

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Kovács Tamás

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	9
2. Irodalmi áttekintés	10
2.1. A dipólpotenciál.....	10
2.1.1. A dipólpotenciál eredete és nagysága.....	10
2.1.2. A dipólpotenciál fontossága	11
2.1.3. A dipólpotenciál nagyságát meghatározó tényezők és a dipólpotenciál nagyságának kísérletes változtatása	14
2.1.4. A dipólpotenciál mérésére alkalmazott módszerek áttekintése.....	16
2.1.5. A dipólpotenciál mérése aminosztirilpiridinium-származékokkal.....	18
2.1.6. A dipólpotenciál mérése 3-hidroxi flavonokkal.....	22
2.2. Az ErbB fehérjecsald	25
2.2.1. Az ErbB fehérjecsald általános leírása	25
2.2.2. Az ErbB fehérjék felfedezése, ligandjai és jelátviteli útvonalai	26
2.2.3. Az ErbB fehérjék felépítése és aktivációjának klasszikus modellje	27
2.2.4. Az ErbB fehérjék transzmembrán doménje és az aktiváció új modellje	30
2.3. A lipdtutajok	32
2.3.1. A lipdtutajok kezdeti leírása és kapcsolatuk koleszterinnel és szfingolipidekkel.....	32
2.3.2. A lipdtutajok és a fehérjék, avagy új elméletek a lipdtutajokkal kapcsolatban	35
2.3.3. A lipdtutajok szelektív jelölésének lehetőségei.....	36
2.3.4. A lipdtutajok funkciója.....	39
2.3.5. A lipdtutajok és a dipólpotenciál	40
2.4. A Gaucher-kór.....	40
2.4.1. A Gaucher-kór általános jellemzői és a betegség pathomechanizmusa	40
2.4.2. CBE-kezelt differenciáltatott THP-1 sejtek, mint a Gaucher-kór in vitro modellje	42
2.4.3. A Gaucher-kórra jellemző eltérések a sejtmembránban	42
2.4.4. A Gaucher-kór és a lipdtutajok kapcsolata.....	43
3. Célkitűzések.....	45
4. Metodikák (anyagok és módszerek).....	47
4.1. Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztésük.....	47
4.2. Antitestek, növekedési faktorok és egyéb reagensek	48
4.3. Sejtek transziens transzfekciója és a kísérletek során használt plazmidok	49
4.4. Sejtek aktiválása EGF-fel.....	49
4.5. A dipólpotenciál változtatása	49

4.6.	Gaucher-fenotípusú makrofágok előállítására	50
4.7.	Sejtek fluoreszcens jelölése antitestekkel szuszpenzióban és fedőlemezen	50
4.8.	Sejtek jelölése dipólpotenciál-szenzitív di-8-ANEPPS, valamint F66 és PPZ8 fluorofórokkal	50
4.9.	A sejtmembránban található lipidtutajok és non-raft régiók jelölése	51
4.10.	A dipólpotenciált változtató kezelések hatásának meghatározása	51
4.11.	A dipólpotenciál EGF kötődésére gyakorolt hatásának mérése (kompetitív és nem-kompetitív módszerrel)	52
4.12.	A dipólpotenciál ErbB fehérjék asszociációjára gyakorolt hatásának meghatározása FRET módszerrel.....	53
4.13.	A dipólpotenciál ErbB fehérjék asszociációjára gyakorolt hatásának meghatározása N&B módszerrel.....	57
4.14.	A dipólpotenciál változtatás funkcionális hatásának mérése az intracelluláris foszforiláció mérésével	60
4.15.	Az ErbB2 tirozin foszforilációja, raft lokalizációja és a dipólpotenciál mértéke közötti korreláció meghatározása	61
4.16.	A dipólpotenciál mértéke és a membránmikrodomén-markerek intenzitása közötti korrelációs koefficiens meghatározása	62
4.17.	A dipólpotenciál nagyságának meghatározása raft és non-raft membrán régiókban	62
4.18.	A dipólpotenciál nagyságának meghatározása kontroll és Gaucher-fenotípusú THP1-eredetű makrofágokban.....	63
4.19.	Statisztikai elemzés.....	63
5.	Eredmények.....	64
5.1.	6-ketocholestanol és phloretin hatása a dipólpotenciál nagyságára.....	64
5.2.	A dipólpotenciál nagyságának növelésének hatása az EGF receptorhoz való kötődésére ...	66
5.3.	A dipólpotenciál hatása az ErbB1 és az ErbB2 klaszterizációjára	69
5.4.	A dipólpotenciál változtatásának hatása az EGF-indukált jelátvitelre	74
5.5.	Az ErbB2 aktivációja, lipidtutajokban való lokalizációja és a dipólpotenciál közötti korreláció	77
5.6.	Emissziós rációmetrikus festékek válasza a dipólpotenciál változtatására.....	80
5.7.	A dipólpotenciál korrelációja raft és non-raft domén markerek megoszlásával	83
5.8.	A dipólpotenciál nagysága a lipidtutajokban és az egyéb membránrégiókban	89
5.9.	A 3-hidroxi-flavon festékek emissziós spektruma a lipidtutajokban és az egyéb membránrégiókban.....	92
5.10.	A dipólpotenciál változása a Gaucher-kórra karakterisztikus szfingolipid akkumuláció hatására	94
6.	Megbeszélés.....	96
6.1.	A dipólpotenciál és az ErbB fehérjék kapcsolata.....	96
6.2.	A dipólpotenciál és a lipidtutajok kapcsolata.....	105

7.	Összefoglalás	110
8.	Summary.....	111
9.	Irodalomjegyzék	112
10.	Tárgyszavak	134
11.	Köszönetnyilvánítás.....	135
12.	Függelék.....	136

Rövidítések jegyzéke

3-HF:	3-hidroxiflavon
ACAT:	acetyl-koenzim A acetiltranszferáz
BPPZ:	3-(4-{4-[4'-(3-Hidroxibenzo[f]flavonil)fenil]piperazino-1-piridiniumil)-1-propánszulfonát
BSA:	marha szérum albumin
di-4-ANEPPS:	1-(3-szulfonatopropil)-4-[β] [2-(di-n-butilamino)-6-naftil vinil] piridinium-betain
di-8-ANEPPS:	1-(3-szulfonatopropil)-4-[β] [2-(di-n-oktilamino)-6-naftil]vinil]piridinium betain
CBE:	konduritol B epoxid
CTX-B:	koleratoxin B alegység
DAG:	diacilglicerol
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle medium
DMPC:	1,2-Dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfokolin
DMPG:	1,2-Dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfoglicerol
DOPC:	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-foszfokolin
DOPE:	1,2- Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin
DTPC:	1,2-di-o-tetradecil-sn-glicero-3-foszfokolin
ECD:	extracelluláris domén
EGF:	epidermális növekedési faktor
EGFR:	epidermális növekedési faktor receptor
EI-TMS:	electrospray ionization - tandem mass spectrometry
ELISA:	enzim-között immunoszorbens assay
ER:	endoplazmás retikulum
ESIPT:	gerjesztett állapotú intramolekuláris proton transzfer („excited state intramolecular proton transfer)

F4N1:	N-[(4'-dimetilamino)-3-hidroxi-6-flavonil]metil-N,N-trimetil ammónium bromid
F8N1S:	3-[2-(4-(dioktilamino)-3-hidroxi-6-flavonilmetil)(dimetil)ammonio]-1-propánszulfonát
F66 (F66NS):	N-[3-(4'-dihexilamino-3-hidroxi-6-flavonil-6-oxi)-propil]-N,N-dimetil-N-(3-szulfopropil)-ammónium, belső só).
FCS:	fetális borjú szérum
FRET:	Förster/fluoreszcencia rezonancia energia transzfer
FLIM:	fluoreszcencia élettartam képalkotás („fluorescence lifetime imaging”)
GAMIG:	kecske anti-egér immunoglobulin
GBA:	savas β -glükozidáz/glükocerebrozidáz
GFP:	zöld fluoreszcens protein
GM1:	monoszialotetrahexozilgangliozid
GM3:	monoszialodihexozilgangliozid
GPI:	glükozilfoszfatidilinozitol
GxxxG:	Sternberg-Gullick dimerizációs motívum
HDL:	magas sűrűségű lipoprotein
HIV:	humán immundeficiencia vírus
H-N*:	a 3-hidroxi-6-flavon fluorofór gerjesztett állapotú normál, hidrogénkötést kialakító formája
IDL:	közepes sűrűségű lipoprotein
Ig:	immunoglobulin
IP ₃ :	inozitol-1,4,5-trifoszfát
JM-A:	juxtamembrán domén N-terminális szegmense
JM-B:	juxtamembrán domén C-terminális szegmense
JMD:	juxtamembrán domén
LacCer:	laktozilceramid

Ld:	folyékony rendezetlen membrán domén
LDL:	alacsony sűrűségű lipoprotein
Lo:	folyékony rendezett membrán domén
MAB:	monoklonális antitest
MAPK:	mitogén aktivált protein kináz
N*:	a 3-hidroxi flavon fluorofór gerjesztett állapotú normál formája
N&B:	number&brightness
NMR:	magnáneses rezonancia
PBMC:	perifériás vérből származó mononukleáris sejtek
PBS:	foszfát puffer oldat
Pgp:	P-glikoprotein
PI3K:	foszfatidilinozitol-3-kináz
PKC:	protein kináz C
PLC γ :	foszfolipáz C- γ
PMA:	forbol-12-mirisztát-13-acetát
POPC:	1-Palmitoil-2-oleoilfoszfatidilkolin
PPZ8:	3-(4-{4-[4'-(3-hidroxi-6-oktiloxiflavonil)fenil]piperazino)-1-piridiniumil)-1-propánszulfonát
RTK:	receptor tirozin kináz
SH2:	Src homológia 2
So:	szilárd rendezett membrán domén
SREBP-1:	szterol reszponzív elemet kötő fehérje-1
SVD:	szinguláris érték dekompozíció
T*:	a 3-hidroxi flavon fluorofór gerjesztett állapotú tautomer formája
TMD:	transzmembrán domén

TX: Triton-X
VLDL: nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein
YFP: sárga fluoreszcens protein

1. Bevezetés

Napjainkban a biofizikai és sejtbiológiai kutatások egyik fókuszterületét képezik a sejtmembrán membránbiofizikai paramétereinek mérésével, változásaival, illetve azok membránba ágyazódó fehérjékre gyakorolt hatásaival kapcsolatos vizsgálatok. Az egyik legfontosabb biofizikai paraméter (a membrán fluiditása, hidrációja, rendezettsége mellett) a membránpotenciálok megjelenése, illetve azok nagysága. Bár a membránpotenciálnak ismereteink szerint három komponense van, ezek közül elsősorban csak a vizes fázisokban oldott ionok eltérő koncentrációja, valamint permeabilitása révén kialakuló transzmembrán potenciál ismert részleteiben, a felületi, illetve főleg a dipólpotenciálok jelentősége jórészt feltáratlan. Utóbbi különösen érdekes lehet, hiszen a membránhoz asszociálódó vízmolekulák, valamint a membránt felépítő foszfolipidek és szterolok dipóljainak preferenciális térbeli orientációja révén a másik két potenciálnál jóval nagyobb mértékű potenciál jön létre a membrán belsejében, amely hatalmas elektromos erőter kialakulását eredményezi az intramembrán térben. Ennek megfelelően néhány vizsgálat már kimutatta, hogy a dipólpotenciál nagysága jelentősen befolyásolhatja bizonyos fehérjék (például ioncsatornák, Na^+/K^+ ATPáz, P-glikoprotein) konformációját, így végső soron funkcióját is. A tumoros betegségek patogenezisében rendkívüli jelentőséggel bíró receptor tirozin kinázok esetében azonban a dipólpotenciál szerepét még nem vizsgálták.

Manapság a fejlett országokban a rosszindulatú daganatos megbetegedések állnak a mortalitási statisztikák élén. Bár a tumorok kialakulásának hátterében számos tényező tölt be jelentős szerepet, az ErbB fehérjecsaldába tartozó receptor tirozin kinázok kiemelt fontossággal bírnak bizonyos daganatok patogenezisében, így túlműködésüket leírták emlő-, petefészek-, méhnyaktumorokban, gliális agytumorokban vagy gasztrointesztinális karcinómákban. Mivel az ErbB fehérjék aktivációjában bebizonyosodott a transzmembrán domének aktív szerepe és a fehérjék ezen régiója a dipólpotenciál által létrehozott elektromos erőter területén helyezkedik el, felmerül, hogy annak nagysága befolyásolhatja az ErbB-k aktivitását is, amelyet azonban még nem tanulmányoztak.

A dipólpotenciál nagyságának elsődleges meghatározója a sejtmembrán lipidösszetétele. A ma leginkább elfogadott sejtmembrán modellek alapján ezen összetétel jelentős laterális heterogenitást mutat, amely speciális membrán mikrodomének, úgynevezett lipidutajok kialakulásában nyilvánul meg. Ezekről a utajokról kimutatták, hogy különleges, a membrán egyéb régióitól eltérő membránbiofizikai tulajdonságaik révén jelentősen befolyásolhatják a bennük szelektíven dúsuló fehérjék szerkezetét, funkcióját és aktivitását. Ehhez hozzájárulhat a raft mikrodomének speciális összetételéből eredő eltérő dipólpotenciálja is. Bár a feltételezés, amely szerint a utajokban a dipólpotenciál mértéke nagyobb lehet, logikusnak tűnik (és modellmembránok esetében ki is mutatták), ezt azonban még nem bizonyították élő sejtek membránja esetén.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A dipólpotenciál

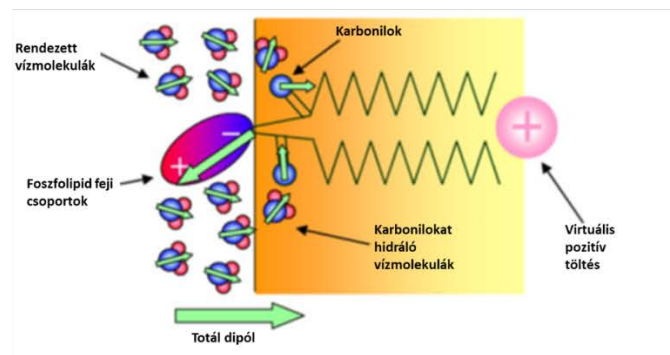
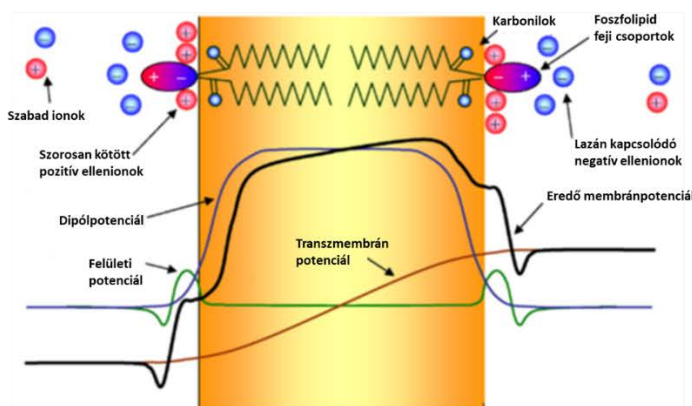
2.1.1. A dipólpotenciál eredete és nagysága

Már az első sejtbiológiai kutatások során kimutatták, hogy a foszfolipid kettősrétegből felépülő sejtmembrán szelektív permeabilitású barrierként viselkedik, így kezdetben azt gondolták, hogy elsődleges funkciója a sejt komponenseinek kompartmentalizációja, az extra- és intracelluláris térrészek elválasztása. Ma már azonban tudjuk, hogy a kezdeti elképzelésektől eltérően mind szerkezete, mind pedig funkciója jóval komplexebb. Az eukarióta sejtmembrán komplexitásának egyik legfontosabb megnyilvánulása a membránt alkotó lipidek sokfélesége, azok laterális heterogenitása, vagyis a membrán mikrodomének, például a lipidtutajok jelenléte, illetve a membránpotenciálok „triumvirátusa”, amely magában foglalja a transzmembrán, a felületi és a legkevésbé ismert dipólpotenciált^{1,2} (2.1.1.1 ábra).

A három potenciál jelenléte azért különösen fontos, mert a biológiailag releváns makromolekulák nem uniform töltéeloszlással rendelkeznek, így azok viselkedése, szerkezete és aktivitása jelentős mértékben függ a potenciálok jelenlététől, illetve nagyságától. A leginkább vizsgált és ismert a három membránpotenciál közül a transzmembrán potenciál, amelyet a membrán két oldalán található töltött részecskék koncentrációi közötti gradiens és a részecskék különböző permeabilitása hoz létre és tart fenn. A második membránpotenciál, a felületi potenciál létrejöttének oka, hogy a membrán-víz határfelületen a foszfolipidek feji régiójában található töltött kémiai csoportok inkomplett neutralizációja révén nettó negatív elektromos töltés jelenik meg, amely elektromos potenciál különbséget hoz létre a membrán felszíne és az azt körülvevő oldat között^{1,2}.

A membránpotenciálok harmadik és egyben legkevésbé ismert komponense, a dipólpotenciál egy intramembrán elektrosztatikus potenciál, amely a lipidekhez hidrogénkötéssel asszociált interfaciális víz dipólok és a foszfolipidek, valamint a szterolok dipoláris szegmentumainak preferenciális, rendezett térbeli orientációjából ered (2.1.1.1 ábra). A potenciál nagyságához negatív előjellel járulnak hozzá a foszfolipidek feji részében található P⁻-N⁺ dipólok. A molekuláris dipólok elrendeződésének eredményeképpen a membrán kettős réteg belső része rendkívül nagy pozitív potenciállal rendelkezik a külső vizes fázishoz képest, amelynek nagyságrendjét a becslések többsége a néhány száz mV-os tartományba teszi. Ez az érték jelentősen nagyobb, mint a transzmembrán és felületi potenciálok esetén. Mivel a dipólpotenciál esése nagyon rövid (a bilayerben a monolayerek vastagságának megfelelő mintegy 2-3 nm-es) távolságon belül következik be a membrán alacsony dielektromos állandójú, erőteljesen hidrofób belsejében és az elektromos erőter a potenciáli térbeli deriváltja, a dipólpotenciál óriási dipól elektromos erőter létrejöttét eredményezi, amelynek nagysága számos

kísérletes és elméleti számításokon alapuló módszer becslése alapján a 10^8 - 10^9 V/m tartományba esik. Ez szignifikánsan nagyobb, mint a transzmembrán és a felületi potenciálok által létrehozott elektromos erőtér, amelyek nagyságát rendre $2,5 \cdot 10^7$ és 10^6 V/m-nek becsülik¹⁻⁵.



2.1.1.1 ábra: A membránpotenciálok trimuvirátusa és a dipólpotenciál eredete. Jelenlegi ismereteink szerint a membránpotenciál három tényező eredőjeként alakul ki (az ábra a ^{6,7} referenciákban fellelhető ábrák felhasználásával készült). A transzmembrán és a felületi potenciálok mellett a legkevésbé ismert a dipólpotenciál, amely a membránhoz asszociált vízmolekulák, valamint a membránt felépítő foszfolipidek és szterolok dipoláris szegmentumainak rendezett, nem véletlenszerű térbeli orientációjából származik. Ez a preferenciális elrendeződés egy nagymértékű, pozitív potenciál létrejöttét eredményezi az intramembrán térben, amely a másik két potenciál esetén tapasztaltaknál jelentősen nagyobb elektromos erőtér kialakulásához vezet az alacsony hatótávolságon belül bekövetkező potenciálesés révén, amely jelentősen befolyásolhatja a transzmembrán fehérjék szerkezetét, így funkcióját is.

2.1.2. A dipólpotenciál fontossága

A dipólpotenciál az általa keltett rendkívül nagy elektromos erőtér révén nélkülözhetetlen lehet a membránfehérjék konformációjának meghatározásához és azok funkcióihoz, valamint általánosságban véve a lipid membrán és az abba ágyazódó biológiailag releváns molekulák közötti kölcsönhatásokhoz. A hatásmechanizmus alapja valószínűleg az, hogy a dipólpotenciál befolyásolhatja a membránfehérjék transzmembrán doménjeinek konformációját, illetve a fehérjék különböző membrán régiók és mikrodomének közötti megoszlását¹⁻⁵.

Ezzel a feltevésével összhangban kimutatták, hogy a dipólpotenciál befolyásolja a nagyméretű hidrofób ionok membránon keresztüli permeabilitását, amely jelenség a dipólpotenciál felfedezéséhez vezetett. Áram-feszültség görbék vizsgálatával ugyanis már a 70-es évek elején felfedezték, hogy hidrofób ionok (például Na^+ , K^+ , NH_4^+) hidrofób hordozók (például nonaktin, valinomycin) segítségével végzett membránon keresztül történő transzportja, illetve hidrofób ionok (például tetrafenilborát, tetrafenilfoszfónium) membránon való átjutása során egy potenciális energia barriert kell leküzdeni és a folyamat sebességét meghatározó lépés a membránban való mozgás. A vizsgálatok során a negatív

töltésű hidrofób ionok permeabilitása jóval meghaladta a kationokét, amely felvetette a membrán lipidek és a hozzájuk rendeződő vízmolekulák térben orientált dipóljainak szerepét a barrier, vagyis a dipólpotenciál kialakításában⁸⁻¹⁰.

A dipólpotenciálról a későbbiekben kimutatták, hogy jelentős hatást gyakorolhat bakteriális eredetű ionofórokra. A pórusképző gramicidin csatorna ugyanis eltérően viselkedett különböző lipidekből felépülő modellmembránokban, megváltozott a csatornák stabilitása, illetve az egyedi csatornák konduktanciája a lipid tartalom függvényében, amelynek hátterében a dipólpotenciál nagyságának eltéréseit valószínűsítették^{11,12}. A későbbiekben ezt a feltételezést megerősítették azon megfigyelések, amelyek szerint a modellmembránok dipólpotenciáljának módosítása megváltoztatta a gramicidin alegységek asszociációs sebességét, a csatornák inaktivációs kinetikáját, valamint konduktanciáját is^{13,14}. A dipólpotenciál nemcsak a gramicidin, hanem egyéb ionofórok működésére is hat, így befolyásolja például egy pórusképző antimikotikum, az amphotericin B egyedi konduktanciáját, valamint a funkcionális csatorna kialakulását is^{15,16}.

Mivel a feszültség vezérelt ioncsatornák kapuzásában fontos töltött aminosavak, az ún. kapuzó töltések (gating charge) a kapuzási mechanizmus során áthaladnak a dipólpotenciál rétegén, kölcsönhatásba léphetnek az általa keltett elektromos erőterrel például oly módon, hogy az intramembrán dipól mező befolyásolhatja a kapuzási áram membránon keresztüli haladásának sebességét, így végső soron a csatorna aktivációs, inaktivációs kinetikáját is. Ezzel összhangban N1E-115 differenciálódó neuroblasztóma sejtekben a feszültségfüggő Na⁺-csatornák aktivációs kinetikája eltért a sejt különböző dipólpotenciállal rendelkező régióiban^{17,18}. Emellett a feszültség és Ca²⁺ által aktivált nagy konduktanciájú K⁺ csatorna egyedi konduktanciájáról azt találták, hogy az jelentősen eltért különböző foszfolipidekből felépülő membránok esetén, amely magyarázatoként a specifikus lipid-fehérje kölcsönhatások mellett felmerült valamilyen általános membránbiofizikai paraméter, így a dipólpotenciál szerepe is¹⁹. Egy későbbi vizsgálat során a hERG K⁺-csatorna kis molekulájú potenciátoraival végzett kvantummechanikai és molekuláris dinamikai szimulációs vizsgálatok eredményei alapján a dipólpotenciál feszültség kapuzott K⁺-csatornákra gyakorolt hatásának jellemzésére egy általános modellt alkottak. Eszerint a hét vizsgált, nagy molekuláris dipólmomentummal rendelkező potenciátor jelentősen csökkentette POPC bilayerek dipólpotenciáljának mértékét, amely hatás nagysága erősen korrelált a pozitív potenciáció fokával. Ezek alapján a szerzők egy hipotézist állítottak fel, amely szerint a csatornák konformációs átalakulásait irányító transzmembrán potenciál és a dipólpotenciál között dinamikus ellensúlyozás alakul ki, amely egyensúly vezérli az aktivációs és deaktivációs kapuzási mechanizmusokat. A transzmembrán potenciál hatását a feszültségszenzor domén (és néha az inaktivációs kapu) közvetíti, míg a dipólpotenciál dinamikus változásait az aktivációs kapu vezeti a pórusdoménhez a depolarizáció, illetve repolarizáció

során egyfajta gyorsító, illetve lassító folyamatként. A hERG potenciátorok hatásának alapja pedig az lehet, hogy a két potenciál közötti egyensúlyt eltolhatják, módosítva az ioncsatorna kapuzásának feszültségfüggését²⁰.

