

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A dipólpotenciál összefüggései az ErbB fehérjecsaláddal és a
lipidtutajokkal**

Dr. Kovács Tamás

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

DEBRECEN, 2018

A dipólpotenciál összefüggései az ErbB fehérjecsaldal és a lipidtutajokkal

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Kovács Tamás, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ, F.402.
szemináriumi terem, 2018. április 12., 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Török Zsolt, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Mádi András, PhD
Dr. Török Zsolt, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület
tanterme, 2018. április 12., 13:00.

1. Bevezetés

1.1. A sejtmembrán dipólpotenciálja

Az eukarióta sejtmembrán komplexitásának megnyilvánulása a membránt alkotó lipidek sokfélesége és laterális heterogenitása mellett a membránpotenciálok „triumvirátusa”, vagyis a traszmembrán, a felületi, valamint a dipólpotenciál jelenléte. A három közül a legkevésbé ismert a dipólpotenciál, amely a lipidekhez asszociált interfaciális vízmolekulák, illetve a foszfolipidek és szterolok dipoláris szegmentumainak preferenciális, rendezett térbeli orientációjából ered. A molekuláris dipólok elrendeződésének eredményeképpen rendkívül nagy, többszáz mV-os pozitív intramembrán elektrosztatikus potenciál jön létre, amely óriási, a másik két potenciálnál jóval magasabb, 10^8 - 10^9 V/m nagyságrendű dipól elektromos erőter kialakulását eredményezi.

A dipólpotenciál az általa keltett elektromos erőter révén befolyásolhatja különböző membránfehérjék konformációját és funkcióit, azok traszmembrán doménjeire (TMD) gyakorolt hatásokon keresztül. Ennek megfelelően kimutatták, hogy a dipólpotenciál jelentős hatásokat fejthet ki bakteriális ionofórok, feszültségfüggő ioncsatornák, Na^+/K^+ ATPázok, P-glikoproteinek, illetve G-fehérjéhez kapcsolt receptorok szerkezetére és funkciójára.

A dipólpotenciál nagyságát elsősorban a sejtmembrán lipidösszetétele határozza meg, hiszen befolyásolja azt a foszfolipidek feji csoportjának típusa; az, hogy a foszfolipid hidrofób lánc észteres vagy éteres kötést tartalmaz; a foszfolipid láncok régiójában a kettős kötések jelenléte; valamint a membránban található szterolok mennyisége. Emellett leírták, hogy mértéke kísérletesen csökkenthető phloretin, míg növelhető 6-ketocholestanol alkalmazásával.

Mivel a dipólpotenciál teljes egészében a membrán alacsony dielektromos állandójú, hidrofób belsejében helyezkedik el, közvetlen mérése rendkívül nehéz. Bár számos módszert alkalmaztak már a dipólpotenciál mérésére (így ellentétes töltésű, nagyméretű hidrofób ionok permeabilitásának különbözőségén alapuló számításokat, krio-elektron mikroszkópiát, molekuláris dinamikai szimulációkat, atomerő mikroszkópiát, vibrációs Stark-effektus spektroszkópiát), a leginkább elfogadott a feszültség-szenzitív fluorofórok használata. Erre a célra leggyakrabban aminosztirilpiridinium-származékokat, elsősorban di-8-ANEPPS vegyületet alkalmaznak. A festék használatának alapja az elektrokrómia jelensége (más néven Stark-effektus), vagyis a fluorofór spektrális tulajdonságainak változása az intramembrán elektromos erőter nagyságának függvényében. Di-8-ANEPPS esetén elsősorban a gerjesztési spektrum erőter hatására megfigyelhető eltolódása alkalmazható excitációs aránymérési módszer segítségével, amely során a festék gerjesztési spektruma két ellentétes szélének megfelelő hullámhosszon történő excitáció után mérjük a festék által kibocsátott fluoreszcencia intenzitását, majd kiszámítjuk a két esetben mért érték hányadosát, amelyről kimutatták, hogy

elsősorban a sejtmembrán dipólpotenciáljának nagyságával arányos. Bizonyos körülmények esetén a di-8-ANEPPS alkalmazását célszerű kiegészíteni egyéb módszerek használatával is. Erre alkalmasak lehetnek a 3-hidroxi-flavon fluorofórok segítségével végzett mérések. Ezen vegyületek emissziós spektruma ugyanis drámai módon megváltozik az intramembrán elektromos erőtér függvényében. Gerjesztett állapotban a fluorofórokban intramolekuláris proton transzfer (ESIPT) reakció megy végbe, így a molekulák excitáció után N* (normál) és T* (foto-tautomer termék) formában fordulhatnak elő, amelyek emissziós tartománya jól elkülönül. Az N* és T* formák közötti egyensúlyi átmenetet az elektromos erőtér nagysága jelentősen befolyásolja, így a vegyületek N* és T* állapotához tartozó emissziós sávjainak megfelelő intenzitások hányadosának meghatározásával becsülhető a sejtmembrán dipólpotenciáljának nagysága. A 3-hidroxi-flavonok alkalmazása különösen kedvező lehet akkor, ha két olyan származékot (például az F66 és PPZ8 vegyületeket) használunk, amelyek ellentétes membránbeli orientációjuk révén ellentétes módon reagálnak a dipólpotenciál által keltett elektromos erőtér változására. Valamilyen egyéb membránbiofizikai paraméter változása eredményeképpen ugyanis a két fluorofór spektrális tulajdonságai várhatóan azonos irányban változnának, ezáltal a dipólpotenciál változásai elkülöníthetők lehetnek az egyéb tényezők módosulásaitól emissziós aránymérési módszerek során.

1.2. Az ErbB fehérjecsald

Az epidermális növekedési faktor receptor család tagjai, vagyis az ErbB fehérjék (ErbB1=EGFR=HER1, ErbB2=HER2/Neu, ErbB3=HER3, ErbB4=HER4) a receptor tirozin kinázok közé tartoznak és fontos szerepet játszanak a korai embrionális fejlődésben, a központi és perifériás idegrendszer, különböző mirigyek, a szívizom és a szívbillentyűk kialakulásában. Mivel aktivációjuk során egyéb celluláris folyamatok mellett sejtsztódást eredményező jelátviteli útvonalakat indítanak be, jelentősek bizonyos tumorok (emlő-, tüdő-, nyelöcső-, petefészek-, méhnyak-, vastagbélkarcinómák, gliális eredetű agytumorok) patogenezisében, mutációjuk, túlzott kifejeződésük ugyanis rákos transzformációhoz vezethet.

Az ErbB fehérjék rendelkeznek egy extracelluláris, ligandot kötő, egy transzmembrán és egy intracelluláris, kinázaktivitással bíró doménnel. Ezen receptorokkal kapcsolatos kiemelt tudományos érdeklődés oka a daganatképződésben játszott szerep mellett az, hogy a dimerizáció által aktiválódott fehérjék prototípusainak tekinthetők. Az aktivációjukat leíró klasszikus allosztérikus aktivációs modell alapján ugyanis az inaktív állapotban levő receptor monomerként fordul elő a sejtmembránban, majd ligand (például EGF) kötődésének hatására megváltozik a fehérje extracelluláris doménjének (ECD) konformációja. Ez a receptorok homo-, illetve

heterodimerizációjához vezet, amely által a szomszédos citoplazmatikus tirozin kináz domének aktiválódnak receptor-receptor kölcsönhatások révén. A megnövekedett kinázaktivitás eredményeképpen az alegységek (kereszt)autofoszforylációja következik be és az így képződő, dokkolóhelyként funkcionáló foszforylált tirozin oldalláncokhoz sejtplazmai fehérjék kötődhetnek, foszforylálódhatnak és aktiválódhatnak, amely a downstream jelátviteli útvonalak beindulását eredményezi. A klasszikus dogma szerint a receptorok dimerizációját és aktivációját elsősorban a fehérjék ECD-je irányítja. Ez a régió nyugalmi állapotban zárt konformációban található, amelyben a ligandot kötő régió képes a ligand megkötésére, viszont a dimerizációs kar rejtve van. A ligand bekötődése indukálhatja a zárt konformáció nyíltba való átmenetét, vagy a receptor konformációja fluktuálhat a zárt és nyitott állapotok között és a ligand bekötődése stabilizálhatja az utóbbit. A nyitott konformációban pedig a dimerizációs kar exponálódik és ezen keresztül megvalósulhat a fehérjék asszociációja.

A klasszikus aktivációs modell szerint az ECD elsődleges jelentősége mellett a transzmembrán domén (TMD) csupán passzív szerepet játszik a receptor aktivációjában azáltal, hogy a fehérjét a membránba horgonyozza. Ennek ellentmondanak azonban azok a megfigyelések, amelyek alapján az ebben a régióban található mutáció (például az ErbB2 mutáns változata, a Neu esetén) jelentősen befolyásolhatja a proteinek asszociációs, így aktivációs hajlamát. Ezzel összhangban az ErbB fehérjék esetén a TMD-ben leírták az ún. Sternberg-Gullick dimerizációs GxxxG motívumokat, amelyek segítségével a TMD-k dimerizációja alakulhat ki. A receptorcsalád tagjainak membránban található α -héliceiben két ilyen szekvencia fordul elő, melyek funkcionális szempontból különböző dimerek kialakulását mediálhatják. A C-terminális motívum segítségével funkcionálisan inaktív, míg az N-terminális révén aktív dimerek képződhetnek, ugyanis utóbbi esetben a kináz domének reorientációján keresztül azok aktiválódhatnak, így a receptor elindíthatja a megfelelő jelátviteli útvonalakat. A két konformáció egyfajta rotációs mozgás során alakulhat át egymásba. Az újabb eredmények alapján az ErbB fehérjék aktivációja egy úgynevezett rotációs aktivációs modellel jellemezhető, amely szerint a transzmembrán és intracelluláris doméneknek intrinsic asszociációs tendenciája van, amelyet ellensúlyoz az ECD zárt konformációja, az inaktív kináz dimerek képződése és az intracelluláris juxtamembrán szegmentum kölcsönhatása a membrán anionos lipidjeivel. A ligand megkötése felszabadítja a receptorokat ezen inhibitoros mechanizmusok alól, így a transzmembrán és intracelluláris domének rotációs reorientációja következik be, aktiválva a fehérjék kináz doménjét és ezáltal a jelátviteli útvonalakat. A dipólpotenciál nagysága pedig a TMD-re gyakorolt hatások révén befolyásolhatja az ErbB fehérjék dimerizációját és így az aktivitását is.

