

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A sejtmembrán biofizikai tulajdonságainak és
dinamikájának szerepe sejtpenetráló peptidek
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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
Az Orvostudomány tudományágban

Írta: Tóth Gabriella okleveles biológus
Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr. Batta Gyula, PhD
Prof. Dr. Nagy Péter Viktor, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Zsebik Barbara, PhD

Dr. Veszélka Szilvia, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, MTA doktora

tagok: Dr. Zsebik Barbara, PhD

Dr. Veszélka Szilvia, PhD

Dr. Dienes Beatrix, PhD

Dr. Visnovitz Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2026. 03. 23. 11:00 óra
Debreceni Egyetem ÁOK,
Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet tanterme

1. Bevezetés

1.1 Sejtpenetráló peptidek (SPP)

A daganatos és más nehezen gyógyítható betegségek kezelésében a biotechnológia és az orvostudomány egyaránt arra törekszik, hogy a gyógyszermolekulák célba jutásának hatékonyságát növeljék. A legtöbb hagyományos kemoterápiás szer, mint a ciklofoszfamid vagy a paclitaxel, könnyen átjut a sejtek membránján, de sok új, intracelluláris vagy intraorganelláris struktúrákat megcélzó molekulák számára a kettős foszfolipid réteg áthatolhatatlan akadályt képez. Ennek oka a membrán belső hidrofób rétege, ami szelektíven gátolja a nagyobb, poláris molekulák bejutását. Emellett a daganatterápiák hatékonyságát a sejtspecifitás hiánya is korlátozza. A kis, elektromosan semleges vagy nem poláris molekulák, mint az oxigén vagy a szén-dioxid, könnyen átjutnak a membránon, míg az ionos vagy hidrofíl részecskék csatornákon és transzportfehérjéken keresztül jutnak be. A 500 Da-nál nagyobb makromolekulák, mint a peptidek, fehérjék vagy nukleinsavak azonban nem képesek spontán átjutni a membránon, és aktív vagy facilitált transzportmechanizmust igényelnek. Ezen kihívások leküzdésére számos módszert fejlesztettek ki, például liposzómák, nanorészecskék, vírusvektorok vagy elektroporáció segítségével.

Az egyik legjelentősebb áttörést a sejtpenetráló peptidek felfedezése jelentette. Ezek az oligopeptidek 8-30 aminosavból állnak, és képesek közvetlenül átjutni a sejtmembránon vagy endocitózissal bejutni a sejtekbe. Az első ilyen peptidet természetes fehérjék sejtekbe való bejutási képessége alapján azonosították, mint például a HIV-1 TAT fehérjéjéből származó TAT48-60 szekvenciát, vagy a *Drosophila* Antennapedia transzkripció faktorából származó penetratint. Derossi és munkatársai írták le a rövid, 16 aminosavból álló peptid, a pAntp₍₄₃₋₅₈₎, más néven penetratin, transzlokációs tulajdonságait, amely megfelel az Antennapedia homeodomén harmadik hélixének. 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 (sejtpenetráló peptidek) nevezik. Az SPP-k jellemzően amfipatikus, hidrofób és kationos tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek meghatározzák a sejtekbe való bejutásukat. A terápiás alkalmazásokhoz ezek a peptidek kémiai módosításokkal tehetők még hatékonyabbá, növelve stabilitásukat és szelektivitásukat. Felfedezésük óta a sejtpenetráló peptidet egyre szélesebb körben alkalmazzák az alapkutatásban különféle sejt típusok 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 sejtes régiókban, amelyek nehezen hozzáférhetőek, ezáltal fokozva a terápiás hatékonyságot. Így tehát az SPP-k ígéretes gyógyszerhordozó rendszerré váltak, amelyek képesek a különböző molekulákat (fehérjék, DNS, antitestek, kontrasztanyagok) alacsony citotoxicitás mellett a sejt belsejébe juttatni. Annak ellenére, hogy az SPP-k hatalmas potenciállal bírnak, a jelenlegi klinikai alkalmazásukat korlátozza alacsony biológiai hozzáférhetőségük, rövid felezési idejük és specifitásuk hiánya.

1.2 Plazmamembrán

A biológiai membránok kutatása rendkívül komplex terület, részben a molekuláris felépítésük és szerkezetük, részben pedig a működésük széles skálája miatt. A membránok funkcionalitásának sokféleségét a változatos megjelenésük is mutatja: a nanométeres méretű lipid-fehérje domének de akár a mikrométeres, ívelt vagy csőszerű struktúrákat alkotó organellek is előfordulnak. A plazmamembrán alapvetően egy kettős foszfolipid-rétegből áll, amely amfipatikus lipidmolekulákból épül fel. Ezek a molekulák egy hidrofil feji résszel és egy hidrofób farki résszel rendelkeznek. A hidrofil fejek a membrán külső, vizes felülete felé, míg a hidrofób farkrészek a membrán belső terébe rendeződnek. Ebbe a kettős rétegbe ágyazódnak be részben vagy teljesen a kulcsfontosságú transzmembrán fehérjék, mint az enzimek, receptorok és transzporterek. A lipidek sokfélesége, valamint a fehérjék és más nem-lipid elemek (pl. szterolok, szénhidrátok) összetétele határozza meg a membránok specifikus biológiai funkcióit. A szénhidrátok glikolipidek és glikoproteinek formájában vannak jelen.

A plazmamembránok klasszikus felépítését a több mint 50 éve kidolgozott Singer-Nicolson "folyékony mozaik modell" írta le. Ez a modell azt feltételezte, hogy az eukarióta membránok lipid kettős rétege egy rendezetlen, folyékony "tengert" alkot, amelyben a lipid- és fehérjemolekulák kaotikusan helyezkednek el. Ez a gondolat évtizedekig meghatározta a membránkutatást, de egyben korlátozta is, mivel a modellt gyakran minden más membránra is alkalmazni próbálták. 2014-ben Nicolson maga is módosította az eredeti elképzelést, és egy "dinamikus összetett modell" vagy "módosított folyékony mozaik modell" nevet adott a felülvizsgált elméletnek. Eszerint a sejthártyák valójában számos mikrodoménből álló mozaik komplexek, amelyekben a fehérje- és lipidklaszterek rendezettebb, heterogén területeket alkotnak. Ez a módosított szemlélet vezetett a "lipidutajok" felfedezéséhez is. 1997-ben Simons és Ikonen javasolták a lipidutajok koncepcióját: kis (10-200 nm), dinamikus,

szterolokban, gliko- és szfingolipidekben gazdag területek, ahol a lipidmolekulák sűrűsége megnövekedett bizonyos fehérjék körül. Fontos megjegyezni, hogy a plazmamembrán felépítése nem szolgál az összes többi membrán alapjául. Például a kloroplasztiszok és a mitokondriumok membránjainak lipidösszetétele jelentősen eltér a plazmamembránétól. A plazmamembrán egy komplex rendszer, amely kétrétegű lipidekből és fehérjékből áll, amelyek nanodoménekké szerveződnek. Bár mindkét réteg aszimmetrikus, a közöttük lévő kapcsolat rendkívül erős, amit az a megfigyelés is alátámaszt, hogy a külső és belső rétegben kialakult nanodomének tökéletesen megegyeznek. A plazmamembrán lipidösszetétele rendkívül változatos, függ a szervezettől, sejttípustól, a sejtciklus állapotától és a környezeti tényezőktől is. A plazmamembránt meghatározó doméneket 3 fő csoportba sorolhatjuk:

1. Membrán lipidei illetve a kapcsolódó és integráns membránfehérjék. A lipidek összetétele: a plazmamembrán főbb lipidei a glicerollipidek, szfingolipidek és szterolok. Továbbá a lipidmembrán fehérjéket is hordoz. Elhelyezkedésük alapján két nagy csoportra oszthatók: integráns membránfehérjék és perifériás membránfehérjék. Az integráns membránfehérjék a foszfolipid kettősrétegbe ágyazódnak, még a perifériás membránfehérjék (PMP-k) 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 membrán alkotói nem egy homogén eloszlású struktúrát alkotnak, hanem aszimmetria jellemzi azokat. Ennek kialakításában fontos szerepet töltenek be a flippázok, a floppázok és a szkrablázok.
2. A lipidtutajok vagy nanodomének: lipidek asszimmetrikus eloszlása révén koncentrált területek, úgynevezett lipidtutajok vagy nanodomének jönnek létre. Az aszimmetria különösen a két réteg között figyelhető meg: a citoszolikus oldalon több anionos lipid, míg az extracelluláris oldalon többnyire semleges lipid található. Ez az aszimmetria eltérő elektrosztatikus felületeket hoz létre, amelyek befolyásolják a fehérjék membránhoz való kapcsolódását és az integráns fehérjék aktivitását. A lipidtutajok nem-egyensúlyi struktúrák, hanem 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 a milliszekundumoktól, másodpercekig is terjedhet. Ez a sokoldalúság megerősíti,

hogy a lipídutajok jelentős átrendeződésen mehetnek keresztül különféle biológiai ingerek hatására.

3. Az aktin citoszkeleton és a membránhoz kötődő fehérjék: az aktin filamentumokból álló hálózat a sejtmembrán alatt helyezkedik el, és "rácsként" funkcionálva osztja fel a membrán területét kompartmentekre. Az aktin hálózat fizikai keretet biztosít, amely elősegíti a nanodomének strukturális kohézióját. A transzmembrán fehérjék a membránban helyezkednek el, és citoplazmatikus részeik gyakran ütköznek az aktin citoszkeletonnal. Ez az "ütközési" mechanizmus nem csupán a fehérjék mozgását korlátozza, hanem lassítja a környező lipidmolekulák diffúzióját is, ami hozzájárul a membrán rendezett, nanodomén-alapú szerveződéséhez.