Az ioncsatornák mellett a dipólpotenciál elsődleges aktív transzporterek funkcióját is befolyásolhatja. Marhaagyból, illetve sertésveséből izolált Na⁺/K⁺ ATPázon végzett vizsgálatok során ugyanis a membránba épülő és ott az elektromos erőteret módosító tetrafenilfoszfónium és tetrafenilborát, illetve perklorát és egyéb, a Hofmeister sorozatba tartozó liotróp ionok hatására a pumpa kationok iránti affinitása, kötődési és disszociációs paraméterei megváltoztak, amely nem a felületi töltésre, hanem valószínűleg az intramembrán elektromos erőterre gyakorolt hatás révén alakult ki^{21,22}. A feltételezést megerősítették 11 különböző állatfajból származó vese és agy minták sejtjeiből nyert membránlipidekből preparált vezikulákon végzett vizsgálatok, amelyek alapján a pumpa aktivitása korrelált a vezikulák dipólpotenciáljának nagyságával. A mérések magyarázatára a későbbiekben egy modellt alkottak, amely szerint a membrán dipólpotenciáljának mértéke befolyásolja a pumpa okkludált és nonokkludált állapotainak stabilitását, így a fehérje funkcióját is^{23,24}.

P-glikoproteinnel (Pgp) transzfektált, illetve kontroll MCF7 emlőkarcinóma sejteken végzett mérések alapján a membrán dipólpotenciált megváltoztató tetrafenilborát alkalmazása jelentősen befolyásolta a Pgp egyik szubsztrátjának, a ^{99m}Tc-sestamibinek a transzportját, a transzmembrán potenciál módosítása nélkül²⁵. A dipólpotenciál Pgp-re gyakorolt hatását támasztotta alá az megfigyelés is, amely szerint mind az α -tokoferol, mind pedig az antioxidáns aktivitással nem rendelkező szukcinát származéka csökkentette vezikulák és Jurkat sejtek membránjának dipólpotenciálját, amely a HIV ellenes gyógyszer saquinavir Pgp iránti affinitásának csökkenésével társult. Ezzel összhangban a sejtek koleszterinnel való töltése, illetve koleszterinjének kivonása növelte, illetve csökkentette a pumpa aktivitását²⁶.

A dipólpotenciál ezek mellett módosíthatja különböző peptidek, illetve akár gyógyszerek membránhoz kötődését is. A citokróm c oxidáz IV alegységének szignál szekvenciájáról, a p25 peptidről, valamint a majom immunodeficiencia vírus fuzogén peptidjéről, a gp32-ről például kimutatták, hogy membránhoz való kötődésének mértéke és sebessége megnő a dipólpotenciált növelő kezelés hatására, míg a kötődés lecsökken ellentétes irányú módosítás esetén^{27,28}. A HIV proteáz inhibitor hasonlóan viselkedett modellmembránok és élő Caco-2 sejtek esetén is, a dipólpotenciál emelése hatására növekedett, a potenciál csökkentésére, illetve a koleszterin kivonására pedig alacsonyabbá vált ugyanis a gyógyszer membránhoz kötődése²⁹. Molekuláris dinamikai szimulációs vizsgálatok eredményei pedig a jelenség általános jellegét sugallták, hiszen az elemzések során a dipólpotenciál számos különböző helikális peptid membrán iránti affinitását befolyásolta³⁰.

Pheochromocytoma eredetű PC12 sejtvonalon a dipólpotenciál phloretin vegyülettel történő csökkentése dóziszfüggő módon védelmet nyújtott a β -amiloid toxikus formája által kiváltott citotoxicitással szemben. A hatás hátterében a dipólpotenciál β -amiloid membránhoz való kötődésére gyakorolt hatását valószínűsítették, amely felvetette, hogy a megváltozott dipólpotenciál akár az Alzheimer-kór patomechanizmusában is szerepet bírhat³¹.

A dipólpotenciál befolyásolhatja G-fehérjéhez kapcsolt receptorok funkcióját is. Natív hippocampalis neuronokból preparált membránokban ugyanis kimutatták, hogy a koleszterin depléciója és a következményes dipólpotenciál csökkenés jelentősen lecsökkentette a szerotonin_{1a} receptor ligand iránti affinitását, amely részben reverzibilisnek bizonyult a koleszterin visszatöltése mellett³².

2.1.3. A dipólpotenciál nagyságát meghatározó tényezők és a dipólpotenciál nagyságának kísérletes változtatása

A sejtmembránban a dipólpotenciál nagysága mind longitudinálisan, mind pedig laterálisan változik a membrán összetételének és a foszfolipidek pakolódási sűrűségének függvényében, amely két tényező a dipólpotenciál nagyságának elsődleges meghatározója^{1-5,33}. Ezzel összhangban spektroszkópiás, valamint molekuláris dinamikai szimulációs módszerekkel kimutatták, hogy a dipólpotenciált jelentősen befolyásolja (i) a foszfolipidek feji csoportjának típusa³³; (ii) az, hogy a foszfolipid hidrofób lánc észter vagy éter kötést tartalmaz³⁴; (iii) valamint a foszfolipid láncok régiójában a kettős kötések jelenléte³⁵.

A dipólpotenciálról emellett már korán azt találták, hogy nagysága kísérletesen változtatható bizonyos vegyületekkel. Mesterségesen előállított hidrofób ionok modellmembránokon keresztül történő permeabilitásának vizsgálata során ugyanis phloretin (3-(4-hidroxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-1-propanon) hatására a kationok membránhoz kötődése és permeabilitása megnőtt, az anionoké lecsökkent, míg a koleszterin származék 6-ketocholestanol (5 α -kolesztan-3 β -ol-6-on) hatására ellentétes változások voltak kimutathatók. Ezek arra utaltak, hogy a phloretin hatására a dipólpotenciál mértéke lecsökkent, míg 6-ketocholestanol hatására megnőtt^{36,37}. A későbbiekben spektroszkópos módszerekkel bizonyították, hogy a két vegyület alkalmas a dipólpotenciál kísérletes megváltoztatására dóziszfüggő módon. Phloretin esetén a dipólpotenciál csökkenésében szaturáció következik be 100 μ M-os koncentrációk felett, míg 6-ketocholestanol alkalmazásánál a hatás lineáris, szaturáció nem mutatható ki, ugyanakkor 100 μ M-nál nagyobb mennyiségek mellett precipitáció történhet, illetve a vegyület megváltoztathatja a membrán egyéb szerkezeti tulajdonságait, így a kísérletek során célszerű a 100 μ M körüli koncentrációk alkalmazása^{38,39}.

A phloretin dipólpotenciálra gyakorolt hatásában fontos szerepe van jelentős intrinszc dipólmomentumának, amely a membránban úgy helyezkedik el, hogy a vegyület pozitív része a vizes

fázis, míg negatív része a membrán belseje felé néz, így orientációja révén a dipólpotenciál ellen hat, csökkentve ezáltal annak nagyságát³⁶. A phloretin dipólpotenciálra gyakorolt hatásához ezenkívül NMR spektroszkópiás vizsgálatok alapján hozzájárulhatnak egyéb indirekt tényezők is, úgymint a foszfolipid feji részek konformáció változása, valamint a membránhoz asszociált vízmolekulák mennyiségének csökkenése, illetve orientációjának megváltozása⁴⁰. Kationos ionofórok modellmembránokon való permeabilitásának vizsgálatával kimutatták, hogy a phloretinhez szerkezetileg hasonló egyéb flavonoidok (például quercetin, myricetin) is csökkentik a dipólpotenciál nagyságát, bár kisebb mértékben⁴¹.

A dipólpotenciál nagyságának egyik legfontosabb meghatározója a membránok szteroltartalma. Már korán kimutatták, hogy különféle szterolok, így a koleszterin is növeli a dipólpotenciál mértékét. A koleszterinről azonban ismert, hogy jelentősen befolyásolja a membránok egyéb biofizikai paramétereit is, például a fluiditást, a lipidrendezettséget vagy a membránvastagságot is. A dipólpotenciál növelése tekintetében leghatékonyabb származéknak a 6-ketocholestanol bizonyult, amely kedvező tulajdonsága, hogy a koleszterinrel ellentétben nem változtatja detektálható mértékben a membránvastagságot, illetve a lipidek rendezettségét, a dipólpotenciált azonban jobban növeli, mint a koleszterin. Az eltérő hatások hátterében a két vegyület eltérő membránbeli lokalizációja állhat. A koleszterin ugyanis a membránok hidrofób-hidrofil határfelületén rögzülhet oly módon, hogy a molekula hossz tengelye a membrán síkjára merőleges állásban található, ezáltal a vegyület a szénhidrogén láncok közötti kölcsönhatásokat jelentősen erősítheti és így a láncok hosszanti kiterjedését megnyújthatja, növelve ezáltal a membrán rendezettségét, illetve vastagságát. A 6-ketocholestanol elhelyezkedése ettől jelentősen eltérhet a ketocsoport jelenléte miatt. Energetikai szempontból kedvező helyzetben ugyanis mind a hidroxil, mind pedig a ketocsoportnak a határfelületen kell elhelyezkednie, amely a mélyre terjedő koleszterinhez hasonló konformáció esetén nem lenne lehetséges. Emiatt a 6-ketocholestanol a membrán síkjához képest egyfajta dőlt orientációban helyezkedhet el hidrogénkötést kialakítva az interfaciális vízmolekulákkal, amely megmagyarázza, hogy miért nem növeli a membrán vastagságát és rendezettségét olyan jelentősen, mint a koleszterin⁴². A két vegyület membránbeli lokalizációja, valamint a dipólpotenciálra, membránrendezettségre és -vastagságra gyakorolt hatásai közötti különbségeket molekuláris dinamikai szimulációs elemzések is megerősítették⁴³.

A szterolok dipólpotenciálra gyakorolt hatását megerősítették különböző fajokból nyert veséből és agyból származó mintákon végzett mérések is, amelyek során a koleszterol kivonása a membránból jelentősen csökkentette a dipólpotenciál nagyságát. Modellvezikulák dipólpotenciáljának meghatározása során pedig különböző szterolok hatására a potenciál növekedett, legnagyobb mértékben 6-ketocholestanol esetén. A hatások hátterében felvetették, hogy fontos tényező lehet a

víz-molekulák membránba történő penetrációjának, illetve a membrán dielektromos állandójának módosulása is⁴⁴. A dipólpotenciál szterolok hatására bekövetkező növekedése jelentős mértékben függ nemcsak a szterolok kémiai szerkezetétől, hanem a membránt felépítő lipidek összetételétől is. Különböző modellmembránok dipólpotenciáljának vizsgálata során ugyanis egyrészt azt találták, hogy a koleszterinnél kisebb mértékben növelte a dipólpotenciált például az egy extra kettős kötést tartalmazó 7-dehidro-koleszterol, illetve a két kettős kötéssel rendelkező ergoszterol, másrészt a szterolok hatása jelentősen kisebb mértékűnek bizonyult többszörösen telítetlen lipidekből felépülő vezikulák esetén⁴⁵.

Mindezek alapján egyrészt a dipólpotenciál nagysága kísérletesen növelhető szterolok (elsősorban 6-ketocholestanol) alkalmazásával, másrészt pedig dipólpotenciál szteroltartalomtól való függése várhatóan azt eredményezheti, hogy a potenciál nagysága eltérő lehet a membrán különböző mikrodoménjeiben. Ezzel összhangban áll az, hogy a koleszterin a dipólpotenciál nagyságát növeli intrinsic dipólmomentuma, a membrán kompaktációja és a membrán egyéb fizikai paramétereire kifejtett hatása révén⁴⁵, valamint az, hogy a dipólpotenciálra kifejtett hatás mellett a koleszterin ismert tulajdonsága, hogy modellmembránokban a folyékony rendezett és rendezetlen domének szeparációját eredményezi⁴⁶.

2.1.4. A dipólpotenciál mérésére alkalmazott módszerek áttekintése

Mivel a dipólpotenciál teljes egészében a membrán alacsony dielektromos állandójú, hidrofób belsejében helyezkedik el, közvetlen mérése rendkívül nehéz. Ehhez nm-es méretű elektródákat kellene helyezni a kettős réteg belsejébe különböző mélységben, amely jelenlegi ismereteink szerint gyakorlatilag lehetetlen, így más, indirekt mérési módszerek alkalmazása szükséges. A dipólpotenciál nagyságáról az első becslések nagyméretű hidrofób ionok modellmembránokon való átjutásának összehasonlításából származtak. A mérések során a negatív töltésű tetrafenilborát permeabilitása jóval meghaladta a pozitív tetrafenilfoszfóniumét. A mért különbségek leírására alkotott elméleti modellek alapján a dipólpotenciál nagyságát ≈ 240 mV-nak becsülték⁴⁷. Az első számítások azonban nem vették figyelembe az ellentétes töltésű ionok eltérő hidrációs energiáját. Amikor viszont ezen tényező hozzájárulását is számításba vették, a dipólpotenciál nagysága jelentősen nagyobbak, ≈ 350 mV-nak adódott⁴⁸.

Különböző liposzómás modellek esetén a krio-elektron mikroszkópia is alkalmasnak bizonyult a dipólpotenciál mérésére az elektronok hullámfüggvényének mintán való áthaladása során bekövetkező fáziseltolódásán alapuló fáziskontrasztos képalkotás segítségével. A vizsgálatok során a dipólpotenciál nagyságát ≈ 510 mV-nak mérték észteres, míg ≈ 260 mV-nak éteres lipidek esetén. A módszer alkalmazása során azonban számos hátrányt írtak le, ilyen volt például a mérések során

tapasztalt jelentékeny (akár a 100 mV-os nagyságrendbe eső) hiba, valamint a tény, hogy a módszer során végzett számítások sok feltételezésen, becslésen alapultak⁴⁹.

A dipólpotenciál nagyságának becslésére kiterjedten alkalmazzák a molekuláris dinamikai szimulációkat is. A kezdeti számítások során a módszerrel észteres lipidek esetén modellmembránok dipólpotenciáljára ≈ 500 - 1000 mV-os értékek adódtak. A módszer alkalmazásánál azonban kezdetben nem vették figyelembe az egyedi atomok polarizálhatóságát, illetve az ebből eredő árnyékoló hatást, amely részben legalábbis magyarázhatta a kapott (valószínűleg irreálisan) magas értékeket^{34,50}. Ennek megfelelően az egyedi atomok polarizálhatóságának figyelembe vételével monolayerek esetén a kísérletes adatoknak jobban megfelelő értékek adódtak⁵¹. Különböző összetételű, DOPC, DOPE, DMPC és DMPG bilayerek vizsgálata esetén ugyanakkor a további molekuláris dinamikai szimulációs vizsgálatok is jóval magasabb dipólpotenciál értékeket határoztak meg, amelyek általában ≈ 500 - 700 mV-nak adódtak, de bizonyos esetekben akár az 1- $1,4$ V-os értékek is előfordultak^{52,53}.

Modellmembránok esetén az atomerő mikroszkópia is használható volt a dipólpotenciál nagyságának becslésére a negatív töltésű próba hegy és az ikerionos lipidek között fellépő taszítóerő segítségével. Kimutatták ugyanis, hogy a taszító hatást az intramembrán dipólpotenciál által keltett gyenge elektromos tér eredményezte. A foszfatidilkolinból felépülő membránok vizsgálata esetén az analízis lipidenként 1,5 Debye-nek megfelelő dipólmomentumot mutatott ki, amely ≈ 275 mV-os potenciál értéknek felelt meg. A mérések során látható volt a dipólpotenciál mértékének laterális heterogenitása a membránban, valamint az, hogy a magasabb dipólpotenciál értékek a folyékony rendezett doméneknek megfelelő helyeken fordultak elő⁵⁴.

Mostanában egy új, vibrációs Stark effektus spektroszkópián alapuló módszert is leírtak, amely során unilamelláris vezikula bilayereken határozták meg a dipólpotenciál mértékét egy nem természetes, nitril-derivatizált aminosav, a p-cianofenilalanin segítségével. Ennek a membránba beépülő nitril oszcillátor próbának az infravörös tartományba eső abszorpciós spektruma érzékeny a lokális környezetre, így az elektromos erőtér változásaira. A próbán végzett Fourier transzformációs infravörös spektroszkópos mérések molekuláris dinamikai szimulációkkal való kombinálása segítségével meghatározható volt a DMPC vezikulákban a dipól elektromos erőtér nagysága, amely 8-11 MV/cm nagyságúnak adódott, összhangban a korábbi becslésekkel⁵⁵. A későbbiekben a módszer használatával megerősítették a koleszterin és 6-ketocholestanol dipólpotenciál növekedését eredményező hatását is⁵⁶.

Bár, mint az előzőekből kiderült, több módszer is alkalmazhatónak bizonyult a dipólpotenciál nagyságának becslésére szimulációk, illetve modellmembránok esetén, mindegyik számos hátránnyal és nehézséggel jellemezhető, főleg ha az élő sejtekre történő alkalmazhatóságukat tekintjük. Élő sejtek

esetén a leginkább használható módszereket a feszültség szenzitív fluorofórok alkalmazásán alapuló technikák jelentik.

2.1.5. A dipólpotenciál mérése aminosztirilpiridinium-származékokkal

A membránpotenciálok mérésére élő sejtekben alkalmazhatók a feszültség szenzitív fluorofórok, amelyek használatának előnye a korábban leírt technikákhoz képest, hogy segítségével egyszerre több élő sejt vizsgálható noninvazív módon. Ezen molekulák két csoportba sorolhatók aszerint, hogy milyen mechanizmussal és milyen gyorsan detektálják a potenciálváltozásokat. Az első csoportot lassú szenzoroknak nevezhetjük, mivel a potenciál változásokat lassabban (s-ms nagyságrendben) képesek követni, ugyanis annak hatására az intra- és extracelluáris tér vagy az oldat-membrán közötti megoszlásuk, illetve dimerizációjuk módosul, ami spektrális sajátágaik következményes megváltozása révén detektálható^{57,58}.

A második csoportot a gyors szenzorok képezik, amelyek elektronjainak megoszlása azonnal (a detektálható μ s-ns időskálán belül) megváltozik elektromos erőter hatására. Ezt a jelenséget nevezzük elektrokrómiának, vagy más néven Stark-effektusnak. Ezen módszerek esetén a festék a lokális elektromos erőter nagyságát érzékeli, melynek eredete a kromofór membránon belüli elhelyezkedése miatt elsősorban a transzmembrán és dipólpotenciál. A kettő közötti különbségtételt a kromofór csoport membránon belüli mélységének beállításával lehet elérni. Feszültség mérésre elsősorban azok a fluofórok (gyors szenzorok) alkalmasak, amelyek elektronjai a molekula egészének mozgása nélkül képesek elmozdulni és ennek eredményeképpen megváltoznak a vegyület gerjesztési és emissziós sajátosságai. Modellszámítások alapján a gyors szenzornak alkalmas molekulák egyik elsőként leírt legígéretesebb csoportját képezték a 4-p-aminosztiril-1-piridinium kromofór származékok⁵⁹.

Ezek az amfifil karakterű, hidrofil feji résszel és hidrofób oldallánccal rendelkező pálca alakú fluorofórok rigid módon a membránba épülnek és fluoreszcencia polarizációs mérések alapján hidrofób hosszú szénláncuk révén a membrán síkjához képest merőleges pozícióban helyezkednek el. Ez kedvező az elektrokrómos hatás maximalizálása szempontjából, hiszen az elektromos erőter vektora párhuzamos a töltésmozgás irányával, ugyanis a töltés a piridin komponensről az anilinre mozog. Az excitáció során fellépő töltésmozgást így az elektromos erőter megváltoztatja, módosítva az elektron átmenetek energiáját. Emellett fontos tulajdonságuk, hogy a molekula egésze nehezen mozdul el, membránbeli orientációjuk nem változik meg, a molekula elmozdulásán alapuló festékekhez képest jóval megbízhatóbbak. Modellmembránon végzett spektrofluorimetriás mérések alapján a feszültség változtatásának hatására a vegyületek excitációs spektruma megváltozik, pozitív potenciál alkalmazása során az alacsonyabb hullámhosszú gerjesztés esetén mért fluoreszcencia megnő, míg magasabb hullámhosszú gerjesztésnél a fluoreszcencia lecsökken. Negatív potenciál ellentétesen hat, a

spektrumban vörös irányú eltolódás figyelhető meg. A transzmissziós spektrumukban történő változás komplementer az excitációs változással, valamint a spektrum hasonlóan viselkedik mind a függőlegesen, mind pedig a horizontálisan polarizált fotonokat vizsgálva (bár a membránra merőleges fényt vizsgálva a változások jóval nagyobbak), így ezek alapján a spektrum eltolódást nem aggregáció, illetve rotációs reorientáció okozza, hanem az elektromos tér jelenléte⁶⁰⁻⁶².

A későbbiekben sokféle aminosztirilpiridinium-származékot teszteltek voltage clamp, spektrofotometria és spektrofluorimetria alkalmazásával élő sejtekben és azt találták, hogy az ikerionos szerkezet kedvezőbb a membránbeli stabilabb rögzülés szempontjából. Bár az elektromos erőtér hatására a vegyületek emissziós spektruma is megváltozik, annak lehet jelentős nem elektrokrómián alapuló komponense is (például a molekula rotációja, a kvantumhatásfok változása, illetve solvatációs tényezők révén), így az excitációs spektrum vizsgálata jóval célszerűbbnek bizonyult. A mérések során a legszenzitívebb származéknak a di-4-ANEPPS (1-(3-szulfonatopropil)-4-[β] [2-(di-n-butilamino)-6-naftil vinil] piridinium-betain) mutatkozott, amely a p-anilino csoport helyett 6-amino-2-naftilt tartalmaz. Ennek a vegyület geometriája szempontjából az az előnye, hogy meghosszabbodik a töltésmozdulás útja, vagyis az elektrokrómia megnövekszik, viszont a molekula flexibilitása nem nő, azaz nem emelkedik a nem-elektrokrómiás hatások nagysága. Ezzel összhangban a festék érzékenységének tisztán elektrokrómiás mechanizmusára utalt, hogy a gerjesztési és az emissziós spektrum gyakorlatilag teljes inverz szimmetriát mutatott. A molekula további előnye, hogy fiziológiai körülmények között nem érzékeny a pH változásaira, töltetlen, ikerionos formában fordul elő. Megfelelő excitációs, illetve emissziós beállításokkal a fluoreszcencia intenzitás potenciálváltozással szembeni érzékenysége 10%/100 mV körülinek bizonyult. A di-4-ANEPPS molekula alkalmazásának a fentiekén kívül előnye volt még, hogy a potenciál változásait lineárisan követte, reprodukálható módon a membránnak csak a külső rétegébe inkorporálódott, intakt sejtekbe csak hosszú inkubáció után penetrált, spektrális sajátosságai alapján kiválóan alkalmasnak látszott mikroszkópos vizsgálatokra, valamint arra, hogy mutassa a membránpotenciál térbeli eloszlását is⁶³⁻⁶⁵.

A továbbiakban mesterségesen előállított lipid vezikulák és non-excitabilis HeLa sejtek külső elektromos erőtér hatására történő membránpotenciál változásait vizsgálva egy kismértékben bonyolultabb, ám jóval megbízhatóbb módszert is leírtak a potenciálok mérésére. A módszer során a fentebb leírt di-4-ANEPPS excitációs, illetve fluoreszcencia spektrumában bekövetkező változásokat mérték két hullámhosszon történő gerjesztés után. A festék gerjesztési spektruma két ellentétes szélének megfelelő hullámhosszon történő excitáció után mérték a festék által kibocsátott fluoreszcencia intenzitását, majd a két intenzitás arányát határozták meg, amelyről kimutatták, hogy az alkalmazott elektromos térerősség nagyságával arányos. A mérések reprodukálhatósága magasnak bizonyult és a módszer 10 mV-os nagyságrendű potenciálváltozások kimutatására is alkalmasnak

mutatkozott. A két hullámhosszon történő gerjesztésen alapuló rációmetrikus fluoreszcenciás módszer alkalmazása azért különösen célszerű a potenciálok mérése során, mert így eliminálhatók a minták közötti, illetve az egyes minták eltérő régióin belüli kismértékben eltérő festékkoncentrációk, a fényelhalványítás és a fényszórás mérést befolyásoló hatásai, valamint kisebb potenciálváltozások is könnyebben kimutathatók a hagyományos módszerekhez képest⁶⁶.

A di-4-ANEPPS módosított változata a di-8-ANEPPS [1-(3-szulfonatopropil)-4- β [2-(di-n-oktilamino)-6-naftil]vinil]piridinium betain], amely annyiban különbözik, hogy hosszabb szénlánccal rendelkezik, így magasabb hidrofobicitása miatt stabilabban rögzül a membránban, mint a rövidebb szénláncot tartalmazó származék, így internalizációja is jóval lassabb, emellett érzékenysége és jel-zaj aránya is kedvezőbbnek bizonyult⁶⁷. A di-8-ANEPPS molekula neuroblasztóma eredetű sejtvonalon használható volt a membránpotenciálban bekövetkező változások detektálására a gerjesztési spektrumban történő eltolódást vizsgáló rációmetrikus módszerrel, 15%/100mV-os szenzitivitással. A mérések során azonban a fluoreszcens jel kismértékű, de szignifikáns eltérést mutatott a membrán különböző régióiban a kálium ionofórként ismert valinomycin jelenlétében, amely háttérben a dipólpotenciál szerepe merült fel^{18,68}.