1.3. A lipidtutajok

A sejtmembrán komplexitásához hozzájárul az azt felépítő lipidek inhomogén laterális eloszlása, amely speciális lipid- és fehérjeösszetételű, illetve szupramolekuláris architektúrájú, szubmikronos, nanométeres nagyságú membrán mikrodomének, úgynevezett lipidtutajok (raftok) kialakulásához vezet. Ennek háttérében a klasszikus lipidtutaj elmélet szerint a szfingolipid és koleszterin molekulák preferenciális laterális asszociációja áll, amely szoros pakolódási denzitású, a modellmembránok folyékony rendezett doménjeihez sok szempontból hasonló régiók kialakulását eredményezi. A membránfehérjék szerkezetüktől függően szelektív módon dúsulnak a lipidtutajokban vagy kiszorulnak belőlük, amely megoszlás a fehérjék kölcsönhatási valószínűségének, valamint konformációjának módosításán keresztül jelentősen befolyásolhatja azok funkcióját. A lipidtutajok klasszikus definíciója szerint tehát azok „kis (10-200 nm-es), heterogén, nagyon dinamikus, szterolban és szfingolipidekben gazdag domének, amelyek kompartmentalizálják a sejtes folyamatokat”. A klasszikus definíció szerint a fázisszeperáció alapja bizonyos lipidek keveredésének képtelensége, a fehérjék nem játszanak aktív szerepet a folyamatban. Az alternatív jelenségek révén kialakuló lipid-fehérje asszociátumok az eredeti definíció szerint nem tartoznak a lipidtutajok közé. A raftokkal kapcsolatos kutatások azonban már a kezdetektől fogva ellentmondásosak voltak, így a klasszikus elméletet folyamatosan módosították az újabb kutatási eredmények alapján. A manapság leginkább elfogadott nézetek alapján képződésükben aktív szereppel bírnak a bennük található fehérjék, a membrán alatti kortikális aktin hálózat az úgynevezett „cölöpkerítés” modellnek megfelelően, illetve bizonyos intracelluláris organelleumok (például az endoplazmás retikulum) a membránnal való közvetlen kapcsolódások révén.

A lipidtutajok szelektív jelölése lehetséges bizonyos markerek alkalmazásával. Bár egyik raftmarker sem tekinthető ideálisnak, a leggyakrabban használt és leginkább elfogadott lipidtutaj jelölési módszernek számít a sejtek transzfekciója a tutajokban dúsuló glükozilfoszfatidilinozitol (GPI)-horgonyzott fehérjéket kódoló plazmiddal, illetve a glikolipid receptor GM1 gangliozidhoz szelektíven kötődő koleratoxin B alegység (CTX-B) vagy a rendezett, koleszterinben gazdag doménekhez kötődő koleszterin ellenes antitestek (például az AC8) alkalmazása.

A lipidtutajokról kimutatták, hogy jelentős szerepet játszanak számos fontos celluláris folyamatban, így a jelátvitel, a membrán trafficking, a sejtek differenciációja, adhéziója és migrációja, a szinaptikus transzmisszió, a citoskeletális organizáció és a patogének sejtbe jutása során. Emellett a tutajok az ErbB fehérjék funkcióját is befolyásolhatják, például a raftokban található GM3 gangliozidról leírták, hogy gátolja az EGFR aktivációját.

Mivel a lipidtutajok speciális, a membrán egyéb régióitól eltérő összetétellel bírnak és a dipólpotenciál nagyságát elsősorban a membrán összetétele határozza meg, logikus feltételezés, hogy a dipólpotenciál nagysága különböző lehet a sejtmembrán raft és non-raft doménjeiben. Bár modellmembránokon végzett atomerő mikroszkópos mérések során kimutatták, hogy a folyékony rendezett doménekben magasabb lehet a dipólpotenciál, valamint élő sejtekben di-8-ANEPPS festéket alkalmazó mérések során a fluoreszcens jel, így a dipólpotenciál nagyságának membránbeli laterális heterogenitása háttérben a lipidtutajok jelenlétét feltételezték, élő sejtek membránjában közvetlen módon még nem demonstrálták a különbséget.

1.4. A Gaucher-kór

Bizonyos patológiás állapotokban a sejtmembrán lipidösszetétele megváltozhat. Az egyik olyan betegség, amelyben bizonyított a membránok összetételének változása, a legismertebb lizoszomális tárolási betegség, a Gaucher-kór, amelynek legalapvetőbb jellemzője a glükoszilceramid felhalmozódása a glükocerebrozidáz enzim deficienciájának következtében. A betegségben a neurológiai és muszkuloszkeletális abnormalitások, valamint a belső szervi tünetek (például masszív máj- és lépmeagnagyobbodás) mellett a leginkább patognómikus eltérés az úgynevezett Gaucher-sejtek kialakulása, amelyek a bennük felhalmozódott glükoszilceramid következtében abnormálisan aktíválódnak makrofágok.

A Gaucher-kór relatíve alacsony előfordulása, illetve a mintavétel nehézkessége miatt a betegség vizsgálata során előszeretettel alkalmaznak különböző modellrendszereket, amelyek közül az egyik leggyakoribb a forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) segítségével makrofággá differenciáltatott monocita sejtek használata. Ha a differenciáltatás során a PMA mellett konduritol B epoxid (CBE) kezelést alkalmazunk, akkor a képződő makrofágokban a glükocerebrozidáz enzim gátlása révén a Gaucher-kórra jellemző fenotípus alakul ki.

A Gaucher-kór vizsgálata során mind betegekből származó mintákon, mind pedig modellrendszerekben kimutatták, hogy az enzimdefektus következtében jelentősen megváltozik a sejtmembrán lipidösszetétele, hiszen jelentősen megnő a ceramid, a di- és trihexozilceramid, a szfingomielin és a foszfatidilglicerol mennyisége, nemcsak a lizoszomákban, hanem egyéb endoszomális régiók mellett a sejtmembránban is, elsősorban annak lipidtutaj doménjeiben. A membrán összetételben megfigyelhető eltérések szerepét felvetették az abnormális makrofág aktiváció folyamatában is.

2. Célkitűzések

A daganatok patogenezisében fontos ErbB receptorok aktivációjának kulcs lépése a fehérjék homo-, illetve heterodimerizációja. Az asszociáció folyamatában korábban elsődlegesnek gondolták a fehérjék extracelluláris doménjének szerepét, ma azonban már tudjuk, hogy abban a transzmembrán domének is aktív szerepet játszanak. Mivel utóbbi a membrán hidrofób belsejében, a dipólpotenciál régiójában helyezkedik el, annak változásai befolyásolhatják ezen domének konformációját, asszociációs folyamatait, így a receptorok aktivációján keresztül a jelátviteli útvonalak beindulását is. A dipólpotenciál jelentőségét azonban még nem vizsgálták, így kísérleteink első fázisában célul tűztük ki:

- a) a már leírt dipólpotenciált változtató kezelések (phloretin és 6-ketocholestanol) hatásának meghatározását a mi kísérletes rendszerünkben,
- b) a dipólpotenciál módosításának az EGFR sejtfelszíni expressziójára és ligand iránti affinitására gyakorolt hatásának vizsgálatát,
- c) a dipólpotenciál változtatására az EGFR, ErbB2 és Neu fehérjék asszociációiban bekövetkező eltérések elemzését,
- d) a fenti kezelések funkcionális jelentőségének tesztelését,
- e) valamint a bekövetkező változások lipídutajok jelenlététől való függésének vizsgálatát.

A dipólpotenciál nagyságát elsősorban a membrán lipidösszetétele határozza meg, így várható, hogy az a speciális összetétellel bíró lipídutajokban eltérhet a membrán egyéb régióiban tapasztalt értékektől. Ezt azonban még nem bizonyítottak élő sejtek esetén. Emellett felmerül, hogy a dipólpotenciál mértéke megváltozhat olyan betegségekből, amely során a sejtmembrán összetétele módosul. Ezek alapján munkánk második részében vizsgálni kívántuk:

- a) új, feszültség-szenzitív 3-hidroxi-flavon származékok (F66 és PPZ8) spektrális változásait a dipólpotenciált módosító kezelések esetén,
- b) különböző feszültségre érzékeny fluorofórok dipólpotenciál szenzitív intenzitás jelei korrelációjának mértékét különböző raft és non-raft doménmarkerek intenzitásaival,
- c) a dipólpotenciál nagyságában a különböző membrán mikrodomének között tapasztalható különbségek mértékét,
- d) az F66 és PPZ8 emissziós spektrumában megfigyelhető eltéréseket a festék lipídutajokban, illetve egyéb membrán régiókban történő elhelyezkedése esetén,
- e) valamint a dipólpotenciál nagyságának esetleges változását, illetve annak mértékét egy, a sejtmembrán (és főleg a lipídutajok) lipidösszetételének megváltozásával járó betegség, a Gaucher-kór in vitro modellrendszerében.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Az alkalmazott sejtvonalak, kezelések és a sejtek transzfekciója

Vizsgálataink során ErbB1 és ErbB2 fehérjéket jelentős mértékben expresszáló humán emlőtumor eredetű SKBR-3, EGFR-t nagymértékben expresszáló humán epiteliális karcinóma eredetű A431 és közepes mértékben kifejező méhnyak eredetű HeLa, valamint érdemi ErbB mennyiséggel nem rendelkező kínai hörcsögből származó petefészek eredetű CHO sejtvonalak mellett az ErbB1-eGFP fúziós fehérjét stabilan expresszáló módosított, CHO eredetű F1-4 sejtvonalat alkalmaztunk. A sejteket bizonyos esetben éheztetés után 100 ng/ml humán rekombináns EGF-fel stimuláltuk 37°C-on 5 percig, illetve a dipólpotenciál mértékét módosítottuk 100 µM-os koncentrációban alkalmazott phloretin vagy 6-ketocholestanol kezelésekkel szobahőmérsékleten 10 percen keresztül Pluronic F-127 detergens jelenlétében.

A tranziensen transzfektált sejteket Lipofectamine 2000 segítségével végzett lipofekcióval, illetve Amaxa Nucleofector készülékkel történő elektroporációval állítottuk elő. Az intracelluláris foszforilációs mérések során ErbB2-pcDNA3, a NeuT vizsgálata során az ErbB2 transzmembrán doménjének 659-es pozíciójában egy Val→Glu mutációt hordozó pSV2neuNT, míg a number&brightness mérések során PCDNA3.1 ErbB2-short-mYFP, illetve az általunk előállított PCDNA3.1 ErbB2 (Val659Glu)-short-mYFP plazmidokkal transzfektáltuk a sejteket. A lipidutajok vizualizációjára GFP-GPI-t kódoló plazmidot használtunk.

A Gaucher-kór modellrendszereként humán akut monocitás leukémia eredetű THP-1 sejteket differenciáltattuk 50 ng/ml PMA-val 5 napig, illetve a betegségre jellemző fenotípus kialakulásának indukciójára párhuzamosan 500 µM-os CBE kezelést alkalmaztunk.

3.2. A sejtek jelölése dipólpotenciál-szenzitív fluorofórokkal, illetve raft és non-raft markerekkel

A dipólpotenciál nagyságának meghatározására di-8-ANEPPS, illetve F66 és PPZ8 fluorofórokat használtunk konfokális mikroszkópia alkalmazásával. A kísérletek során 8-lyukú fedőlemez aljú kamrákban növesztett sejteket jelöltünk 2 µM di-8-ANEPPS-sel 10 percig 12°C-on, illetve 10 nM-os koncentrációban alkalmazott F66 vagy PPZ8 vegyületekkel 20 percig jégen.

A sejtmembránban található lipidutajok vizualizációjához a sejteket GFP-GPI-t kódoló plazmiddal transzfektáltuk vagy 8 µg/ml AlexaFluor647-tel konjugált koleratoxin B alegységgel, illetve 10 µg/ml AC8 anti-koleszterin antitesttel jelöltük 20 percig jégen. Utóbbi antitestet Cy5-tel konjugált GAMIG Fab fragmentum segítségével tettük láthatóvá. A non-raft membrán domének jelölése 25 µg/ml AlexaFluor647-tel konjugált transzferrinnel történt.