1.3 A sejtbe történő bejutás: a direkt transzlokáció és az endocitózis

Kezdetben azt gondolták, hogy a sejtpenetráló peptidek (SPP-k) főként közvetlenül membránon keresztül transzlokációval jutnak be a sejtekbe. A közvetlen penetráció, más néven membrán transzdukció, egy egyedülálló, energiafüggetlen folyamat, amely alacsony hőmérsékleten és endocitózis-gátlók jelenlétében is végbemehet. Ez a bejutási mód a pozitív töltésű sejtpenetráló peptidek (SPP-k) és a negatív töltésű membránkomponensek közötti kölcsönhatáson alapul. Ezt az interakciót a peptid bejutása követi, amely átmeneti pórusképződés vagy membrán destabilizáció révén történik. Két pórusképződési modellt írtak le: toroidális pórusok és hordó-nyílású pórusok. Más mechanizmusok a membrán destabilizációján alapulnak: amelyet a „szőnyegszerű” modell és inverz micella mechanizmus ír le.

Később azonban kiderült, hogy bizonyos kísérleti módszerek, mint például a sejtek fixálása, megkérdőjelezi az eredményeket. A legújabb elfogadott adatok szerint a legtöbb SPP és SPP-komplex esetében a fő bejutási útvonal az endocitózis. Az endocitózis egy természetesen lejátszódó, energiaigényes folyamat, amely során a sejt bekebelezi a külső molekulákat. Különböző típusai vannak, például a makropinocitózis, valamint a klatrin- vagy kaveolin-mediált endocitózis. A domináns útvonal a molekula méretétől és fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ. Míg a nem endocitikus úton bejutó SPP-k közvetlenül a citoszolba kerülnek, addig az endocitózissal bekerülő peptidek az endolizoszómális rendszerbe jutnak. Ahhoz, hogy elérjék a célpontjukat és kifejtsék biológiai hatásukat, ki kell szabadulniuk az endolizoszómákból, hogy elkerüljék a lizoszómális lebomlást. Az endolizoszómális kiszabadulás a hatékony intracelluláris gyógyszert szállítás egyik legfőbb korlátozó tényezője.

Az SPP-k bejutási mechanizmusa a következőképpen alakul: 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 peptidek elérik a citoplazmát, magot vagy egyéb intracelluláris célorganellumokat, és a szállított molekulát is célba juttatják. A kutatások előrehaladtával egyre több információ gyűlik össze ezekről a folyamatokról. Kimutatták, hogy az SPP-k és a lipid kettős réteg közötti elektrosztatikus kölcsönhatások konformációs változásokat idéznek elő a peptidekben, ami a membránba való beépülést és a fizikai tulajdonságok megváltozását vonja maga után.

1.4 A bejutást befolyásoló tényezők: dipóluspotenciál

A plazmamembránon keresztül történő töltéssel rendelkező anyagok transzportját háromféle membránpotenciál befolyásolja: a transzmembrán potenciál, a felszíni potenciál és a dipóluspotenciál. A dipóluspotenciál, egy a lipidmembrán belsejében lévő elektromos potenciál, amelyet a membránhoz asszociált vízmolekulák és a lipidek dipólusos oldalláncainak kedvező elrendeződése hoz létre. Ez a potenciál 200–300 mV nagyságrendű, ami többszörösen meghaladja a transzmembrán potenciált, és erőssége elérheti a 10^8 – 10^9 V/m-t. Ennek köszönhetően a dipóluspotenciál jelentős hatást gyakorol a transzmembrán fehérjék konformációjára, a molekulák membránkötődésére és transzportjára. A dipóluspotenciál egyik legfontosabb meghatározója a membrán koleszterin-tartalma. A koleszterin közvetlenül (saját dipólusmomentuma révén) és közvetetten is növeli a potenciált, mivel fokozza a lipidek és vízmolekulák rendeződését, valamint módosítja a membrán dielektromos állandóját. Ezért a potenciál magasabb a membrán lipidtutaj doménjeiben, amelyek gazdagok koleszterinben.

A sztatinok a HMG-CoA reduktáz gátlásával csökkentik a sejtek koleszterinszintjét, ezáltal csökkentik a plazmamembrán dipóluspotenciálját is. Ezeket a gyógyszereket széles körben alkalmazzák a magas koleszterinszint (hiperkoleszterinémia) kezelésére, mivel hatékonyan csökkentik a szív- és érrendszeri megbetegedések kockázatát. Az atorvasztatin például hatékonyabb más sztatinoknál, mivel alacsonyabb dózisban is képes ugyanazt az LDL-koleszterin-csökkentő hatást elérni. Az atorvasztatin aktív formában van jelen, szemben a szimvasztatinnal vagy a lovasztatinnal, amelyek először enzimatisz aktiválást igényelnek. Az ismertetett elvek alapján feltételezhető, hogy a membránpotenciálok befolyásolják a pozitív töltéssel rendelkező penetratin sejtbe jutását. Bár a kutatások száma korlátozott, már

kimutatták, hogy a transzmembrán potenciál nem fiziológias módon történő megszüntetése gátolja a pozitív töltésű SPP-k felvételét. Ez megerősíti a membránpotenciálok kritikus szerepét a gyógyszerek sejten belüli szállításában.

1.5 Ligandumok

A plazmamembrán nem csupán ellenőrzött, félig átteresztő határfelületet alkot a sejt és környezete között, hanem számos membránfehérjét is. Annak ellenére, hogy a transzmembrán jelátvitel első lépése a ligandumok receptorokhoz való kötődése, a hagyományos kutatások jellemzően a membrán citoplazmatikus oldalán zajló folyamatokra – például a foszforilációra – összpontosítanak. A modern kvantitatív biofizikai módszerek azonban egyre inkább feltárják, hogy a receptorok oligomerizációjának bonyolultságát, amelyet fehérje-fehérje kölcsönhatások, membrándomének és a citoszkeleton dinamikája szabályoz. Ugyanakkor maga a ligandumkötés is nagy mértékű komplexitást mutathat: a receptor affinitása függ a ligandum típusától, valamint attól, hogy a receptor dimer milyen kötött állapotban van, ami a kötődés kooperativitásához vezet. A növekedési faktorok kapcsolódásának további nehézsége a plazmamembrán bonyolult és dinamikus szerkezete. Ezt a szempontot sokáig figyelmen kívül hagyták, mivel még a kvantitatív elemzések is azon az egyszerűsítő feltételezésen alapultak, hogy a ligandum az extracelluláris térben homogén eloszlású és egységes. A membrán által befolyásolt ligandumkötődés vizsgálata következtében azonban számos váratlan jelenséget írtak le. Ilyen például a receptor látszólagos affinitás-növekedése, amelyet a receptorok klasztereződése vagy a disszociált ligandumok újrakötődését segítő akadályozott diffúzió idézhet elő. Egyes esetekben még az a kiinduló feltevés is megdőlt, hogy az extracelluláris térben a ligandum koncentrációja egységes. A ligandum olyan molekula, amely specifikusan kapcsolódik egy receptorhoz vagy más biomolekulához, és ezáltal biológiai választ idéz elő. Ligandumok közé sorolhatók a fehérjék, hormonok, gyógyszerek, neurotranszmitterek vagy kisebb molekulák is, amelyek a receptorhoz való kötődés következtében módosíthatják annak konformációját. A koncepciók fejlődése során a ligandum–receptor kapcsolat kezdetben merev testek egyszerű asszociációjaként volt ismert, később azonban nyilvánvalóvá vált a konformációs változások meghatározó szerepe is. Ez a konformációváltozás aktiválhatja vagy gátolhatja a receptor működését, közvetve pedig a sejt működés szabályozását is befolyásolja. A ligandum–receptor interakciók rendszerint reverzibilisek, és különféle nem kovalens kölcsönhatások által jönnek létre. A ligandumok működésük helye szerint lehetnek intracellulárisak, amelyek sejten belüli receptorokhoz kötődnek (például ösztrogén), vagy

extracellulárisak, amelyek sejtfelszíni receptorokon keresztül hatnak (például inzulin vagy neurotranszmitterek). Ligandumok és célpontjaik kölcsönhatása számos kémiai és biológiai folyamat alapját képezi.

1.6 Sejtfelszíni receptorok: receptor tirozin-kináz család

A sejtfelszíni receptorok a membránba vannak ágyazódva: a sejt külső felszínén helyezkednek el, de mégis a plazmamembránban találhatóak, és specifikusan megkötik a sejten kívüli, hidrofíli ligandumokat, vagy egyéb jelzőmolekulákat. A sejtfelszíni receptorokat funkciójuk és működési mechanizmusuk alapján négy fő csoportba sorolhatjuk: ioncsatorna-kapcsolt receptorok, G-fehérje-kapcsolt receptorok, enzimkapcsolt receptorok, és az adhézíós receptorok (vagy szabályozott intracelluláris jelátvitelű receptorok). Az enzimkapcsolt receptorok transzmembrán fehérjék, amelyek ligandumkötő doménje a plazmamembrán extracelluláris oldalán helyezkedik el. A citoszolikus részük vagy önálló enzimaktivitással rendelkezik, vagy közvetlenül asszociál egy enzimmel. Jellemzőjük, hogy minden alegységük általában egyetlen transzmembrán szegmenst tartalmaz. Ezeket a receptorokat elsősorban az alapján azonosították, hogy milyen szerepük van az extracelluláris ligandumokra adott sejtválaszok közvetítésében, mivel kulcsfontosságúak a sejtnövekedés, osztódás, differenciálódás és túlélés szabályozásában. Jelenleg hat fő osztályuk ismert: receptor tirozin-kinázok, tirozin-kináz-asszociált receptorok, receptor-szerű tirozin-foszfatazok, receptor szerin/treonin-kinázok, receptor guanilil-ciklázok és hisztidin-kináz-asszociált receptorok. Mindegyik csoport széleskörű biológiai funkciókat lát el. Ezek közül a legnagyobb családot a receptor tirozin-kinázok alkotják, amelyek ATP felhasználásával katalizálják célfehérjék meghatározott tirozin oldalláncainak foszforilációját.