Ennek megfelelően 6-ketocholestanol és phloretin segítségével kimutatták, hogy a dipólpotenciál növekedésének hatására a di-8-ANEPPS gerjesztési spektruma kék irányú eltolódást mutat, a változás pozitív irányú maximuma 450 nm-nél, negatív irányú maximuma 520 nm-nél található. A dipólpotenciál csökkenése esetén a változás ellentétes, maximuma pozitív irányban 520 nm-nél, negatív irányban pedig 450 nm-nél található, a vörös irányú eltolódásnak megfelelően. A dipólpotenciál mérését ennek megfelelően kettős hullámhosszon történő rációmetrikus fluoreszcenciás módszerrel célszerű végezni. A rációmetrikus módszer során ezért a molekulát két különböző hullámhosszú (például 460 és 520 nm) fényel gerjesztjük és a két esetben az emissziót azonos hullámhosszon (például az emissziós spektrum maximuma, 580 nm felett) detektáljuk. A mért fluoreszcenciaintenzitások hányadosa arányos a dipólpotenciál értékével. A spektrum a festék membránban való elhelyezkedése miatt elsősorban a dipólpotenciál nagyságára érzékeny, a transzmembrán potenciálra jóval kevésbé, míg a felületi potenciálra nagyon kevésbé^{27,39}. A di-8-ANEPPS dipólpotenciál mérésre való alkalmazhatóságát bizonyították azon mérések is, amely során különböző foszfolipideket tartalmazó vezikulák esetén határozták meg a korábban említett intenzitásarányokat és az azokból számolt dipólpotenciál értékeket hasonlították össze az irodalomban fellelhető potenciál adatokkal, és erős lineáris korrelációt találtak a kettő között⁶⁹.

A di-8-ANEPPS molekula tulajdonságainak vizsgálata közben azonban az is kiderült, hogy a két különböző gerjesztési hullámhossz esetén kapott fluoreszcencia intenzitások aránya eltért annak

függvényében, hogy az emissziót milyen hullámhossz tartományban vizsgálták. Az arány magasabb volt 580 nm feletti emissziót vizsgálva, mint 670 nm felett. Emellett mind mesterséges, mind természetes membránokat vizsgálva azt találták, hogy 580 nm feletti emissziót mérve a membrán fázisátalakulási hőmérséklete alatt a hőmérséklet növelésével az emissziós arány nőtt, míg afelett a hőmérséklet növelésével csökkent. Ez arra utalt, hogy a fluoreszcencia intenzitás aránya függ a membrán viszkozitásától. 670 nm feletti emisszió mérése esetén azonban az arány nem változott szignifikánsan a hőmérséklet, így a fluiditás függvényében, amely arra utalt, hogy ebben az esetben az a festékpopoláció vizsgálható, amely nem érzékeny a festék fluiditásfüggő reorganizációjára, mivel az elektronok az excitáció után azonnal a gerjesztett állapot leginkább relaxált szintjein találhatóak. Ezek miatt olyan esetekben, ahol a membrán fluiditásának változása várható, célszerűbb az emissziós spektrum vörös oldalának megfelelő hullámhosszokon végezni a méréseket. Emellett felvetődött, hogy a di-8-ANEPPS önmaga is képes lehet megváltoztatni a dipólpotenciál nagyságát, illetve túl magas koncentrációk esetén a festék molekulák aggregálódhatnak is, amely tényezők a mérések pontatlanságát eredményezhetik. Ezek alapján célszerű a fluorofórt úgy alkalmazni, hogy a lipid:festék arány legalább 100:1 legyen a festék által okozott torzító hatás elkerülésének érdekében³⁸. Későbbi mérések során bebizonyosodott, hogy a festék az általánosan használt koncentrációtartományban (5 μ M alatt) nem változtatja érdemben a dipólpotenciál nagyságát, hiszen különböző foszfolipidekből előállított mesterséges bilayerek esetén a di-8-ANEPPS nem változtatta érdemben a K^+ -valinomycin, illetve a K^+ -nonaktin permeabilitását⁷⁰.

Bár a di-8-ANEPPS molekulát elsősorban excitációs rációmetrikus módszerek esetén alkalmazták, az elektromos erőtér hatására a festék emissziós spektruma is eltolódik. Így felmerült, hogy olyan esetekben, amelyekben a jó térbeli felbontás mellett szükséges a nagyon jó időbeli felbontás is, az emissziós rációmetrikus technikák alkalmasabbak lehetnek. Ebben az esetben ugyanis a gerjesztési hullámhosszt nem szükséges változtatni, a vizsgálathoz elég lehet kétféle, időben párhuzamosan működő különböző fotodetektor használata⁷¹. Amikor azonban az excitációs, illetve emissziós spektrumeltolódáson alapuló rációmetrikus módszereket összehasonlították különböző lipidekből felépülő, illetve phloretinnel vagy 6-ketocholestanollal kezelt DMPC vezikulumokon, az excitációs rációmetrikus módszerrel kapott adatok jó egyezést mutattak az irodalomban fellelhető értékekkel, az emissziós rációmetrikus módszerrel nyert értékek azonban jelentősen eltértek ezektől, valamint jelentősen függtek az alkalmazott hőmérséklettől és gerjesztési hullámhossztól. A gerjesztési és emissziós módszer közötti eltérések hátterében az állhat, hogy az előbbinél a mérések során az oldószer molekuláknak, illetve egyéb molekulák atomjainak nincs ideje elmozdulni, így az excitációs spektrális eltolódás ténylegesen csak a fluorofór változásait tükrözi. Az emissziós spektrum mérése során ezzel ellentétben a szomszédos molekulák dipóljainak van ideje átrendeződni, a molekuláris

reorientáció pedig az orientációs polarizálhatóság révén módosíthatja az átmenetek energia szintjeit, valamint a folyamatot jelentősen befolyásolják a membrán fluiditásából származó hatások. Ezek miatt dipólpotenciál mérésre elsősorban a di-8-ANEPPS gerjesztési spektrumának rációmetrikus vizsgálata használható⁷².

Elvileg a di-8-ANEPPS segítségével történő dipólpotenciál mérés másik lehetséges módját jelenthetné, hogy a lipidkörnyezet (így a dipólpotenciál) változása a vegyület pK-jának, ezáltal fluoreszcens tulajdonságainak megváltozását eredményezheti. Ez azonban csak elvi lehetőség, ugyanis a festék pK-jának értéke erősen a savas tartományba esik (a lipid kettős réteg összetételétől függ, de általában $\leq 1,8$), így a mérést a fiziológias tartománytól távol kellene végezni, amely régióban már a membrán fázisátalakulása megtörténhet, így a pK eltolódáson alapuló mérések nem tekinthetők biológiailag relevánsnak⁷³.

Bár eredetileg a di-8-ANEPPS festéket a transzmembrán potenciál nagyságának mérésére alkalmas festékként írták le, excitációs rációmetrikus módszerek során az intenzitás arány elsősorban a dipólpotenciál nagyságára érzékeny. Ezt támasztották alá azok a fluoreszcencia kioltáson alapuló ún. parallax módszerrel POPC membránokon végzett mérések, amelyek azt mutatták, hogy a festék fluoreszcenciát kibocsátó régiója 12,2 Å-re helyezkedik el a kettős lipid réteg centrumától, vagyis éppen a membrán interfaciális régiójában található, amely éppen a dipólpotenciál régiója és ahová a felületi potenciál alacsony hatótávolsága miatt már nem ér el. A transzmembrán potenciál hatása pedig a kisebb potenciál esés, illetve az ezáltal generált alacsonyabb mértékű elektromos erőter miatt itt a dipólpotenciálhoz képest sokkal kevésbé érvényesül⁴⁵.

2.1.6. A dipólpotenciál mérése 3-hidroxi flavonokkal

A korábban leírtaknak megfelelően a fluorofórok gerjesztési spektrumában bekövetkező eltolódás mérése alapján történő dipólpotenciál meghatározással szemben az emissziós spektrum vizsgálatának jelentős gyakorlati előnye lenne, azonban erre az aminosztirilpiridinium származékok nem alkalmasak. Ehhez olyan fluoreszcens festékek kellene, amelyek jó kémiai és fotokémiai stabilitással és magas kvantumhatásfokkal rendelkeznek, valamint a molekulák gerjesztett állapotában bekövetkező valamilyen reakció révén nagy spektrális változással reagálnak a membránbeli változásokra. Ilyen reakció lehet izomerizáció, töltés-, illetve protontranszfer is, amely folyamatok révén ideális esetben a gerjesztett állapotú molekula két olyan formája jöhet létre, amely akár eltérő emissziós sávban bocsáthat ki fotonokat. Mindezen követelményeknek megfeleltek a később kifejlesztett 3-hidroxi flavon (3-HF) fluorofórok, amelyek emissziós spektrumáról kimutatták, hogy drámai módon megváltozik a membránlipidek tulajdonságainak változására. Gerjesztett állapotban ugyanis a fluorofórokban intramolekuláris proton transzfer (ESIPT: excited state intramolecular proton transfer)

reakció megy végbe, így a molekulák excitáció után N^* (normál gerjesztett állapot) és T^* (foto-tautomer termék) formában fordulhatnak elő. Az ESIPT reakció a molekulák 3-hidroxil és 4-karbonil csoportja között zajlik és a két forma emissziója jól elkülönül, a T^* formáé a magasabb hullámhossz tartományba esik. A 3-HF-ok fontos tulajdonsága még, hogy hidrofíli csoportjaik révén a membrán-víz határfelületen helyezkednek el és hosszú szénláncuk miatt erősen rögzülnek a membránban, így mobilitásuk alacsony. A N^* - T^* formák közötti átmenetről azt találták, hogy a membránban található elektromos tér erőssége befolyásolja (a molekula π elektron rendszerének módosításán keresztül) a két forma megoszlását, ami arra utalt, hogy a 3-HF származékok alkalmasak lehetnek a fluorofórok emissziós spektrumának eltolódásán alapuló rációmetrikus potenciál mérésre⁷⁴.

A későbbiekben felvetődött a 3-HF-ok alkalmazásának lehetősége dipólpotenciál mérések során, hiszen azt találták, hogy bizonyos származékok (például F4N1 és a vele ellentétes membránbeli orientációjú BPPZ) gerjesztett T^* formája alacsony, míg N^* formája magas dipólmomentummal rendelkezik, így a membránban található elektromos tér különböző mértékben befolyásolja a két forma energia szintjeit, ezáltal stabilitását is. Míg a T^* forma érdemben nem változik az elektromos tér változásának hatására, a N^* forma esetén a molekula töltés eloszlása jelentős mértékben módosul, így a N^* forma T^* -hoz viszonyított relatív stabilitása megváltozik, ami a két forma közötti megoszlás módosítása által a két emissziós sáv közötti intenzitás változásban is megnyilvánulhat, vagyis a festékek modulációjában az elektrokrómos effektusnak is szerepe lehet. Ezek mellett a di-8-ANEPPS-hez hasonlóan a 3-HF-ok gerjesztési spektruma, illetve két emissziós sávja is eltolódhat, amelyeknél azonban sokkal jelentősebb az emissziós sávok közötti intenzitás arány változása. Ennek megfelelően különböző lipidösszetételű (DMPC, DTPC) vezikulumok és a dipólpotenciál nagyságát módosító kezelések (phloretin és 6-ketocholestanol) spektrofotometriás és spektrofluorometriás vizsgálata során azt találták, hogy magasabb dipólpotenciál hatására az F4N1 excitációs és emissziós spektruma két irányú eltolódást mutatott, a N^* és T^* fluoreszcencia intenzitása közötti arány pedig lecsökkent és ez utóbbi bizonyult messze a legjelentősebb hatásnak. Alacsonyabb dipólpotenciál (DTPC vezikulumok, illetve phloretin kezelés) hatására éppen ellenkező változások voltak megfigyelhetők. A membránban ellentétes orientációjú BPPZ esetén a vártan megfelelően az F4N1-hez képest ellentétes hatásokat láttak. Minden 3-HF-származékokkal megfigyelt változás hasonló jellegűnek adódott, mint a referenciaként használt di-8-ANEPPS esetén, közöttük erőteljes kvantitatív korrelációt tapasztaltak, viszont a 3-HF-származékokat használó mérések szenzitivitása jóval magasabb volt, valamint azok mérés technikai szempontból egyszerűbbnek bizonyultak. Ezen kívül a 3-HF-ok előnye, hogy a molekula töltött része nem a kromofór eleme, valamint a festék hossza változtatható, így a membránba történő penetráció mélysége is szabályozható. A fenti eredmények arra utaltak, hogy vezikulumok dipólpotenciáljának mérésére egyszerűen használhatóak a 3-HF-származékok, a két emissziós sávjuk

intenzitásának arányát mérve emissziós rációmetrikus módszerrel. A mérések során különösen kedvező, ha két ellentétes membránbeli orientációjú származékot, például az F4N1-BPPZ párt alkalmazunk a dipólpotenciál meghatározására, ugyanis ha a két festékkel ellentétes irányú változásokat tapasztalunk, az a dipólpotenciál változását támasztja alá. Valamilyen egyéb membrán biofizikai paraméter változása eredményeképpen ugyanis a két fluorofór spektrális tulajdonságai várhatóan azonos irányban változnának. Ezáltal a dipólpotenciál változása a mérések során elkülöníthetővé válik az egyéb tényezők módosulásaitól⁷⁵.

A későbbiekben újabb 3-HF-származékokat fejlesztettek ki, amelyek kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkeztek a korábbiakhoz képest. Ilyen volt az F8N1S, amely az analóg F4N1-nél hosszabb szénláncsal és a pozitív töltésű rész helyett ikerionos csoporttal rendelkezik, ezáltal a sejtekbe történő penetrációja lassabb, valamint a PPZ8, amelynek az analóg BPPZ-hez képest egy extra 6-oktiloxi csoportja van, így a membránbeli szerkezeti illeszkedése erősebb és az emittált fluoreszcencia intenzitása magasabb. A fluorofórokat észteres DOPC és éteres DTPC vezikulumokon, 6-ketocholestanol jelenlétében vagy anélkül alkalmazva a fentiekhez hasonló eredményeket kaptak, vagyis e származékokkal is mérhető volt a dipólpotenciál emissziós rációmetrikus módszerrel (a két emissziós sáv arányát vizsgálva). A módszer nem mutatott érzékenységet a felületi potenciál iránt, valamint a festékek tulajdonságai változatlanok mutatkoztak 5 és 9 közötti pH tartományban. A két új 3-HF-származékkal azonban már élő sejteken (humán akut monociták leukémia eredetű THP-1 sejteken és egér fibroblaszt L929 sejteken) is mérni tudták a dipólpotenciál nagyságának változásait mind spektrofluorométeren sejtszuszpenziót mérve, mind pedig konfokális lézer pásztázó mikroszkópon, egyedileg láthatóvá téve az adherens sejteket (és kimutatva a sejtmembrán heterogenitását a dipólpotenciált tekintve). Ezen eredmények bebizonyították, hogy a di-8-ANEPPS-hez képest nagyobb szenzitivitással és egyszerűbb mérés technikával is mérhető a dipólpotenciál nagysága élő sejteken is emissziós rációmetrikus módszerrel⁷⁶.

A 3-HF-származékok (például F4N1 és F8N1S) esetén felvetődött egy harmadik gerjesztett állapotú forma jelenléte is, ugyanis a korábban leírt két emissziós sáv nagyon közel esett egymáshoz, valamint az alacsonyabb hullámhosszú sávhoz tartozó csúcsonál egy széles váll volt megfigyelhető a görbén. Ezt a feltevést megerősítették fluoreszcencia anizotrópia mérések is, amelyek során a váll területéhez tartozó hullámhossz értékeken mért anizotrópia jelentősen kisebb volt a többi hullámhosszon mért értékekhez képest. Dekonvolúciós eljárás során kiderült, hogy a váll valójában egy harmadik sáv, amelynek jelenléte jelentősen függ a lipidek és az oldószer milyenségétől és tulajdonképpen a vízmolekulákhoz hidrogénkötéssel asszociálódó N* formájú gerjesztett állapotnak (H-N*) felel meg, amely emissziós spektruma a hidrogénkötés, illetve a határfelülethez közelebbi lokalizáció révén a magasabb hullámhosszak felé tolódik el. Hidrogénkötött formában a fluorofórokban ESIPT nem mehet

végbe, így jön létre a 3 sáv az emissziós spektrumban. A H-N* sáv relatív aránya a membrán hidrációjáról hordozhat információt, amelynek azonban nem volt jelentős hatása az N* és T* arányára, vagyis a dipólpotenciál nagyságának meghatározása során a H-N* sáv jelenléte nem befolyásolja szignifikáns módon a méréseket⁷⁷.

Az egyik első 3-HF-származék, az F2N12S továbbfejlesztésével egy az F8N1S-hez szerkezetileg hasonló vegyületet állítottak elő, amelyet F66NS-nek neveztek el. Az F66NS (a későbbiekben F66) esetén a molekula alkil láncának létrehozásához hexil csoportot alkalmaztak a lipid membránokhoz való affinitás javítása céljából. A vegyület ikerionos szerkezete és a 3-hidroxiflavon rész ellentétes oldalaihoz kapcsolódó két hosszú alkil lánc révén a fluorofór a membránban vertikális orientációban rögzül, mélyebben, mint az eredeti festékek. Ezáltal a molekula fényessége magasabbnak adódott, valamint a lipid környezetben bekövetkező változások érzékelésében magasabb szenzitivitásúnak bizonyult élő sejtek vizsgálata esetén. Emellett a festék áramlási citometriás mérések során is alkalmazható volt⁷⁸.

2.2. Az ErbB fehérjecsalád

2.2.1. Az ErbB fehérjecsalád általános leírása

Az epidermális növekedési faktor receptor család tagjai, vagyis az ErbB fehérjék (ErbB1=epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)=HER1, ErbB2=HER2/Neu, ErbB3=HER3 és az ErbB4=HER4) széles körben ismert molekulák, amelyek számos tudós érdeklődésének középpontjában állnak, sejtbiológusoktól klinikai kutatókig^{79,80}. Ezek a fehérjék többnyire epiteliális sejtekben fejeződnek ki (az ErbB1 és ErbB2 mezenchimális szövetekben is előfordul) és fontos szerepet játszanak a korai embrionális fejlődésben, a központi és a perifériás idegrendszer, különböző mirigyek, a szívizom és a szívbillentyűk kialakulásában^{81,82}. A receptorcsalád iránti különleges érdeklődés egyik oka, hogy a család tagjai jelentős szerepet játszanak bizonyos tumorok patogenezisében, mutációjuk, túlzott sejt felszíni kifejeződésük ugyanis rákos transzformációhoz vezethet. Ennek megfelelően az ErbB fehérjék patogenetikai szerepét mutatták ki például a következő tumorokban: laphámsejtes tüdőkarinómában, nyelőcsőkarinómában, epidermoid fej-nyak és gliális eredetű agytumorokban (EGFR); emlő-, petefészek-, méhnyak- és gyomorkarionómákban (ErbB2); emlő- és vastagbélkarionómákban (ErbB3); valamint emlő-, hasnyálmirigykarionómákban és neuroblasztómában (ErbB4)^{83,84}. Az ErbB fehérjék tumorokban játszott patogenetikai szerepük miatt a gyógyszeres kezelések célpontjai lehetnek, amely felfedezés ErbB ellenes célzott tumorellenes terapeutikumok kifejlesztéséhez vezetett⁸⁵.

Az ErbB fehérjék a receptor tirozin kinázok (RTK) csoportjába tartoznak, rendelkeznek ugyanis egy extracelluláris, erősen glikozilált, ciszteinben gazdag ligandkötő doménnel, a fehérje membránba való integrációját biztosító hidrofób, egy hélixből felépülő transzmembrán doménnel, valamint egy

intracelluláris, protein kináz aktivitással rendelkező doménnel. Az EGFR és az ErbB4 „hagyományos” RTK-nak tekinthető, míg az ErbB2 és ErbB3 speciális molekulák, előbbinek ugyanis nincs ismert ligandja, míg utóbbi nem rendelkezik érdemi kináz aktivitással, ugyanakkor mindkét fehérje rendkívül fontos, hiszen befolyásolják a család többi tagjának működését^{86,87}.

2.2.2. Az ErbB fehérjék felfedezése, ligandjai és jelátviteli útvonalai

Az EGFR ligandját, az epidermális növekedési faktort (EGF) 1962-ben fedezték fel és izolálták egerek nyálmirigyéből⁸², majd nem sokkal később kiderült, hogy a molekula sejthez kötődése specifikus és reverzibilis, hatása pedig szaturációt mutat, amelyek arra utaltak, hogy specifikus receptorokhoz kötődhet a sejtek felszínén⁸⁸. Ennek megfelelően hamarosan azonosították az EGFR-t és az is kiderült, hogy a molekula kináz aktivitással rendelkezik^{89,90}. A fehérje és ezáltal a molekulacsalád elnevezése az avian erythroblastosis vírus nevéből származik, ebben azonosították ugyanis a v-erbB onkogént, amelyről kiderült, hogy az EGFR csonkított formája⁹¹. Ezt követően patkányban etil-nitrozourea által indukált neuroektodermális tumorokból a v-erbB-hez nagyon hasonló onkogént mutattak ki, amelyet neu-nak neveztek el⁹² és amelynek megtalálták az ErbB2-ként elnevezett megfelelőjét az emberi genomban^{93,94}. Az is kiderült, hogy a neu-nak nevezett variáns annyiban tér el a vad típusú ErbB2-től, hogy a transzmembrán doménben egy Val→Glu aminosavcserét eredményező pontmutációt tartalmaz, amely a tumoros transzformáció létrejöttét eredményezi⁹⁵. Az aktív kináz doménnel rendelkező ErbB2 legfontosabb eltérése az volt az EGFR-hez képest, hogy nem kötött EGF-et ligandként⁹⁶. A család harmadik tagját, az ErbB3 molekulát az EGFR és ErbB2 fehérjékkel való homológiája alapján azonosították, azonban az is hamar kiderült, hogy intracelluláris doménje jelentősen eltérő a többi ErbB fehérjéhez képest, lényegében nem rendelkezik ugyanis érdemi kináz aktivitással⁹⁷⁻⁹⁹, ugyanakkor heregulinot köt ligandként¹⁰⁰. Az ErbB4 ezzel szemben egy tipikus receptor tirozin kináz, intracelluláris doménje leginkább az ErbB2-höz hasonlít, ennek megfelelően aktív, míg extracelluláris doménje az ErbB3-mal mutat jelentős hasonlóságot, így az ErbB4 is heregulinot és más hasonló ligandokat köt^{101,102}.

Az ErbB fehérjék receptor tirozin kináz voltak megfelelően (az ErbB2 kivételével, amelynek nincs ismert fiziológiás ligandja) különböző extracelluláris ligandokat kötnek, amelyek közös tulajdonsága, hogy meghatározott helyen 6 ciszteint tartalmaznak, melyek egymással három intramolekuláris diszulfid kötést alakítanak ki, megfelelő konformációt biztosítva az ErbB proteinekkel való kölcsönhatáshoz. Ugyanaz a ligand a család különböző tagjaihoz kötődhet, illetve az adott receptor különböző ligandokat is felismerhet. Az így létrejövő számos ligand-receptor kombináció sokféle sejtválaszt eredményezhet sejttípustól függően. A ligandokat a különböző ErbB receptorokhoz való affinitásuk alapján csoportosíthatjuk: 1) EGF-szerű ligandok, amelyek leginkább az EGFR-hez kötődnek (EGF, transzformáló növekedési faktor α , amfiregulin, epigén); 2) heregulinok vagy más néven

neuregulinok, melyek az ErbB3-hoz és ErbB4-hez kötődnek (neuregulin-1 (=heregulin), -2, -3 és -4) ; 3) azon ligandok, amelyek egyaránt kötődnek az ErbB1-hez és ErbB4-hez (heparint kötő EGF-szerű növekedési faktor, betacellulin, epiregulin)^{103,104}.