3.3. A dipólpotenciál EGF kötődésére gyakorolt hatásának meghatározása

A dipólpotenciál EGF ErbB1 iránti affinitására gyakorolt hatásának mérésére éheztetett SKBR-3, A431 és HeLa sejtek dipólpotenciálját módosítottuk, majd meghatároztuk tetrametil-rodaminnal konjugált EGF (TAMRA-EGF) receptorhoz való kötődésének mértékét áramlási citométer segítségével (nem-kompetitív módszer). A sejteket a különböző koncentrációkban alkalmazott jelölt EGF-fel jégen, 30 percig inkubáltuk. Ennek alternatívjaként változó mennyiségű jelöletlen EGF alkalmazása mellett mértük a TAMRA-EGF ErbB1-hez való kötődését (kompetitív módszer). A mintákban meghatároztuk a sejtek átlagos fluoreszcenciaintenzitását és ezeket ábrázoltuk az alkalmazott (nem-kompetitív esetben a jelölt, kompetitív mérések esetén a jelöletlen) EGF koncentrációjának függvényében. A kapott adatokra a megfelelő Hill-egyenlet szerint kötődési görbéket illesztettünk és meghatároztuk az EGF receptor iránti affinitását jellemző paramétereket.

3.4. A dipólpotenciál ErbB fehérjék asszociációjára gyakorolt hatásának mérése

A dipólpotenciál ErbB fehérjék asszociációira gyakorolt hatásainak vizsgálata céljából előbb áramlási citometria segítségével határoztuk meg a receptorok közötti dimerizáció mértékét fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérések során. A kísérletekben transzfektálatlan SKBR-3 sejteket alkalmaztunk az ErbB2 homoasszociáció és az ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció, transzfektálatlan HeLa sejteket az ErbB1 homoasszociáció mérésére, illetve CHO sejteket transzfektáltunk elektroporációs módszerrel vad típusú fehérjét tartalmazó ErbB2-pcDNA3 vagy NeuT fehérjét kódoló pSV2neuNT plazmiddal a transzmembrán doménben Val→Glu mutációt tartalmazó ErbB2 variáns homoasszociációjának meghatározására és a két variáns összehasonlítására. Éheztetés, dipólpotenciált módosító kezelés és EGF-fel történő stimuláció után AlexaFluor546-tel (donor) vagy AlexaFluor647-tel (akceptor) konjugált ErbB1 ellenes Ab11 és/vagy ErbB2 ellenes trastuzumab antitestekkel jelöltük a sejteket jégen 30 percig, majd meghatároztuk a sejtenkénti donor, FRET és akceptor csatornáknak megfelelő fluoreszcenciaintenzitásokat. Végül az értékek megfelelő korrekciója után kiszámítottuk az asszociációk fokát jellemző átlagos FRET hatékonyságokat.

A FRET mérések alternatívjaként a receptorok közötti asszociációk mértékét konfokális mikroszkópos felvételek number&brightness (N&B) analízise segítségével is meghatároztuk. Az EGFR molekulák közötti homoasszociáció elemzéséhez az ErbB1-eGFP fúziós fehérjét stabilan expresszáló F1-4 sejtvonalat használtuk, míg az ErbB2 és Neu vizsgálata során HeLa sejteket transzfektáltunk PCDNA3.1 ErbB2-short-mYFP, illetve PCDNA3.1 ErbB2 (Val659Glu)-short-mYFP plazmiddal. A sejtek 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában történő növesztését követően

éheztetés, a minták egy részének dipólpotenciált módosító kezelése és EGF stimulációja után konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó régiójáról, majd meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitás pixelenkénti átlagát és varianciáját, majd azokból az asszociáció mértékével arányos átlagos molekuláris fényesség értékeket.

3.5. A dipólpotenciál változtatás funkcionális hatásának mérése és lipidtutajok jelenlétével való összefüggésének meghatározása

Éheztetést követően SKBR-3 sejtek egy részének dipólpotenciáljának módosítása, EGF-fel történő stimulációja, fixálása és permeabilizálása után a receptorok foszforilációjának mérése során PY99 antitesttel jelöltük a foszforilált tirozin oldalláncokat, Ab18 antitesttel az ErbB2 1248-as pozícióban, míg 1H12 antitesttel az ErbB1 1068-as pozícióban foszforilált tirozinjait 10 µg/ml-es koncentrációt alkalmazva jégen 30 percig, amelyet 20 µg/ml-es AlexaFluor647-GAMIG jelenlétében történő inkubáció követett jégen 30 percig. Ezután az egyedi sejtek átlagos fluoreszcenciaintenzitásait határoztuk meg áramlási citométeren. Méréseinket megismételtük ErbB2-pcDNA3, illetve pSV2neuNT plazmiddal elektroporált sejteken is.

Az ErbB2 foszforiláció és a lipidtutajok jelenléte közötti összefüggés vizsgálatára éheztetett, 8-lyukú kamrában növesztett SKBR-3 sejtek egy részének dipólpotenciáljának módosítása és EGF-fel történő stimulációja után kombinált AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-CTX-B jelölést alkalmaztunk. A sejteket fixáltuk, permeabilizáltuk és foszforilált ErbB2-ellenes Ab18 antitesttel jelöltük, amelyet AlexaFluor488-GAMIG alkalmazásával vizualizáltunk. A sejtek fedőlemezhez tapadó régiójáról konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk, amelyek kiértékelése során a membránt manuálisan azonosítottuk, majd két maszkba szegmentáltuk, amelyek a magas, illetve alacsony CTX-B intenzitású pixeleket tartalmazták („CTX magas” és „CTX alacsony” régiók). A foszforilált ErbB2 mennyiséget jelző Ab18 intenzitást pixelenként normáltuk az ErbB2 sejtfelszíni expresszióját jelző trastuzumab jelölődésre, majd külön-külön meghatároztuk az átlagos normált intenzitást a raft doméneknek megfelelő „CTX magas” és a non-raft régióknak megfelelő „CTX alacsony” membrán területeken. Emellett kiszámítottuk az Ab18 és CTX-B intenzitás, valamint a trastuzumab és CTX-B jelölődés közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens nagyságát.

3.6. A dipólpotenciál mértéke és a membránmikrodomén-markerek intenzitása közötti korrelációs koefficiens meghatározása

A dipólpotenciál mértéke és a membránmikrodomén-markerek intenzitása közötti korreláció meghatározásához 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában tenyésztett SKBR-3 és A431 sejteket jelöltünk dipólpotenciál-szenzitív fluorofórral (di-8-ANEPPS, F66 vagy PPZ8), valamint lipidtutaj (GFP-GPI, AlexaFluor647-CTX-B vagy AC18 és AlexaFluor647-GAMIG-Fab) vagy non-raft membrán régiókhöz asszociálódó jelölővel (AlexaFluor647-transzferrin), a korábban leírtak szerint. A jelölés után a sejtek fedőlemezhez tapadó régiójáról lézer pásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk. A képek elemzése során manuálisan azonosítottuk a membránnak megfelelő régiókat, majd ezekben pixelenként meghatároztuk a dipólpotenciál-szenzitív intenzitásarányokat. Végül ezen intenzitás arányok és raft vagy non-raft marker intenzitások közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens nagyságát határoztuk meg. A korrelációs koefficiensnek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható konfidencia intervallumát Costes módszere alapján számítottuk ki minden kép esetén. Pozitív kontrollként két lipidtutaj-marker, a GFP-GPI és a CTX-B közötti korrelációs koefficiens határoztuk meg. A módszer alternatívájaként a kiértékelést elvégeztük úgy is, hogy az azonosított membránból az elemzés során kihagytuk a legmagasabb intenzitású pixeleket tartalmazó „fényes foltokat”.

3.7. A dipólpotenciál nagyságának meghatározása raft és non-raft membrán régiókban

Az SKBR-3 és A431 sejtekről elkészített felvételek elemzése során a fentiek mellett meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságát a raft és non-raft mikrodoménekben. Ehhez a kiértékelés során a sejteket manuálisan azonosítottuk, majd két maszkba szegmentáltuk oly módon, hogy a lipidraft-marker (CTX-B vagy GFP-GPI) egy küszöbintenzitását határoztuk meg, vizuális ellenőrzés mellett. A pixeleket „raft” pixelekként azonosítottuk, ha az intenzitás a küszöbintenzitás felett volt, míg alacsonyabb intenzitás esetén „non-raft” régiónak tekintettük őket. Végül az átlagos di-8-ANEPPS excitációs és F66 emissziós arányt számítottuk ki az egyedi pixelek adataiból külön a „raft”, illetve „non-raft” régiókban. Emellett a konfokális mikroszkóp lambda módjának használatával meghatároztuk az F66 és a PPZ8 emissziós spektrumát külön-külön a tutajokon belül és azokon kívül úgy, hogy a különböző régiókat a korábban leírt módszerrel azonosítottuk.

3.8. A dipólpotenciál nagyságának meghatározása kontroll és Gaucher-fenotípusú THP1-eredetű makrofágokban

A mérések során THP-1 monocitákat differenciáltattunk makrofággá PMA kezelés segítségével. A Gaucher-fenotípus indukciójához a differenciációval párhuzamosan a sejtek egy részében CBE kezelést alkalmaztunk. A kitapadó sejteket a korábban leírtaknak megfelelően di-8-ANEPPS, F66 vagy PPZ8 fluorofórral jelöltük, majd a sejtek középsíkjáról készítettünk felvételeket. A kiértékelés során azonosítottuk a membránpixelet, majd a háttérintenzitások levonása után ezekben meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságát jellemző átlagos intenzitásarányokat a korábbiak szerint.

4. Eredmények

4.1. A 6-ketocholestanol növeli, míg a phloretin csökkenti a dipólpotenciál nagyságát

A dipólpotenciál nagysága befolyásolja számos transzmembrán fehérje szerkezetét és funkcióját, ugyanakkor az ErbB receptorcsalád tagjait még nem elemezték ilyen szempontból. Kísérleteink első fázisa során ezért megvizsgáltuk, hogy a dipólpotenciál változásai befolyásolják-e az ErbB fehérjék (azon belül is az EGFR és az ErbB2) működését. Ehhez azonban az élő sejtek membránjának dipólpotenciálját módosítanunk kellett, amelyre alkalmasnak tűnt a 6-ketocholestanol és a phloretin, hiszen irodalmi adatok alapján előbbi növeli, míg utóbbi csökkenti a dipólpotenciál nagyságát. Munkánk elején ezek alkalmazhatóságát teszteltük konfokális mikroszkópos módszerrel. A dipólpotenciál méréséhez a di-8-ANEPPS fluorofórt használtuk egy excitációs rációmetrikus módszer segítségével. SKBR-3, A431 és HeLa sejteket jelöltünk di-8-ANEPPS-sel a dipólpotenciált módosító kezelés után, majd konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtek középsíkjának megfelelően. A képelemzés során a membrán pixelekből meghatároztuk a kétféle gerjesztés esetén mért fluoreszcenciaintenzitások átlagos arányát. Várakozásainknak megfelelően a 6-ketocholestanol szignifikánsan növelte, phloretin pedig szignifikánsan csökkentette az excitációs intenzitás arányt, azaz a sejtmembrán dipólpotenciáljának mértékét minden vizsgált sejtvonal esetén, vagyis ezen vegyületek alkalmazhatónak bizonyultak vizsgálataink során.