A receptor tirozin-kinázok aktivációja a ligandum extracelluláris doménhez való kötődésével indul. A tirozin-kinázok rendellenes aktivációjának gátlása, amelyet okozhat túlzott expresszió, mutáció vagy autokrin stimuláció, napjainkban a rákterápiás kutatások egyik központi eleme. Számos terápiás szer fejlesztése irányul kifejezetten ezen kóros jelátviteli mechanizmusok blokkolására. A receptor tirozin-kinázok sajátossága, hogy egyszerre működnek sejtfelszíni transzmembrán receptorokként és kináz aktivitással rendelkező enzimekként. Szerkezetük három fő részből épül fel: egy többsdoménés extracelluláris ligandumkötő régióból, egy egyszeres hidrofób transzmembrán hélixből, valamint egy citoplazmatikus doménből állnak. A kináz doménhez mind az N-terminális, mind a C-terminális végen szabályozó szekvenciák

kapcsolódnak. A receptor tirozin-kinázok aktivációja során a ligandum kötődése dimerizációt indukál, amely lehetővé teszi a citoplazmatikus régiók kölcsönös transz-foszforilációját.

Az elsőként azonosított receptor tirozin-kináz az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) volt.

1.7 Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és az ErbB2

Az epidermális növekedési faktor receptor az ErbB receptorcsalád tagja, amely a receptor tirozin-kinázok szupercsaládjába tartozik. Az ErbB család négy receptort foglal magában: EGFR (más néven ErbB1 vagy HER1), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) és ErbB4 (HER4). Az EGFR egyetlen transzmembrán doménnel rendelkező fehérje, amely több strukturális elemből áll: extracelluláris ligandumkötő doménből, transzmembrán régióból, juxtamembrán szegmensből, kináz doménből, valamint egy C-terminális szabályozó „farokból”. Az EGFR több sejten belüli jelátviteli útvonalat is képes aktiválni, többek között a Ras/Raf/MAP-kináz útvonalat. Aktivációját különböző extracelluláris ligandumok váltják ki, mint például az epidermális növekedési faktor (EGF). Az EGFR volt az egyik első olyan receptor, amelynél a ligandum-indukált dimerizációját, a transzmembrán jelátvitel alapvető molekuláris mechanizmusaként írták le. Maga az epidermális növekedési faktor egy 53 aminosavból felépülő polipeptid, amely a növekedési faktorok egyik legjelentősebb képviselője. Hatását egy körülbelül 170 kDa tömegű plazmamembrán-receptoron, az EGFR-en keresztül fejti ki. Az EGF és az EGFR szöveti koncentrációit endokrin faktorok – például pajzsmirigyhormonok, ösztrogén, tesztoszteron és növekedési hormon – modulálják, ami arra utal, hogy ezen hormonok bizonyos növekedési és fejlődési hatásait az EGF közvetítheti.

Az ErbB2 egy transzmembrán tirozin-kináz, amelynek túlzott sejt felszíni expressziója összefügg a tumorgenezissel és az emlőrák esetén tapasztalt, kedvezőtlen prognózissal. Az ErbB2 önmagában nem képes ligandumkötésre, hanem elsősorban ligandum által aktivált testvérreceptorok preferált heterodimerizációs partnereként működik, amivel felerősíti a mitogén jelátvitelt. Ez a sajátosság szerkezetileg az extracelluláris domén „nyitott” konformációjával magyarázható, amely az EGFR aktivált, ligandumhoz kötött állapotát utánozza. Az ErbB2 endocitikus forgalmának értelmezésére két, egymással ellentétes modell született. Az egyik szerint az ErbB2 hatékonyan reciklál a bazális endocitózist követően, és ugyanezt a sorsot biztosítja az aktivált EGFR–ErbB2 heterodimerek számára is. A másik modell úgy véli, hogy az ErbB2-t tartalmazó dimerek a sejt felszínen maradnak, és elkerülik az endocitózist. Mindkét megközelítés hangsúlyozza az ErbB2 endocitikus forgalmának

fontosságát a normális működés és a túlzott expresszióval összefüggő onkogenezis szempontjából. Bár az ErbB2 endocitózisának kiemelkedő jelentősége van a rákterápiában, a folyamat részletei kevésbé ismertek. Antitestvizsgálatok arra utaltak, hogy az ErbB2 hasonló módon képes indukálható endocitikus degradációra, mint az EGF által stimulált EGFR. Ugyanakkor későbbi, kiméra receptorokon végzett kísérletek kimutatták, hogy az EGFR egyedülálló, mert a többi ErbB receptor – beleértve az ErbB2-t is – ezzel a tulajdonsággal nem rendelkezik. Bizonyítást nyert, hogy az ErbB2 sejt felszíni készlete dinamikus: bazális endocitózison megy keresztül, amelyet gyors és hatékony reciklálás követ.

Ezen receptorok és mechanizmusok vizsgálatai során gyakran alkalmaznak fluoreszcensen jelölt ligandumokat a receptorok vizsgálatához. A TAMRA-EGF egy ilyen molekula: az epidermális növekedési faktort a tetrametilrhodamin (TAMRA) fluoreszcens festékkel jelölik meg. A jelölést helyspecifikusan, a fehérjébe beépített TAMRA-aminofenilalanin segítségével végzik, ami lehetővé teszi a pontos fluoreszcens követést, ezáltal az EGFR vizsgálatát fluoreszcens mikroszkópia és más fluoreszcencia-alapú módszerek segítségével.

1.8 Ligandum-koncentráció gradiens kialakulása és annak vizsgálata FCS méréssel

Egyes paraméterek, mint például a ligandumok célreceptorhoz való kötődési affinitásának meghatározására szolgáló klasszikus egyenletek azon a feltételezésen alapulnak, hogy a ligandumok szabadon diffundálnak, egyenletesen oszlanak el, és a receptor közvetlen közelében a koncentrációjuk megegyezik az általános (bulk) vizes fáziséval. Ugyanakkor ismert, hogy a gyógyszermolekulák közvetlen kölcsönhatásba léphetnek a plazmamembránnal, ami a receptorok környezetében a helyi ligandum-koncentráció növekedéséhez vezethet. Azoknál a ligandumoknál, amelyek beépülnek a lipid kettősrétegbe, felmerült, hogy a membránban kialakuló „raktárak” miatt a helyi koncentráció jelentősen meghaladhatja az általános fázisban mérhető értéket. A membránból történő ligandum-diffúzió, valamint a membrán és a környező vizes közeg határfelületén zajló kölcsönhatások szintén hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a ligandum koncentrációja a sejt hátya közvetlen közelében magasabb legyen.

Az fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópia (FCS) módszer a fluoreszcens molekulák diffúziója során fellépő intenzitás-ingadozásokat detektálja egy kis (~0,25 fL) konfokális térfogatban, majd ezek autokorrelációs elemzése alapján meghatározható a vizsgált molekulák koncentrációja és diffúziós együtthatója. Az FCS a fluktuáció–disszipáció tételre alapul, és lehetőséget nyújt a fluoreszcensen jelölt molekulák kinetikai és termodinamikai

tulajdonságainak vizsgálatára oldatban. A módszer alapja a detektált fluoreszcencia-intenzitás spontán ingadozásainak elemzése: a fluktuációk időbeli relaxációja a rendszer kinetikai jellemzőire, míg amplitúdójuk a termodinamikai paraméterekre ad információt. Az FCS olyan rendszerekben is alkalmazható, amelyek tartósan stacionárius állapotban vannak akár egyensúlyi, akár nem-egyensúlyi körülmények között is. Bár ezen rendszerekben az átlagos koncentráció hosszú időn át állandó, lokális szinten folyamatosan fellépnek spontán fluktuációk a Brown-mozgás (molekulák térbeli mozgása) és a kémiai reakciók (Poisson-folyamatok) következtében. A molekulák folyamatosan belépnek és kilépnek a vizsgált kis térfogathoz, így időleges változásokat okoznak a helyi koncentrációban. Ha a molekulák fluoreszcensen jelöltek, ez a fluoreszcencia intenzitásában is ingadozásokat eredményez.

Az FCS működési elve azon alapul, hogy a fluoreszcensen jelölt molekulák a gerjesztő lézer hatására fluoreszcencia-fotonokat bocsátanak ki. Ezeket a fotonokat a mikroszkóp objektívje összegyűjti, majd az optikai rendszer felé továbbítja. A visszaérkező fény még tartalmazza a gerjesztő sugárzást is, amelyet egy dikroikus tükör választ szét: csak a hosszabb hullámhosszú emissziós fotonokat engedi át. Az így kiválasztott fény egy emissziós szűrőn halad át, amely biztosítja, hogy a detektorhoz kizárólag a fluoreszcencia jusson. A jel ezt követően belép a konfokális rendszer túlyukán (pinhole), amely kiszűri a fókusz síkon kívülről érkező fotonokat, így rendkívül kisméretű, femtoliter nagyságrendű detekciós térfogat jön létre. Végül a fény eléri a nagy érzékenységű lavinafotodiódát (APD), amely az egyes fotonokat elektromos jellé alakítja, lehetővé téve a molekulák számából és mozgásából származó intenzitásfluktuációk rögzítését. A módszer kulcsa éppen ez a kis, pontosan definiált detekciós régió, amelyet a konfokális optika hoz létre. A fluoreszcencia-intenzitásból autokorrelációs függvényt számítanak különböző időeltolásokra, majd a kapott görbét megfelelő elméleti modellekkel illesztik. E modellezés révén meghatározhatók a molekulák száma, diffúziós ideje, valamint olyan paraméterek, amelyek a molekulák különböző kölcsönhatásaira vagy állapotaira (például triplet-állapot) utalnak.

