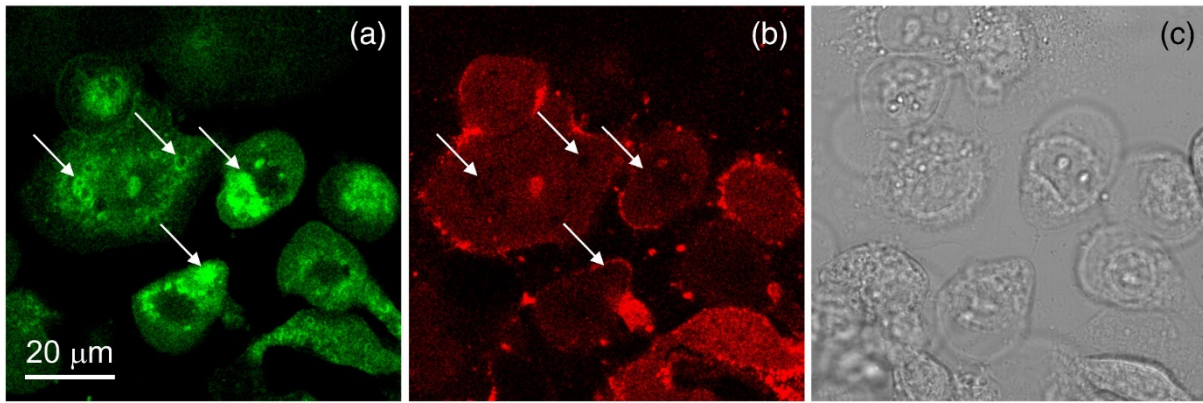
## 14. Kiegészítő ábrák

Ebben a fejezetben olyan ábrák kerülnek bemutatásra, amelyek nem a saját készítésűek, de hozzájárulnak a kutatás megértéséhez.



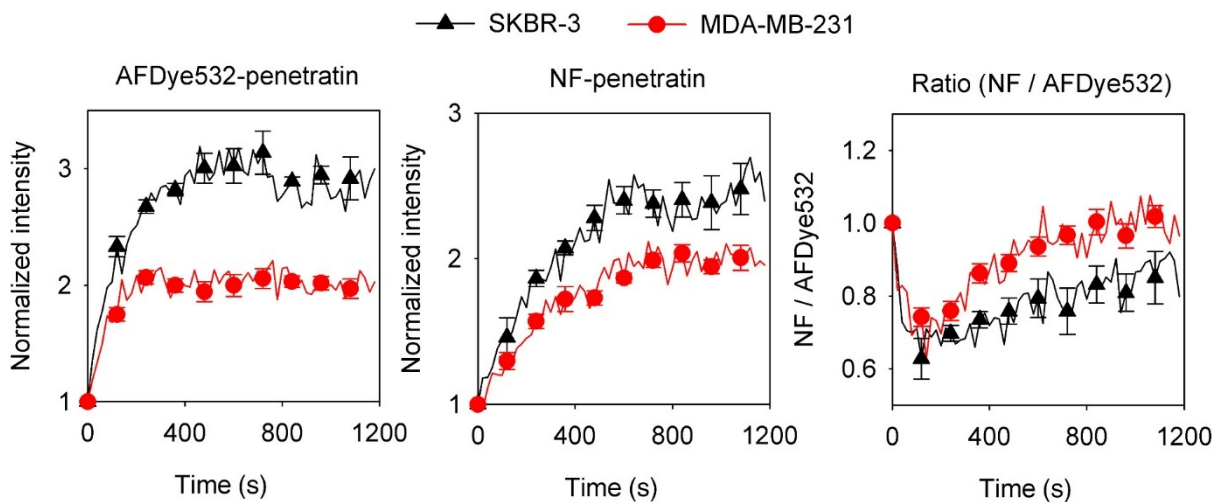
### 1. kiegészítő ábra: A floretin, a 6-ketokoleszتانol és az atorvasztatin membrán biofizikai tulajdonságaira gyakorolt hatásainak jellemzése [294]

A sejteket előkezelték floretinnel, 6-ketokoleszتانollal (6-KC) vagy az atorvasztatin (ATO) két különböző koncentrációjával, ahogy azt az anyagok és módszerek részben leírtam. A dipóluspotenciált di-8-ANEPPS segítségével mérték, amelynek gerjesztési intenzitásaránya pozitív korrelációt mutat a dipóluspotenciállal (a). A TMA-DPH fluoreszcencia-anizotrópiája fordítottan arányos a membrán fluiditásával (b), míg a Laurdan által mért generalizált polarizáció (GP) fordítottan arányos a membrán hidrációjával (c). A hibasávok öt biológiai ismétlés SEM értékét mutatják. A csillagok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelölik ( $P < 0,05$ ), amelyet ANOVA és Tukey-féle HSD teszt igazolt.