4.2. A dipólpotenciál növelése csökkenti az EGFR ligand iránti affinitását a sejt felszíni expresszió változtatása nélkül

Mivel az EGFR funkcionális aktivációjának első lépése a ligand bekötődése, megvizsgáltuk, hogy a dipólpotenciál változtatása befolyásolja-e az ErbB1 ligandkötési tulajdonságait. Ehhez SKBR-3, A431 és HeLa sejteken változtattuk a dipólpotenciál mértékét, majd nem-kompetitív mérések során TAMRA-EGF törzsoldatából készített hígítási sor tagjaival történő jelölés után áramlási citométeren mértük azok átlagos fluoreszcenciaintenzitásait. Végül az adatpontokra illesztett Hill-egyenlet analízisével meghatároztuk a disszociációs állandó nagyságát. Azt találtuk, hogy a dipólpotenciál növelése szignifikánsan csökkentette az EGF ErbB1 iránti affinitását.

Mivel egy fluoreszcens festék inkorporációja esetlegesen megváltoztathatja az EGF dipólpotenciállal való kölcsönhatását, kompetitív kötődési kísérleteket végeztünk annak a kizárására, hogy a magas dipólpotenciál mellett megfigyelhető gátolt EGF kötődést a fluorofór jelenléte okozza. Méréseinket a non-kompetitív módszernél alkalmazott módon hajtottuk végre, annyi különbséggel, hogy jelöletlen EGF-ből készített hígítási sorral inkubáltuk a sejteket

állandó koncentrációjú fluoreszcens EGF jelenlétében. Adataink elemzése során korábbi eredményeinkkel összhangban azt találtuk, hogy a jelöletlen EGF receptor iránti affinitását a magas dipólpotenciál hasonló mértékben csökkentette, mint a fluoreszcens EGF esetén.

Mivel későbbi kísérleteink során a dipólpotenciál receptorokra gyakorolt hatásait liganddal történő stimuláció mellett kívántuk vizsgálni, teszteltük a fluoreszcens EGF kötődését a későbbiekben használt kísérletes körülmények között is. A sejtek dipólpotenciáljának módosítása és 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott TAMRA-EGF-fel történő inkubáció után áramlási citométerrel meghatároztuk a mintára jellemző átlagos fluoreszcenciaintenzitást. A hatások hőmérséklettől való függésének vizsgálatára kísérleteinket elvégeztük mind 37°C-on, mind pedig jégen történő inkubáció esetén. Eredményeink alapján a dipólpotenciál növelése a fluoreszcens EGF kötődését kb. 50%-kal csökkentette függetlenül az alkalmazott hőmérséklettől. A tapasztalt változások jó egyezést mutattak a korábbi kötődési görbék alapján várt értékekkel.

Mivel az EGF csökkent receptorhoz való kötődésének hátterében elvileg a sejt felszíni ErbB1 expresszió csökkenése is állhat, meghatároztuk a receptor sejt felszíni mennyiségét phloretin, illetve 6 ketocholestanol alkalmazása esetén. A dipólpotenciál változtatása után a sejteket AlexaFluor546-tal konjugált ErbB1 ellenes Ab11 monoklonális antitesttel jelöltük, majd áramlási citométerrel meghatároztuk a mintákon belül az átlagos fluoreszcenciaintenzitás mértékét. Jóllehet a dipólpotenciál módosítása jelentősen megváltoztatta az EGF receptor iránti affinitását, eredményeink alapján az Ab11 intenzitása nem mutatott érdemi különbséget, így mindez az ErbB1 receptor változatlan sejt felszíni expressziója mellett történt.

4.3. A dipólpotenciál növeléses serkenti az ErbB1 és az ErbB2 klaszterizációját

Mivel a ligand indukált transzmembrán jelátvitel beindulását megelőzi az ErbB receptorok klaszterizációja, kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a dipólpotenciál megváltoztatása befolyásolja-e a receptorok oligomerizációját éhezett vagy stimulált sejtekben. Erre a célra kétféle módszert alkalmaztunk, az asszociációk mértékét meghatároztuk ugyanis egyrészt áramlási citometriás FRET módszerrel, másrészt konfokális mikroszkópia segítségével végzett number&brightness (N&B) analízissel.

Mind a FRET, mind pedig a N&B méréseink eredményei azt mutatták, hogy stimulálatlan sejtekben a dipólpotenciál módosítása csak kis változásokat eredményezett az ErbB1 és ErbB2 homoasszociációkban. Az ErbB1 stimulálatlan sejtekben elsősorban monomer formában fordult elő, mivel az ErbB1-EGFP számított molekuláris fényessége (0,07) a monomer EGFP esetén meghatározott érték (0,06) közelében volt. Ezzel szemben az ErbB2 nyugalomban

levő sejtekben is klasztereket képezett, hiszen az ErbB2-mYFP számított molekuláris fényessége majdnem háromszor akkora adódott (0,08), mint a monomer mYFP esetén várható érték (0,032). A TMD-ben mutációt hordozó NeuT homoklaszterizációja szingifikánsan megnövekedett a dipólpotenciál növelésének hatására már nyugalomban levő sejtekben is mind a FRET, mind pedig a N&B mérések során. Jóllehet a dipólpotenciál növelésének hatására a vad típusú ErbB2 homoklaszterizációja is megnövekedett a FRET mérések alapján, ez a növekedés szignifikánsan kisebb volt, mint a NeuT esetén (vad típusú ErbB2 esetén 15%, míg NeuT esetén 52%).

A nyugalomban levő sejtekben megfigyeltekkel szemben a megnövelt dipólpotenciál szignifikánsan és szisztematikusan serkentette az ErbB1 és ErbB2 EGF által indukált homoasszociációit mind a FRET, mind a N&B mérések alapján. Jóllehet a dipólpotenciál csökkentésének hatása kevésbé bizonyult jelentősnek, az ErbB2 EGF indukált homoklaszterizációja szignifikánsan csökkent phloretin hatására.

A dipólpotenciál növelésének a NeuT EGF indukált homoklaszterizációjára kifejtett hatása mintegy kétszerese volt, mint vad típusú ErbB2 esetén a FRET és N&B mérések során. Az EGF stimulált mintákban ugyanis a 6-ketocholestanol kezelés a FRET hatékonyságot 40%-kal növelte NeuT, míg 19%-kal vad típusú ErbB2 esetén, illetve a molekuláris fényesség értékeket pedig rendre 33%-kal, valamint 13%-kal a kétféle esetben.

Mivel az ErbB2 az EGF által aktivált ErbB1 preferált heterodimerizációs partnere, a dipólpotenciál ErbB1 és ErbB2 klaszterekre gyakorolt hatásának elemzése nem lett volna teljes a közöttük létrejövő heteroasszociáció vizsgálata nélkül. FRET méréseink alapján a dipólpotenciál nem befolyásolta az ErbB1 és ErbB2 heteroklaszterizációját nyugalomban levő sejteken, a két receptor kölcsönhatásának EGF indukált növekedése azonban szingifikánsan nagyobb volt a dipólpotenciál növelése esetén. Mindezen eredményeink alapján leszűrhető, hogy az ErbB1 és ErbB2 homo- és heteroasszociációinak mértéke pozitív korrelációt mutat a dipólpotenciállal, elsősorban liganddal történő stimuláció esetén.

4.4. A dipólpotenciál változtatása befolyásolja az EGF-indukált jelátvitelt

Az ErbB receptorok klaszterizációja tirozin oldalláncaik foszforilációjához és a szignál terjedéséhez vezet. A dipólpotenciál változtatására a klaszterizációban bekövetkező eltérések funkcionális jelentőségének tesztelésére meghatároztuk a tirozin foszforiláció szintjét általános foszfortirozin ellenes (PY99), az ErbB1 foszforilált Tyr1068-ja (1H12) és az ErbB2 foszforilált Tyr1248-ja (Ab18) elleni antitestek segítségével. Ehhez a dipólpotenciál változtatása és a nem kontroll minták EGF stimulációja után SKBR-3 sejteket jelöltünk a fenti elsődleges

antitestekkel, amelyeket Alexa647-GAMIG másodlagos antitesttel vizualizáltunk és áramlási citométeren meghatároztuk az átlagos sejtenkénti fluoreszcencia intenzitásokat. Méréseinket megismételtük plazmid nélkül, vad típusú fehérjét tartalmazó ErbB2-pcDNA3 plazmiddal, illetve NeuT fehérjét kódoló pSV2neuNT plazmiddal transzfektált HeLa sejteken is.

Vizsgálataink alapján a dipólpotenciál változtatása nem befolyásolta a stimulálatlan sejtek alacsony tirozin foszforilációs alap szintjeit, míg az EGF stimulációra adott válasz mértéke korrelált a dipólpotenciál nagyságával. A FRET és N&B mérések során tapasztaltakkal összhangban a dipólpotenciál NeuT fehérjékre gyakorolt hatása sokkal kifejezettebb volt, mint vad típusú ErbB2 esetén. Kísérleteink bizonyították, hogy a dipólpotenciál szignifikánsan módosította a sejtek növekedési faktor stimulációra adott tirozin foszforilációs válaszát.

4.5. Az ErbB2 aktivációja, lipidtutajokban való lokalizációja és a dipólpotenciál mértéke között korreláció figyelhető meg

A dipólpotenciál nagysága különböző lehet a lipidtutajokban a membrán egyéb régióihoz képest, így korreláció várható az ErbB2 aktivációs állapota, raft lokalizációja és a dipólpotenciál között. Ennek vizsgálatára éheztetett sejtek egy részének dipólpotenciálját növeltük, amelyet a minták egy részénél EGF stimuláció követett. A sejtek membránjában az ErbB2 fehérjét AlexaFluor546-trastuzumabbal, a lipidtutajokat AlexaFluor647-CTX-B-vel jelöltük, majd fixálás után foszforilált ErbB2 ellenes Ab18 elsődleges és AlexaFluor488-GAMIG másodlagos antitesteket alkalmaztunk. A sejtek fedőlemezhez tapadó régiójáról konfokális felvételeket készítettünk, a képeken a membránt manuálisan azonosítottuk és két maszkba szegmentáltuk, amelyek a magas, illetve alacsony CTX-B intenzitású pixeleket tartalmazták („CTX magas” és „CTX alacsony” régiók). A foszforilált ErbB2 mennyiséget jelző Ab18 intenzitást pixelenként normalizáltuk az ErbB2 expresszióját jelző trastuzumab jelölődésre, majd külön-külön meghatároztuk az átlagos normalizált intenzitást a raft doméneknek megfelelő „CTX magas” és a non-raft régióknak megfelelő „CTX alacsony” membrán területeken. Emellett kiszámítottuk az Ab18 intenzitás és CTX-B jelölődés, valamint a trastuzumab intenzitás és CTX-B jelölődés közötti Pearson-féle korrelációs koefficiensek nagyságát.