2 Célkitűzések

A membránjelenségek, a membrán biofizikai tulajdonságait és körforgását több szempontból is vizsgáltam. A sejtpenetráló peptidok felvételére kifejlesztett hatásokkal kapcsolatban az alábbi célok megvalósítását tűztük ki célul:

- A dipóluspotenciál, mint fontos membrán-potenciál tényező, megváltoztatásának révén a sejtpenetráló peptidok sejtbe történő bejutásának hatékonyságának növelése
- Az atorvasztatin alkalmazásával a sejtpenetráció és az endoszómális felszabadulás növelése
- Az endocitózis, mint sejtbe történő bejutási mechanizmus, szerepének feltárása az SPP-k penetrációjában
- A fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidok lizoszomális degradációjának mértékének meghatározása a sejtbe történő bejutást követően
- A módosított „ β ”-penetratin sejtbe történő bejutási hatékonyságának meghatározása
- A „ β ”-penetratin „önkioltási” jelenségének mértékének meghatározása
- A „ β ”-penetratin sejtfelvétele során mért küszöb-koncentráció meghatározása
- A penetratin aggregációs képességének vizsgálata FRET méréssel
- Az aggregációs képesség vizsgálata, annak fényében, hogy milyen hatással van a sejtpenetráló peptidok bejutási hatékonyságára

Munkám második fázisában azt vizsgáltam, hogy az EGF, amely egy membrán-impermeabilis ligandum, a kötődést követően, az így előidézett aktív, membránhoz kapcsolódó működései révén, milyen hatást gyakorol az extracelluláris térben kialakuló ligandumkoncentrációra:

- Ligandum koncentrációjának meghatározása, fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópiával (FCS), figyelembe véve a plazmamembrántól mért távolságot
- Extracelluláris mátrix emésztésének következményei a membránforgalmat és a ligandumkoncentrációt tekintve
- Az ioncsatornák hatása a membránforgalomra, és a tapasztalt membrán közeli ligandumkoncentráció csúcsra

- TAMRA-EGF koncentrációs gradiensének vizsgálata sejtek és óriás plazma-membrán vezikulumok esetén
- BODIPY-alapú molekuláris rotor alkalmazása a viszkozitás mérése

3 Anyagok és módszerek

3.1 Sejtpenetráló peptidek bejutási hatékonyságának növelésére irányuló kísérletek

3.1.1 Alkalmazott sejtvonalak

Kísérleteinket két különböző sejtvonallal végeztük: MDA-MB-231 és SKBR-3

Az MDA-MB-231 egy humán emlőrák sejtvonal, amelyet gyakran alkalmaznak a tripla-negatív emlőrák (triple-negative breast cancer, TNBC) modellezésére. A TNBC sajátossága, hogy hiányzik benne az ösztrogénreceptor, a progeszteronreceptor és a HER2 expressziója, ezért nem reagál sem a hormonális terápiákra, sem a HER2-gátló kezelésekre.

Az SKBR-3 sejtvonal szintén humán emlőrák eredetű, és a HER2-pozitív emlőrák kutatásának egyik fontos modellje. Erre a sejtvonalra jellemző a HER2 gén túlzott expressziója, amely meghatározó szerepet játszik a HER2-pozitív daganatok biológiájában.

Mindkét sejtvonalat a specifikációjuknak megfelelően DMEM tápoldatban tenyésztettük, amelyet 10% fetális borjúsérummal (FBS), 50 µg/ml gentamicinnel és 2 mM L-glutaminnal egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, termosztáttal szabályozott inkubátorban növesztettük sejttenyésztő flasksokban, majd 2–3 naponta passzáltuk, a konfluencia mértékétől függően.

A mikroszkópos mérésekhez a sejteket 8 lyukú kamrákban tenyésztettük, amíg el nem érték a ~80%-os konfluenciát. Az áramlási citometriás vizsgálatokhoz a sejteket T-25 vagy T-75 méretű tenyésztő flasksokban növesztettük, a szükséges sejtszámnak megfelelően. Ezekben az esetekben a méréseket sejtszuspenzióban végeztük. Ehhez szükség volt a sejtek eltávolítására a flasksok aljáról amelyet tripszin-EDTA-PBS oldattal értünk el (0,05% tripszin, 0,02% EDTA).

3.1.2 Sejtpenetráló peptidek

A penetratint kollaborációs partnerünk, Mándity István (Semmelweis Egyetem, Budapest) szintetizálta TentaGel R RAM gyantán. A peptidet a Merrifield-féle szilárd fázisú szintézis standard Fmoc kémiájával állították elő. A penetratin felét AlexaFluor532 N-hidroxiszukcinimidil-észterrel egy éjszakán át jelölték. A másik felét 5(6)-karboxinaftofluoreszcein N-szukcinimidil-észterrel reagáltatták. A jelölt peptideket

deprotektáltuk, eltávolítottuk a gyantáról, majd szűréssel és kicsapással előkészítettük a durva termékeket. Tisztításukat preparatív reverz fázisú HPLC-vel végeztük C18-os oszlopon, majd fagyasztva szárítottuk. A termékek tisztaságát analitikai C18-os oszlopon végzett reverz fázisú HPLC-vel ellenőriztük, míg a peptid hitelességét Bruker elektropray ionizációs tömegspektrometriával igazoltuk. Ezekkel a módszerekkel lehetőség nyílt a penetratin módosított változatának vizsgálatára is. A továbbiakban erre a peptidre a β -penetratin elnevezést használom; a szerkezetének publikálására nincs lehetőség a tervezett szabadalombenyújtás révén.

3.1.3 Dipóluspotenciált befolyásoló anyagok alkalmazása

Különböző anyagok a membrán dipóluspotenciáljára gyakorolt hatását vizsgáltuk: a floretin csökkenti a dipóluspotenciált a membránban, 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 alkalmaztunk. Az A MDA-MB231 és SKBR-3 sejteket először a dipóluspotenciál-módosító anyagokkal inkubáltuk 10 percig, majd hozzáadtuk a 1 μ g/ml koncentrációjú DAPI-t tartalmazó oldatot 5 percre szobahőmérsékleten. Továbbá 2 különböző fluoreszcens festékkel jelölt penetratint használtunk, az AlexaFluor 532-vel és Naftofluoreszceinnel jelölt penetratint 5 μ M-os koncentrációban. 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.

3.1.4 Az atorvasztatin hatásának vizsgálata a dipóluspotenciálra

Az atorvasztatin csökkenti a membrán dipóluspotenciálját, annak köszönhetően, hogy a szterol tartalmát is csökkenti a koleszterin bioszintézis gátlása révén. A MDA-MB231 és SKBR-3 sejtek flaskába helyezése után 24 órával, a sejteket atorvasztatinnal kezeltük. 4 koncentrációban alkalmaztuk az atorvasztatint: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 10 μ M, 48-72 órás inkubációs idővel. A DAPI-t 1 μ g/ml koncentrációban, az AlexaFluor 532-vel és Naftofluoreszceinnel jelölt penetratint 5 μ M-os koncentrációban alkalmaztunk. Az inkubáció 37°C-on 20 percen keresztül ment végbe. Mosási lépést mellőzve, hajtottuk végre a mérést, az előző kísérletekben leírtaknak megfelelően, azonos gerjesztési és detektálási körülményekkel BD FACS Aria III áramlási citométerrel.

3.1.5 Endocitózis gátlása Dyngo4a dinamin inhibitorral

Az endocitózis gátlás kivitelezéséhez dyngo4a dinamin inhibitorral alkalmaztunk, amely gátolja a dinamin függő endocitózist, melynek hatására a fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptidek csak dinamin független endocitózis, vagy direkt membránpenetrációval tudnak a sejtekbe bejutni. A dyngo4a -t 4 különböző koncentrációban alkalmaztuk: 5 μM , 10 μM , 20 μM és 40 μM , 15 perces inkubációs időt alkalmazva. A dinamin inhibitor működését a Transferrin AFDye 647 anyaggal követtük nyomon, amelyet minden esetben 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációbanban használtunk 15 perces inkubációs idővel. Az AlexaFluor532-vel és a naftofluoreszcinnel jelölt penetratin koncentrációján nem változtattunk, de a sejtekhez közvetlenül a mérés előtt adtuk hozzá őket, a DAPI- oldattal együtt. Ezt követően a FACS Aria áramlási citométer segítségével kezdetben 5 mérési pontot detektáltunk, a későbbiekben ezt a mérési metódust folyamatos mérésre cseréltük.

3.1.6 A sejtpenetráló peptidek lizoszomális degradációjának vizsgálata

A sejtpenetráló peptidek lizoszomális degradációjának vizsgálata során annak a lehetőségét vizsgáltuk, hogy a fluoreszcensen jelzett sejtpenetráló peptid a bejutást követően kiszabadul az endolizoszomális rendszerből. Mennyiben a lizoszómákban reked és lebomlik, a szabaddá váló fluorofórok jutnak csak át az endolizoszomális rendszer membránján így csak a festék fluoreszcencia intenzitása detektálható a citoplazmában. A kísérletet az E-64d nevű cisztein proteináz inhibitorral végeztük el. A sejteket 10 nM koncentrációjú atovastatinnal kezeltük 48 óráig emellett, floretines kezelést is alkalmaztunk 10 percen keresztül. A megfelelő kezeléseket követően az adott mintákhoz hozzáadtuk a proteináz inhibitorral 10 mM-os koncentrációban. 5 perces inkubációs idő elteltével hozzáadtuk a fluoreszcensen jelölt sejtpenetráló peptideket és DAPI-t tartalmazó oldatot a sejtekhez, majd azonnal elindítottuk a mérést az áramlási citométeren.