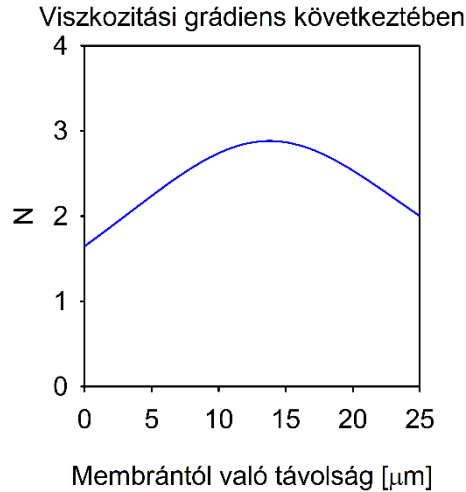
**2. kiegészítő ábra: Élő sejtek konfokális mikroszkópos felvételei, amelyek kettősen vannak jelölve AlexaFluor532- és NF-penetrattal [294]**

A sejteket 37 °C-on 20 percen át inkubálták AlexaFluor532-penetrattal (a) és NF-penetrattal (b), majd a képeket konfokális mikroszkópiával rögzítették. A (c) panel a sejtek differenciál-interferencia kontraszt képét mutatja. A fluoreszcenciaképeken látható nyilak olyan területekre mutatnak, ahol az AlexaFluor532 pH-független fluoreszcenciája és az NF fluoreszcenciája – amely savas pH-n kioltódik – anti-korrelációt mutat.



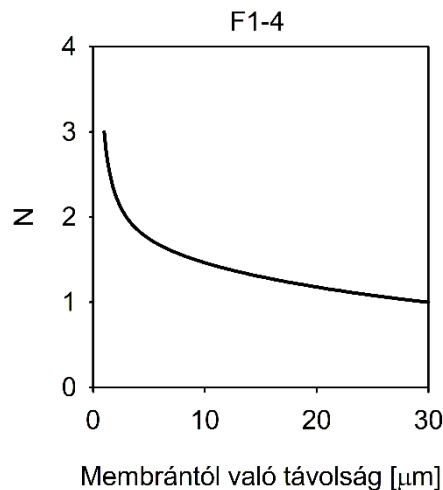
**3. kiegészítő ábra: A penetratin sejt felvétele és endo-lizoszómális kiszabadulása [294]**

Két különböző sejtípust inkubáltak 37 °C-on fluoreszcensen jelölt penetratinok folyamatos jelenlétében (5  $\mu$ M AlexaFluor532-penetratin és 5  $\mu$ M NF-penetratin). A sejtek fluoreszcenciaintenzitását időkorrelált áramlási citometriás méréssel rögzítették. Az AlexaFluor532-penetratin átlagos intenzitását – amely a teljes sejt felvételt jellemzi – valamint az NF-penetratin átlagos intenzitását – amely a pH-semleges kompartmentekben jelenlévő penetratin mennyiségére utal – számították ki az idő függvényében, miután kiszűrték a törmeléket és az életképtelen sejteket. A két fluoreszcenciaintenzitás arányát a jobb oldali panel mutatja. A folytonos vonalak a 20 másodperces időablakokra számított átlagos fluoreszcenciaintenzitást ábrázolják, normalizálva az első időablak intenzitásához. A hibásávvval jelölt szimbólumok – amelyek öt biológiai ismétlésből származó 13–15 minta alapján számított SEM-et jelölnek – az ábra áttekinthetősége érdekében csak minden hatodik adatpontnál kerültek feltüntetésre.



**4. kiegészítő ábra: Diffúziós együttható lokális minimumából eredő TAMRA-EGF koncentrációgradiens [289]**

Az F1-4\_ErbB2 sejtekben FCS-sel meghatározott TAMRA-EGF diffúziós együttható lokális heterogenitásának analitikus modellezése után, megoldottuk a Fokker–Planck-egyenletet stacionárius állapotra. Az így kapott, a diffúziós együttható lokális minimumából eredő TAMRA-EGF koncentrációgradiens látható az 5. kiegészítő ábrán.



**5. kiegészítő ábra: Az EGF egyensúlyi koncentrációprofiljának modellje [289]**

A 24. ábrán bemutatott, nem homogén EGF-diffúziós együttható alapján várható EGF-koncentrációgradiens számításának eredményét mutatja be ez az ábra. A számítás elve megegyezik az 4. kiegészítő ábrán bemutatottal. Az EGF térben változó diffúziós együtthatóját hatványfüggvénnyel modelleztük, majd a Fokker–Planck-egyenlet megoldásával határoztuk meg az EGF egyensúlyi koncentrációprofilját, amely figyelemreméltó módon nagyon hasonló a 24. ábrán látható kísérletileg megfigyelt görbéhez.

## 15. Melléklet



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/482/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Gabriella  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. \*Nagyné Szabó, Á. T., **Tóth, G.**, Szatmári, T., Mocsár, G., Rebenku, I., Szöllősi, J., Nagy, P.: Local ligand concentration gradients induced by the plasma membrane.  
*iScience*. 28 (7), 1-12, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2025.112954>  
IF: 4.1 (2024)
2. Batta, G., Kárpáti, L., Henrique, G. F., **Tóth, G.**, Tarapcsák, S., Kovács, T., Zákány, F., Mándity, I. M., Nagy, P.: Statin-boosted cellular uptake and endosomal escape of penetratin due to reduced membrane dipole potential.  
*Br. J. Pharmacol.* 178 (18), 3667-3681, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15509>  
IF: 9.473

### További közlemények

3. Yousef, M., Szabó, I., Murányi, J., Illien, F., Soltész, D., Bató, C., **Tóth, G.**, Batta, G., Nagy, P., Sagan, S., Bánóczy, Z.: Cell-Penetrating Dabcyl-Containing Tetraarginines with Backbone Aromatics as Uptake Enhancers.  
*Pharmaceutics*. 15 (1), 1-22, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15010141>  
IF: 4.9

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,473**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
13,573**



A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.08.19.

\*Nagyné Szabó Ágnes és Tóth Gabriella megosztott első szerzők.

## 16. Fűggelék