A kontroll sejtekben nem találtunk lényeges különbséget az ErbB2 normált tirozinfoszforilációjának mértékében a membrán különböző régiói között. A dipólpotenciál növelése az ErbB2 aktivációs szintjének emelkedését eredményezte, amely hatás jelentősebb mértékben a lipidtutajokon kívül volt megfigyelhető. A 6-ketocholestanollal nem kezelt sejtekben az EGF stimuláció a foszforiláció növekedését eredményezte mindkét membránrégióban, a változás viszont nagyobb volt a non-raft régiókban. Az EGF stimuláció a

megnövelt dipólpotenciállal rendelkező sejtekben nem emelte tovább lényegesen az ErbB2 normált tirozin foszforilációját.

Eredményeink alapján a dipólpotenciál nagyságának a 6-ketocholestanol kezelés eredményeképpen létrejövő növekedése az ErbB2 tirozin foszforilációját jelentősebb mértékben befolyásolta a lipidtutajokon kívül. Az EGF stimuláció szintén jobban növelte az ErbB2 tirozin foszforilációt raftokon kívül. Ez arra utalhatott, hogy a ligand preferenciálisan a lipidtutajokon kívül elhelyezkedő ErbB2 molekulákat aktiválja, vagy az aktivált ErbB2 kikerül a raftokból. Ezt alátámasztotta, hogy a foszforilált ErbB2 és a CTX jel közötti korrelációs koefficiens nagysága szignifikánsan lecsökkent EGF vagy 6-ketocholestanol kezelés hatására, míg ezeknek az ErbB2 és a CTX jel közötti korrelációra kifejtett hatása sokkal kevésbé volt jelentős. Ezek alapján az EGF vagy a megnövekedett dipólpotenciál által aktivált ErbB2 preferenciálisan a lipidtutajokon kívül található vagy azért, mert az aktiváció itt történik, vagy azért, mert a lipidtutajban aktiválódó receptor elhagyja a raftokat.

4.6. Emissziós rációmetrikus festékek alkalmazhatók a dipólpotenciál mérésére

A dipólpotenciál ErbB fehérjékre gyakorolt hatásainak vizsgálata során felvetődött, hogy bennük szerepet játszhat a lipidtutajok jelenléte. Bár azt már korábban felvetették, hogy a membránban található raftokban a speciális lipidösszetétel miatt a dipólpotenciál nagysága magasabb lehet, mint a membrán egyéb régióiban, ezt még nem igazolták közvetlenül élő sejtekben. Kísérleteink második felében ezért élő sejtek membránjában is bizonyítani kívántuk, hogy a lipidtutajokban mérhető dipólpotenciál magasabb, mint non-raft régiókban. Ehhez azonban olyan megbízható mérési módszerre volt szükségünk, amellyel egyrészt kimutatható a dipólpotenciál nagyságában a két régió közötti különbség, másrészt pedig igazolható, hogy azt nem valamilyen egyéb membránbiofizikai paraméter (például membránfluiditás) eltérései okozzák. Di-8-ANEPPS használatával végzett excitációs rációmetrikus méréseinket ezért egyéb módszerrel egészítettük ki. Erre a célra alkalmasnak tűntek a PPZ8 és az F66 elnevezésű 3-hidroxi-flavon származékok emissziós rációmetrikus módszerek során, különösen akkor, ha a két molekulát egymással párhuzamosan alkalmazzuk. Membránbeli orientációjuk ellentétes volta miatt ugyanis spektrális változásaik éppen ellentétesek a membránbeli elektromos erőtér módosulása esetén. Ha azonban valamilyen egyéb paraméter (például fluiditás) változása eredményezné a spektrum eltéréseit, az ugyanabba az irányba hatna a két fluorofór esetén. Kísérletes munkánk második fázisa kezdetén ezért teszteltük, hogy a PPZ8 és az F66 alkalmas-e a dipólpotenciál változásainak kimutatására élő sejtek membránjában. Ehhez A431 és SKBR-3 sejtek dipólpotenciálját növeltük, majd jelölés után a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó lapos

régiójáról konfokális felvételeket készítettünk. Az emittált fluoreszcencia nagyságát a festékek N^* és T^* állapotaihoz tartozó sávoknak megfelelő hullámhossztartományokban mértük és pixelenként meghatároztuk a két intenzitás arányát, amely a dipólpotenciál nagyságára utal.

Várakozásainknak megfelelően a 6-ketocholestanol PPZ8 esetén szignifikánsan növelte, míg F66-nál szignifikánsan csökkentette az N^*/T^* intenzitásarányt. Mind az emissziós arány pixelenkénti megoszlásai, mind pedig az átlagos intenzitás arányok megerősítették, hogy a PPZ8 és az F66 alkalmas élő sejtekben a dipólpotenciálban bekövetkező változások meghatározására egy konfokális mikroszkópon alkalmazott emissziós rációmetrikus módszer segítségével.

4.7. A dipólpotenciál nagysága korrelál raft és non-raft doménmarkerek megoszlásával

A következőkben vizsgálni kívántuk, hogy a lipidtutajok jelentősen eltérő összetétele miatt ezen mikrodoménekben a dipólpotenciál mértéke nagyobb-e, mint a membrán egyéb régióiban. Ehhez élő A431 és SKBR-3 sejtekben a három dipólpotenciál-szenzitív festék, a di-8-ANEPPS, a PPZ8 és az F66 rációmetrikus válasza és néhány általánosan használt lipidtutaj-marker, a fluoreszcensen jelzett koleratoxin B alegység (CTX-B), a GPI-horgonnyal fuzionált GFP (GFP-GPI) és az anti-koleszterin AC8 antitest intenzitása közötti korrelációs koefficiensek nagyságát számítottuk ki. A mérések során használt PPZ8 és di-8-ANEPPS kromofór csoportjai egymással párhuzamosak a membránban, míg az F66 fluorofórjának beállása ellentétes orientációban történik a membrán normálvektorához képest.

Kísérleteink során először két lipidtutaj-marker közötti korrelációs koefficiens nagyságát határoztuk meg pozitív kontrollként. Sejteket transzfektáltunk GFP-GPI-t kódoló plazmiddal, majd jelöltünk CTX-B-vel és a sejtek fedőlemezhez tapadó membrán régiójáról konfokális felvételeket készítettünk. A két lipidtutaj-marker pixelenkénti intenzitásainak adataiból kiszámítottuk a Pearson-féle korrelációs koefficiensek átlagos nagyságát, amely 0,55-nek adódott A431, míg 0,48-nak SKBR-3 sejtek esetén. Az erős pozitív korrelációt alátámasztotta, hogy a kapott korrelációs koefficiensek jelentősen kívül estek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható konfidenciaintervallum határain. Ezen eredmények bebizonyították, hogy az általunk alkalmazott módszer alkalmas két szignál közötti korreláció vizsgálatára élő sejtekben.

Ezután a dipólpotenciál és a lipidraft-markerek intenzitása közötti kapcsolatot határoztuk meg. A sejteket a három dipólpotenciál-szenzitív fluorofór egyikével jelöltük és pixelenként meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságával arányos intenzitásarányokat és kiszámítottuk azok korrelációját az alkalmazott lipidtutaj-marker (CTX-B, GFP-GPI vagy anti-koleszterin AC8 monoklonális antitest) intenzitásával. A di-8-ANEPPS esetén kapott excitációs arány pozitív korrelációt mutatott mindegyik alkalmazott lipidraft-markerrel. Ezzel szemben az F66 esetén

mért N*/T* emissziós arány negatívan korrelált az alkalmazott tutaj jelölővel. Eredményeink statisztikai szignifikanciáját bizonyította, hogy a számított korrelációs koefficiensek jelentősen kívül estek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható konfidenciaintervallumok határain. Az eredmények biológiai szignifikanciáját pedig az támasztotta alá, hogy a dipólpotenciál és a lipidtutaj-markerek közti korrelációs koefficiensek nagyságrendje hasonló volt, mint a pozitív kontroll esetén. Egy másik dipólpotenciál mérésre alkalmas fluorofór, a PPZ8 intenzitás aránya és a CTX-B tutaj jelölő közötti kapcsolat vizsgálata során negatív korrelációt találtunk. Mivel F66 esetén a kromofór ellentétes orientációban található a membrán normálvektorához képest, mint a di-8-ANEPPS és a PPZ8 esetén, a dipólpotenciál nagyságának a di-8-ANEPPS és a PPZ8 intenzitás arányával pozitív, míg az F66 emissziós arányával negatív korrelációt kellene mutatnia. Ebből következik, hogy a két ellentétes orientációjú dipólpotenciál-szenzitív fluorofór, a di-8-ANEPPS és az F66 használatával kapott eredményeink alapján a dipólpotenciál nagysága pozitívan korrelált a raft mikrodomének jelenlétével, míg a PPZ8 segítségével nyert eredmények ellentmondtak ezen konklúciónak. Ennek magyarázatát a későbbiekben adjuk meg.

Eredményeink független megerősítése céljából megvizsgáltuk a dipólpotenciál és a non-raft marker transzferrin receptor közötti kapcsolatot is. Korábbi méréseink megerősítéseként azt találtuk, hogy a di-8-ANEPPS excitációs arány szignifikánsan negatívan korrelált a fluoreszcensen jelölt transzferrin megoszlásával mind A431, mind SKBR-3 sejtekben, arra utalva, hogy a dipólpotenciál alacsonyabb a non-raft membránrégiókban, mint a tutajokban.

4.8. A dipólpotenciál magasabb a lipidtutajokban, mint az egyéb membránrégiókban

Bár az eddig ismertett eredmények meggyőzően alátámasztották, hogy a dipólpotenciál pozitívan korrelál a lipidraftok lokalizációjával, azt nem mutatták meg, hogy milyen mértékben különbözik a dipólpotenciál nagysága a tutajokban a membrán egyéb régióihoz képest. Ezt a különbséget egy másik módszerrel kvantifikáltuk. A korábbiakhoz hasonlóan A431 és SKBR-3 sejteket transzfektáltunk GFP-GPI-vel vagy jelöltünk CTX-B-vel, illetve di-8-ANEPPS vagy F66 dipólpotenciál-szenzitív festékekkel. A sejtek alsó régiójáról készült konfokális felvételeinket raft és non-raft régiókra szegmentáltuk a GFP-GPI, illetve CTX-B intenzitások alapján. Az átlagos di-8-ANEPPS, illetve F66 intenzitásarányt meghatároztuk külön a tutajokban („GFP-GPI magas”, illetve „CTX-B magas” régiók), valamint a non-raft mikrodoménekben („GFP-GPI alacsony”, illetve „CTX-B alacsony” területek), majd minden sejt esetén a raftokban kapott értékeket normáltuk a non-raft régiókban nyert értékekre.

Összhangban a fentiekkel, a di-8-ANEPPS excitációs arány szignifikánsan magasabb volt a tutajokban a non-raft régiókhoz képest mindkét sejttypusban, míg az F66 emissziós arány

esetén ellentétes különbség volt megfigyelhető, az arány ugyanis szignifikánsan alacsonyabb volt a raftokban. A két festék egymáshoz képest ellentétes membránbeli orientációját figyelembe véve ez azt jelentette, hogy a dipólpotenciál nagysága magasabb a tutajokban, mint a membrán non-raft régióiban. Mindezek megerősítették hipotézisünket, hogy a dipólpotenciál nagysága magasabb a lipidtutaj mikrodoménekben, mint az élő sejtek membránjának egyéb területein.