3.1.7 A β -penetratin sejtbe történő bejutásának vizsgálata konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp és áramlási citométer segítségével

A módosított β -penetratin sejtbe történő bejutását szerettük volna vizsgálni az α -penetratinnal való vizsgálatokat alapul véve, majd összehasonlítani az eredményeket. A kísérlet során a sejtek 8-lyukú kamrában voltak letapadva. AlexaFluor532-vel és a naftofluoreszcinnel jelölt penetratin-oldattal való inkubáció 20 percet, míg a DAPI-val való kezelés 5 percet vett igénybe, azután PBS segítségével kimostuk a felesleges fluoreszcens oldatot, majd a Zeiss LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével készítettünk képeket.

Az áramlási citométeres mérések esetén a sejtek sejtuszuszenzióban voltak, a korábban leírtakhoz hasonlóan. Az AlexaFluor532-vel és a naftofluoresceinnel jelölt penetratin koncentrációján és kezelési idején nem változtattunk. A mérést FACS Aria áramlási citométer segítségével végeztük.

3.1.8 A β -penetratin önkioltó tulajdonságának vizsgálata

A naftofluoresceinnel jelölt β -penetratinról kapott áramlási citométerrel, és mikroszkóppal végzett vizsgálatok eredmények, jelentősen eltérnek az AlexaFluor532-vel jelölt penetratinhoz képest. Ezen eltérések lehetséges magyarázatául szolgál a „self-quenching” avagy az önkioltás jelensége. Két különböző közegben végeztük a méréseinket: PBS-ben, mint hidrofíl, trifluoretanolban (TFE), mint hidrofób közeg. Mintáink tartalmaztak AlexaFluor532 szabad festéket, AlexaFluor532-vel jelölt α és β -penetratint illetve naftofluorescein szabad festéket, naftofluoresceinnel jelölt α és β -penetratint. Öt különböző koncentrációjú oldatot készítettünk a mintákból: 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M. méréseket a Yobin Yvon Fluorolog spectrofluorométerrel végeztük.

3.1.9 A penetratin felvételének küszöbkoncentrációjának meghatározása

Két különböző sejt típuson alkalmaztuk az α illetve a módosított β -penetratin fluoreszcensen jelölt változatát. Az Alexa Fluor532-penetratin és az NF-penetratin felvételét 7 koncentrációban vizsgáltuk: 0 μ M, 100nM, 500nM, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M. A mérést áramlási citometriával vizsgáltuk inkubációs idő nélkül.

3.1.10 A penetratin aggregációs képességének vizsgálata FRET méréssel

A fluoreszcensen jelölt penetratinok aggregációs képességének feltérképezésére konfokális lézer-pasztázó mikroszkóp segítségével végeztünk FRET méréseket. AlexaFluor532-vel és Cy5-tel jelölt penetratinokat alkalmaztunk: ezen fluorofórok jó párosítást alkotnak a FRET mérés szempontjából. 20 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk a sejteket 5 μ M donorról (AlexaFluor532) jelölt és 5 μ M akceptorral (Cy5) jelölt módosítatlan (α) és módosított β -penetratinnal.

3.2 Plazmamembrán által indukált helyi ligandum-koncentrációs gradiensek vizsgálata

3.2.1 Alkalmazott sejtvonalak

A kísérletekhez két sejtvonalat alkalmaztunk: olyan CHO sejtekből hoztuk létre, amelyek endogén módon nem expresszáltak ErbB fehérjét. Az F1-4 sejtvonala stabilan GFP-vel jelölt EGFR-t expresszál, és ezt alkalmaztuk az EGFR-specifikus hatások jellemzésére más ErbB fehérjék befolyása nélkül. Az F1-4_ErbB2 sejtvonala az F1-4 sejtek transziens transzfektálásával hoztuk létre CFP-vel jelölt ErbB2-vel, és ezt az ErbB2 együttes expressziójának esetleges hatásának vizsgálatára használtuk.

3.2.2 A fluoreszcens EGF sejtmembrán közelében lévő koncentrációjának és diffúziós állandójának meghatározása a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával

Az F1-4 sejteket 10 nM fluoreszcensen jelölt TAMRA-EGF jelenlétében inkubáltuk, és a peptid növekedési faktor koncentrációját a plazmamembrántól 100 μm távolságig mértük: a membrántól számított minden 1 μm -es távolságban 20 μm -ig, majd minden 10 μm -nél egészen 100 μm -ig. A mérést Nikon-konfokális és STORM szuperfeloldású mikroszkóppal végeztük.

3.2.3 A sejtmembrán körforgásának gátlása

Ezt a gátlást 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 kezelőanyagokat 5 μM , 50 μM és 50 μM koncentrációban használtuk 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 méréseket szintén FCS technika révén valósítottuk meg.

3.2.4 Extracelluláris mátrix emésztése

Az extracelluláris mátrix emésztéséhez a sejteket 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kollagenázzal (C8176, Sigma- és 20 U/mL hialuronidázzal 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 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 módszert és beállításokat eszközöltük.

3.2.5 Ioncsatornák blokkolása

A sejteket naringeninnek kezeltük annak érdekében, hogy a kétpórusú ioncsatorna 2 aktivitását gátoljuk. A naringenint 1mM koncentrációban 30 percig 37°C-on alkalmaztuk, és az inhibitor az FCS mérés teljes időtartama alatt jelen volt. Az FCS mérés az eddigiekben leírtak alapján zajlott.

3.2.6 GPMV-k környezetében vizsgált TAMRA-EGF koncentrációs gradiensek

A GPMV-eket ozmotikus vezikulációval állítottuk elő. A sejteket kétszer átmostuk hipotóniás mosópufferrel, majd 12 órás inkubációt alkalmaztunk 37°C-on, hipertóniás vezikulációs pufferrel. A GPMV-eket tartalmazó felülúszót egy 8 lyukú poli-L-lizinezett kamrába osztottuk szét. A vezikulumokat 10 nM TAMRA-EGF-vel inkubáltuk, és a konfokális térfogatban lévő részecskeszámát (N) valamint a diffúziós együtthatóját FCS segítségével határoztuk meg, az eddigiekben leírtaknak megfelelően.

3.2.7 A viszkozitás mérése BODIPY-alapú molekuláris rotorral

A moláris rotormolekulák fluoreszcens élettartama a viszkózus környezetekben megnő. Erre alapozva 8-Phenyl-BODIPY 505/515-t adtunk az F1-4_ErbB2 sejtekhez, és a festék fluoreszcencia-élettartamát mértük TCSPC módszerrel mértük.

4 Eredmények

4.1 A floretin, a 6-ketokolesztanol és az atorvasztatin hatása a dipóluspotenciálra

A csökkent dipóluspotenciál szignifikánsan fokozta mind a penetratin teljes sejtfelvételét, és annak koncentrációját a nem savas kompartmentekben, SKBR-3, MDA-MB-231 sejtekben egyaránt. Az egyik legjelentősebb eredmény a penetratin felvételének szempontjából, a citoszolban mért koncentrációjára (az NF-penetratin intenzitás alapján) vonatkozik: 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 sejtfelvételére, mind az endo-lizoszomális felszabadulására. Az MDA-MB-231 sejtek atorvasztatinnal való kezelése 1 nM, 10 nM, 100 nM és 10 µM koncentrációtartományban szignifikánsan fokozta a penetratin endo-lizoszomális felszabadulását, miközben a teljes sejtfelvételre csak kis hatással volt. Ezzel szemben az atorvasztatin SKBR-3 sejtekre gyakorolt hatása csekélyebb volt, és a kisebb koncentrációk esetében (1 nM, 10 nM) nem érte el a statisztikai szignifikanciát, amely azzal magyarázható,

hogy e sejtvonal koleszterintartalmának csökkenése kisebb mértékű volt. Magasabb atorvasztatin-koncentrációk esetén (100 nM és 10 μ M) atorvasztatin szignifikánsan csökkentette a penetratin teljes sejt felvételét az SKBR-3 sejtekben. Ezt az eredményt a sztatinkezelés által gátolt endocitózissal magyarázhatjuk. A penetratin endo-lizoszomális kompartmentből való kilépésének mértéke szignifikánsan magasabb volt ezekben a magas atorvasztatin-koncentrációkkal kezelt sejtekben, még abban az esetben is, ha a teljes sejt felvétel alacsonyabb volt. Ezt alátámasztja az, hogy NF/AlexaFluor532 intenzitásarány majdnem a kétszeresére növekedett, amely a penetratin endoszómákból való kiszabadulásának mértékét jellemzi.

4.2 A penetratin jellemzően endocitotikus útvonalakon jut be a sejtekbe

A Dyngo4a a dinamin inhibitora. Annak ellenére, hogy dinamin gátlása nem feltétlenül blokkolja az endocitotikus folyamatok minden típusát, ezek a kísérletek az endocitózis domináns szerepére utalnak a penetratin felvételében. A kezeletlen sejtekhez viszonyítva az inhibitor szignifikánsan, 50%–80%-kal csökkentette a fluoreszcens penetratinok teljes sejt tartalmát és citoplazmatikus koncentrációját.