A ligandok receptorhoz kötődésének hatására a következő fejezetekben részletesen tárgyalt folyamat során végső soron a fehérje kináz doménje aktiválódik, amely egyrészt a kialakuló dimerben a másik receptor alegységet, másrészt pedig másodlagos hírvivők foszforilációját eredményezi. Ezek a sejt plazma egyéb fehérjéit, további másodlagos hírvivőket aktiválnak, amelyek attól függően, hogy milyen ligand mely receptorhoz kötődött, különféle jelátviteli útvonalak beindulásához vezetnek. Egyik leggyakoribb ilyen a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal, amelyben a foszforilált receptorhoz kötődő elsődleges adaptor fehérje a Grb2/SOS komplex, amely a protoonkogén Ras és azon keresztül a Raf-1 fehérjék és végső soron számos transzkripciós faktor aktiválásán keresztül fokozza a sejtek proliferációját. A foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) által aktivált Akt kináz útvonal a sejtek túléléséért felelős, antiapoptotikus jeleket indukál, melyet elsősorban az ErbB3 receptort is tartalmazó heterodimerek aktiválnak. A foszfolipáz C- γ (PLC γ) útvonal aktiválódását a családon belül csak az EGFR képes indukálni. Ilyenkor az enzim hatására keletkező inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP₃) hatására Ca²⁺-ionok szabadulnak fel az intracelluláris raktárakból, melyek befolyásolják számos Ca²⁺-függő enzim működését. Emellett stimulálódik a számos transzkripciós faktor aktivációjáért is felelős protein kináz C (PKC) az IP₃ mellett keletkező diacilglicerol (DAG) segítségével. A beinduló jelátviteli útvonalak eredményeképpen különböző sejt válaszok alakulnak ki, így a korábban említett sejtproliferáció, apoptózis gátlás, migráció, növekedés, adhézió vagy differenciáció^{79,80,105-107}.

2.2.3. Az ErbB fehérjék felépítése és aktivációjának klasszikus modellje

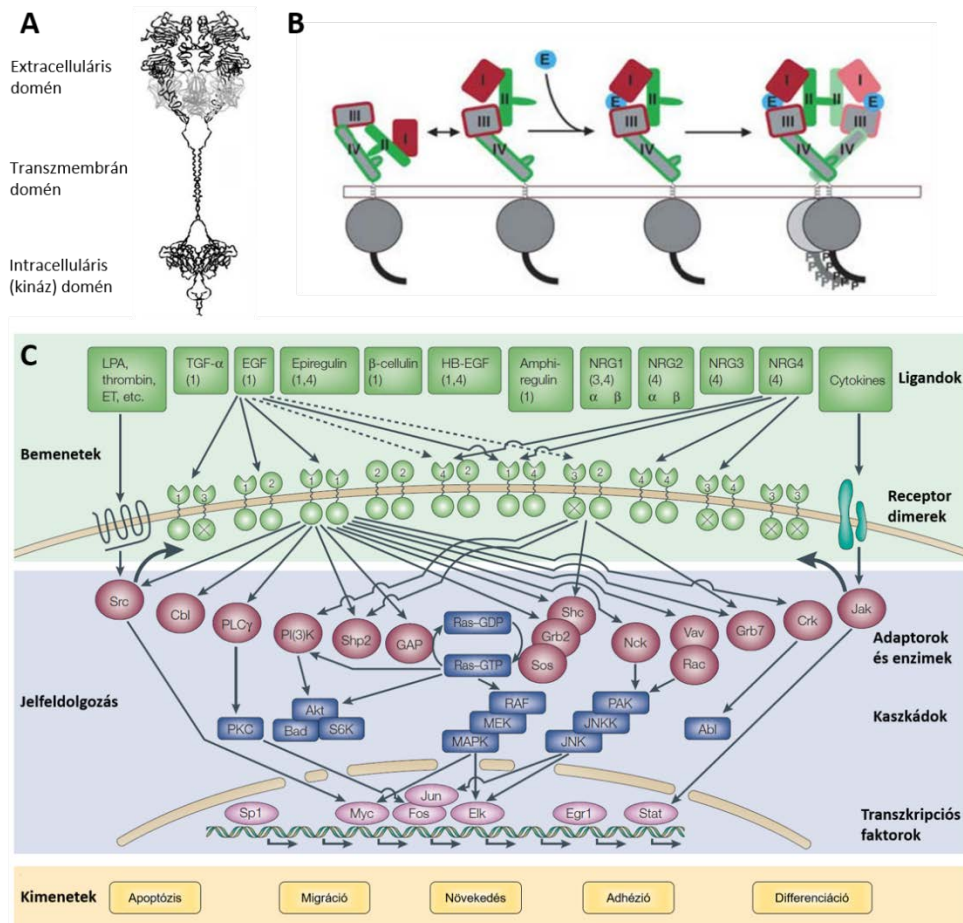
Az ErbB fehérjékkel kapcsolatos kiemelt érdeklődés másik oka, hogy a dimerizáció által aktiválódott fehérjék prototípusainak tekinthetők⁸⁴. A négy receptor szerkezete és funkciója nagyfokú hasonlóságot mutat egymással és általános értelemben az egyéb receptor tirozin kinázokkal. A transzmembrán proteinek jellemző módon rendelkeznek egy extracelluláris, egy transzmembrán és egy intracelluláris doménnel (2.2.3.1 ábra). A fehérjék extracelluláris része négy szubdoménból épül fel, amelyek közül kettő, az L1 (I) és az L2 (III) leucinban gazdag és a ligand megkötésében játszik szerepet, míg a másik kettő, a ciszteinben gazdag CR1 (II, S1) és CR2 (IV, S2) a receptor monomer alegységeinek dimerizációs folyamataiban fontos. A fehérjék transzmembrán doménje 23 aminosavból áll és α -helikális szerkezetű, amely az intracelluláris régióban a 40 aminosavat tartalmazó juxtamembrán doménben folytatódik. Ezt követi a foszforilálható aminosavban gazdag tirozin kináz domén, amely a jelátviteli útvonalak szabályozásában jelentős. A molekulák C-terminális végén találhatóak a foszfitirozint kötő effektor molekulák kötőhelyei. Az ErbB3 és ErbB2 fehérjék szerkezete ettől némileg különbözik, előbbi kináz doménje inaktív a módosult aminosavösszetétel miatt, míg utóbbi esetén az I

és III szubdoménekből képződő ligandkötő zseb túl kicsi, így a mai napig nem találtak hozzá kötődő fiziológias ligandot^{92,99,108}.

Az ErbB fehérjék aktivációját leíró klasszikus alloszterikus aggregációs modellt az EGFR vizsgálata során alkották meg. Már az EGFR felfedezése idején felvetődött a receptor-ligand komplexek aggregációjának szerepe az aktiváció folyamatában¹⁰⁹. A modell szerint az inaktív állapotban levő receptor monomerként fordul elő a sejtmembránban, majd ligand (pl. EGF) kötődésének hatására megváltozik a fehérje extracelluláris doménjének konformációja¹¹⁰. Ez a receptor dimerizációjához vezet, amely által a szomszédos citoplazmatikus tirozin kináz domének közel kerülnek egymáshoz és receptor-receptor kölcsönhatások révén aktiválódnak^{111,112}. A megnövekedett kinázaktivitás eredményeképpen a receptor-alegységek (kereszt)autofoszforylációja következik be, amely hatására az intracelluláris részen a dokkolóhelyként funkcionáló foszforylált tirozin oldalláncokhoz sejtplazmai fehérjék kötődhetnek Src homológia 2 (SH2) doménjeik segítségével, foszforylálódhatnak és aktiválódhatnak, amely a downstream jelátviteli útvonalak beindulását eredményezi¹¹³⁻¹¹⁵ (2.2.3.1 ábra). A dimerizáció és autofoszforyláció szerepét támasztották alá azon megfigyelések, amelyek szerint kinázdeficiens EGFR jelenléte domináns negatív módon csökkentette a foszforylációs aktivitást és a jelátviteli folyamatok beindulását, valamint az EGFR molekulák mesterséges keresztkötése növelte foszforylációs aktivitásukat¹¹⁶⁻¹¹⁸.

ErbB fehérjék esetén nemcsak a receptor alegységek homodimerizációs folyamatai vezethetnek aktivációhoz, hanem a család különböző tagjai heterodimereket is képezhetnek, amely szintén a jelátviteli útvonalak beindulását eredményezi. Ennek első bizonyítékeként, gyomorkarcinóma eredetű sejtek esetén az EGF liganddal történő stimuláció az ErbB2 fehérjék foszforyláltságának növekedéséhez vezetett¹¹⁹. A jelenség hátterében később kimutatták az EGFR-ErbB2 heterodimerek jelenlétét és azt is, hogy a heterodimerek kialakulása az EGFR EGF iránti affinitásának növekedését eredményezte¹²⁰. Hasonló kölcsönhatást mutattak ki az ErbB3 és az ErbB2 között, a kialakuló heterodimer pedig funkcionálisan ötvözta és felerősítette a két alegység tulajdonságait, hiszen magas heregulin affinitással és kináz aktivitással bírt¹²¹. Emellett bebizonyosodott az is, hogy az EGFR heterodimereket alakíthat ki ErbB3-mal^{122,123}, valamint ErbB4-gyel is¹²⁴. Az ErbB2 szintén a család összes többi tagjával képezhet heterodimert, amely egyrészt megnöveli a partner ligand iránti affinitását (valószínűleg a ligand disszociációjának lassítása révén), másrészt pedig a jelátviteli útvonal aktivációjának növekedését eredményezi, a heterodimer magasabb kináz aktivitása, valamint lassabb endocitózisa révén^{125,126}. A későbbiekben az is kiderült, hogy bár a családon belül szinte bármilyen heterodimer képződése lehetséges, az ErbB2 jelenléte esetén ez a fehérje számít preferált heterodimerizációs partnernek, a többi dimer elsősorban annak hiánya esetén alakul ki. A legfontosabb dimer kölcsönhatásoknak az ErbB2-ErbB3 és ErbB2-EGFR heterodimerek kialakulása mutatkozott. Az ErbB

fehérjék a receptor interakciók komplex hálózatát hozzák létre és a különböző receptor kombinációk eltérő szignalizációs útvonalakat aktiválhatnak, amelyek a növekedést szabályozó szignálok finomhangolásában és amplifikációjában jelentősek, valamint nélkülözhetetlenek az ErbB3 produktív jelátviteléhez¹²⁷⁻¹³⁰ (2.2.3.1 ábra).



2.2.3.1 ábra: Az ErbB fehérjék felépítése, klasszikus aktivációs modellje és az általuk aktivált jelátviteli útvonalak (az ábra ^{79,131,132} referenciákban fellelhető ábrák felhasználásával készült). A. Az ErbB fehérjék az egyéb receptor tirozin kinázokhoz hasonlóan rendelkeznek egy ligandot kötő extracelluláris, egy transzmembrán és egy kináz aktivitással bíró intracelluláris doménnel. B. A klasszikus allosztérikus aktivációs modell alapján az ErbB receptorok nyugalomban inaktív monomerként fordulnak elő, amely állapotban az extracelluláris domén jellemzően zárt konformációban található. Ez a konformáció átalakulhat egy nyitott szerkezetté, elsősorban ligand jelenléte esetén, amely stabilizálja a nyitott konformációt. Ebben az elrendezésben az extracelluláris dimerizációs kar exponálódik, amely révén a monomerek homo-, illetve heterodimerekké alakulnak. Ennek hatására az intracelluláris domének megfelelő orientációjának kialakulása eredményeképpen a kináz domének aktiválódnak, amely a jelátviteli útvonalak beindulását eredményezi. C. Az ErbB receptor homo-, illetve heterodimerek kialakulása a kölcsönhatásban részt vevő receptorok és a sejtek/szövetek típusa függvényében számos különféle jelátviteli útvonal aktiválódását eredményezheti, amely különféle sejtválaszok kiváltásához vezet. Ezek egyik leggyakrabban előforduló típusa a sejt proliferációja, amely magyarázza azt a megfigyelést, hogy a receptorok túlműködése számos daganat patomechanizmusában szerepet játszik.

A klasszikus dogma szerint a receptor dimerizációt és aktivációt elsősorban az ErbB fehérjék extracelluláris doménje irányítja. A korábban leírtaknak megfelelően a ligand kötődéséért az extracelluláris I és III, míg a dimerizációért a II és IV szubdomén felelős. Az ErbB fehérjéről (az ErbB2 kivételével) krisztallográfias vizsgálatokkal kimutatták, hogy aktiválatlan állapotukban egy zárt konformációban találhatók^{108,133,134}. Ebben a konformációban a II szubdomén dimerizációs karja a IV szubdoménnel intramolekuláris kölcsönhatást alakít ki, amely stabilizálva a térszerkezetet megakadályozza a dimerizációt, amely a II szubdomén dimerizációs karjának intermolekuláris kölcsönhatásával jöhetne létre. A zárt konformációban a ligandot kötő szubdomének távol vannak egymástól, de képesek ligandot kötni¹³⁵. Egyik elmélet szerint a ligand bekötődése indukálja a zárt konformáció nyíltba való átmenetét, míg más elképzelések szerint a receptor konformációja fluktuál a zárt és nyitott állapotok között, és a ligand bekötődése stabilizálja az utóbbit¹³² (2.2.3.1 ábra). Az ErbB2 esetén ezzel szemben a II és IV szubdomének közötti intramolekuláris kölcsönhatás hiányzik és a receptor extracelluláris doménje egyfolytában nyílt konformációban van, ezért preferált heterodimerizációs partner. Homodimerizációja ugyanakkor az alegységek közötti elektrosztatikus taszítás miatt csak túlzott sejtfelszíni expresszió vagy a transzmembrán doménben található mutáció esetén figyelhető meg¹⁰⁸.

2.2.4. Az ErbB fehérjék transzmembrán doménje és az aktiváció új modellje

Számos kutatás utalt azonban arra, hogy a receptoraktiváció jóval komplexebb folyamat, nem írható le olyan egyszerűen, mint az az eredeti klasszikus modellben szerepelt. Már korán voltak arra utaló jelek, hogy az ErbB alegységek asszociációja nem elegendő a fehérje aktivációjához. Kimutatták például, hogy az ErbB2 homodimerizációjának indukálása egy, az extracelluláris doménben történő aminosavcserével nem eredményezi a foszforiláció növekedését, illetve a jelátviteli folyamatok beindulását. Ez arra utalt, hogy inaktív dimerek képződése is lehetséges¹³⁶. Ezzel összhangban FRET és FLIM mérések során egy jelátviteli szempontból inaktív, dimerizált vagy oligomerizált EGFR szubpopuláció jelenlétét mutatták ki intakt, élő sejtekben ligand nélkül is. A közleményben prezentált modell szerint az ilyen preformált komplexeket az EGFR dimert alkotó két partner egyszerű, nonallostérikus, ligandindukált reorientációja aktiválhatja, amelyet a transzmembrán és citoplazmatikus domének összehangolt rotációs mozgása mediálhat¹³⁷. Ezt megerősítve FLIM, fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia, number&brightness analízis és egyéb módszerek segítségével bizonyították preformált EGFR (főleg tranzienst) dimerek, tetramerek és egyéb magasabb rendű komplexek jelenlétét ligand hiányában is¹³⁸⁻¹⁴⁴. A család egyéb tagjairól, így az ErbB2 és ErbB3 fehérjéről is kimutatták, hogy nagyméretű, néhány tíz vagy akár száz proteiból felépülő homoaggregátumokat alkotnak néhány tíz vagy akár száz nanométeres méretben. Aktiváció során pedig a receptor-alegységek elhagyhatják ezen komplexeket¹⁴⁵⁻¹⁴⁸.

Bár kezdetben a dimerizáció folyamatában kizárólagosnak gondolták az extracelluláris domén szerepét, később kiderült, hogy az ErbB receptorok klaszterizációjában a transzmembrán és az intracelluláris domén is szerepet játszik. Az inaktív állapotban az ErbB1 kináz doménje egy önmagát gátló konformációban található, amelynek szerkezete nagyban hasonlít az inaktív ciklin-dependens kinázok struktúrájához. Aktiváció során a két kináz domén aszimmetrikus dimert képez, amelyben a „receiver” kináz aktiválja az „activator” kináz^{149,150}. Hasonló feladatmegosztást figyeltek meg indirekt módon ErbB heterodimerek kináz doménjei között is¹⁵¹.

Az ErbB fehérjék három nagy alkotóeleme közül a transzmembrán domén (TMD) dimerizációban játszott szerepe a legkevésbé ismert. A receptorcsalád tagjainak felfedezése után azt gondolták, hogy a TMD szerepe passzív, csupán annyi, hogy a proteint a membránba horgonyozza, hiszen a TMD-ben különféle mutációt hordozó receptorokban nem találtak eltérést sem a ligandaffinitás, sem a dimerizáció, sem pedig a foszforilációs aktivitás tekintetében¹⁵²⁻¹⁵⁴. Ezzel összhangban az extra- és intracelluláris domének kapcsolódását biztosító transzmembrán és juxtamembrán domének nagyon rugalmasnak tűnnek^{155,156}, ugyanakkor néhány megfigyelés a TMD receptoraktivációban játszott jelentős szerepét támasztja alá. Az első erre utaló jeleket a humán ErbB2 (NeuT) vagy patkány homológja transzmembrán doménjének vizsgálata során találták. A 664-es pozícióban levő Val aminosavat ugyanis Glu-ra vagy Gln-ra cserélő pontmutáció hatására a fehérje homodimerizációjának és aktivitásának fokozódását figyelték meg^{95,157,158} (Jóllehet a Neu jelölést eredetileg egy nitrozoetilurea-indukált patkány neuroblasztómában talált onkogén leírására használták, manapság széles körben használják a humán ErbB2/HER2 onkoprotein elnevezésére is. A dolgozatban minden fehérje-, illetve génszimbólum a humán verzióra utal). Ezzel összhangban ugyanezen valin aminosav izoleucinra történő cseréjét eredményező egyedi nukleotid-polimorfizmus az emlőtumor csökkent rizikójával társul¹⁵⁹.

Kiderült, hogy az ErbB fehérjék esetén a dimer kialakulása során az alegységek TMD-jei is kapcsolódnak egymáshoz. A TMD-k közötti dimerizáció mechanizmusában Sternberg és Gullick szerint leginkább a Glu, Gln és Asp aminosavak játszanak szerepet, amelyek hidrogénkötéseket hozhatnak létre protonált formájukban. A hidrofób környezetben a savas aminosavak pK_a-ja megemelkedik, így neutrális pH-n az oldalláncok egy része ionizálatlan. A monomerek protonált oldallánca hidrogénkötést alakíthat ki a másik monomer karbonil oxigént tartalmazó részével, ami stabilizálja a receptort dimer formában. A dimerizációhoz a transzmembrán hélixek megfelelő pozíciójában szükséges egy konszenzus szekvencia, amely egy kis oldalláncú aminosavat tartalmaz a 0 pozícióban ('P₀', az ErbB2-ben Ala661), egy alifás oldalláncot a 'P₃'-ban (664-es pozíció ErbB2-ben) és egy kis oldalláncot (Gly vagy Ala) a 'P₄'-ben. Ezt a szekvenciát Sternberg-Gullick szekvenciának nevezik¹⁶⁰. A későbbiekben a membránfehérjék TMD-jeiben található α -hélixek kölcsönhatásait modellező szerkezeti és termodinamikai számítások

alapján az ErbB fehérjékben (és valószínűleg más receptor tirozin kinázokban is) a dimerizáció a TMD-ben található két Sternberg-Gullick GxxxG dimerizációs motívum egyikén keresztül valósulhat meg. A stabilabb asszociáció a TMD C-terminális részén levő motívum segítségével történhet, amely a receptor inaktív dimer formájának felelhet meg és amely kialakulása nem eredményezi a kináz domén aktiválódását, míg az N-terminális szekvencián keresztül megvalósuló forma jelenti az aktív konformációt. Az utóbbi konformációba történő átalakulás az intracelluláris katalitikus domének reorientációját eredményezheti, amely a receptor transzautofosforilációjához és a kinázaktivitás fokozódásához vezethet. A receptor dimer konformációk egyszerűen, energetikailag kedvezőtlen köztes állapot nélkül képesek átalakulni egymásba, vagyis a (kísérletes eredményekkel összhangban) az aktív és inaktív dimerek egymás mellett fordulhatnak elő a sejt felszínén normál expresszió mellett is. Túlexpresszió esetén megnövekedhet az aktív dimerek abszolút mennyisége, amely emelkedett kinázaktivitáshoz és tumoros transzformációhoz vezethet anélkül, hogy az aktív és inaktív dimer forma aránya eltolódna¹⁵⁸. A két motívumról azt is leírták, hogy szerepük különbözhet a TMD-k homo- és heterodimer kölcsönhatásainak stabilizációja szempontjából¹⁶¹. Az ErbB fehérjék lehetséges kombinációi közül az ErbB1 és ErbB2 TMD-k homodimerjei, valamint azok heterodimerjei mutatják a legerősebb asszociációs tendenciát¹⁶². A TMD-k receptoraktivációban játszott szerepéről leírták azt is, hogy azt terápiás célokra is fel lehet használni, hiszen speciális, TMD-k elleni oligopeptid szekvenciák kompetitív módon gátolhatják a receptorok dimerizációját, aktivációját és így a tumorok növekedését is¹⁶³.

A legújabb kísérletes adatok figyelembe vételével az ErbB1 (és valószínűleg a többi ErbB receptor) aktivációja egy újabb aktivációs modellel jellemezhető, amely szerint a transzmembrán és kináz doméneknek intrinsic dimerizációs és aktivációs tendenciája van, amelyet ellensúlyoz az extracelluláris domén zárt konformációja, az inaktív kináz dimerek képződése és a juxtamembrán szegmentum kölcsönhatása a membránban található anionos lipidekkel¹⁶⁴⁻¹⁶⁸. A ligand megkötése az extracelluláris domén által felszabadítja a receptorokat ezen inhibitoros mechanizmusok alól¹⁶⁸. Mivel a dipólpotenciálról kimutatták, hogy jelentősen befolyásolhatja a membránban található fehérjék TMD-jének szerkezetét és funkcióját, logikusnak tűnik a feltételezés, hogy az ErbB fehérjék asszociációjára is hatást gyakorolhat, amelyet azonban eddig még nem vizsgáltak.

2.3. A lipidtutajok

2.3.1. A lipidtutajok kezdeti leírása és kapcsolatuk koleszterinnel és szfingolipidekkel

Már régóta ismert, hogy a sejtmembrán alapvetően egy kettős molekularéteg, amelynek szerveződését az amfipatikus foszfolipidek határozzák meg. A sejtmembrán legfontosabb alkotóelemei a foszfolipidek, a szfingolipidek és a koleszterin, amelyek különböző típusai aszimmetrikus eloszlást

mutatnak az extra-, illetve intracelluláris rétegben. A membrán szerkezetét főleg az amfipatikus komponensek aggregációs hajlama határozza meg. Hidrofób részeik asszociálnak egymással, kiszorítva a vízmolekulákat és lecsökkentve a vízzel kölcsönható felületet, míg hidrophil részeik az extra- és intracelluláris oldatokkal lépnek kölcsönhatásba, ezáltal egy energetikailag stabil szerkezet jön létre. A korábbi elképzelések szerint a foszfolipidek oldalláncai folyékony fázisban vannak, így fiziológiai körülmények között a lipid kettősréteg egy kétdimenziós folyadéknak tekinthető. A membránfehérjék ebben a kettős rétegben helyezkednek el oldott formában úgy, hogy laterális motilitásuk segítségével a lipidek között szabadon diffundálhatnak, véletlenszerű fehérjeeloszlást mutatva. Ez a szerkezet volt a kezdeti Singer-Nicolson folyékony-mozaik membránmodell¹⁶⁹.

A későbbiekben azonban kiderült, hogy a sejtmembrán szerveződése bonyolultabb, hiszen a különböző lipidek rendezett, inhomogén laterális eloszlást hoznak létre. Az így létrejövő régiók lipid- és fehérjeösszetétele, valamint szupramolekuláris architektúrája eltér a membrán többi régiójától. A mikronos nagyságrendű speciális régiókat membrán doméneknek nevezzük. Ezek főleg polarizált sejtekre jellemzőek (epiteliális sejtek, neuronok), de gyakorlatilag minden sejtben előfordulnak (például a sejt mozgása során megfigyelhető polaritás formájában). Hasonló szerveződési elemek szubmikronos, nanométeres nagyságrendben is előfordulhatnak, amelyeket mikrodoméneknek nevezünk. Ezek egyik első leírása GPI-horgonyzott fehérjék vizsgálata során történt, amely során megfigyelték, hogy a fehérje az epitheliális sejtek lizátumából alacsony sűrűségű, detergens inszolubilis formában volt kinyerhető. Ez arra utalt, hogy a fehérjék a lipid kettősréteg detergens inszolubilis részével asszociálódtak, amely glikoszfinolipidekben rendkívül gazdagnak bizonyult. Felvetették, hogy ezek a glikoszfinolipidek egymással asszociálva speciális mikrodoméneket képezhetnek, a GPI-horgonyzott fehérjék pedig preferenciálisan ezekben helyezkedhetnek el. Ez a felvetés vezetett a lipidtutaj elmélet megalkotásához^{170,171}.