4.9. A 3-hidroxi flavon festékek emissziós spektruma különbözik a lipidtutajokban és az egyéb membránrégiókban

Kísérleteink folytatásaképpen meghatároztuk a 3-hidroxi flavon festékek emissziós spektrumait a raftokon belül és kívül. A sejteket a korábbiakhoz hasonlóan jelöltük, felvételeket készítettünk és a membránnak megfelelő területeken meghatároztuk az emissziós spektrumot minden egyes egyedi pixelben, majd azokat külön átlagoltuk a raft és a non-raft régióknak megfelelően. A spektrumok között a legnyilvánvalóbb különbség a non-raft területeken megfigyelhető szignifikánsan alacsonyabb intenzitás volt a tutaj pixelekhez képest, valószínűleg a fluoreszcencia víz által indukált kioltásának következtében. Emellett fontos különbségnek bizonyult, hogy az F66 emissziójához jelentősen hozzájárult mind az N* állapotnak megfelelő 460 és 520 nm közötti, mind pedig a T*-nak megfelelő 550 és 600 nm közötti emissziós sáv, a PPZ8 esetén azonban az N*-nak megfelelő tartományban gyakorlatilag nem volt megfigyelhető emissziós csúcs. Ez magyarázhatja, hogy miért nem volt képes a PPZ8 megbízhatóan kimutatni a dipólpotenciál különbségét a tutajokon belül, illetve kívül.

A továbbiakban az N* és T* állapotokhoz tartozó hullámhosszokon a spektrumok integrálásával meghatároztuk az F66 emissziós arányt a raftokon belül, illetve kívül 6-ketocholestanol kezelés mellett, valamint anélkül. Az eredmények alapján a vegyület az F66 emissziós arányt, vagyis a dipólpotenciált hasonló mértékben növelte mindkét mikrodoménben.

4.10. A dipólpotenciál nagysága emelkedik a Gaucher-kórra karakterisztikus szfingolipid akkumuláció hatására

Mivel a dipólpotenciál nagysága elsősorban a membránt alkotó lipidek összetételének a függvénye, azok a betegségek, amelyek a sejtmembrán összetételének megváltozásával járnak, módosíthatják a dipólpotenciál mértékét is. A Gaucher-kór vizsgálata során kimutatták, hogy a betegség a sejtmembrán általános lipidösszetételének jelentős megváltozásával jár, különös tekintettel a lipidtutajokra, így kísérleteink során tanulmányoztuk, hogy ezek a változások elegendőek-e ahhoz, hogy a dipólpotenciál nagyságát módosíthassák a Gaucher-kór egy in vitro modelljében. Ehhez kontroll és Gaucher-fenotípusú THP-1 eredetű makrofágokat jelöltünk di-

8-ANEPPS, PPZ8 vagy F66 dipólpotenciál-szenzitív fluorofórral, majd konfokális mikroszkópos felvételeket készítettünk és a képelemzés során a dipólpotenciálra jellemző átlagos fluoreszcencia intenzitásarányokat meghatároztuk az azonosított membrán pixelek adataiból. A Gaucher-fenotípus kialakulását indukáló CBE kezelés hatására a di-8-ANEPPS gerjesztési és a PPZ8 emissziós arányok szignifikáns mértékben növekedtek, míg az F66 emissziós arány szignifikánsan csökkent. Mindhárom dipólpotenciál-szenzitív fluorofórral kapott eredményünk arra utalt, hogy a Gaucher-kórra jellemző szfingolipid-felhalmozódás szignifikáns mértékben növelte a sejtmembrán dipólpotenciáljának nagyságát. Megfigyeléseink szerint patológiás állapotokban a lipid összetételben bekövetkező eltérések megváltoztathatják a dipólpotenciál nagyságát az élő sejtek membránjában, amely akár ezen betegségek patomechanizmusában is szerepet játszhat.

5. Megbeszélés

5.1. A dipólpotenciál és az ErbB fehérjék kapcsolata

Jóllehet a három ismert membránpotenciál közül a dipólpotenciál hozza létre a legnagyobb mértékű elektromos erőteret, ez a legkevésbé ismert a három közül. Bár különféle transzmembrán fehérjék esetén kimutatták, hogy nagysága befolyásolja azok szerkezetét és funkcióját a TMD-jeik stabilitásának és konformációs változásainak befolyásolásán keresztül, receptor tirozin kinázok működésére gyakorolt hatásait ezidáig nem vizsgálták. Ugyanakkor mivel felmerült a TMD ErbB fehérjék funkciójában játszott szerepe, logikus a feltételezés, mely szerint a dipólpotenciál a TMD-n keresztül befolyásolhatja az ErbB-k működését.

Kísérleteink első részében ezért a dipólpotenciál ErbB fehérjék funkcióira gyakorolt hatásait vizsgáltuk és áramlási citometriás FRET mérések és konfokális mikroszkópos N&B analízis segítségével kimutattuk, hogy a dipólpotenciál nagysága szignifikánsan korrelál az ErbB1 és ErbB2 (homo- és hetero)klaszterizációjának mértékével. A hatás szisztematikusan megjelent EGF stimuláció esetén, míg anélkül a dipólpotenciál változtatása nem fejtett ki lényeges hatást. Az ErbB-k dipólpotenciál-emelkedés hatására bekövetkező megnövekedett ligandindukált asszociációja jelátviteli aktivációval társult a receptorok foszforiláltságának mérése során. A dipólpotenciál emelkedése esetén megfigyelt nagyobb mértékű foszforiláció azonban csökkent ligandkötéssel társult. Ha ezt is figyelembe vesszük, az EGF hatás dipólpotenciál általi felerősítése még nagyobbak adódik. Ez a látszólagos ellentmondás feloldható, ha feltételezzük, hogy a magasabb dipólpotenciál kedvező a TMD dimerek aktív konformációjának kialakulása szempontjából, amely a többi domén konformációjának változását indukálhatja. Ez hasonlíthat arra a folyamatra, amelyet a növekedési faktor kötődése indít el (vagy akár meg is egyezhet vele).

A lipídutajok fontosak az EGF által mediált jelátvitelben, hiszen mind az ErbB1, mind pedig az ErbB2 a utajokban található. A raftok kettős szerepet játszhatnak a receptorok klaszterizációjában és jelátvitelében. Egyrészt gátolják a ligand kötődését, másrészt viszont potenciózzák a kiváltott jelátvitelt. Eredményeink alapján a dipólpotenciál hatásai pontosan tükrözik ezeket. A dipólpotenciál növelése az ErbB2 aktivációjára nagyobb hatást gyakorolt a utajokon kívül, míg a dipólpotenciál változás mértéke megegyezett a különböző régiókban. Ennek oka lehet, hogy a utajokban kezelés nélkül is olyan magas a dipólpotenciál, hogy a TMD-eket permisszív, a dimerizációt elősegítő konformációban tartja, így itt a további növekménynek kisebb a hatása. A utajokon kívüli alacsony dipólpotenciál azonban nem elég a TMD-k dimerizációt elősegítő konformációjának stabilizálásához, így itt a dipólpotenciál növelése jelentős hatást fejt ki a dimerizációra és az aktivációra.

Annak a jelenségnek a magyarázatára, hogy a dipólpotenciál csak a ligandindukált klasztereket befolyásolta jelentős mértékben anélkül, hogy a konstitutív dimerekre érdemi hatást fejtett volna ki, hat lehetséges modellt alkottunk.

1. A dipólpotenciál a klaszterizációra permisszív hatást gyakorol, amely nem elég erős ahhoz, hogy a gyenge és tranziens konstitutív dimereket és oligomereket érdemben befolyásolja.
2. A konstitutív dimerek és oligomerek azáltal keletkezhetnek, hogy a citoszkeleton összezárja a receptorokat, míg az aktív klaszterek fehérje-fehérje kölcsönhatások révén jönnek létre. Mivel az valószínűtlen, hogy a dipólpotenciál a citoszkeleton általi behatárolódást befolyásolja, hatásait csak a ligandindukált klaszterekre fejtheti ki.
3. A fehérjék TMD-jében elhelyezkedő α -helikális szerkezet meghatározásában a peptidkötések jelentős dipólmomentuma miatt fontosak az atomok által generált elektromos erők közötti kölcsönhatások. A TMD-k specifikus dimerizációs motívumaik, például a Sternberg-Gullick GxxxG asszociációs konszenzus szekvencia révén a fehérjék asszociációs folyamataiban és ezáltal azok aktivációjában is fő szerepet játszanak. Az ErbB fehérjék TMD-jében (az ErbB3 kivételével) két GxxxG motívum található, az egyik a domén N-, a másik a C-terminális közelében, amelyek közötti kapcsolódás eredményeképpen két eltérő konformációjú dimer jöhet létre. Ezek egyszerű elcsúszás és 120 fokos rotáció révén átalakulhatnak egymásba, köztük egyensúlyi állapot alakulhat ki. A C-terminális motívumon keresztüli asszociáció esetén inaktív, míg az N-terminális kapcsolódása esetén aktív dimerek keletkeznek. A manapság elfogadott rotációs modell szerint aktiváció (például ligand kötődése) esetén az egyensúly eltolódik az aktív dimerek irányába, amely a receptor alegységek intracelluláris doménjeinek aktiválódásához vezet. Kísérletes eredményeink szervesen illeszkedhetnek ebbe a rotációs aktivációs elméletbe. A dipólpotenciál hatásainak hátterében ugyanis az állhat, hogy a membránfehérjékben található egymással párhuzamos α -hélixek taszító elektrosztatikus erőt fejtenek ki egymásra. A hatást eredményező elektromos potenciálkülönbség nagysága az általunk alkotott szemikvantitatív modell alapján összemérhető a membrán dipólpotenciáljának mértékével. Ennek növelése ellensúlyozhatja az N-terminusok közötti taszító hatást, amely az aktív dimerek kialakulásáért felelős N-terminális dimerizációs motívumok közötti kölcsönhatás stabilizációjához vezethet. Ezzel szemben a dipólpotenciál nem fejt ki hasonló hatást a dipólpotenciállal azonos orientációban elhelyezkedő C-terminális dimerizációs motívumokra, így a két forma közötti egyensúly eltolódhat az aktív dimerek képződése felé. Mivel a fentiek alapján a membránban található fehérjék transzmembrán doménjeit felépítő hélixek közötti kölcsönhatások jelentőségét számos különböző protein (integrinek, citokin receptorok, egyéb receptor tirozin kinázok)

esetén leírták, elméletünk alkalmazható lehet ezen fehérjék esetén is. A dipólpotenciál nagysága ebben az esetben általánosan befolyásolhatja többféle biológiailag releváns molekula asszociációs folyamatait az élő sejtek membránjában.