4.3 A penetratin lizoszomális degradációja megváltoztatott dipóluspotenciál mellett is elhanyagolható

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a lizoszomális degradáció milyen mértékben járul hozzá a naftofluorescein-fluoreszcencia növekedéséhez, a penetratin felvételi kísérleteket aloxistan (E-64d), a lizoszomális cisztein-proteázok inhibitorával hajtottuk végre. Az eredmények azt mutatták, hogy a penetratin degradációja nem játszik jelentős szerepet az általunk megfigyelt fluoreszcenciaintenzitás-változásokban a 20 perces mérési időablak esetében. Úgy véljük, hogy a jelentős mértékű lizoszomális degradációhoz a sejtekbe jutó peptidek esetében hosszabb inkubációs idő szükséges. Megállapítottuk tehát, hogy a penetratin lizoszomális degradációjának hozzájárulása a citoszolban történő felhalmozódásához elhanyagolható, az atorvasztatin és floretin kezelés hatására megváltoztatott dipóluspotenciál körülményei között is.

4.4 Az α -penetratin és a β -penetratin koncentrációfüggő felvételének vizsgálata konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal és áramlási citométerrel

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, ezáltal az NF sejthez kötött fluoreszcenciája az endo-lizoszomális kompartmenten kívülről származik. Erre alapozva feltételezzük: az AlexaFluor532-penetratin és NF-penetratin fluoreszcenciaintenzitása valóban a teljes sejtes penetratin-felvételt, illetve a sejten belüli, endoszómán kívüli mennyiséget tükröz. Ezt az eredményt szeretnénk volna összevetni a β -penetratinnal végzett kísérletek eredményeivel is, illetve áramlási citométeres mérésekkel is alátámasztani. Az AFDye532-penetratin sejtes fluoreszcenciája arányos a penetratin teljes sejt felvételével. Az NF-penetratin intenzitása a nem savas kompartmentekben (elsősorban a citoszolban) lévő koncentrációját jellemzi, míg az NF- és AFDye532-jelölt penetratin intenzitások aránya feltárja a sejten átjutó peptid savas kompartmentekből való kijutásának mértékét. A konfokális mikroszkópos képeken jól látható, hogy a β -penetratin mindkét sejt vonal esetén több sejtben mutat homogén eloszlást, ami arra enged következtetni, hogy a hatékonyabb bejutás mellett, az endolizoszomális rendszerből is kijut. Ez különösen az AlexaFluor532-vel jelölt penetratin esetén figyelhető meg.

Az áramlási citométeres mérések eredményei is szignifikáns különbséget mutatnak az α és a β -penetratin fluoreszcens intenzitása, ezáltal a sejtbe történő bejutás és az endolizoszomális rendszerből való felszabadulás tekintetében. Az eredmények tükrözik a fluoreszcencia intenzitásból következtetett bejutási hatékonyság eredményét: a β -penetratin körülbelül négyszer akkora intenzitás értékeket vesz fel mint az α -penetratin az AlexaFluor532-vel jelölt mintákat tekintve, mindkét sejt vonal esetén. Továbbá a AlexaFluor532-vel jelölt β -penetratin fluoreszcencia intenzitása, amelyek az α -penetratin fluoreszcencia intenzitásához lettek normalizálva, négyszer akkora értékeket vesz fel.

Továbbá azonosítottuk, hogy a penetratin celluláris felvétele koncentrációfüggő folyamat, amelyre 5 μ M-os peptidkoncentrációs határérték jellemző. Az 5 μ M-os küszöbkoncentráció eléréséig az intenzitás jelentősen nem változik, de a küszöbérték elérése után a folyamat robbanás szerűen 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.

4.5 A naftofluoreszceinnel jelölt penetratin önkioltást produkál

Az eredmények azt mutatják, hogy a két festék közül a naftofluoreszcein mutatja az önkioltás jelenségét, hiszen fluoreszcencia intenzitása mind vizes közegen (PBS), mind hidrofób közegen (TFE) elmarad a lineáris összefüggés esetén várható értéktől amely a moláris koncentráció és a fluoreszcencia intenzitás összefüggéséből ered. A penetratinnal való konjugáció a naftofluoreszcein önkioltó jellegét csökkentette (valószínűleg az önaggregációs hajlam csökkentésén keresztül), de a β -penetratinnal konjugált naftofluoreszcein esetében ismét jelentős mértékű önkioltás volt jellemző. Ez arra utal, hogy a β -penetratin valószínűleg nagyobb aggregációs hajlamot mutat, mint az α -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 β -penetratinnal konjugált AlexaFluor532 már mind vizes, mind hidrofób közegen enyhe önkioltást mutatott.

4.6 A β -penetratin aggregálódó képessége nagyobb

A méréseket FRET módszerrel hajtottuk végre: a AlexaFluor532-vel és Cy5-tel jelölt penetratinokat jó párosítást alkotnak a mérés szempontjából mivel spektrálisan kompatibilisek. Mivel a FRET csak akkor hatékony, ha a donor és az akceptor nagyon közel vannak egymáshoz és a hatásfok molekuláris kölcsönhatások révén nő, így magasabb hatásfok esetén nagyobb aggregációs képességet tulajdoníthatunk az adott molekuláknak. Az eredmények szerint a β -penetratin FRET hatásfok értékei közel négyszer magasabb értékeket vesznek fel mint az α -penetratiné. Ebből arra következtethetünk, hogy a β -penetratin aggregációs képessége jóval nagyobb, mint az α -penetratiné, ami a bejutási hatékonyságának kulcsa lehet.

4.7 Fluoreszcens EGF koncentrációjának és diffúziós állandójának meghatározása a sejtmembrán közelében fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával

Az EGF koncentrációja a membrán közvetlen közelében egy csúcsot mutatott, amely kb. 5 μm -re terjedt ki a membrántól, és amelynek maximális koncentrációja háromszorosa volt a szabad oldatban mérhető koncentrációnak. Ez a membrán-közeli csúcs az F1-4_ErbB2 sejtekben is megfigyelhető volt, az F1-4 sejtekben egy második, távolabbi EGF-csúcs is megjelent, amelynek nagysága hasonló volt a membrán-közeli csúcshoz, és a membrántól kb. 10–20 μm -re helyezkedett el. A konfokális térfogatban levő részecskeszám, és a diffúziós állandó alapján 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 szerint 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.

4.8 A sejtmembrán körforgásának gátlása megszüntette a membránközeli csúcsot

A háromkomponensű koktél amely latrunculin B-t, para-amino blebbistatint és mirisztoilezett dinaminnövekedést gátló peptidet tartalmazott, megszüntette a membránközeli csúcsot, de egy másikat hozott létre helyette. Az utal arra, hogy ez az új membránközeli koncentrációcsúcs más, mint a korábban detektált és hogy az új koncentrációcsúcs kiterjedése nagyobb illetve a diffúziós együtthatóval negatívan korrelál.

4.9 Ioncsatornák blokkolása szintén megszüntette a membránközeli csúcsot

A latrunculin, para-amino blebbistatin és mirisztoilezett dinaminnövekedést gátló peptidet tartalmazó koktéllal történő kezelés eredménye arra utal, hogy ezen csúcs kialakulásában a membránkörforgalom szerepet játszik. Azonban az exocitózis inhibitoraként széles körben használt monensin, nem tudta megszüntetni a membránközeli ligandumkoncentrációs csúcsot. Ez megmagyarázhatja azt, hogyan vezethet a membránforgalom – azaz az endocitózis és exocitózis nagyon gyors egymásutánja – membránközeli ligandumkoncentrációs csúcs kialakulásához: az endocitált tartalom azonnali vissza-exocitózisa lehet a felelős, miután az endoszómák zsugorodása miatt koncentrációzott. A kétpórusú ioncsatornák szerepet játszhatnak ebben a folyamatban így az F1-4_ErbB2 sejtek naringeninnel kezeltük, amely szignifikánsan csökkentette a membránközeli csúcs nagyságát, miközben nem befolyásolta a membrántávoli csúcsot. Érdeemes megjegyezni, hogy a membrántávoli csúcs alakja ezekben a kísérletekben némileg eltér a korábbiaktól.

4.10 GPMV-k körül a ligandumkoncentráció teljesen homogénnek mondható F1-4 sejtek esetén

A GPMV-k összetételük nagyban hasonlít a plazmamembránéhoz, ugyanakkor nem mennek keresztül membránforgalmon. Az F1-4 sejtekből előállított GPMV-k körül a ligandumkoncentráció teljesen homogénnek bizonyult, azonban az F1-4_ErbB2 sejtek esetében membránközeli csúcs jelent meg. Mivel ez a koncentrációs csúcs fordítottan korrelált

a diffúziós együtthatóval, ezért helyileg gátolt diffúzió hozhatta létre, amely a képződésük során a felszínükre rakódó extracelluláris mátrix-komponensekből állhat. Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a membránközelbeli EGF-koncentrációs csúcs létrejöttéhez aktív membránforgalmat mutató élő sejthártya szükséges.

4.11 Extracelluláris mátrix emésztése megszüntette a membrántól távolabbi csúcsot

Megmértük a diffúziós együttható és az EGF koncentráció korrelációját kollagenáz és hialuronidáz keverékével kezelt F1-4_ErbB2 sejtekben. Bár a kezelés megszüntette a membrántól távolabbi csúcsot, egy nagyon erős ligandumkoncentráció-csúcsot eredményezett közvetlenül a membrán közelében. 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 lebonthatásának és fragmentumainak plazmamembránon való lerakódásának tulajdonítjuk.