A lipidtutaj elmélet szerint a szfinolipid és a koleszterin molekulák preferenciális rendeződésük révén mozgó platformokká, más elnevezéssel tutajokká állnak össze, amelyek specifikus módon bizonyos fehérjéket foglalnak magukba. A modell szerint a rendeződés alapja, hogy a glikoszfinolipidek a szénhidrát feji csoportok közötti kölcsönhatás révén laterálisan kapcsolódnak. A szfinolipidek feji csoportjai a külső membrán réteg síkjában nagyobb területet foglalnak el, mint a főleg telített zsírsav oldallánccok, a köztes területet pedig koleszterin molekulák töltik ki. A szfinolipidek és a koleszterin közötti szoros kölcsönhatások révén a modellmembránokban leírtakhoz hasonló folyékony rendezett (Lo) domének alakulhatnak ki, amelyek képződése laterális fázisszeparációhoz vezet. Az így keletkező, lipidtutajnak nevezett területeket a szoros pakolódási denzitás, a modellmembránok gél (So, szilárd rendezett) fázisához képest relatíve magas laterális motilitás, valamint a detergens inszolubilitás jellemzi. Ezen mikrodomének a sok telítetlen molekulát tartalmazó foszfolipidekben gazdag domének

mellett fordulnak elő, amelyeket laza pakolódású, a modellmembránokban leírt folyékony rendezetlen (Ld) állapothoz hasonló szerkezet jellemez. Ezt a fázisszeparációt kezdetben modellmembránokban írták le, de azt feltételezték, hogy a biológiai membránokra is jellemző lehet, vagyis élő sejtekben az L_o fázisnak megfelelő lipidtutajokat körülveszi a membrán egyéb lipidjeinek Ld fázisnak megfelelő folyékony „tengere”. Az elmélet azt feltételezte, hogy 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 funkcióját¹⁷²⁻¹⁷⁴.

A lipidtutajokkal kapcsolatos kezdeti kutatások összefoglalásaképpen a 2006-os Keystone Szimpóziumon megalkották a lipidtutajok definícióját: „a lipidtutajok kis (10-200 nm-es), heterogén, nagyon dinamikus, szterolban és szfingolipidekben gazdag domének, amelyek kompartmentalizálják a sejtes folyamatokat. A kis tutajok bizonyos esetekben fehérje-fehérje és fehérje-lipid kölcsönhatások révén nagyobb platformokat képezhetnek”. A klasszikus definíció szerint a fázisszeparáció alapja bizonyos lipidek keveredésének képtelensége. Az alternatív jelenségek révén kialakuló lipid-fehérje asszociátumok nem tartoznak a lipidtutajok közé¹⁷⁵.

A lipidtutajok kezdeti definíciója szerint tehát képződésük alapja a membránt alkotó lipidek keveredésének képtelenségéből fakadó laterális szegregációja. A folyamatban rendkívül fontos a koleszterin, hiszen a rigid szterol gyűrű planáris szerkezete kedvező a telített zsírsavat tartalmazó merev lipidek számára, míg kedvezőtlen a nagyobb kiterjedésű, telítetlen lipideknek. A koleszterinnel való kölcsönhatás emellett a zsírsavoldalláncok nyújtott konformációját eredményezi, amely növeli a membrán vastagságát, ezáltal a hidrofób mismatch következtében segíti bizonyos lipidek szegregációját. Mivel a szfingolipidek általában hosszabb és telítettebb szénhidrogén oldalláncokat tartalmaznak, valamint feji csoportjuk és szfingozin bázisuk mind akceptorként, mind pedig donorként részt vehet hidrogénkötések kialakításában, előszeretettel lépnek kölcsönhatásba koleszterin molekulákkal, elősegítve a mikrodomének kialakulását¹⁷⁶.

A kezdeti lipidtutaj definíció szerint a fehérjék nem vesznek részt aktívan ezen mikrodomének létrehozásában, ugyanakkor affinitásuk szerint dúsulnak a membrán raft vagy non-raft régióiban. A tutajokba történő partíció molekuláris szerkezeti meghatározói még nem teljesen ismertek, néhány tényezőről azonban már bebizonyosodott, hogy a tutajba történő lokalizációt segíti. Ilyen szerkezeti determináns például a fehérje lipidációja (GPI-horgony, palmitoiláció, mirisztoiláció, preniláció vagy szterol konjugáció) és fehérjék transzmembrán doménjének néhány fontos jellemzője (elsődleges szerkezet, a transzmembrán domén hossza és kölcsönhatási képessége a membránlipidekkel)¹⁷⁷.

A konszenzusos definíció ellenére a lipidtutajokkal kapcsolatos kutatások már a kezdetektől fogva bizonyos szempontokból ellentmondásosak voltak. Ennek egyik oka az volt, hogy ezen mikrodomének létezésével és funkciójával kapcsolatos bizonyítékok indirekt módszereket, így detergens extrakciót vagy koleszterindepléciót alkalmazó vizsgálatokból származtak. Ezek használata során problémát jelentett, hogy a modellmembránokban megfigyelték nem ültethetőket át közvetlenül élő sejtekre, a detergens kezelés mesterségesen a mikrodomének szegregációjához vezethet, a koleszterin és a szfingolipidek tutajoktól független hatásokat is kifejthetnek (pl. direkt kölcsönhatás), illetve az alkalmazott próbák a raftmarkerek mesterséges aggregációját eredményezhetik. Élő sejtekben a tutaj alkotóinak közvetlen vizsgálatai során pedig még a mikrodomének méretével, illetve egyáltalán a létezésével kapcsolatban sem mutatkozott konszenzus, valamint a tutajok vizualizációja is rendkívül nehézkesnek bizonyult¹⁷⁸.

2.3.2. A lipidtutajok és a fehérjék, avagy új elméletek a lipidtutajokkal kapcsolatban

A lipidtutajokkal kapcsolatos bizonytalanságok egyik fő forrása, hogy méretük révén nem mutathatók ki hagyományos mikroszkópos módszerekkel. A kísérletes tapasztalatok ellentmondásainak feloldására egy új elméletet alkottak, amely szerint a korábban felvetett mechanizmusoknak megfelelően kis, laterálisan mobilis Lo domének alakulnak ki spontán módon a sejtmembránban, amelyek azonban csak átmeneti jellegűek, nagyon rövid ideig (<0,1 ms) és kis méretben (<10 nm) léteznek, így rendkívül nehezen mutathatók ki. A domének szélein elhelyezkedő fehérjék azonban surfactant funkcióval bírhatnak, illetve egyéb doménekkal való véletlenszerű ütközés révén a kis domének fúziójával nagyobb lipid bázisú klaszterek képződéséhez vezethetnek. Akár egészen nagy asszociátumok is kialakulhatnak, ehhez azonban fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulása szükséges. Ezek alapján a fehérjék a korábbi elmélettel ellentmondó módon aktív szerepet játszhatnak a detektálható lipidtutajok kialakulásában, egymással, szterollokkal és szfingolipidekkel való kölcsönhatásaik révén ugyanis felerősítik a lipidek szubkompartmentalizációs hajlamát, amely a nagyobb domének kialakulását eredményezheti^{176,179}. A hagyományos lipidtutajoknál nagyobb, szubmikrométeres lipid domének más mechanizmusok révén is kialakulhatnak. Ilyenek lehetnek a ceramid alapú, szignalizációban fontos platformok, amelyek a membránban található szfingomielin szfingomielináz általi hasítása során keletkező ceramid révén jönnek létre. Az még vitatott, hogy ezek a platformok a sejtmembránban már jelen levő lipidtutajok asszociációjával képződnek vagy újonnan alakulnak ki és a raftokkal párhuzamosan fordulnak elő¹⁸⁰.

A későbbiekben alternatív elméleteket is leírtak a korábban a lipidtutajoknak tulajdonított jelenségek magyarázatára. Az egyik ilyen szerint a lipidtutajok helyett a membránban található fehérjéket egy annuláris lipidekből álló burok veszi körül, amelyet kedvező lipid-fehérje, lipid-lipid vagy lipid-glikán kölcsönhatások hoznak létre. Mivel egy ilyen komplex mérete 3-4 nm lehet, ez a gyakorlatban a

fehérjék nagy száma miatt azt jelentheti, hogy a membránban minden lipid részt vesz egy ilyen asszociátum kialakításában. A fehérjék transzmembrán doménje specifikus motívumok segítségével közvetlen módon is kölcsönhatást alakíthat ki lipidekkel, leggyakrabban koleszterin vagy szfingolipid molekulákkal, amelyek alloszterikus módon szabályozhatják a fehérje funkcióját. Emellett intracelluláris organelum, például az endoplazmás retikulum is befolyásolhatja a sejtmembrán szerveződését közvetlen kapcsolódások kialakítása révén. Végül, de nem utolsósorban a kortikális aktin hálózat is befolyásolhatja a fehérjék membránbeli kompartmentalizációját, amelyet az ún. cölöpkerítés modell ír le. Eszerint az aktinhálózat egyfajta kerítést alakít ki, amelyhez bizonyos fehérjék cölöpként kapcsolódnak és ez a szerkezet befolyásolja egyéb fehérjék diffúzióját a membránban¹⁸¹.

Bár a fentiekből látható, hogy a lipidtutajok tulajdonságaival, funkcióival kapcsolatos kutatásokat, illetve azok eredményeit számos vita és ellentmondás jellemzi, abban a legtöbb kutató egyetért, hogy a lipidtutajok termodinamikusan instabil, szfingolipidekben és koleszterinben gazdag mikrodomének a sejtmembránban, amelyek bizonyos dinamikus paramétereikben jelentős hasonlóságot mutatnak a modellmembránok folyékony rendezett, stabil Lo doménjeivel. Azonban a kezdeti elmélettel szemben valószínűleg nem a lipidek által mediált kölcsönhatások felelősek elsődlegesen a lipidtutajok képződéséért, mivel mind a citoskeleton, mind a membránfehérjék, illetve azok lipidekkel való kölcsönhatásai, mind pedig a membrán turnover jelentősen hozzájárulnak a tutajok képződéséhez és tulajdonságainak meghatározásához¹⁸¹⁻¹⁸⁴. A lipidtutajokkal kapcsolatos ellentmondások ellenére a raftok sokrétű szerepet játszanak számos különböző biológiai funkcióban, így a transzmembrán jelátvitelben és a membrán traffickingben mind egészséges, mind patológiás állapotok esetén^{185,186}.

2.3.3. A lipidtutajok szelektív jelölésének lehetőségei

A lipidtutajok jelölése sokféle technika és marker használatával lehetséges. Az ideális próba kicsi, nem-toxikus lenne, specifikusan jelölné az élő sejtek membránjában előforduló endogén lipideket, valamint megfelelő spektrális tulajdonságokkal rendelkezne. Jelenleg egy ilyen jelölési módszer sem áll rendelkezésre, minden ismert technika és jelölő komoly hátrányokkal rendelkezik¹⁸⁰.

Általában a lipidtutajok szelektív jelölése bizonyos membránkomponensek raftokban történő preferenciális koncentrációján alapul. A leggyakrabban alkalmazott lipidtutaj-markerek közé tartoznak a glükoszilfoszfatidilinozitol (GPI)-horgonyzott fehérjék. Ezek olyan proteinek, amelyek a C-terminuson GPI horgonyt tartalmaznak, így a sejtmembrán extracelluláris rétegébe rögzülnek. A GPI-horgony révén ezek a molekulák a lipidtutajokba inkorporálódnak és alkalmasnak bizonyultak a lipidtutajok szerveződésének és dinamikájának vizsgálatára mind fluoreszcencia, mind pedig elektron mikroszkópos vizsgálatok során^{171,187}. A későbbiekben felvetődött, hogy a GPI-horgonyzott fehérjék az ún. „átmeneti behatárolt zónákban” (transient confinement zone) helyezkednek el, amelyek az aktin

citoszkeleton és a spektrin hálózat által létrehozott kortikális mátrix barrier effektusa révén keletkeznek a korábban említett cölöpkerítés modellnek megfelelően. Bár az átmeneti behatárolt zónák és a lipidtutajok kapcsolata még nem teljesen tisztázott, a lipidtutajok jelenleg érvényben levő definíciója szerint a citoszkeleton által mediált hatások szintén hozzájárulnak a tutajszerű mikrodomének kialakulásához, így a GPI-horgonyzott fehérjék alkalmasak a lipidtutajok jelölésére¹⁸⁸. A későbbiekben a GPI-horgonyzott fehérjék membránbeli klaszterizációját és az aktin citoszkeleton membránszerkezetet szabályozó funkciójára alapuló cölöpkerítés modellt alátámasztották FRET és szuperrezolúciós képalkotó technikákkal történő mérések is^{189,190}.

A Gram-negatív *Vibrio cholerae* által előállított koleratoxin nem-toxikus B alegysége (CTX-B) szintén széles körben használt lipidtutaj-markerként, ugyanis a toxin a lipidtutajokban dúsuló glikolipid receptor GM1 gangliozidhoz kötődik szelektív módon¹⁹¹⁻¹⁹³. A CTX-B egy pentavalens molekula, egyszerre öt GM1 gangliozid kötésére képes, ezáltal az egyébként kisméretű és tranziens lipidtutajok keresztkötése révén a membrán szerkezetének reorganizációját indukálhatja. Ezáltal elősegíti a korábban említett Lo jellegű membrán domének kialakulását, amelyek sok tulajdonságukban emlékeztetnek a lipidtutajokra. Emiatt a CTX-B rendkívül hasznos a fehérjék által stabilizált membrán domének tanulmányozása szempontjából, különösen, mivel a receptora széleskörűen elterjedt különféle sejttípusok esetén. Ezen tulajdonságai és a celluláris toxicitás hiánya miatt a CTX-B-t kiterjedten alkalmazzák a lipidtutajok markereként mikroszkópos és áramlási citométeres mérések során¹⁹⁴⁻¹⁹⁷.

A lipidtutajok szelektív jelölése lehetséges koleszterin ellenes antitestekkel is. Bár az ilyen antitestek létezését már 1925-ben felvetették, később a koleszterin széleskörű előfordulása és fontos biológiai szerepe miatt azt feltételezték, hogy a koleszterin egy nem vagy csak igen gyengén immunogén molekula. Az első olyan megfigyelések, amelyek meggyőzően alátámasztották a koleszterin immunogén szerepét ELISA vizsgálatok során születtek, amelyek kristályos koleszterin, mint antigén segítségével kimutatták, hogy csaknem minden felnőtt ember szérumában természetesen is előfordultak főleg IgG és IgM autoantitestek, amelyek reagáltak a koleszterinnel¹⁹⁸. Sőt, felvetették ezen antitestek szerepét a szérum koleszterin koncentrációjának szabályozásában, illetve vaszkuláris betegségek, elsősorban az ateroszklerózis, illetve az ahhoz társuló stroke vagy miokardiális infarktus patomechanizmusában is^{199,200}. Egerek magas (71%) koleszterin tartalmú vezikulákkal történő immunizálásával mesterségesen is előállítottak koleszterin ellenes monoklonális IgM antitesteket az erős lipid A adjuváns segítségével. Az antitest (2C5-6, ATCC HB-8995) csak nagy mennyiségű koleszterint tartalmazó liposzómákkal reagált, illetve ELISA és elektron mikroszkópos vizsgálatok alapján felismerte a kristályos koleszterint²⁰¹. Különféle szterol származékok vizsgálatával kimutatták, hogy az antitest a szterolok 3 β -hidroxil csoportját ismerte fel, illetve reagált emberből származó intakt

VLDL/IDL és LDL lipoproteinekkal, HDL partikulumokkal viszont nem. Ennek hátterében felvetették, hogy utóbbiak esetén a magasabb fehérjetartalom miatt a fehérjék sztérikus okok miatt elfedik a koleszterin molekulákat, amelyek így nem hozzáférhetők az antitestek számára. Mivel a koleszterin poláris hidroxil régiója nagyon kicsi és a sejtmembrán lipid bilayerének felszínén, annak legmélyebb pontján található, sejtek esetén is fedett lehet környező lipidek (főleg glikolipidek) és fehérjék által, amely jelentősen megnehezíti a koleszterin ellenes antitestek kötődését²⁰². A későbbiekben vízben oldhatatlan koleszterin monohidrát kristályokkal történő immunizáció segítségével egy újabb koleszterin ellenes antitestet, a monoklonális IgM típusú MAb 58B1-et állították elő, amely a koleszterin 5-20 molekulából álló specifikus háromdimenziós elrendeződését ismerte fel, az individuális koleszterin molekulákat nem²⁰³. Ezzel összhangban az MAb 58B1 indirekt immunofluoreszcenciás vizsgálatok során képes volt kötődni macrophagok és fibroblasztok membránjához, ha a sejtek koleszterintartalmát ACAT inhibitor segítségével megnövelték. A jelölés mintázata pontozottnak mutatkozott a konfokális felvételeken, illetve az antitest kötődése eltűnt a koleszterin kivonása vagy traffickingjének blokkolása esetén. Ezek arra utaltak, hogy a MAb 58B1 valójában a sejtmembránban a koleszterin megfelelő rendezettségű, több molekulából álló komplexét ismerte fel. Mivel ez az elrendeződés valószínűleg kizárólag a koleszterinben gazdag membrán mikrodoménekben fordul elő, a MAb 58B1 koleszterin ellenes antitest tulajdonképpen inkább egy lipidtutaj-jelölőnek tekinthető²⁰⁴. Ennek megfelelően az MAb 58B1-et a későbbiekben koleszterinben gazdag mikrodomének vizsgálatára használták például humán monocita, illetve csontvelő eredetű makrofágok vagy ateroszklerotikus plakkok esetén^{205,206}. A későbbiekben magas koleszterintartalmú liposzómák és adjuváns lipid A segítségével történő immunizációval a korábban alkalmazott IgM típusú koleszterin ellenes antitestek mellett IgG izotípusú monoklonális anti-koleszterin antitesteket (AC1 és AC8) is előállítottak. A két új antitest sejtmembránban található koleszterinhez kötődését megerősítették mind direkt, mind indirekt jelölés során különféle humán és egér limfocita, valamint monocita-makrofág sejtvonalakon konfokális mikroszkópia és áramlási citometria segítségével is. A jelölés mértékét a sejtek papainos emésztése jelentős mértékben növelte, utalva arra, hogy az antitest kisméretű epitópot ismerhet fel a membránban, amelyet a hosszú, protrudáló fehérjék elfedhetnek. Az AC1 és AC8 szintén elsősorban a lipidtutajokban található koleszterint ismeri fel, amelyet alátámasztott, hogy az antitestekből származó jel erős pozitív korrelációt mutatott más lipidtutaj-markerek (fluoreszcensen jelzett koleratoxin B alegység, Thy1 antitest, illetve diIC18 lipid próba) szignáljával. A kötődés specifikus voltára utaltak azon megfigyelések is, amelyek szerint a membrán koleszterintartalmának depléciója metil- β -ciklodextrinnel jelentősen lecsökkentette az antitestkötődés mértékét²⁰⁷. Az AC1 és AC8 antitestek lipidtutajokkal való kapcsolatára utal, hogy azok a sejtmembrán laterális organizációjának átrendeződését okozhatják. Humán makrofágok, illetve egyéb professzionális antigénprezentáló sejtek ezen antitestekkel történő inkubációja ugyanis a GM1

raftok méretének növekedését, azok laterális klaszterizációját, koaleszcenciáját eredményezte, amely az immunsejtek aktivációs állapotát is befolyásolta^{208,209}.

2.3.4. A lipidtutajok funkciója

A lipidtutajokról kimutatták, hogy jelentős szerepet játszanak számos fontos celluláris mechanizmusban, így a jelátvitel, a membrán trafficking, a sejtadhézió és -migráció, a szinaptikus transzmisszió, a citoskeletális organizáció és a patogének sejtbe jutásának során. Ezen jelenségek alapja különféle mechanizmus lehet. A tutajok jelátviteli folyamatokra gyakorolt hatásának hátterében például az állhat, hogy a raftok a jelátviteli folyamatban résztvevők közötti kölcsönhatásokat serkenthetik azáltal, hogy azokat egymás közelében tartják a mikrodoménon belül. A tutajok inkomplett szignalizációs útvonalakat tartalmazhatnak, amelyek aktiválódhatnak, amikor a receptor vagy más szükséges molekula rekrutálódik a raftba, illetve ezek lehetnek a színterei az egyedi receptorok ligandkötődés hatására bekövetkező koncentrálódásának. Emellett ha a receptor aktiváció a tutajban történik, a szignalizációs komplex védve lehet a non-raft enzimek, például foszfatázok hatása ellen. Általánosságban a fehérjék a tutajokban egy más mikrokörnyezetben helyezkedhetnek el, amelyben a foszforilációs állapotukat a lokális kinázok és foszfatázok módosíthatják, beindítva a megfelelő jelátviteli útvonalakat. A tutajok akár a jelátvitel gátlásában is fontosak lehetnek, szekvesztrálva a szignalizáció komponenseit (így limitálva azok kölcsönhatásait) vagy gátolva az ott elhelyezkedő fehérjék intrinszc aktivitását. Az egyedi tutajok akár klaszterizálódhatnak is, kialakítva egy nagyméretű szignalizációs komplexumot, amelyet adaptorok, stabilizáló és horgonyzó fehérjék hálózata jellemezhet. Ez a jelátviteli komplexum a tutajklaszterekben izolálódhat a folyékony rendezetlen lipid mátrixtól, amely a szignalizáció molekulák koncentrációját, illetve a felesleges modulátorok exklúzióját eredményezheti¹⁸⁵.

A fentieknek megfelelően a lipidtutajok jelentőségét már bebizonyították számos jelátviteli folyamatban, különösen az idegrendszerben, amelynek sejtjei leggazdagabbak koleszterinben és szfingolipidekben. Ezzel összhangban kimutatták a raftok szerepét a neuronok differenciációjában²¹⁰, a neurotrop faktorok által kiváltott jelátviteli folyamatokban²¹¹⁻²¹³, a sejtek adhéziójában és migrációjában^{214,215}, az axon és neurit növekedésben²¹⁶, a szinaptikus transzmisszióban²¹⁷, illetve a neuron-glia kölcsönhatásokban²¹⁸.

A lipidtutajok befolyásolhatják növekedési faktor receptorok, így az ErbB fehérjecsald tagjainak működését is. Már a raft elmélet megalkotása előtt kimutatták, hogy exogén glikoszfingolipidek adása csökkenti a sejtek proliferációját, amely felvetette annak a lehetőségét, hogy gangliozidok gátolhatják a növekedési faktor receptorok funkcióját²¹⁹. A hatást a GM3 gangliozid okozza az EGFR gátlásán keresztül, amely során a GM3 a receptorhoz való kötődésben nem kompetál az EGF-fel²²⁰, de a

hatáshoz szükséges a GM3 és az EGFR szénhidrát csoportjainak kölcsönhatása²²¹. Az EGFR a kaveolin-1 fehérjével is kölcsönhat és a kaveolinban gazdag doménekben található^{222,223}, de a GM3 gátolja ezt az asszociációt és egyben gátolja az EGFR kölcsönhatását az integrin fehérje β_1 alegységével, amely az EGFR jelátvitelének inhibíciójában szerepet játszhat^{224,225}. A GM3 hatásának fontos eleme lehet még az is, hogy stabilizálja az EGFR inaktív monomer formáját²²⁶. A GM3, illetve az azt tartalmazó membrán mikrodomének egyéb receptorok, például az inzulin receptor működésének szabályozásában is jelentősek lehetnek^{227,228}.

2.3.5. A lipidtutajok és a dipólpotenciál

A lipidtutajokkal kapcsolatos viták ellenére a legtöbb kutató egyetért abban, hogy ezen mikrodomének speciális, a membrán egyéb régióitól eltérő összetétellel bírnak, amely rendkívül fontos a raftok funkciója szempontjából. A lipidtutajokra jellemző, hogy a membrán ezen doménjeiben dúsulnak a GPI-horgonyzott fehérjék, a koleszterin és a (gliko)szfingolipidek, a hosszú szénláncú telített zsírsavat tartalmazó lipidek, a palmitoilált transzmembrán fehérjék és a hosszú transzmembrán doménnel rendelkező proteinek, míg a többi membránrégió alacsonyabb mértékben tartalmaznak non-raft fehérjéket, így transzferrin receptort vagy izoprenoid horgonnyal rendelkező proteineket^{172,229}.

Mivel a sejtmembrán dipólpotenciáljának nagyságát elsősorban a membrán összetétele határozza meg, a tutajszerű mikrodomének és a sejtmembrán egyéb régióinak jelentősen különböző lipidösszetétele alapján logikusnak tűnik az a feltételezés, amely szerint a dipólpotenciál nagysága magasabb lehet a raftokban a membrán egyéb régióhoz képest. Ezt azonban élő sejtek membránjában közvetlen módon még nem demonstrálták. Bár korábban élő sejtekben di-8-ANEPPS festéket alkalmazó mérések során a fluoreszcens jel, így a dipólpotenciál nagyságának membránbeli laterális heterogenitása háttérben a lipidtutajok jelenlétét feltételezték, ennek explicit módon történő bizonyítását és a korreláció kvantitatív analízisét még nem prezentálták^{1,7,29}. Modellmembránokon végzett atomerő mikroszkópos mérések során ugyanakkor a kapott elektrosztatikus és topográfiai térképek közötti jó egyezés arra utalt, hogy a dipólpotenciál nagysága nagyobb lehet modellmembránok folyékony rendezett doménjeiben⁵⁴.