4. A TMD-k hélix terminusainak a vizes fázis felé történő expozíciója a „szolvans screening” jelensége miatt dipólmomentumaik, így a közöttük megfigyelhető taszítás csökkenéséhez vezet. Ezért ha a dipólpotenciál növekedése a membránvastagság csökkenésével jár, a TMD-k közötti gyengébb taszítás kedvező a receptor klaszterizáció számára, amely magyarázhatná eredményeinket. Ennek azonban ellentmond, hogy irodalmi adatok alapján sem a phloretin, sem pedig a 6-ketocholestanol nem befolyásolja a membránvastagságot.
5. A rotációs aktivációs elmélettel összhangban kimutatták az ErbB fehérjék juxtamembrán doménjének (JMD) szerepét a dimerizáció és a következményes aktiváció folyamatában. A kináz domének aktivációjához ugyanis szükséges, hogy azok megfelelő szerkezetű aszimmetrikus dimert képezzenek, amelyhez nélkülözhetetlen a TMD dimerhez csatoltan az N-terminális, α -helikális szerkezetet kialakító részek (JM-A szegmensek) közötti antiparallel orientációjú dimer kapcsolódás. A kináz domén inaktivitását eredményezi azonban, ha a JM-A szegmensben és a kináz doménben található pozitívan töltött lizin és arginin aminosavak és a sejmembrán belső rétegében levő negatívan töltött lipidek közötti kölcsönhatás révén ezen régiók a membránhoz horgonyzódnak. Ez ugyanis lehetetlenné teszi a JM-A antiparallel dimer kialakulását, vagyis a receptor aktiválódását is. A megfelelő aktív szerkezet kialakításában fontosak a TMD-k, az N-terminális GxxxG motívum által mediált asszociációjuk ugyanis a transzmembrán hélixek C-terminális végeinek egymástól való eltávolodását és a JM-A szegmensek membránnal való kapcsolódásának szétválasztását eredményezi. Az ECD jelenléte az N-terminális motívumokon keresztüli TMD dimer formációt gátolja, mivel távol tartja a hélixek N-terminális végeit egymástól. Ligandkötődés azonban az ECD konformációjának változását eredményezi, amely felszabadítja a gátlás alól a TMD-eket, lehetővé téve az aktív TMD dimer, ezáltal a kináz aktiváció létrejöttét.

A dipólpotenciál jelentősen befolyásolhatja ezt a folyamatot, egyrészt mivel a korábban leírtaknak megfelelően elősegítheti a TMD-k N-terminális dimerizációs motívumainak kölcsönhatását, másrészt közvetlen módon a JMD-k konformációját is módosíthatja. A dipólpotenciál pozitivitása ugyanis taszíthatja a JM-A szegmens pozitív aminosavait, így csökkentheti a gátló konformáció stabilitását. A dipólpotenciál növekedése pedig a taszító hatás fokozódásán keresztül elősegítheti a JM-A membránba ágyazódásának megszűnését, így a JM-A dimer és ezáltal az aktív aszimmetrikus kináz dimer formációját, végső soron pedig a jelátviteli útvonalak beindulását.

6. A dipólpotenciál változásai, illetve az ennek hatására a lipid-fehérje kölcsönhatásokban bekövetkező eltérések megváltoztathatják az ErbB receptorok raft és non-raft membrán domének közötti megoszlását. Irodalmi adatok alapján a lipidtutajok gátolják az ErbB1 ligandkötését és a kiváltott jelátviteli folyamatokat, illetve az aktiváció során a receptor kijuthat a raftokból. Az általunk kapott eredmények alapján az ErbB2 EGF általi aktivációja preferenciálisan a lipidtutaj doménekén kívül történik és a dipólpotenciál növelése ezt a jelenséget utánozza. Ezek alapján pedig a receptorok dipólpotenciál indukált redisztribúciója szintén növelheti azok asszociációját és serkentheti azok jelátviteli folyamatait.

A fentebb leírt mechanizmus(ok) hatására az ErbB monomerek dimerizációs hajlama megnő a dipólpotenciált növelő kezelés hatására, így több monomer lesz képes homo- és heterodimerek létrehozására növekedési faktor stimuláció esetén. Emiatt az ErbB1-ErbB2 heterodimerek képződése nem vezet az ErbB1 és ErbB2 homoasszociációinak csökkenéséhez, mivel azok a megnövekedett dimerizációs hajlammal rendelkező monomerekből alakulnak ki.

A dipólpotenciál jelentős lehet tumorok kialakulásában és kezelésében is. A tumoros sejtekre jellemző a lipidtutajok megnövekedett sűrűsége és mivel a dipólpotenciál nagyobb ezen régiókban, ez hozzájárulhat a receptor tirozin kinázok aktivációjához. Ez magában foglalja annak a lehetőségét, hogy a dipólpotenciál csökkentése a jelátviteli folyamatok gyengítésén keresztül akár terápiás szempontból is hasznosítható lehet. Megfigyeléseink azt hangsúlyozzák, hogy a dipólpotenciál hatásait nem szabad figyelmen kívül hagyni olyan esetekben, amelyekben a membránkörnyezet receptor klaszterizációjára gyakorolt hatásait elemzik.

5.2. A dipólpotenciál és a lipidtutajok kapcsolata

Irodalmi adatok alapján a koleszterin, a membrán tömörsége, valamint a lipidek rendezettsége mind befolyásolja a dipólpotenciált, így indokoltnak tűnik az a feltételezés, mely szerint a dipólpotenciál nagysága különbözhet a modellmembránok folyékony rendezett doménjeihez hasonló, raftszerű membrán mikrodoménekben és a membrán egyéb régióiban. Bár erre utaló megfigyeléseket leírtak modellmembránokban, illetve indirekt vizsgálatokkal felvetették élő sejtekben is, a korrelációt még soha nem bizonyították direkt és kvantitatív módon élő sejtek membránja esetén. Kísérleteink második fázisában ezért célul tűztük ki, hogy (a) bizonyítsuk a dipólpotenciál nagyságának eltéréseit a lipidtutajokon belül és kívül; (b) becsüljük ezen eltérés nagyságrendjét; (c) vizsgáljuk, hogy az anyagcsere-betegségekben (például Gaucher-kórban) a sejtmembrán lipid összetételében bekövetkező eltérések milyen mértékben befolyásolják a dipólpotenciál nagyságát.

Méréseink során három különböző lipidtutaj-marker fluoreszcenciája (GFP-GPI, fluoreszcensen jelzett koleratoxin B alegység és rendezett koleszterin domén ellenes antitest) és az elektromos erőtér érzékeny festékek (di-8-ANEPPS és F66) dipólpotenciál szenzitív intenzitásarányai közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens kvantitatív meghatározása segítségével bizonyítottuk, hogy a dipólpotenciál pozitívan korrelált a raftok jelenlétével. A dipólpotenciál lipidtutajokon belül és kívül tapasztalható nagysága közötti eltéréseket független módon megerősítették azon kísérleteink, amelyek során a non-raft doméneket jelöltük fluoreszcensen jelölt transferrin segítségével és azt találtuk, hogy a dipólpotenciál szignifikánsan gyengébb a transferrinnel jelölt nem-tutaj régiókban. Ezen eredményeink szignifikanciáját két módon is meghatároztuk. A metodikai szignifikanciát megerősítette az a tény, hogy a korrelációs koefficiensek mindig a korreláció feltételezett hiánya esetén számított 95%-os konfidenciaintervallumon kívülre estek. A biológiai szignifikancia ellenőrzése céljából két ismert lipidtutaj-marker, a GFP-GPI és a fluoreszcensen jelzett koleratoxin B alegység között is meghatároztuk a korrelációs koefficiens nagyságát. Mivel a tutaj jelölők és a dipólpotenciál közötti korrelációs koefficiensek értéke összemérhető volt a pozitív kontroll esetén tapasztaltakkal, leszűrhető a következtetés, hogy a korrelációk erősek és biológiai szempontból relevánsnak tekinthetők.

A dipólpotenciál-szenzitív fluorofórok intenzitásarányainak a lipidtutajokon belüli, illetve kívüli részeken elkülönülten történő meghatározása lehetőséget nyújtott arra, hogy a dipólpotenciál nagyságában a tutajfüggő növekedés mértékét megbecsüljük. Mivel a di-8-ANEPPS gerjesztési intenzitás arányában bekövetkező 15%-os változás a dipólpotenciál kb. 100 mV-os eltérését jelenti, az excitációs arány ~7%-os különbsége, amelyet a lipidtutajok és az azokon kívüli membrán régiók között figyeltünk meg, a dipólpotenciál nagyságrendileg 50 mV-os differenciáját mutathatja. A dipólpotenciál raftokban megfigyelhető növekedésének becslésére egy független módszer lehet, ha összehasonlítjuk a 6-ketocholestanol kezelés, illetve a lipidtutajok jelenlétének hatására bekövetkező változások mértékét a feszültségszenzitív indikátorok emissziós aránya esetén. E célból az F66 használatával meghatároztuk a dipólpotenciál mértékét, illetve annak 6-ketocholestanol kezelésre történő változását a raftokon belül, illetve kívül. A vegyület hatására az F66 emissziós arány ~35%-kal csökkent mind a tutajokon belül, mind pedig azokon kívül, arra utalva, hogy a szterolszármazék dipólpotenciálra gyakorolt hatása megegyezik a raft mikrodoménekben és az egyéb membrán régiókban. Korábbi méréseink alapján a 6-ketocholestanol alkalmazása a di-8-ANEPPS gerjesztési arány ~25%-os növekedését eredményezte, amely az irodalomban leírt kalibráció szerint a dipólpotenciálban bekövetkező ~160-170 mV-os változásnak felelt meg. Azt feltételezve, hogy az F66 emissziós

arányban a 6-ketocholestanolra bekövetkező 35%-os változás a dipólpotenciál nagyságában mintegy 160-170 mV-os eltérést jelent, az F66 fluoreszcencia intenzitásarány ~20%-os különbsége a lipidtutaj mikrodomének és a membrán egyéb régiói között ~100 mV-os dipólpotenciál különbséggel ekvivalens. Ha tekintetbe vesszük a dipólpotenciál számított, illetve mért értékeinek variabilitását az irodalomban, a fenti két becslésünk által meghatározott értékek elfogadható mértékű egyezést mutatnak.