4.12 A távoli ligandumkoncentráció-csúcsot a lokális viszkozitás maximuma okozza

A BODIPY-alapú molekuláris rotor fluoreszcencia-élettartama a lokális mikroviszkozitást jelzi. Sejtek hiányában a szenzor élettartama állandó volt a közegben, míg F1-4_ErbB2 sejtek membránja fölött 10–20 μm -rel maximumot mutatott, jelezve a lokális mikroviszkozitás növekedését. Kollagenáz és hialuronidáz kombinációval kezelt sejtek esetében ez a magas viszkozitású régió a membrán közelébe helyeződött át hasonlóan, ahogy a diffúziós együttható lokális minimuma közvetlenül a membrán fölött volt az emésztőenzimekkel kezelt sejtekben. Következésképpen elmondható, hogy F1-4_ErbB2 sejtekben a membrántól 10–20 μm -re lévő ligandum koncentrációcsúcsot a lokális viszkozitás maximuma okozza, ami valószínűleg az extracelluláris mátrix komponenseinek jelenlétéből ered.

5 Diszkusszió

Számos sejtbiológiai folyamat kiindulópontja a sejtmembránon keresztül történő transzport. Munkám során két olyan jelenségre fókuszáltam, amelyek szabályozásában a membránhoz kapcsolódó folyamatok kulcsszerepet játszanak. Elsőként a sejtpenetráló peptidek (SPP-k) sejtekbe jutását vizsgáltam. Bár az SPP-k membránon való átjutásának képessége régóta ismert, hatékonyságukat nagymértékben korlátozza az endolizoszómákból való kiszabadulás nehézsége. Ezért a kutatás első részében a plazmamembrán biofizikai tulajdonságait és azokat a tényezőket tanulmányoztam, amelyek befolyásolják az SPP-k felvételének hatékonyságát.

Megfigyeléseink szerint a membrán magas dipóluspotenciálja akadályozza a penetratin teljes sejt felvételét, valamint az endolizoszomális rendszerből való kiszabadulását. Ezt az AlexaFluor532- és NF-jelölt penetratin sejten belüli intenzitásának időbeli alakulása támasztotta alá. A dipóluspotenciál hatása legnagyobb valószínűséggel a sejtbe jutó peptid membránba épülésén keresztül érvényesül, mivel annak tulajdonságait módosítja. Ismert ugyanis, hogy peptidok és kis hidrofób molekulák membránba való beépülése és penetrációja erősen függ a dipóluspotenciáltól. Bár az endocitózisa gyakorolt hatása feltehetően kisebb, a peptid membránhoz való kötődése a dipóluspotenciál függvényében szintén változhat. A membrán biofizikai tulajdonságainak elemzése alapján kiderült, hogy a vizsgált jellemzők közül kizárólag a dipóluspotenciál szolgáltat elegendő információt a penetratin felvételének mértékéről. A penetratin pozitív töltése érthető magyarázatot ad arra, hogy a pozitív dipóluspotenciál miért korlátozza a membránon való átjutását, és ez az elv más kationos SPP-k esetében is érvényes lehet. A floretin és az atorvasztatin kezelések csökkentették a membrán dipóluspotenciálját, és jelentősen növelték a penetratin citoplazmatikus koncentrációját. Kiemelendő, hogy az atorvasztatin nanomoláris koncentrációban történő alkalmazása megegyezik a klinikumban használt dózissal, így a sztatin által fokozott penetratin-felvétel potenciálisan orvosi jelentőséggel bír. Érdekes módon, bár az atorvasztatin nagyobb mértékben csökkentette a dipóluspotenciált, kizárólag az endolizoszómákból történő kiszabadulást segítette elő, míg a floretin a teljes sejt felvételt fokozta. Utóbbi esetben feltételezhető, hogy a rövid, 10 perces inkubáció során a floretin nem éri el az intracelluláris membránokat szükséges mennyiségben, ezért az endolizoszómák dipóluspotenciálja változatlan marad. Az atorvasztatin háromnapos kezelése viszont elegendően hosszú ahhoz, hogy a koleszterinszint jelentősen csökkenjen, és ennek következtében az endo-lizoszomális membránok dipóluspotenciálja is mérséklődjön. A floretin által kiváltott csekély dipóluspotenciál-csökkenés és a penetratin jelentősen fokozott felvétele közötti kettősség azt sugallja, hogy a fiziológiás dipóluspotenciál eleve erősen korlátozza a felvételt. Ezt támasztja alá, hogy a 6-ketokolesztanollal megnövelt dipóluspotenciál alig befolyásolta a penetratin felvételét, ugyanakkor a floretin által okozott kisebb mértékű csökkenés már elegendő volt a felvétel fokozásához. Az atorvasztatin jelentősebb dipóluspotenciál-csökkenést idézett elő, de nem növelte a penetratin teljes sejt koncentrációját. Az AlexaFluor532-penetratin gyors intenzitásnövekedése és az NF-penetratin elnyújtott jelváltozása arra utal, hogy a kezdeti felvétel endocitózissal történik, amelyet egyik kezelés sem módosított. Így az atorvasztatin-kezelés során nem nőtt meg a teljes penetratin-felvétel, ami az endocitózis gátlására utal. Ez különösen fontos, mivel az endocitózis során a molekulák az endolizoszomális rendszerbe kerülnek, ahol fennáll a degradáció

veszélye, ami akadályozhatja a célhely elérését. Eredményeink ugyanakkor azt mutatják, hogy fluoreszcensen jelölt penetratin esetében a lizoszomális degradáció mértéke elhanyagolható, függetlenül a dipóluspotenciál változásától.

A membrán biofizikai tulajdonságait befolyásoló kezelések mellett más stratégiákat is kipróbáltunk az SPP-k felvételének hatékonyabbá tételére. Ennek keretében egy szerkezetében módosított sejtpenetráló peptidet vizsgáltunk, amelyet a Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézetének kutatócsoportja szintetizált (a részletek nem publikálhatóak). Vizsgálataink kimutatták, hogy a módosított β -penetratin önmagában, dipóluspotenciált befolyásoló kezelések nélkül is jelentősen hatékonyabban jut be a sejtekbe, miközben fokozottan hajlamos aggregációra (FRET és önkioltási kísérletek alapján). A homogén, erős jelintenzitás azt mutatja, hogy könnyen kiszabadul az endolizoszomális rendszerből, és eljut a citoplazmába. Ez alátámasztja az SPP-k orvosi alkalmazhatóságát, hiszen a terápiás célokra hordozóként használt peptideknek is hasonló hatékonysággal és tulajdonságokkal kell rendelkezniük.

Eredményeink új megvilágításba helyezték a plazmamembránról alkotott képünket. A korábban statikus határfelületként felfogott membrán, jelenlegi információk tudatában egy dinamikus, térben és időben folyamatosan változó rendszerként írható le. Jelen munkánkban nemcsak bizonyítékokat mutattunk be arra, hogy ez a dinamizmus miként módosítja a ligandumok koncentrációját a membrán közvetlen környezetében, hanem a jelenség lehetséges következményeit is elemeztük. Ha az eredményeket sejtbiológiai folyamatok összefüggésében kívánjuk értelmezni, fel kell tennünk a kérdést: milyen mechanizmusok képesek stabil koncentrációgradiensek létrehozására? Fizikai elvek és korábbi megfigyelések alapján koncentrációgradiensek két módon alakulhatnak ki:

(1) a diffuzivitás lokális változásai, vagyis a diffúziós együttható térbeli eltérései által; illetve
(2) folyamatos, lokális termelés következtében – ez utóbbi ismert mechanizmus például morfogének esetében. Mivel a diffúzió önmagában gradiensek kiegyenlítésére törekszik, nem hozhat létre stabil koncentrációkülönbséget. A diffúziós együttható tartós, térben és időben stabil mintázata azonban képes gradienst fenntartani, amely létrejöhet (1) kapcsolásszerű, lokálisan szabályozott konformációváltozások, (2) viszkozitás-gradiensek, vagy (3) méretfüggő diffúziós állandó-változások révén a membránfelszín közelében. Utóbbi lehetőséget kizárhatjuk, mivel csak az EGF-nél jóval nagyobb molekulák esetében jelentős, ráadásul csupán nanométeres skálán, míg a mi eredményeink mikrométeres távolságban is kimutatható gradienst mutattak. A membrán fluktuációja sem magyarázat, mert az eltérő

autokorrelációs függvényt eredményezett volna, amit nem tapasztaltunk. Az EGF esetében nem ismertek diffuzivitást befolyásoló konformációs változások, így ez a lehetőség is kizárható. Hasonlóképpen, a lokális viszkozitás-gradiensek sem állják meg a helyüket, mivel az EGF-gradiens nem korrelált a diffúziós együtthatóval. Mindezek alapján a membránhoz közeli EGF-koncentrációs csúcs kialakulását legvalószínűbben egy folyamatos, lokális forrás magyarázza.

Fontos hangsúlyozni, hogy sem a receptorokhoz, sem a lipid kettősréteghez való reverzibilis, egyensúlyi kötődés nem képes tartós koncentrációgradienst létrehozni, mert a diffuzivitás változása nélkül a koncentrációcsúcs kiegyenlítődik. A gradiens fenntartásához ezért állandó forrás szükséges. Biofizikai szempontból a membránközeli ligandum-gradiensre a következő állítások igazak:

- spontán módon nem alakulhat ki, mivel sértené a termodinamika második főtételét;
- kialakulásához mindenképpen aktív biológiai folyamat szükséges (amit az is jelez, hogy GPMV-kben nem figyelhető meg);
- a gradiens időbeli stabilitása arra utal, hogy az aktív folyamat biológiai egyensúlyi állapothoz vezet.

Kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy mely folyamat képes időben stabil, membránközeli ligandum-gradienst létrehozni. Az aktin polimerizációt, miozin- és dinamin-aktivitást, valamint a membránforgalmat blokkoló inhibitoroktól hatására a membránközeli koncentrációcsúcs eltűnt, ugyanakkor egy új, eltérő jellegű csúcs jelent meg. Kezeletlen F1-4 sejtekben a koncentrációcsúcs 5 μm -en belül helyezkedett el a membrántól, és nem mutatott összefüggést a diffúziós együtthatóval. Inhibitor-kezelés után viszont $\sim 10 \mu\text{m}$ -ig terjedt, és fordított korrelációt mutatott a diffúziós együtthatóval. Ez utóbbi magyarázható a latrunculin-B exocitózist kiváltó hatásával, amely gyors vezikulum felszabadulást indukál. Bár nem ismert, milyen molekulák szabadulnak fel, a diffúziós együttható és a részecskeszám közötti negatív korreláció egyértelműen diffúziós gát jelenlétére utal. Ahhoz, hogy a membránközeli koncentrációcsúcs fennmaradjon, feltételeznünk kell, hogy a membránforgalom – az endocitózissal internalizált anyagok ismételt exocitózisa – biztosítja a szükséges utánpótlást. Szimulációink alátámasztották, hogy mind a ligandumhoz kötött receptorok, mind a szabad ligandumok újramegjelenése képes fenntartani a gradienst. Ezt erősíti, hogy a monenzin, a klasszikus exocitikus útvonalak inhibitora, nem fejtett ki hatást, így a membránhoz közeli EGF-csúcsot valószínűleg a membrán dinamikus forgalma okozza. Ez a folyamat különböző módokon – „kiss-and-run”, „open and closed” vagy „flicker” exocitózis – valósulhat meg,

melyek során nem teljes vezikulák alakulnak ki, illetve nem teljes mértékben ürülnek ki. Hasonló mechanizmust írtak le például a PECAM esetében, amelyet funkcionálisan eltávolítanak a membránról anélkül, hogy endocitálnák, majd rövid időn belül újra megjelenik a sejtfelszínen. Ezek a mechanizmusok elegendő forgalmat biztosíthatnak a membránközeli EGF-csúcs fenntartásához.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az endoszómák vagy makropinoszómák zsugorodása és ezt követő exocitózisa állhat a jelenség hátterében. A kétpórusú ioncsatornák szerepe már ismert az endoszómák érésében és zsugorodásában, és az a megfigyelés, hogy a narigenin – ezen csatornák inhibitora – szignifikánsan csökkentette a membránközeli EGF-csúcsot, tovább erősíti ezt a feltételezést.

A membrán közvetlen közelében azonosított koncentrációcsúcs mellett egy másikat is detektáltunk, amely távolabb helyezkedik el. Ez az EGF-csúcs a lokális viszkozitás növekedésével magyarázható, mivel fordított összefüggést mutatott az EGF diffúziós együtthatójával. Számításaink igazolták, hogy az EGF diffúziós együtthatójának megfigyelt csökkenése elegendő a koncentrációcsúcs létrehozásához. A BODIPY molekuláris rotor megnövekedett élettartama ezen a tartományon szintén megerősíti, hogy a magasabb mikroviszkozitás lassítja a diffúziót. Bár a megnövekedett viszkozitás pontos forrását nem tudtuk meghatározni, az a tény, hogy kollagenáz- és hialuronidáz-kezelés hatására a koncentrációcsúcs eltolódott az F1-4_ErbB2 sejtekben, arra utal, hogy az extracelluláris mátrixhoz kapcsolódik. Érdekes módon CHO-eredetű sejtvonalainkban ez az EGF-csúcs kizárólag az ErbB2-t expresszáló sejtekben jelent meg, de más sejttípusokban valószínűleg ErbB2-függetlenül is kialakulhat.

Összességében tehát kimutattuk, hogy egy növekedési faktor membránközeli eloszlása nem homogén. Két különálló koncentrációcsúcsot azonosítottunk: az egyik az aktív membránforgalomhoz, a másik a lokálisan gátolt diffúzióhoz kapcsolódik. Ezek a jelenségek jelentősen befolyásolják a plazmamembrán közelében mérhető ligandumkoncentrációt az átlag koncentrációhoz képest, így alapvetően módosíthatják a dózisfüggő sejtválaszokat. Úgy véljük, hogy eredményeink figyelembevétele elengedhetetlen a kvantitatív sejtbiológiai kísérletek értelmezése során, különösen akkor, amikor transzmembrán receptorok stimulációját vizsgáljuk.

6 Összefoglalás

A sejtpenetráló peptidek (SPP-k) vizsgálatát az a probléma indokolta, hogy a sejtmembrán kettős foszfolipid-rétege a legtöbb molekula számára áthatolhatatlan. Az SPP-k olyan oligopeptidek, amelyek képesek önmaguk, illetve más, a membránon átjutni nem képes molekulák sejtbe történő bejuttatására. Az értekezés középpontjában a penetratin áll, amely a *Drosophila Antennapedia* transzkripciós faktorából származik. Kísérleteink eredményei a következőkben foglalhatók össze:

- Dyngo4a inhibitor alkalmazásával igazoltuk, hogy 5 μM koncentrációban a penetratin elsősorban dinamin-függő endocitózissal jut a sejtekbe.
- A penetratin felvétele a membrán dipóluspotenciáljától függ: az atorvasztatin annak csökkentésével fokozza az endolizoszomális felszabadulást, míg a 6-ketokolesztanol a membrán merevségének növelésével gátolja a bejutást.
- A peptid endoszómákban és lizoszómákban akkumulálódik, azonban cisztein-proteázok gátlása révén arra az eredményre jutottunk, hogy a lizoszomális degradáció mértéke nem jelentős
- A β -penetratin szignifikánsan hatékonyabb sejtfelvételt mutat, amely fokozott aggregációs hajlamával magyarázható (FRET és fluoreszcencia-kioltási vizsgálatok).

Az eddig ismert hagyományos modellek homogén extracelluláris ligandumeloszlást feltételeznek, eredményeink azonban arra utalnak, hogy a plazmamembrán aktív forgalma és az extracelluláris mátrix (ECM) inhomogén eloszlást, valamint membránközeli koncentrációcsúcsokat hoz létre. Ez közvetlenül befolyásolja a receptorok – például az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) – működését. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával kimutattuk, hogy a membrántól 10–20 μm -re megjelenő EGF-koncentrációcsúcs a diffúziós állandó lokális minimumával esik egybe, amely az ECM-hez köthető (kollagenáz- és hialuronidáz-kezelés). Ezzel szemben az 1–5 μm -es tartományban detektált koncentrációcsúcs a membrán aktív körforgásának következménye, és kizárólag élő sejtekben jön létre (GPMV-ben nem).

Összességében a két alprojekt eredményei egyértelműen jelzik, hogy a plazmamembrán dinamikája és az ECM lokális szerveződése alapvetően meghatározza a transzmembrán transzport és a ligandumkötődés biofizikai környezetét.

7 Új megállapítások/ eredmények

A sejtpenetráló peptidek transzportjának szabályozása szempontjából a kutatás egyik legfontosabb megállapítása, hogy a membrán dipóluspotenciálja az a kulcsfontosságú biofizikai paraméter, amely korlátozza a kationos, pozitívan töltött SPP-k, mint például a penetratin sejtfelvételét és endolizoszomális felszabadulását. Igazolást nyert egy jelentős farmakológiai moduláció lehetősége: a floretin és az atorvasztatin csökkentik a dipóluspotenciált, ezzel növelve a penetratin citoplazmatikus koncentrációját. Ennek klinikai relevanciája abban rejlik, hogy az atorvasztatin már nanomoláris, a klinikumban jelenleg is alkalmazott, dózisban is elősegíti a peptidek endolizoszómákból való kiszabadulását a koleszterinszint csökkentésén keresztül.

Továbbá egy sikeres szerkezeti módosítás ígéretes eredményeket mutat: megalkottunk egy új, módosított β -penetratin variánst, amely külső kezelés nélkül is hatékonyabban jut a citoplazmába, bár fokozott aggregációs hajlamot mutat.

A munka második része bizonyítékokat prezentál arra, hogy a sejtmembrán nem statikus határfelület, hanem egy dinamikus, gyorsan változó szerkezet, amely miatt a membrán környezetében a ligandumok, jelen esetben az EGF eloszlása nem homogén. Két különálló koncentrációcsúcsot sikerült azonosítani:

- Aktív membránkörforgás okozta csúcs, amely 0–5 μm távolságra helyezkedik el a membrántól: Ezt a gradienst a folyamatos exo- és endocitózis, az ún. „kiss-and-run” mechanizmus tartja fenn. A kutatás feltárta, hogy a folyamat az endoszómákéréséhez és a kétpórusú ioncsatornák működéséhez kötődik.
- Diffúziós gát okozta csúcs: A membrántól távolabb eső (10-20 μm) koncentrációmaximumot a helyi mikroviszkozitás növekedése és az extracelluláris mátrix (ECM) szerkezete okozza, ami lassítja a diffúziót.

Az eredmények rávilágítanak, hogy a sejtbiológiai folyamatok során a receptorok nem az átlagos („bulk”) oldatkoncentrációval, hanem ezekkel a lokális „csúcsokkal” találkoznak. Bár a koncentrációcsúcsok jelenségét korábban is leírták, a háttérükben álló sejtbiológiai folyamatok azonosítása a mi projektünkhöz fűződik. Ez a felismerés alapvetően módosítja a dóziszfüggő sejtválaszokról és a transzmembrán jelátvitelről alkotott eddigi modelljeinket.

8 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.