2.4. A Gaucher-kór

2.4.1. A Gaucher-kór általános jellemzői és a betegség pathomechanizmusa

Bizonyos patológiás állapotokban a sejtmembrán lipid összetétele megváltozhat¹⁸⁶. Az egyik olyan betegség, amelyben bizonyított a membránok összetételének változása a legismertebb lizoszomális tárolási betegség, a Gaucher-kór, amelynek legalapvetőbb jellemzője a glükozilceramid felhalmozódása a glükocerebrozidáz enzim deficienciájának következtében²³⁰.

A betegséget először 1882-ben írta le Philip Gaucher és a leggyakoribb lizoszomális tárolási betegségnek számít, előfordulási gyakorisága világszerte $\approx 1:40000-1:60000$. Legfontosabb jellemzője, hogy elsősorban a reticuloendothelialis sejtekben felhalmozódik a glükozilceramid, amely egy ceramidból, D-eritro-szvingozinból és egy 16-26 szénatomot tartalmazó zsírsav láncból felépülő glikoszfinolipid. Normál esetben a glükozilceramidot egy lizoszomális enzim, a glükocerebrozidáz (GBA, savas β -glükozidáz) bontja glükózzá és ceramiddá. A Gaucher-kórban az elsődleges defektus a glükocerebrozidáz enzim deficienciája, amely a szubsztrát glükozilceramid felhalmozódásához vezet. A betegség oka a GBA génben előforduló több, mint 300 mutáció és az ezek következtében kialakuló defektus az enzim katalitikus funkciójában, intracelluláris stabilitásában vagy szubcelluláris traffickingjében. A Gaucher-kórnak három klasszikus variánsát írták le. A leggyakoribb, non-neuropátiás I. típus a betegek 90%-ában fordul elő, az enzim szubtotális deficienciájával jár és elsősorban belső szervi (masszív máj és lép megnagyobbodás, tüdő infiltráció) és mozgásszervi tüneteket okoz, valamint jellegzetes manifesztáció a csontvelő patológiás makrofágok (Gaucher-sejtek) általi infiltrációja. A II. típusú akut perinatális forma ritka, súlyos neuropátiával, irritabilitással, bulbáris bénulással, opisthotonussal és a belső szervek kismértékű megnagyobbodásával jár és általában a betegek halálához vezet néhány éves korban. A Gaucher-kóros betegek 10%-át érintő krónikus vagy szubakut neuropátiás III. típus tekintésbénulással, mioklonusos epilepsziával és idegi eredetű vaksággal, valamint bizonyos fokú belső szervi érintettséggel jár, amelyek közül a legjellegzetesebb a tüdő infiltráció és általában a betegek halálához vezet a második-negyedik évtizedben²³¹⁻²³³.

A betegekben a belső szervekben megfigyelhető legjellemzőbb, egyben patognómikus eltérés a glükozilceramid felhalmozódása a makrofágokban, amely egyben a hepatosplenomegalia, anémia, trombocitopénia és tüdő manifesztációk kialakulását is eredményezi. Ezen Gaucher-sejtek rendkívül fontos szerepet játszanak a betegség patomechanizmusában, ennek pontos módja azonban még nem ismert²³¹⁻²³³. Bár a tünetek kialakulásának hátterében elsősorban a glükozilceramid felhalmozódását valószínűsítik, a direkt ok-okozati összefüggésnek ellentmondanak azon megfigyelések, amelyek szerint nincs összefüggés vagy csak gyenge korreláció mutatható ki a tünetek súlyossága, a reziduális enzimaktivitás és a felhalmozódott lipid mennyisége között. A kórban a genotípus és a fenotípus közötti összefüggés nem egyértelmű és a klinikai manifesztációk sokszínűségének magyarázata sem ismert²³⁴. A betegségre jellemző tünetek kifejlődésének hátterében a szubsztrát felhalmozódása mellett felvetették egyéb tényezők, így a különböző vegyületek lizoszomális degradációjában kialakuló vagy az endolizoszomális útvonal zavara következtében létrejövő durva eltérések, valamint az ER-stressz szerepét is^{235,236}.

2.4.2. CBE-kezelt differenciáltatott THP-1 sejtek, mint a Gaucher-kór in vitro modellje

Mivel a Gaucher-sejtek jelenléte a betegség legjellemzőbb, patogenetikai szempontból is fontos eltérését jelenti, a hasonló fenotípussal rendelkező makrofágok alkalmazása széles körben elfogadott a kór kísérletes vizsgálata során. Mivel a makrofágok gyűjtése és ex vivo expansiója rendkívül nehézkes, különösen egy olyan ritka betegségben, mint a Gaucher-kór, célszerű monocita eredetű sejtvonalak alkalmazása a kísérletek során. A humán akut monocitás leukémia eredetű THP-1 sejtvonalat kiterjedten alkalmazzák, hiszen forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) kezelés hatására a sejtek érett makrofággá differenciálódnak, amelyek a legtöbb szempontból jelentősen hasonlítanak a primer humán szöveti makrofágokhoz²³⁷⁻²³⁹.

A Gaucher-kórra jellemző fenotípus kialakulása indukálható a betegség állat vagy sejtes modelljei esetén a glükocerebrozidáz enzim legpotensebb, helyspecifikus irreverzibilis kompetitív inhibitora, a konduritol B epoxid (CBE) alkalmazásával^{240,241}. A CBE kezelést kiterjedten használják a betegség modelljeiben, így segítségével mutatták ki egerekben a glükoszilceramid felhalmozódását az agyban és perifériás szövetekben²⁴¹, vizsgálták a génterápia hatékonyságát a betegségben²⁴², akut neuropátiás formában a károsodások reverzibilitását²⁴³, illetve egy új orális aktív szubsztátredukciós terápia hatékonyságát²⁴⁴. Különböző sejtes modellekben pedig CBE kezeléssel vizsgálták a megnövekedett glutamát neurotoxicitását²⁴⁵, a proreceptor citokin milió²⁴⁶, valamint a csökkent hematopoiesis²⁴⁷ szerepét a tünetek kialakulásában, illetve a patogenetikai kapcsolat meglétét a Gaucher-kór és különböző neurodegeneratív betegségek, így az Alzheimer- és Parkinson-kór között²⁴⁸. A CBE rágcsálóból származó peritoneális, illetve humán vérből izolált makrofágok esetén is a glükoszilceramid Gaucher-kórban megfigyelhető felhalmozódásához vezetett dóziszfüggő módon^{249,250}. A CBE indukált Gaucher modellt használták humán vérből izolált PBMC, illetve THP-1 eredetű, PMA segítségével differenciáltatott makrofágok esetén a sejtmembránban megfigyelhető változások kimutatására is²⁵¹⁻²⁵⁴.

2.4.3. A Gaucher-kórra jellemző eltérések a sejtmembránban

A sejtekben a szfingolipid metabolizmus zavarát eredményező enzimdeficienciák a membránok összetételének változásaihoz vezethetnek. Ezt először a laktozilceramid egy fluoreszcens analógja (BODIPY-LacCer) segítségével mutatták ki, ugyanis ez a fluoreszcens lipid különböző, a laktozilceramid metabolizmusát primeren nem érintő szfingolipid-tárolási betegséggel rendelkező egyénekből származó fibroblasztokban a Golgi-komplexum helyett a lizoszómákban akkumulálódott²⁵⁵. A szfingolipid trafficking e zavara a koleszterinmegoszlás változásával társult, illetve jelentős mértékben függött a koleszterintől. A sejtek koleszterindepléciója esetén ugyanis a fluoreszcens lipid az egészséges fibroblasztokhoz hasonlóan a Golgiba került, míg a koleszterintartalom növelése a BODIPY-LacCer-ot az endoszomális/lizoszomális kompartmentekbe irányította²⁵⁶. Ezzel összhangban humán bőr eredetű

fibroblasztok exogén szfingolipiddel való töltése segítségével kimutatták, hogy a szfingolipid megnövekedett szintje a koleszterintartalom növekedését és redisztribúcióját eredményezte valószínűleg oly módon, hogy egyfajta „molekuláris csapdaként” szolgált a koleszterin számára, amely így az endoplazmás retikulum csökkent koleszterintartalmához, az SREBP-1 (sterol regulatory element-binding protein-1) indukcióján keresztül az LDL receptorok szintjének növekedéséhez és végső soron megváltozott lipid traffickinghez és membránösszetételhez vezetett²⁵⁷. A későbbiekben a szfingolipid trafficking, a koleszterinmegoszlás és endocitotikus targeting hasonló eltéréseit mutatták ki CBE kezelt fibroblasztokban és egér eredetű RAW makrofágokban, amelyek megakadályozhatónak bizonyultak a glikoszfingolipid bioszintézisét gátló N-butildeoxigalaktonojirimicin alkalmazásával²⁵⁸.

A szfingolipid trafficking befolyásolásán kívül a glükoszilceramid egyéb lipidek metabolizmusát is képes befolyásolni, például direkt módon aktiválta a CTP:foszfokolin citidiltranszferáz enzimet patkányból és egérből származó izolált hippocampalis neuronokban, valamint emberi eredetű CBE indukált makrofágokban^{254,259}. Gaucher betegekből származó tenyésztett fibroblasztokban EI-TMS (electrospray ionization-tandem mass spectrometry) segítségével a kontrollhoz képest emelkedett ceramid, di- és trihexozilceramid, szfingomielin, foszfatidilkolin, foszfatidilinozitol és foszfatidilglicerol tartalmat írtak le. Szubcelluláris frakcionáció alapján ezek az eltérések nem kizárólag a lizoszómákban, hanem egyéb endoszomális régiókban, sőt, kisebb mértékben a plazmamembránban is megjelentek²⁶⁰. Ugyanezzel a módszerrel CBE indukált Gaucher modell makrofágokban is hasonló eltéréseket találtak. A kezelés a glükoszilceramid mennyiségét 12-szeresére növelte, szubcelluláris frakcionálás alapján az akkumuláció primer helye a lizoszóma volt. A glükoszilceramid-tartalom növekedésével azonban az emelkedés minden frakcióban, így a plazmamembránban is megjelent. Emellett másodlagosan a ceramid, di- és trihexozilceramid, szfingomielin és foszfatidilglicerol szintje is megnőtt minden szubcelluláris részben. Ezek alapján a glükoszilceramid akkumulációja során kezdetben a lebontás hiánya miatt a lizoszóma szaturációja következik be, majd a trafficking telítése révén a glükoszilceramid mellett egyéb szfingolipidek is felhalmozódnak más helyeken is, így kezdetben az endoszomális kompartmentekben, majd az endolizoszomális rendszer eltömődése miatt a sejt egészében, beleértve a plazmamembránt is. Ez pedig a sejt diszfunkcióján keresztül a patológiás tünetek, így abnormális makrofág aktiváció megjelenéséhez vezethet²⁵³. Mivel a dipólpotenciál nagyságát elsősorban a sejtmembrán lipid összetétele határozza meg, a Gaucher-kórban az ezzel a mechanizmussal kialakuló eltérések akár a dipólpotenciál nagyságának változását is eredményezhetik.

2.4.4. A Gaucher-kór és a lipidtutajok kapcsolata

Mivel a szfingolipidek a lipidtutajok intrinsic alkotóelemei, azok mennyiségének változása a membránban a lipidtutajok szerkezetének és funkciójának a módosítását eredményezheti, amelynek akár a Gaucher-kór pathogenezisében is szerepe lehet. A feltevést alátámasztó első megfigyelésként

azt találták, hogy bizonyos jelátviteli folyamatok során a szfingomielináz enzim aktiválódik, amelynek hatására ceramid képződik a lipidtutajokban. A ceramid mennyiségének növekedése jelentősen megváltoztatja a tutajok biofizikai paramétereit asszociációs tendenciája miatt, amely kisméretű, nagyon rigid, gélszerű, a hagyományos lipidtutajoktól eltérő tulajdonságokkal bíró membrán mikrodomének kialakulásához vezet. Ezek spontán fúziója nagyméretű, ceramidban gazdag makrodomének vagy platformok képződését eredményezheti, amely a receptorok klaszterizációján keresztül a jelátviteli folyamatokat facilitálhatja és amplifikálhatja, illetve egyéb sejtfunkciókra is hatással lehet, így befolyásolhatja ioncsatornák szabályozását, az immunszinapszis kialakulását, patogének sejtbe jutását vagy a sejtek apoptózisát. Ezek hátterében az állhat, hogy a membrán szerkezetének változása elég nagy lehet ahhoz, hogy bizonyos membrán fehérjék konformációját, illetve a fehérjék és lipidek laterális diffúzióját megváltoztassa²⁶¹⁻²⁶³.

Az egyszerű szfingolipidek mellett a glikoszfingolipidek is befolyásolják a membrán mikrodomének formációját. Ezen molekulák általában nagyon magas fázisátalakulási hőmérséklettel rendelkeznek megnövekedett hidrogénkötési kapacitásuk által (mind donorként, mind akceptorként), ezáltal jelenlétük gélszerű, nagyon szoros laterális pakolódási denzitású domének kialakulásához vezethet. Az egyik legegyszerűbb ilyen típusú molekula, a glükoszilceramid a koleszterinben gazdag doménekkal képes nagyon erősen asszociálni, elősegítve azok laterális szegregációját, amely így serkenti a szterolban és szfingolipidben gazdag domének kialakulását a biológiai rendszerekben^{264,265}. A glükoszilceramid ilyen hatását megerősítették különböző összetételű mesterséges bilayerekben, valamint élő sejtek membránjában is. Alacsony koleszterintartalom mellett a glükoszilceramid gélszerű domének kialakulását eredményezte, míg jelentősebb mennyiségű koleszterin jelenléte esetén a szfingolipidben és koleszterinben gazdag domének kialakulását segítette elő. Kontroll és CBE kezelt, valamint Gaucher betegekben származó fibroblasztokban a sejtmembrán magasabb glükoszilceramid tartalma esetén csökkent membránfluiditást tapasztaltak, alátámasztva a feltételezést, amely szerint a glükoszilceramid növeli a membrán rendezettségét. Ez pedig a membrán mikrodomének kialakulását segítheti, ezáltal pedig befolyásolhatja bizonyos fehérjék és lipidek megoszlását a membránban, így befolyásolva azok funkcióját. A glükoszilceramid ilyen jellegű hatása pedig akár fontos lehet a Gaucher-kór patomechanizmusa szempontjából is²⁶⁶.

3. Célkitűzések

A daganatos megbetegedések patogenezisében fontos ErbB receptor tirozin kinázok aktivációjának kulcslépése a klasszikus allosztérikus aktivációs modell szerint a fehérjék homo-, illetve heterodimerizációja. Az asszociáció folyamatában korábban elsődlegesnek gondolták a fehérjék extracelluláris doménjének szerepét, ma azonban már tudjuk, hogy abban az intracelluláris és transzmembrán domének is aktív szerepet játszanak. Mivel a transzmembrán domén a membrán hidrofób belsejében, a dipólpotenciál régiójában helyezkedik el, annak változásai befolyásolhatják ezen domének konformációját, asszociációs folyamatait, végső soron pedig a receptorok aktivációján keresztül a jelátviteli útvonalak beindulását is. A dipólpotenciál jelentőségét azonban még nem vizsgálták ezen folyamatokban, így kísérleteink első fázisában célul tűztük ki:

- a) a már leírt dipólpotenciált változtató kezelések (phloretin és 6-ketocholestanol) hatásának meghatározását a mi kísérletes rendszerünkben konfokális mikroszkópia és di-8-ANEPPS dipólpotenciál szenzitív fluorofór alkalmazásával,
- b) a dipólpotenciál módosításának az EGFR sejtfelszíni expressziójára és ligand iránti affinitására gyakorolt hatásának vizsgálatát áramlási citometriás módszerekkel,
- c) a dipólpotenciál változtatására az EGFR, ErbB2 és neu fehérjék asszociációiban bekövetkező eltérések elemzését áramlási citometriás FRET és konfokális mikroszkópos number&brightness analízis segítségével,
- d) fenti kezelések funkcionális jelentőségének tesztelését a receptorok foszforilációs szintjének áramlási citométerrel történő meghatározásával,
- e) valamint a bekövetkező változások lipidtutajok jelenlététől való függésének vizsgálatát konfokális mikroszkópos felvételek elemzésével a sejtek raft doménjeinek jelölése után.

Mivel a dipólpotenciál nagyságát elsősorban a sejtmembrán lipidösszetétele határozza meg, várható, hogy a speciális összetétellel bíró lipidtutajokban annak nagysága eltérhet a membrán egyéb régióiban tapasztalt értékektől, amelyet azonban még nem bizonyítottak élő sejtek esetén. Emellett felmerül az is, hogy a dipól potenciál mértéke megváltozhat olyan betegségekben, amely során a sejtmembrán összetétele módosul. Ezek alapján munkánk második részében vizsgálni kívántuk:

- a) új, feszültség szenzitív 3-hidroxiflavon származékok spektrális változásait a dipólpotenciált módosító kezelések esetén, egy alternatív dipólpotenciál mérési módszer használatához (a már említett di-8-ANEPPS alkalmazását kiegészítendő),
- b) különböző feszültségre érzékeny fluorofórok dipólpotenciál-szenzitív intenzitásjelei korrelációjának mértékét különböző raft és non-raft domén markerek intenzitásaival konfokális mikroszkópos felvételek elemzésével,

- c) a dipólpotenciál nagyságában a különböző membrán mikrodomének között tapasztalható különbségek mértékét konfokális mikroszkópos felvételek elemzésével történő kvantitatív becslés segítségével,
- d) a 3-hidroxi flavon származékok emissziós spektrumában megfigyelhető eltéréseket a festék lipidtutajokban, illetve egyéb membránrégiókban történő elhelyezkedése esetén,
- e) valamint a dipólpotenciál nagyságának esetleges változását, illetve annak mértékét egy, a sejtmembrán (és főleg a lipidtutajok) lipidösszetételének megváltozásával járó betegség, a Gaucher-kór in vitro modellrendszerében.

4. Metodikák (anyagok és módszerek)

4.1. Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztésük

A kísérletek során felhasznált sejtvonalak egy részét (SKBR-3, A431, HeLa és CHO) az American Type Culture Collections-től (ATCC, Manassas, VA) szereztük be. Az SKBR-3 egy trastuzumab-szenzitív humán emlőtumor sejtvonal, amely $\approx 2 \cdot 10^5$ ErbB1 és $\approx 10^6$ ErbB2 fehérjét fejez ki, az A431 egy humán epiteliális karcinóma sejtvonal, amely sejtfelszínén $\approx 2 \cdot 10^6$ ErbB1 és $\approx 2 \cdot 10^4$ ErbB2 fehérje expresszálódik, míg a HeLa humán méhnyak karcinóma eredetű sejtvonal sejtenként $\approx 5 \cdot 10^4$ ErbB1 és $\approx 3 \cdot 10^4$ ErbB2 fehérjét tartalmaz (4.1.1 táblázat). A CHO kínai hörcsög petefészek eredetű sejtvonal nem rendelkezik érdemi ErbB1, illetve ErbB2 expresszióval. Az F1-4 egy, a göttingeni kollaborációs partnereink által előállított módosított CHO eredetű sejtvonal, amely stabilan expresszálja az ErbB1-eGFP fúziós fehérjét, sejtenként $\approx 6 \cdot 10^5$ mennyiségben²⁶⁷.

A sejteket specifikációjuknak megfelelően 10% fetális borjú szérumot (FCS), gentamicint (50 $\mu\text{g/ml}$) és L-glutamint (2 mmol/l) tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük korai konfluens állapotig 37°C-on 5% CO₂ jelenlétében, majd a növekedési faktor stimulációt magukba foglaló kísérletek előtt 16-24 órán keresztül éhezettük őket 0,1% FCS-t tartalmazó médiumban. A sejtek felszínén kifejeződő ErbB1 és ErbB2 fehérjék mennyiségét FACSCalibur áramlási citométer (BD Biosciences, San Jose, CA) segítségével Qifikit-tel (Dako, Glostrup, Dánia) határoztuk meg a gyártó útmutatásainak megfelelően (4.1.1 táblázat).

Sejtvonal neve	ErbB1	ErbB2
	expressziós szintek (*1000)	
SKBR-3	190	1100
A431	2300	25
HeLa	50	31
CHO	0	~0
F1-4	610 (ErbB1-eGFP)	~0

4.1.1 táblázat: az ErbB fehérjecsald és a dipólpotenciál összefüggéseinek vizsgálata során alkalmazott sejtvonalak és azok sejtfelszíni ErbB1 és ErbB2 expressziója. A sejtek felszínén kifejeződő fehérjék mennyiségét FACSCalibur áramlási citométer segítségével Qifikit-tel határoztuk meg a gyártó útmutatásainak megfelelően.

A Gaucher-kórra jellemző eltérések vizsgálata során használt humán akut monocitás leukémia eredetű THP-1 sejtvonal szintén az ATCC-től származott. A sejteket specifikációjuknak megfelelően tenyésztettük.

4.2. Antitestek, növekedési faktorok és egyéb reagensek

Az ErbB2 ellenes, klinikumban is alkalmazott humanizált monoklonális antitestet, a trastuzumabot (Herceptin®) a Roche-tól (Basel, Svájc), az ErbB1 ellenes Ab11 elnevezésű monoklonális antitestet pedig a Thermo Fisher Scientific-től (Waltham, MA) vásároltuk. Az antitesteket AlexaFluor546 és AlexaFluor647 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) fluoreszcens festékekkel konjugáltuk a gyártó útmutatása szerint. A festék-protein arányt (egy antitesthez kötődő fluorofórok átlagos száma) spektrofotometriásan határoztuk meg, ami általában 1-2 körüli érték volt.

Az intracelluláris foszforilációs mérések során általános foszforilált tirozin ellenes (PY99, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), az ErbB2 1248-as pozíciójában található foszforilált tirozinja elleni (Ab18, Thermo Fisher Scientific), valamint az ErbB1 1068-as pozíciójában levő foszforilált tirozinja elleni (1H12, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) antitesteket használtunk. Az elsődleges antitestek mellett Alexa647 festékekkel konjugált GAMIG-ot (goat anti-mouse immunoglobulin G) (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific), illetve Cy5-tel konjugált GAMIG Fab fragmentumot (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk másodlagos jelölőként.

Az ErbB1 ligandját, az epidermális növekedési faktort (EGF) az R&D Systems-től (Minneapolis, MN), illetve a Peprotech-től (London, Egyesült Királyság) szereztük be. Az EGF kötődéses mérések során használt tetrametil-rodaminnal jelölt EGF-et a Life Technologies/Thermo Fisher Scientific-től vásároltuk.

A sejtek dipólpotenciáljának megváltoztatására használt 6-ketocholestanol (3 β -hidroxi-5 α -cholestan-6-on) és phloretin (3-(4-hidroxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil)propan-1-on), valamint az ezek gyors sejtmembránba épüléséhez szükséges Pluronic F-127 detergens a Sigma Aldrich-től (St. Louis, MO) származott.

A sejtmembránban található lipidtutaj mikrodomének jelöléséhez használt AlexaFluor647-konjugált koleratoxin B alegység (CTX-B), valamint a nem-tutaj régiók vizualizációjára alkalmazott AlexaFluor647-konjugált transferrin a Thermo Fisher-től került beszerzésre. Az AC8 anti-koleszterin antitest Matkó János (Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, Magyarország) ajándéka volt.

A dipólpotenciál mérésére használt di-8-ANEPPS (4-(2-[6-(dioktilamino)-2-naftalenil]etenil)-1-(3-szulfopropil)piridinium belső só) fluorofórt a Thermo Fisher-től vásároltuk, míg az F66 (N-[3-(40-dihexilamino-3-hidroxi-flavonil-6-oxi)-propil]-N,N-dimetil-N-(3-szulfopropil)-ammónium, belső só) és PPZ8 (3-(4-(4-[4V-(3-hidroxi-6-oktiloxiflavonil)fenil]piperazino)-1-piridiniumil)-1-propánszulfonát) vegyületeket Andrey Klymchenko-tól (Université de Strasbourg, Strasbourg, Franciaország) kaptuk.

A THP-1 sejtek makrofág irányú differenciációjához alkalmazott protein kináz C aktivátor phorbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA), valamint a Gaucher-kóros fenotípus indukciójához használt conduritól B epoxid (CBE) a Sigma Aldrich-től származott.

4.3. Sejtek tranziens transzfekciója és a kísérletek során használt plazmidok

A tranziensen transzfektált sejteket Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) segítségével állítottuk elő, illetve bizonyos esetekben elektroporációt végeztünk Amaxa Nucleofector készülékkel (Lonza, Bazel, Svájc) a gyártó útmutatásai alapján a sejtípusnak legmegfelelőbb oldatot és programot használva.