Bár a három lipidtutaj-marker, azaz a GFP-GPI, a CTX-B és az anti-koleszterin antitest és a két dipólpotenciál érzékeny indikátor, a di-8-ANEPPS és az F66 közötti korrelációk egyértelműen azt mutatták, hogy a dipólpotenciál szignifikánsan erősebb a lipidtutajokban, a PPZ8 festékekkel nyert eredmények a többi fluorofórral kapott adatokkal jelentős ellentmondást mutattak. Ezen ellentmondás magyarázatához figyelembe kell vennünk a 3-hidroxi flavon festékek fotofizikai paramétereit. Ezen fluorofórok kétféle különböző alapállapotban fordulnak elő: 1) egy hidrogén-kötött (hidrált, H-N); és 2) egy nem-hidrogén-kötött alakban. Utóbbi forma ESIPT reakción megy keresztül, amely eredményeképpen az emisszió az így létrejövő két különböző molekuláris állapot, egy normál (N^*) és egy tautomer (T^*) variáns relaxációjából származik. Az N^* és T^* formák emisszióinak aránya a dipólpotenciálra érzékeny. A dipólpotenciál mellett azonban más tényezők is befolyásolhatják a 3-hidroxi flavon festékek fluoreszcenciáját: 1) a H-N forma relatív hozzájárulása a membrán hidrációjától függ, vagyis attól, hogy a víz molekulák milyen mélységbe tudnak penetrálni a membránban és ott az indikátorral hidrogén-kötéseket létesíteni; 2) a membrán hidrációja mindhárom molekuláris forma fluoreszcenciájának kioltását eredményezheti. Az F66 esetén a dipólpotenciál növekedése a T^* forma emissziójának relatív növekedéséhez vezet az N^* kárára. Ezen változások hatásai mellett azonban fontos tényező még az is, hogy a lipidtutajokban a csökkent víz indukálta fluoreszcencia kioltás mindhárom forma esetén erősebb fluoreszcenciát eredményez. A 3-hidroxi flavon festékek esetén a dipólpotenciál-szenzitív intenzitásarányt úgy számítjuk, hogy az alacsonyabb hullámhossztartományban mért emissziót osztjuk a magasabb tartományban kapott intenzitással. Mind a N^* , mind pedig a H-N forma az alacsony hullámhossztartományba eső emisszióhoz járul hozzá. Az F66 esetén az emissziós arány várhatóan negatívan korrelál a dipólpotenciál nagyságával, vagyis az alacsonyabb hullámhossztartományhoz tartozó emisszióknak csökkennie, míg a magashoz tartozóknak nőnie kellene. Mivel mind a N^* , mind pedig a H-N forma hozzájárulása csökken az alacsony hullámhossztartományban, az emissziós arány a várakozásoknak megfelelően változik.

A PPZ8 viselkedése azonban két szempontból is eltér: 1) egyrészt az alacsony hullámhossztartományban az indikátornak alig van érdemi emissziója, amely potenciálisan

problémássá teszi a háttér intenzitás levonásakor a korrekció mértékének meghatározását és így a specifikus fluoreszcencia intenzitás becslését; 2) másrészt a lipidtutajokban a magasabb dipólpotenciál és az alacsonyabb hidráció várhatóan ellentétes előjellel változtatja a N* és H-N formák relatív hozzájárulását. Mivel a raftokban a domináns T*-nek megfelelő sávban az emisszió mértéke nő a csökkent víz indukált kioltás miatt, PPZ8 esetén az alacsonyabb hullámhossztartományba eső emisszióknak jelentősen növekedni kellene ahhoz, hogy az emissziós arány a várt pozitív korrelációt mutassa a lipidtutajok magasabb dipólpotenciáljával. Az alacsony hullámhossztartományban azonban a PPZ8 intenzitása nem emelkedhet ehhez elég erőteljesen az 1) és 2) pontok miatt.

A dipólpotenciál nagyságrendjét általában a 200-500 mV tartományba teszik a különböző módszerekkel végzett vizsgálatok. Mivel a dipólpotenciál mértékének különbsége a lipidtutajok, illetve az egyéb membrán régiók között becsléseink szerint 50-100 mV körülnek mutatkozott, ez a differencia elég nagy lehet ahhoz, hogy szignifikánsan befolyásolja azon membránhoz kapcsolódó jelenségeket, amelyekben fehérjék is közreműködnek, így a membrántranszport, jelátvitel és membrán trafficking folyamatait, illetve az azokban tapasztalható különbségeket aszerint, hogy raft vagy non-raft mikrodoménekben mennek végbe.

A lipidösszetételben és a membránrendezettségben tapasztalható különbségek a dipólpotenciált és a membránhoz kötődő jelenségeket nemcsak fiziológias állapotok, hanem betegségek esetén is képesek befolyásolni. A Gaucher-kór egy in vitro modelljében a kialakuló szfingolipid eltérések következtében létrejövő dipólpotenciál-emelkedés nagyságrendje hasonlóan bizonyult, mint a lipidtutajok és az egyéb membrán régiók dipólpotenciálja között talált különbség mértéke. Mivel az általunk használt in vitro modell esetén a membrán koleszterin- és szfingolipid-tartalmában megfigyelhető eltérések mértéke hasonló ahhoz, mint amelyeket egy kondicionális glükocerebrozidáz knock-out egér modellben találtak, a kapott eredmények arra utaltak, hogy általánosságban humán betegségekben, illetve különös tekintettel a Gaucher-kórban a sejtmembrán lipidtartalmában megfigyelhető patológias változások a dipólpotenciál nagyságának szignifikáns eltéréseit eredményezhetik. Ezek pedig a membránfehérjék funkcióinak jelentős módosításai révén hozzájárulhatnak a betegségekben megfigyelhető tünetek kifejlődéséhez is.

Kísérleteink második fázisában kimutattuk, hogy a dipólpotenciál szignifikánsan nagyobb a lipidtutajokban a membrán egyéb régióihoz képest. A különbség elég lehet ahhoz, hogy a fehérjék transzmembrán doménjeinek konformációját megváltoztassa, amikor azok a tutajokba kerülnek, illetve elhagyják azokat, így a lipidtutajok jelenlétéhez köthető hatások létrejöttéhez hozzájárulhat a raft mikrodoménekben megfigyelhető emelkedett dipólpotenciál is.

6. Összefoglalás

A membránpotenciál legkevésbé ismert komponense, a dipólpotenciál, a membrán alkotó lipidek karbonil csoportjainak és a membránhoz asszociálódó vízmolekulák dipól momentumainak rendezett orientációja révén alakul ki. Az egyéb membránpotenciáloknál jóval erősebb elektromos erőteret generál, befolyásolva számos fehérje transzmembrán doménjének (TMD) feszültségfüggő konformáció változásait. Bár az ErbB receptorok aktivációja az intermolekuláris kölcsönhatások által mediált oligomerizáción keresztül zajlik, a TMD szerepe ismeretlen a folyamatban. Bár a dipólpotenciál megváltoztathatja a transzmembrán peptidok konformációját, ErbB fehérjékre gyakorolt hatása azonban még ismeretlen.

Kísérleteink során áramlási citometriás FRET mérések és konfokális mikroszkópos felvételeken végzett N&B analízis segítségével kimutattuk, hogy a dipólpotenciál növekedése felerősíti az ErbB1 és ErbB2 receptorok közötti homo- és heteroasszociációk EGF hatására bekövetkező növekedését. Ezen hatások még jelentősebbeknek bizonyultak a TMD-ben egy aktiváló Val → Glu mutációt hordozó ErbB2 (NeuT) esetén. A receptorok jelátviteli kapacitása korrelált a dipólpotenciál nagyságával. A dipólpotenciál növekedése csökkentette az EGF ErbB1 iránti affinitását, így a ligand felerősített hatásai csökkent receptortelítettség mellett következtek be. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a megnövekedett dipólpotenciál által indukált dimerizáció a TMD-n keresztül a receptorok aktivációjához vezet az ECD-k és TMD-k közötti kölcsönhatások által stabilizált dimerekben. A dipólpotenciál az ErbB receptorok klaszterizációjában permisszív szerepet tölthet be és a lipidtutajok receptor tirozin kinázokra gyakorolt hatásai mögött részben a dipólpotenciál állhat.

Elméleti megfontolások és modellmembránok vizsgálatából származó közvetett kísérletes bizonyítékok alapján a dipólpotenciál nagysága magasabb lehet a lipidtutajokhoz több szempontból hasonlító folyékony rendezett doménekben. Három különböző dipólpotenciálra érzékeny fluorofór és négy különböző raft, illetve non-raft marker segítségével konfokális felvételek kvantitatív elemzése során élő sejtek esetén is bebizonyítottuk, hogy a dipólpotenciál magasabb a tutajokban a membrán egyéb régióihoz képest. A különbség elég jelentősnek tűnik ahhoz, hogy a fehérjék TMD-jeinek konformációja különböző legyen a raft és non-raft régiókban. A Gaucher-kórra jellegzetes, szfingolipidekben gazdag és kontroll sejtek dipólpotenciáljának összehasonlítása során hasonló mértékű eltérést tapasztaltunk, amely a megfigyeléseink patofiziológiai jelentőségére utalhat. Eredményeink megerősítették, hogy élő sejtek membránjában a dipólpotenciál laterális heterogenitása korrelál a lipidtutajok jelenlétével és a sejtmembrán lipid összetételében bizonyos betegségek esetén bekövetkező eltérések a dipólpotenciál jelentős megváltozását eredményezhetik.

7. Publikációk



**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/12/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Tamás
Neptun kód: FR0CR7
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, T.**, Batta, G., Zákány, F., Szöllősi, J., Nagy, P.: The dipole potential correlates with lipid raft markers in the plasma membrane of living cells.
J. Lipid Res. 58 (8), 1681-1691, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M077339>
IF: 4.81 (2016)
2. **Kovács, T.**, Batta, G., Hajdu, T., Szabó, Á., Váradi, T., Zákány, F., Csomós, I., Szöllősi, J., Nagy, P.: The Dipole Potential Modifies the Clustering and Ligand Binding Affinity of ErbB Proteins and Their Signaling Efficiency.
Sci. Rep. 6, 35850, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35850>
IF: 4.259

További közlemények

3. Batta, G., Soltész, L., **Kovács, T.**, Bozó, T., Mészár, Z. M., Kellermayer, M., Szöllősi, J., Nagy, P.: Alterations in the properties of the cell membrane due to glycosphingolipid accumulation in a model of Gaucher disease.
Sci Rep. 8 (1), 157, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18405-8>
IF: 4.259 (2016)
4. Nagy, P., Szabó, Á., Váradi, T., **Kovács, T.**, Batta, G., Szöllősi, J.: rFRET: a comprehensive, Matlab-based program for analyzing intensity-based ratiometric microscopic FRET experiments.
Cytom. Part A. 89 (4), 376-384, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22828>
IF: 3.222





5. Nagy, P., Szabó, Á., Váradi, T., **Kovács, T.**, Batta, G., Szöllősi, J.: Maximum likelihood estimation of FRET efficiency and its implications for distortions in pixelwise calculation of FRET in microscopy.
Cytometry A. 85 (11), 942-952, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22518>
IF: 2.928
6. Illés, Á., Váróczy, L., Papp, G., Wilson, C. P., Alex, P., Jonsson, R., **Kovács, T.**, Kontinen, Y. T., Zeher, M., Nakken, B., Szodoray, P.: Aspects of B-cell non-Hodgkin's lymphoma development: a transition from immune-reactivity to malignancy.
Scand. J. Immunol. 69 (5), 387-400, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02237.x>
IF: 2.108
7. **Kovács, T.**, Kárász, A., Szöllősi, J., Nagy, P.: The Density of GM1-Enriched Lipid Rafts Correlates Inversely with the Efficiency of Transfection Mediated by Cationic Liposomes.
Cytometry A. 75A (8), 650-657, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20756>
IF: 3.032
8. Pályi-Krekk, Z., Barok, M., **Kovács, T.**, Saya, H., Nagano, O., Szöllősi, J., Nagy, P.: EGFR and ErbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate shedding, internalization and motogenic effect of CD44.
Cancer Lett. 263 (2), 231-242, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.01.014>
IF: 3.504

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,122

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,069

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

Debrecen, 2018.01.12.