Az intracelluláris foszforilációs mérések során a sejtekbe transzfektált vad típusú fehérjét tartalmazó ErbB2-pcDNA3 plazmidot Yosef Yarden-től (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael) kaptuk, míg az ErbB2 transzmembrán doménjének 659-es pozíciójában egy Val→Glu mutációt hordozó NeuT fehérjét kódoló pSV2neuNT plazmid Richard Pestell (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA²⁶⁸) ajándéka volt.

A N&B mérések előtt a sejteket PCDNA3.1 ErbB2-short-mYFP plazmiddal transzfektáltuk, amely mYFP-hez fuzionált vad típusú ErbB2-t tartalmazott¹⁴². A NeuNT N&B módszer segítségével történő vizsgálatához az előbbi plazmidban Val659Glu mutációt hoztunk létre NEB Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB E0554S, New England Biolabs, Ipswich, MA) segítségével. A plazmid amplifikációjához és a mutagenézishez használt forward (TCTGCGGTGGAAGGCATTCTGC) és reverse primereket (GATGATGGACGTCAGAGG) a NEBaseChanger™ online applikációval terveztük meg. A kívánt mutáció meglétét szekvenálással erősítettük meg. Az így előállított, PCDNA3.1 ErbB2 (Val659Glu)-short-mYFP-nak nevezett plazmiddal transzfektáltuk a sejteket.

A lipidtutajok vizualizációjára alkalmazott GFP-GPI plazmidot Jennifer Lippincott-Schwartz-tól (National Institutes of Health, Bethesda, MD) kaptuk.

4.4. Sejtek aktiválása EGF-fel

A kísérletek előtt a sejteket 16-24 órán keresztül éhezettük 0,1% FCS-t tartalmazó médiumban, majd a megfelelő előkezelés után 100 ng/ml (≈ 16 nM) humán rekombináns EGF-fel kezeltük 5 percen át 37°C-on 0,1% borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó Hank-féle pufferben. A sejteket stimulálásuk után jelöltük, illetve mértük az adott kísérletnek megfelelő módon.

4.5. A dipólpotenciál változtatása

A sejtmembrán dipólpotenciáljának nagysága módosítható a membránhoz adszorbeálódó vagy abba inkorporálódó lipid bázisú vegyületekkel. Kísérleteink során ezek közül a dipólpotenciál növeléséhez 6-ketocholestanolt, míg annak csökkentéséhez phloretint alkalmaztunk 100 μ M-os koncentrációban. A vegyületek membránba épülésének gyorsítására a kezelést 0,5% (v/v) Pluronic F-127 detergens

jelenlétében végeztük szobahőmérsékleten 10 percen keresztül^{38,39}. A Pluronic F-127 micellákat képez az alkalmazott vegyületekkel, elősegítve azok membránba kerülését, valószínűleg nem úgy, hogy fuzionál a target membránokkal, hanem átadja a molekulákat a membrán bilayerek külső rétegébe. Az inkorporáció sebességét legalább két nagyságrenddel növeli, így az inkubációs idők ≈ 10 perces tartamra rövidülhetnek. Az általunk alkalmazott koncentrációk mellett nem befolyásolja érdemben a sejtek életképességét, illetve a nyugalmi membránpotenciál értékét^{68,269,270}.

4.6. Gaucher-fenotípusú makrofágok előállítása

A Gaucher-fenotípusú makrofágok előállításához THP-1 monocitákat differenciáltattunk makrofággá 5 napon át 50 ng/ml koncentrációban alkalmazott PMA kezelés segítségével, hogy a sejtek fedőlemezhez történő megfelelő kitapadását biztosítsuk. A differenciáció PMA-val történő indukciójával párhuzamosan 500 μ M-os konduritol B epoxid kezelést alkalmaztunk, így a sejtekben a Gaucher-kórra jellemző fenotípus fejlődött ki²⁵³.

4.7. Sejtek fluoreszcens jelölése antitestekkel szuszpenzióban és fedőlemezen

Sejtfelszíni antigének jelölése során a sejteket PBS-ben történő mosást követően az antitestek telítő koncentrációjával inkubáltuk 30 percig jégen. Az antitesteket 0,1% BSA-t tartalmazó PBS-ben hígítottuk. Ha az elsődleges antitestek nem voltak fluoreszcensen jelzettek, kétszeri mosást követően a sejteket másodlagos antitesttel jelöltük szintén jégen 30 percig. Az antitestkötődés után kétszeri PBS-ben történő mosást követően 1%-os formaldehidben fixáltuk a sejteket. Amennyiben intracelluláris antigént jelöltünk, a procedúra elején 3,7%-os formaldehidben fixáltuk a sejteket, majd kétszeri Tris pufferben (100 mM Tris + 100 mM NaCl; pH 7,4) történő mosást követően a jelölés a fentieknek megfelelően történt, kivéve, hogy az antitesteket 0,1% BSA-t és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben hígítottuk a sejtek permeabilizálása céljából.

Az áramlási citometriás mérésekhez a sejteket 0,05%-os tripszin kezeléssel távolítottuk el a flaskából, míg a mikroszkópos kísérleteknél a sejteket kb. 80%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük 8-lyukú fedőlemez aljú Lab-Tech™ II kamrában, melyet a Nalge Nunc International-től (Rochester, NY) vásároltunk.

4.8. Sejtek jelölése dipólpotenciál-szenzitív di-8-ANEPPS, valamint F66 és PPZ8 fluorofórokkal

A sejtek dipólpotenciáljának méréséhez di-8-ANEPPS, illetve F66 és PPZ8 fluorofórokat használtunk konfokális mikroszkópia alkalmazásával. Ezen fluorofórok a gyorsan reagáló feszültség szenzitív festékek csoportjába tartoznak, fluoreszcens tulajdonságaik a jelenlevő elektromos erőter nagyságának függvényében jelentősen változnak. Membránbeli elhelyezkedésük révén a festékek

elsősorban a dipólpotenciálra érzékenyek. A di-8-ANEPPS esetén a dipólpotenciál nagyságának mérésére leginkább a gerjesztési spektrum elektromos tér hatására bekövetkező eltolódásán alapuló rációmetrikus módszerek alkalmasak^{39,68}, míg az F66 és a PPZ8 esetén a normál és a tautomer gerjesztett formának megfelelő két emissziós sáv intenzitásának egymáshoz viszonyított aránya változik meg a dipólpotenciál által keltett elektromos erőtér hatására^{76,78}.

Kísérleteink során a 8-lyukú fedőlemez aljú Lab-Tech™ II kamrában kb. 80%-os konfluencia eléréséig tenyésztett sejteket mostuk 1 mg/ml BSA-t is tartalmazó Hank-féle pufferben, majd a dipólpotenciált módosító kezelés után jelöltük 2 µM koncentrációjú di-8-ANEPPS-sel 10 percre, 12 °C-on, illetve 10 nM koncentrációjú F66-tal vagy PPZ8-cal 20 percre, jégen. Bizonyos esetekben a festést a dipólpotenciál módosítása előtt végeztük. A sejtek mosása után konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk, majd a felvételek elemzésével meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságát a későbbiekben leírtaknak megfelelően.

4.9. A sejtmembránban található lipidutajok és non-raft régiók jelölése

A sejtmembránban található raft mikrodomének jelöléséhez három különböző módszert alkalmaztunk. (i) 8-lyukú fedőlemez aljú Lab-Tech™ II kamrában tenyésztett sejtek membránjában található GM1-ben gazdag membrán raftokat jelöltünk 8 µg/ml AlexaFluor647-CTX-B jelenlétében 20 percre jégen, hogy a CTX-B internalizációját elkerüljük. (ii) A lipidutajok GFP-GPI-vel történő jelöléséhez 8-lyukú fedőlemez aljú Lab-Tech™ II kamrában tenyésztett sejteket transzfektáltunk 0,5 µg DNS/lyuk mennyiségű GFP-GPI plazmiddal Lipofectamine2000 segítségével 2:1 (v/w) lipid:DNS arányt használva. (iii) A lipidutajokat jelöltük egy (megfelelő elrendeződésű) koleszterinre specifikus monoklonális antitest, az AC8 segítségével²⁰⁷, amelyet Cy5-tel konjugált GAMIG Fab fragmentummal vizualizáltunk, hogy a keresztkötődés mértékét minimalizáljuk. A sejtmembrán non-raft régiójának jelöléséhez a 8-lyukú fedőlemez aljú Lab-Tech™ II kamrában tenyésztett sejteket 25 µg/ml AlexaFluor647-tel konjugált transferrinnel jelöltük 20 percre jégen. A sejtek mosása után konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk, majd a felvételeket Matlab-ban elemeztük a későbbiekben leírtaknak megfelelően.

4.10. A dipólpotenciált változtató kezelések hatásának meghatározása

A sejtek dipólpotenciáljának méréséhez a di-8-ANEPPS fluorofórt használtuk konfokális mikroszkópon egy excitációs rációmetrikus módszer segítségével^{39,68}. A kamrában növesztett sejteket mostuk 1 mg/ml BSA-t is tartalmazó Hank-féle pufferben, majd a dipólpotenciált módosító kezelés után jelöltük 2 µM koncentrációjú di-8-ANEPPS-sel 10 percre, 12 °C-on. Bizonyos esetekben a festést a dipólpotenciál módosítása előtt végeztük. A sejtek mosása után a fluorofórt 458 és 514 nm-es hullámhosszon gerjesztettük és az emissziót 630 nm felett detektáltuk, a gerjesztési arány fluiditástól

függő változásainak kiküszöbölése érdekében³⁸. A képek felvételéhez LSM510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópot (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) használtunk Plan Apocromat 63x/1.4 NA olaj immerziós objektív alkalmazásával 1 Airy egységre beállított pinhole mérettel. A képek feldolgozását Matlab (Mathworks, Natick, MA) programkörnyezetben végeztük a DipImage toolbox (Delft University of Technology, Delft, Hollandia) segítségével. A képeken a membrán pixelek azonosítását egy korábban erre a célra készített kézzel kijelölt vízfeltöltéses algoritmus („manually seeded watershed algorithm”) segítségével végeztük²⁷¹. Az algoritmus alkalmazása során egy konfokális képszeleten a felhasználó minden sejt belsejébe egy pontot („seed”) helyez el. Az algoritmus a képet úgy kezeli, mintha egy háromdimenziós domborzati térkép lenne, ahol a magasságot az intenzitás értékek határozzák meg. Az algoritmus ezt a domborzati térképet képzetesen vízzel tölti fel, és a medencék (sejtek) közti határok ott találhatóak, ahol két, egymással határos medence között átszap a víz. A felhasználó által elhelyezett pontok azért szükségesek, mert a teljesen automatikus vízfeltöltéses algoritmus túlszegmentálja a képeket, tehát túl sok határvonalat azonosít. A membrán azonosítása után az ahhoz tartozó pixelek esetén meghatároztuk a kétféle gerjesztés esetén mért fluoreszcencia intenzitások arányát a háttér intenzitás levonása után.

4.11. A dipólpotenciál EGF kötődésére gyakorolt hatásának mérése (kompetitív és nem-kompetitív módszerrel)

A dipólpotenciálnak az EGF ErbB1 iránti affinitására gyakorolt hatását SKBR-3, A431 és HeLa sejteken határoztuk meg mind nem-kompetitív, mind pedig kompetitív módszerrel fluoreszcensen jelzett EGF alkalmazásával. Az éheztetett sejteket feltripszineztek, centrifugáltuk, 1 mg/ml BSA-t is tartalmazó Hank-féle pufferben szuszpendáltuk és a korábban leírtaknak megfelelően változtattuk a dipólpotenciál mértékét. Közben a nem-kompetitív mérések során a tetrametil-rodaminnal konjugált EGF (TAMRA-EGF, LifeTechnologies) 10 μ M koncentrációjú törzsoldatából hígítási sort készítettünk úgy, hogy a sorban minden cső 250 μ l-nyi 0,1% (w/v)-os BSA-t tartalmazó Hank-féle pufferben megfelelően hígított TAMRA-EGF-et tartalmazott. A kompetitív módszer esetén a hígítási sort jelöletlen EGF-ből készítettük úgy, hogy minden cső állandó koncentrációjú TAMRA-EGF-et tartalmazott a megfelelő mennyiségű jelöletlen növekedési faktor mellett. A jégen tartott csövekbe ezek után 20 μ l-nyi megfelelően kezelt sejtszuszpenziót mértünk, amelyben \approx 100000 sejt volt. A mintákat jégen inkubáltuk 30 percen keresztül folyamatos rázogató mellett, majd a sejtek fluoreszcencia intenzitásait FACS Aria III áramlási citométeren (BD Biosciences) határoztuk meg mosás nélkül, hogy megelőzzük a fluoreszcens EGF EGFR-ről való disszociációját. A mérések során a TAMRA-t 561 nm-en gerjesztettük és az emissziót 595/50 nm-es sávszűrő alkalmazása mellett detektáltuk.

Mintánként és kísérletenként 10000 sejt adatait elemeztük FCS Express (Denovo Software, Thornhill, Ontario, Kanada) segítségével. Az adott mintákban található sejtek átlagos fluoreszcenciáját számítottuk ki és a kötődési görbe meghatározásához a kapott értékeket ábrázoltuk az alkalmazott EGF (jelölt a nem-kompetitív, jelöletlen a kompetitív mérések során) koncentrációjának függvényében. A kötődési görbe illesztése nem-kompetitív esetben az alábbi Hill-egyenletnek megfelelően történt:

$$I = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + 10^{n(\log K_d - \log c)}} \quad (4.11.1),$$

ahol I a minta intenzitása, c a TAMRA-EGF koncentrációja, I_{\min} és I_{\max} a minimum és maximum intenzitások, K_d a disszociációs állandó, n pedig a Hill-koefficiens.

A kompetitív módszer esetén a kötődési görbét az alábbi egyenlet alapján illesztettük:

$$I = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + 10^{n(\log c - \log IC50)}} \quad (4.11.2),$$

amelyben

$$IC50 = K_i \frac{c + K_d}{K_d} \quad (4.11.3),$$

ahol K_d a TAMRA-EGF, K_i pedig a jelöletlen EGF disszociációs állandója, c pedig a TAMRA-EGF koncentrációja.

A kiértékelés során a különböző sejtípusok és minták esetén a K_d , K_i és $IC50$ paramétereket határoztuk meg és hasonlítottuk össze egymással.

4.12. A dipólpotenciál ErbB fehérjék asszociációjára gyakorolt hatásának meghatározása FRET módszerrel

A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) egy sugárzásmentes energiaátadás, ahol a gerjesztett állapotban lévő fluoreszcens molekula (donor), valamint egy megfelelő spektroszkópiai paraméterekkel rendelkező molekula (akceptor) között dipól-dipól kölcsönhatás jön létre. Az energiaátadás legfontosabb feltétele a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának átfedése, valamint a donor és az akceptor megfelelő relatív orientációja mellett a donor és az akceptor közötti megfelelő, 2-10 nm közé eső távolság. Az utóbbi tényező különösen fontos, mivel ezáltal a FRET jelensége kiterjedten alkalmazható a biológiában, hiszen segítségével a donor és akceptor közötti távolság mérhető, illetve a donor-akceptor távolság megváltozása becsülhető²⁷². Ennek alapja az, hogy a FRET sebességi állandó (k_{FRET}) a donor és akceptor közötti távolság hatodik hatványával fordítottan arányos:

$$k_{FRET} = konst \cdot J \cdot n^{-4} \cdot k_f \cdot R^{-6} \cdot \kappa^2 \quad (4.12.1),$$

ahol J a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumainak átfedési integrálja, n a közeg törésmutatója (ezt 1,4-nek feltételezik sejtfelszíni jelölés esetén), k_f a donor fluoreszcencia átmenet sebességi állandója, R a két molekula távolsága és a κ^2 a donor és az akceptor relatív orientációját leíró faktor. A FRET sebességét befolyásoló paraméterek közül általában csak a donor és az akceptor közötti távolság (R) és a relatív orientáció (κ^2) jön számításba. Legtöbbször a két vizsgált molekula relatív orientációja nem ismert, de a molekulák gyors forgása miatt a lehetséges irányok kiátlagolódnak és a κ^2 értékét 2/3-nak tekintjük^{273,274}. Így feltételezhetjük, hogy a FRET sebességi állandója csak a két molekula átlagos távolságának függvénye.

Az energia transzfer határfokát (E), amely megadja a FRET segítségével relaxálódó gerjesztett donor molekulák arányát, leggyakrabban a kritikus Förster távolság felhasználásával szokták kifejezni:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (4.12.2),$$

ahol az R_0 az a távolság, amelynél az adott donor-akceptor pár esetében a FRET hatásfoka 50%²⁷⁵.

Kísérleteink során a FRET módszer alkalmazásának alapja az volt, hogy ha a sejtfelszíni ErbB1, illetve ErbB2 receptorokat donor, illetve akceptor fluorofórral konjugált antitestekkel jelöljük meg és közöttük FRET jön létre, a gyakorlatban ez azt jelenti, hogy a két receptor egymással asszociálódik. Ezek alapján a FRET hatékonyság kiszámításából a receptorok asszociációjának mértékére következtethetünk.

Az ErbB fehérjék asszociációjának FRET módszerrel való vizsgálata során 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 illetve NeuT fehérjét kódoló pSV2neuNT plazmiddal a neu homoasszociációjának meghatározására és a vad típusú variánssal történő összehasonlítására.

A FRET kísérletekhez az éheztetett sejtek tripszinezése, mosása, 1 mg/ml BSA-t is tartalmazó Hank-féle pufferben való szuszpendálása, a dipólpotenciált módosító kezelése és a minták egy részének EGF-fel történő stimulációja után a megfelelő festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel jelöltük azokat 30 percen át, jégen és sötétben. Az ErbB1 jelöléséhez Ab11 antitestet (Thermo Fisher Scientific), az ErbB2-höz pedig trastuzumabot (Herceptin®, Roche) alkalmaztunk. Donor fluorofórként az antitestekhez konjugált AlexaFluor546-ot, míg akceptorként AlexaFluor647-et (Life

Technologies/Thermo Fisher Scientific) használtunk. A spektrofotometriásan meghatározott festék-protein arány 1-2 körül volt. A jelölés után a sejteket hideg PBS-ben mostuk, 1%-os formaldehid-PBS eleggyel fixáltuk és FACS Aria III áramlási citométeren (BD Biosciences) mértük. Az ErbB1 homoasszociáció méréséhez AlexaFluor546-Ab11 és AlexaFluor647-Ab11, az ErbB2 homoklszterizáció meghatározásához AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-trastuzumab, míg az ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció vizsgálatához AlexaFluor546-Ab11 és AlexaFluor647-trastuzumab donor-akceptor párokat alkalmaztunk.

Az áramlási citometriás FRET mérések alapelve minden esetben az volt, hogy minden sejtről három fluoreszcencia intenzitást detektáltunk, a donor, FRET és akceptor intenzitásokat rendre az I_1 , I_2 és I_3 csatornában határoztuk meg. A donor csatorna esetén az AlexaFluor546 fluorofórt 561 nm-en gerjesztettük és egy 595/50 sávszűrőn (bandpass, BP) keresztül detektáltuk. Az akceptor csatorna esetén az AlexaFluor647 fluorofórt 633 nm-en gerjesztettük és a fluoreszcencia intenzitást 635 nm-es felüláteresztő szűrőn (longpass, LP) keresztül mértük. A FRET csatornában donornak megfelelő gerjesztést (561 nm) és akceptornak megfelelő detektálást (635LP) alkalmaztunk. Mivel az egyes csatornák szinte sosem tisztán a nevüknek megfelelő intenzitást detektálják, szükség van a spektrális átfedések korrekcióira, amelyeket csak donorral, illetve csak akceptorral konjugált antitestekkel jelölt minták segítségével határoztunk meg. A citométeren használt lézer hullámhosszakát, detektorokat és detektálási szűrőket a jobb átláthatóság kedvéért táblázatban is feltüntettem (4.12.1. táblázat):

FACSAriaIII	lézer	561	561	633
	detektor	I_1	I_2	I_3
	szűrő	595/50	635LP	635LP

4.12.1. táblázat: A vizsgálatban használt FACSAria III áramlási citométer optikai adatai.

A lézereknél a gerjesztés hullámhosszát, a detektornál a FRET egyenletrendszerben (4.12.3) használt elnevezést, a szűrőknél pedig az áteresztési hullámhossztartományt (595/50: 570-620 nm között, 635LP: 635 nm felett) jelöltem.

A mérések során mintánként és kísérletenként legalább 10-20000 sejt adatait lista módú fájlban mentettük el, és a kiértékelést a ReFlex program segítségével hajtottuk végre²⁷⁶. Az elemzés első lépéseként az előre és oldal irányú fényszórás adatait tartalmazó dot plot ábrákon kikapuztuk az intakt sejteket tartalmazó populációt és a fluoreszcenciaintenzitások átlagát határoztuk meg erre az alpopulációra. A korrigált intenzitások kiszámítása során a jelölt minták átlagából levontuk a jelöletlen minták átlagát.

A FRET hatékonyságot (E) a korrigált intenzitások alapján határoztuk meg, de ehhez több korrekciós faktort is figyelembe kellett venni a számítások során. A különböző csatornában mért intenzitásokat az alábbi, korrigálandó tényezőket is figyelembe vevő egyenletek alapján lehet meghatározni:

$$\begin{aligned}
 I_1 &= I_D(1-E) + I_A S_4 + I_D E \alpha \frac{S_4}{S_2} \\
 I_2 &= I_D(1-E) S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \\
 I_3 &= I_D(1-E) S_3 + I_A + I_D E \frac{\varepsilon_{R2}}{S_2}, \quad \varepsilon_{R2} = \frac{\varepsilon_D^A \varepsilon_A^D}{\varepsilon_D^D \varepsilon_A^A}
 \end{aligned}
 \tag{4.12.3}$$

Az egyenletekben az I_D és I_A változók a kioltatlan donor intenzitást és a közvetlenül gerjesztett akceptor intenzitást jelölik. Az S_{1-4} faktorok a donor és az akceptor más fluoreszcens csatornákkal mutatott spektrális átfedését jellemzik. Az S_1 és S_3 a donor fluoreszcencia FRET, ill. akceptor csatornába, az S_2 és S_4 pedig az akceptor FRET, ill. donor csatornába történő átvilágítását jellemzik. Az S_1 és S_3 faktorokat csak donorral, míg az S_2 és S_4 faktorokat csak akceptorral egyszeresen jelölt mintákon határoztuk meg az alábbi egyenletek szerint:

$$S_1 = \frac{I_2}{I_1}; \quad S_3 = \frac{I_3}{I_1}; \quad S_2 = \frac{I_2}{I_3}; \quad S_4 = \frac{I_1}{I_3}
 \tag{4.12.4}$$

Az egyenletrendszerben az ε a moláris abszorpciós koefficiensét jelöli, amelynek a felső indexében szereplő D vagy A arra utal, hogy a donor vagy akceptor paraméteréről van-e szó, az alsó indexben szereplő D vagy A pedig arra, hogy a donor vagy az akceptor hullámhosszán kell-e értelmezni. Az α paraméter megadja egy gerjesztett akceptor molekula FRET csatornában mért intenzitásának és egy gerjesztett donor molekula donor csatornában mért intenzitásának a hányadosát az alábbi egyenlet szerint:

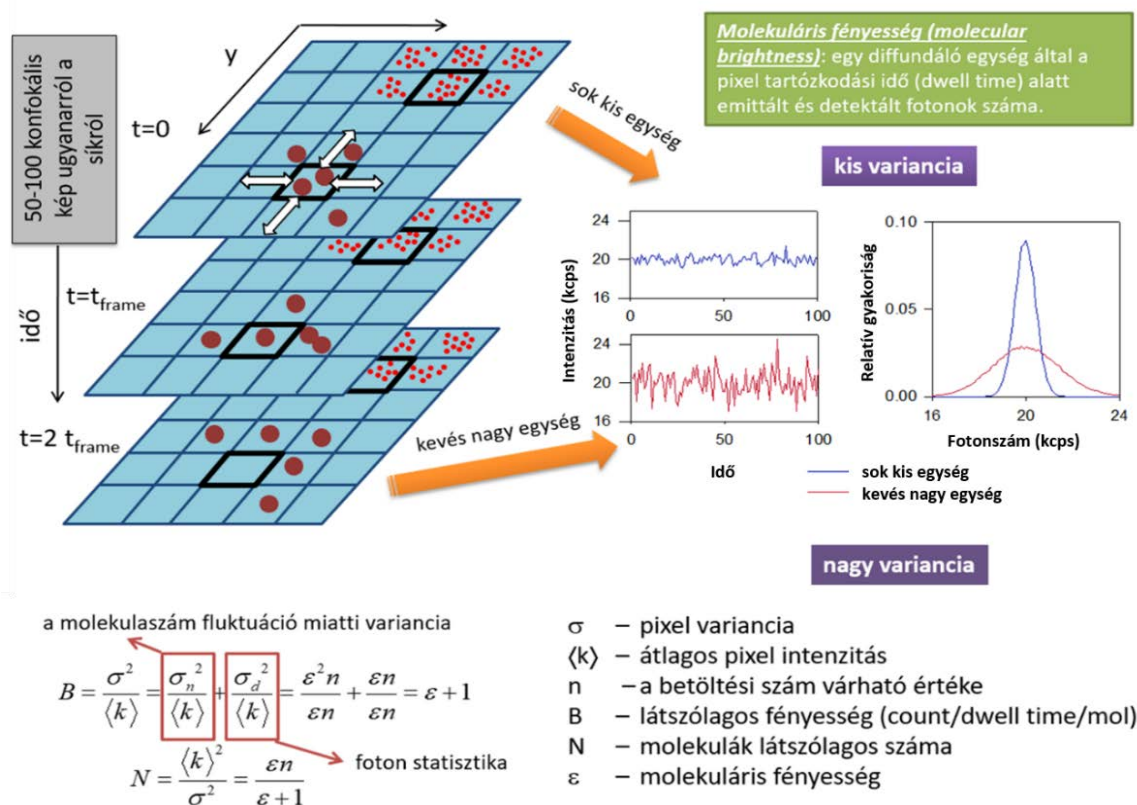
$$\alpha = \frac{Q_A \eta_{A,2}}{Q_D \eta_{D,1}}
 \tag{4.12.5}$$

Ebben az egyenletben Q_A és Q_D az akceptor, illetve a donor kvantumhatásfokait jelzik, míg a $\eta_{A,2}$ jellemzi egy akceptor foton FRET csatornában való detektálásának, a $\eta_{D,1}$ pedig egy donor foton donor csatornában való detektálásának hatékonyságát.

A fenti egyenletrendszer E -re történő megoldása pedig megadja a sejtenkénti FRET hatékonyság nagyságát. A módszer, illetve az annak alkalmazása során végzendő számítások bővebb leírása a ²⁷⁷ referenciában található.

4.13. A dipólpotenciál ErbB fehérjék asszociációjára gyakorolt hatásának meghatározása N&B módszerrel

A number&brightness (N&B) analízis egy, a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS) mérési elvén alapuló módszer, de míg az FCS-hez speciális műszerezettség szükséges, addig a N&B egy hagyományos konfokális mikroszkóppal is elvégezhető. A mérés pontosságát növeli, ha a mikroszkóp fotonszámláló detektorral rendelkezik, de egy kalibrációs mérés után analóg detektorral felszerelt mikroszkóp is alkalmas lehet, igaz, alacsonyabb érzékenységgel^{278,279}.



4.13.1 ábra: A fehérjék közötti asszociáció meghatározása konfokális mikroszkópos felvételek number&brightness analízise segítségével. A módszer során a sejtmembrán ugyanazon régiójának megfelelő konfokális szeletről 50-100 felvételt készítünk, majd meghatározzuk az egyes pixelek intenzitásainak varianciáját és átlagát az 50-100 felvétel során. A két érték hányadosa az ún.

látszólagos fényesség értékét adja meg, amely két tényezőből ered, ugyanis egyrészt a fotondetektálás poissoni természete (a „fotonstatisztika”), másrészt pedig a molekulaszám fluktuációja eredményezi. A látszólagos fényességből meghatározható a molekuláris fényesség nagysága, amely arányos a fehérjék asszociáltsági fokával, azaz a fehérjeasszociátumok átlagos nagyságával, illetve az asszociált fehérjék arányával. Vagyis a pixelenkénti intenzitások varianciája, illetve átlaga ismeretében az asszociáció mértéke becsülhető, hiszen sok kis diffundáló egység esetén az arány nagysága relatíve kisebb, míg kevés nagy objektum esetén nagyobb.

A mérés elméleti hátterét a 4.13.1. ábra mutatja be. A N&B mérések szempontjából (az FCS-hez hasonlóan) egy molekuláris egységnek az számít, ami egy egységként diffundál (amely molekuláris

szempontból lehet monomer, dimer vagy magasabb rendű oligomer is). Egyetlen ilyen diffundáló egység által a pixelidő (az adott pixelből érkező fotonok detektálásának ideje) alatt kibocsátott és detektálásra került fotonok számát molekuláris fényességnek („molecular brightness”) nevezzük. Az egy pixelben levő egységek számát a Poisson eloszlás írja le. A Poisson-eloszlás esetében a relatív szórás nagysága a várható érték négyzetgyökével fordítottan arányos. Ez az N&B szempontjából azt jelenti, hogy ha egy adott intenzitást átlagosan $\langle N \rangle$ darab molekula hoz létre, akkor ennek a molekulaszámnak a fluktuációja az $\langle N \rangle$ négyzetgyökével lesz arányos:

$$\frac{\sigma_N}{\langle N \rangle} = \frac{\sqrt{\langle N \rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}} \quad (4.13.1),$$

ahol σ_N a molekulák számának szórása.

A N&B során ugyanarról a konfokális szeletről veszünk fel képet 50-100 alkalommal és az analízis során a fotonszám szórását számítjuk ki az egyes pixelekből, amely információt hordoz arról, hogy hány darab és milyen fényességű diffuzibilis egység van egy adott pixelben. Egy adott pixelben mért intenzitás (fotonszám) fluktuál egyrészt azért, mert véletlenszerűen változik a pixelben levő diffuzibilis egységek száma, másrészt pedig azért, mert a fotondetektálás statisztikai volta miatt még akkor is fluktuálna a detektált fotonok mennyisége, ha ugyanannyi molekula lenne a pixelben minden időpillanatban, tehát:

$$\sigma^2 = \sigma_N^2 + \sigma_D^2 \quad (4.13.2),$$

ahol σ^2 az egy pixelben mért intenzitás varianciája, σ_N^2 a varianciának az egy pixelben levő diffuzibilis egységek számának fluktuációjából eredő komponense, σ_D^2 pedig a detektált fotonok Poisson-statisztika szerinti fluktuációja. Az átlagos intenzitást (fotonszámot) ($\langle I \rangle$) a molekuláris fényességből (ε), valamint az $\langle N \rangle$ változókból származtathatjuk az alábbi egyenlet szerint:

$$\langle I \rangle = \varepsilon \langle N \rangle \quad (4.13.3).$$

Statisztikai megfontolásokból következik, hogy a σ_N^2 a molekuláris fényesség négyzetével arányos:

$$\sigma_N^2 = \text{Var}(N\varepsilon) = \varepsilon^2 \text{Var}(N) = \varepsilon^2 \langle N \rangle \quad (4.13.4),$$

ahol a Var a variancia operátort jelenti. A σ_D^2 a Poisson eloszlás tulajdonságai miatt az átlagos detektált fotonszámmal egyenlő:

$$\sigma_D^2 = \varepsilon \langle N \rangle \quad (4.13.5).$$

Ha a látszólagos fényességet (B) két könnyen meghatározható paraméter, a detektált fotonszám varianciájának és várható értékének hányadosaként definiáljuk, akkor a (4.13.2)-(4.13.5) egyenletek alapján:

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle I \rangle} = \frac{\sigma_N^2 + \sigma_D^2}{\varepsilon \langle N \rangle} = \frac{\varepsilon^2 \langle N \rangle + \varepsilon \langle N \rangle}{\varepsilon \langle N \rangle} = \varepsilon + 1 \quad (4.13.6).$$

A (4.13.6) egyenlet szerint a látszólagos fényesség a molekuláris fényességgel szoros összefüggést mutat. A molekuláris fényesség definíciójából következően változik akkor, ha a molekulák oligomerizációs foka átalakul (például dimerizáció következik be), hiszen ekkor módosul a diffuzibilis egységek mérete (molekuláris fényessége) is, ami a fenti egyszerű számítással követhető. A relatív változások detektálása mellett lehetőség van arra is, hogy pontosan meghatározzuk, hogy az adott pixelben átlagosan hány monomer alkot egy diffuzibilis egységet. Ehhez ismerni szükséges a monomer molekuláris fényességét, amit pl. monomer eGFP vagy mYFP oldatok N&B analízisével határozhatunk meg.

A módszer alkalmazásakor figyelembe kell venni azt, hogy a fluktuációk helyes detektálása akkor hajtható végre, ha a pixelidővel és az ismétlési idővel kapcsolatban két feltétel teljesül:

- a pixelidő ne legyen túl hosszú, hogy a diffuzibilis egységek számának fluktuációi ne átlagolódjának ki,
- az ismétlési idő ne legyen túl rövid, hogy egy pixel két egymást követő felvétele független legyen egymástól, ami a Poisson-statisztika feltétele.

A pixelidő és az ismétlési idő helyes megválasztásához közelítőleg ismerni szükséges a vizsgált fehérje diffúziós állandóját és a konfokális detektálási térfogat átmérőjét. Ezekből a molekula autokorrelációs függvénye kiszámolható, amelyből leolvasható a választandó pixel és ismétlési idő²⁷⁸.

A fentiek alapján a N&B analízis alkalmas az ErbB fehérjék asszociációjának dipólpotenciál módosításra bekövetkező változásainak meghatározására a FRET módszerhez hasonlóan, azt kiegészítendő. Az EGFR asszociációjának mérése során kísérleteinket egy módosított CHO eredetű sejtvonalon, az ErbB1-eGFP fúziós fehérjét stabilan expresszáló F1-4 sejtvonalon végeztük, míg az ErbB2 és a neu vizsgálata során HeLa sejteket transzfektáltunk pCDNA3.1 ErbB2-short-mYFP, illetve az általunk mutációval előállított pCDNA3.1 ErbB2 (Val659Glu)-shortmYFP plazmiddal. A képek felvételét egy pszeudofotonszámláló üzemmódban működtetett Olympus FV1000 (Olympus Corp., Tokió, Japán) konfokális mikroszkópon végeztük a ²⁷⁸ referenciában leírtaknak megfelelően. Az élő, fedőlemeze növesztett éheztetett sejteket a mérések alatt 10 mM glükózt és 0,1% BSA-t tartalmazó Tyrode pufferben tartottuk szobahőmérsékleten. Az éheztetett sejtek vizsgálata után a mintákat stimuláltuk EGF-fel és megismételtük a méréseket. A kísérleteket max. 30 percig folytattuk, hogy a klaszterek szerkezetében

szobahőn bekövetkező átalakulásokat megelőzzük. A GFP-t 488 nm-en gerjesztettük és a fluoreszcenciát 500-600 nm között detektáltuk, míg a mYFP excitációja 514 nm-en történt és az emissziót az 530-630 nm tartományban mértük. A fluoreszcencia intenzitás varianciájának meghatározása céljából az élő sejtek fedőlemezhez közeli rétegéről 100 optikai szeletet készítettünk, 82 nm-es pixelmérettel és 10 μ s-os pixelidővel. A konfokális képeket 1 Airy egységre beállított pinhole mérettel vettük fel, 60x (NA=1,35) nagyítású olajimmerziós objektívet használva. Az 512 \times 512 pixel felbontású képek középső részén található, membránnak megfelelő pixeleket vizsgáltuk az analízis során, hogy a képek széli régiójában a pásztázás sebességének nemlineáris voltából fakadó szél-arterfaktumok torzító hatását kiküszöböljük. A képsorozatok elemzését egy erre a célra korábban készített, a Diplmage toolbox (Delft University of Technology) függvényeit használó Matlab programmal (NB_tools) végeztük¹⁴². A képsorozatokon esetlegesen előforduló laterális elmozdulást a Diplmage „correctshift” parancsával korrigáltuk, majd minden egyes pixelre kiszámoltuk az intenzitások átlagát és varianciáját. A látszólagos és molekuláris fényesség értékeket a (4.13.6) egyenletnek megfelelően határoztuk meg. A molekuláris fényesség értékek a fentebbieknek megfelelően a receptorok klaszterizációs állapotára, asszociációs fokára utaltak. Ha a teljes kép átlagos fluoreszcenciájának változása meghaladta a 10%-ot a fotoelhalványítás miatt, illetve a pixel intenzitásának varianciája nem konvergált a 0-hoz a képszám növelésével, a sorozatot nem vettük figyelembe a kiértékelések során.

4.14. A dipólpotenciál változtatás funkcionális hatásának mérése az intracelluláris foszforiláció mérésével

Éheztetés után a feltripszinezett SKBR-3 sejteket centrifugáltuk, majd 1 mg/ml BSA-t is tartalmazó Hank-féle pufferben szuszpendáltuk és változtattuk a dipólpotenciáljának mértékét, valamint a sejtek egy részét EGF-fel stimuláltuk. Ezután a sejteket 3,7% formaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk 30 percen keresztül jégen, majd kétszer mostuk hideg Tris-pufferrel (100 mM Tris + 100 mM NaCl; pH 7,4) azért, hogy a felesleges formaldehiddel a Tris elreagáljon. Ezt követően minden mintát négy részre osztottunk, PY99 antitesttel jelöltük a foszforilált tirozin oldalláncokat, Ab18 antitesttel az ErbB2 foszforilált tirozinjait az 1248-as pozícióban, míg 1H12 antitesttel az ErbB1 foszforilált tirozin oldalláncait az 1068-as pozícióban, 10 μ g/ml-es antitest koncentrációt alkalmazva. A negyedik minta a jelöletlen kontroll volt. Az inkubálást a megfelelő mértékű jelölődés és az aspecifikus kötődés csökkentése érdekében PBS-BSA-TX permeabilizáló pufferben (0,1 (v/v)% Triton X-100 + 1 mg/ml BSA PBS-ben, pH 7,4) végeztük 30 percig jégen. Az inkubációt követően a mintákat kétszer mostuk hideg PBS-BSA-TX-ben, majd a sejteket megjelöltük 20 μ g/ml Alexa647-GAMIG másodlagos antitesttel 30 percen keresztül jégen és fénytől védve. Ezután kétszer mostuk a mintákat hideg PBS-BSA-TX-ben, majd felszuszpendáltuk a sejteket 1% formaldehidet tartalmazó PBS-ben. Az egyedi sejtek

fluoreszcenciaintenzitását FACSaria III áramlási citométert alkalmazva határoztuk meg, míg a kiértékelés során a korábban említett ReFlex szoftvert használtuk.

Intracelluláris foszforilációs méréseinket megismételtük transzfektált HeLa sejteken is. A sejteket elektroporációs módszerrel transzfektáltuk vad típusú fehérjét tartalmazó ErbB2-pcDNA3 plazmiddal, illetve NeuT fehérjét kódoló pSV2neuNT plazmiddal. Kontrollként plazmid nélkül hajtottuk végre az elektroporációs protokollt. A transzfektált sejteket két napig tenyésztettük, majd a fentieknek megfelelően mértük a foszforilációk mértékét.

4.15. Az ErbB2 tirozin foszforilációja, raft lokalizációja és a dipólpotenciál mértéke közötti korreláció meghatározása

A kísérletek előtt a sejteket 16-24 órán keresztül éhezettük 0,1% FCS-t tartalmazó médiumban, majd a sejtek egy részének dipólpotenciálját növeltük 100 μ M 6-ketocholestanol alkalmazásával Pluronic F127 jelenlétében, míg a sejtek másik részénél csak a detergenst alkalmaztuk kontrollként. Ezután a sejtek egy részét 100 ng/ml (\approx 16 nM) humán rekombináns EGF-fel kezeltük 5 percen át 37°C-on 0,1% BSA-t tartalmazó Hank-féle pufferben. Ezután mind a stimulálatlan, mind a stimulált sejteket 20 percig jelöltük jégen AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-CTX-B segítségével. A sejteket 3,7%-os formaldehiddel fixáltuk, majd a foszforilált ErbB2-ellenes Ab18 antitesttel jelöltük, amelyet AlexaFluor488-GAMIG alkalmazásával vizualizáltunk. A fixálást követő jelölési lépések 1 mg/ml BSA-t és 0,1 (v/v)% Triton X-et tartalmazó PBS-ben történtek. A sejtek fedőlemezhez tapadó régiójáról Zeiss LSM880 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk 1 Airy egységre beállított pinhole mérettel, 40x (NA=1,3) nagyítású vízimmerziós objektívet használva, 83 nm-es pixelmérettel és 512-512 pixeles felbontással. Az AlexaFluor488-at, AlexaFluor546-ot és AlexaFluor647-et rendre 488 nm-en, 543 nm-en és 633 nm-en gerjesztettük és az emittált intenzitásokat a 493-559 nm, 562-624 nm és 638-755 nm tartományokban detektáltuk.

A felvételek kiértékelése során a sejteket 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 sejt felszíni 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 intenzitás és CTX-B jelölődés, valamint a trastuzumab intenzitás és CTX-B jelölődés közötti Pearson korrelációs koefficiensek nagyságát. A képek elemzését a Matlab-ban végeztük.

4.16. 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 Lab-Tech™ II kamrában tenyésztett SKBR-3 és A431 sejteket jelöltünk dipólpotenciál-szenzitív fluorofórral (di-8-ANEPPS, F66 vagy PPZ8), valamint lipidtutaj-markerrel (GFP-GPI, AlexaFluor647-CTX-B vagy AC18 és AlexaFluor647-GAMIG-Fab) vagy non-raft membrán régiókhoz asszociálódó jelölővel (AlexaFluor647-transzferrin), a korábban leírtak szerint. A jelölés után a sejtek fedőlemezhez tapadó régiójáról LSM880 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk 1 Airy egységre beállított pinhole mérettel, 40x (NA=1,3) nagyítású vízimmerziós objektívet használva, 83 nm-es pixelmérettel és 512·512 pixeles felbontással. Di-8-ANEPPS esetén a fluorofórt 458 és 514 nm-es hullámhosszon gerjesztettük és az emissziót 584 és 686 nm között detektáltuk. Az F66 és PPZ8 dipólpotenciál szenzitív indikátorokat 405 nm-en gerjesztettük, az emisszió mértékét pedig az N*, illetve a T* formának megfelelő emissziós tartományokban, azaz 463 és 527nm, illetve 543 és 589 nm között határoztuk meg. A GFP gerjesztése 488 nm-en, az emittált intenzitás detektálása 506 és 555 nm között történt. Az AlexaFluor647 festéket 633 nm-en gerjesztettük, az emissziót 649 és 759 nm között mértük.

A képek elemzését Matlab programkörnyezetben végeztük a Diplmage toolbox segítségével. Előbb a felvételeken manuálisan azonosítottuk a membránnak megfelelő régiókat, majd ezekben pixelenként meghatároztuk a dipólpotenciál-szenzitív intenzitásarányokat, di-8-ANEPPS esetén az excitációs (exc458/514), F66 és PPZ8 esetén pedig az emissziós (em463-527/543-589) arányt a háttérintenzitások levonása után. Ezután a pixelenkénti dipólpotenciál-szenzitív intenzitásarányok és raft vagy non-raft marker intenzitások közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens nagyságát határoztuk meg egy erre a célra készített Matlab algoritmus segítségével. A korrelációs koefficiensnek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható konfidencia intervallumát Costes módszere alapján számítottuk ki minden kép esetén²⁸⁰. Pozitív kontrollként két lipidtutaj-marker, a GFP-GPI és a CTX-B közötti korrelációs koefficienst határoztuk meg.

A módszer alternatívájaként a kiértékelést elvégeztük úgy is, hogy a manuálisan azonosított membránból az elemzés során kihagytuk a legmagasabb intenzitású pixeleket tartalmazó „fényes foltokat”.

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

Az előzőekben SKBR-3 és A431 sejtekről elkészített felvételek elemzése során meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságát a raft és non-raft mikrodoméneknél. Ehhez a kiértékelés során a sejteket

manuálisan azonosítottuk, majd egy erre a célra készített Matlab algoritmus segítségével két maszkba szegmentáltuk oly módon, hogy a maxentropy algoritmussal a lipidraft-marker (CTX-B vagy GFP-GPI) egy küszöb intenzitását határoztuk meg, vizuális ellenőrzés mellett. A pixeleket „raft” pixelekként azonosítottuk, ha az intenzitás a küszöb intenzitás felett volt, míg alacsonyabb intenzitás esetén „non-raft” régióknak tekintettük őket. A maxentropy algoritmus átlagosan a pixelek 5-10%-át azonosította tutajként. Az átlagos di-8-ANEPPS excitációs és F66 emissziós arányt az egyedi pixelek adataiból számítottuk külön a „raft”, illetve „non-raft” régiókban.

Emellett az LSM880 mikroszkóp lambda módjának használatával meghatároztuk az F66 és a PPZ8 emissziós spektrumát a 468 és 621 nm közötti tartományban 9 nm-es intervallumokat használva, 405 nm-es hullámhosszon történő gerjesztés mellett. Ezen kísérletekben elvégeztük az emissziós spektrum kiértékelését külön-külön a tutajokon belül és azokon kívül úgy, hogy a különböző régiókat a korábban leírt módszerrel azonosítottuk.

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

A mérések során THP-1 monocitákat differenciáltattunk makrofággá 5 napon át 50 ng/ml koncentrációban alkalmazott PMA kezelés segítségével. A Gaucher-fenotípus indukciójához a PMA-val történő differenciációval párhuzamosan a sejtek egy részében 500 μ M-os conduritolt B epoxid 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 a fentebb említett vízfeltöltéses algoritmussal azonosítottuk a membrán pixeleket, majd a háttérintenzitások levonása után ezekben meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságát jellemző átlagos intenzitásarányokat a korábbiak szerint.

4.19. Statisztikai elemzés

A dolgozat ábráin az adatok átlagát \pm SEM ábrázoltuk. A minták közötti statisztikai különbség meghatározására kétszemponos variancia analízist (ANOVA, two-way analysis of variance), majd Tukey-féle HSD tesztet használtunk. Az eltéréseket 5%-os szignifikancia szint mellett vizsgáltuk ($p < 0.05$).

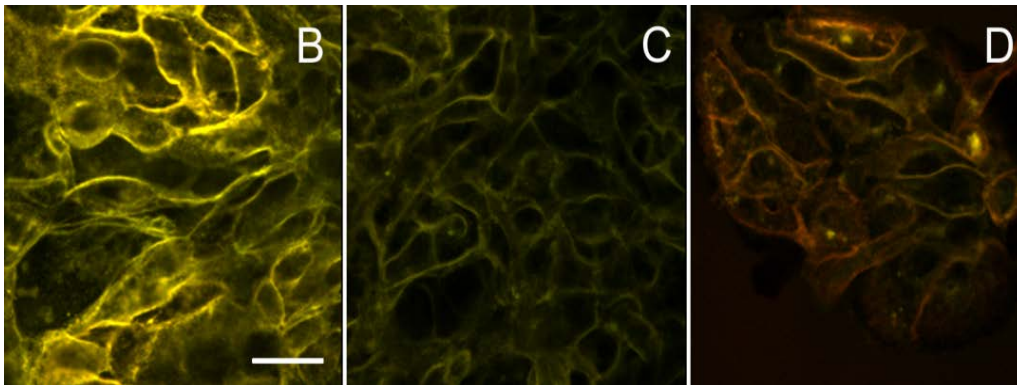
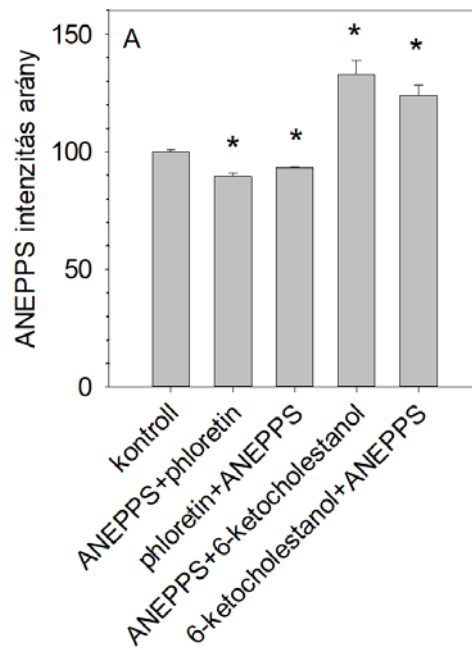
A Pearson-féle korrelációs koefficiens statisztikai szignifikanciájának teszteléséhez a korrelációs koefficiensnek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható konfidencia intervallumát Costes módszere alapján számítottuk ki minden kép esetén²⁸⁰.

5. Eredmények

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

Ismert, hogy a dipólpotenciál nagysága befolyásolja számos transzmembrán fehérje szerkezetét és funkcióját, ugyanakkor az ErbB receptorcsalád tagjait még nem elemezték ilyen szempontból. Vizsgálataink első fázisa során ezért célul tűztük ki annak meghatározását, hogy a dipólpotenciál változásai befolyásolják-e az ErbB fehérjék (azon belül is az EGFR és az ErbB2) működését. Ilyen mérésekhez azonban az élő sejtek membránjának dipólpotenciálját módosítanunk kellett, így először találnunk kellett egy erre alkalmas módszert. Korábbi irodalmi adatok alapján a dipólpotenciál nagysága növelhető 6-ketocholestanol, míg csökkenthető phloretin vegyületekkel, így ezek a vegyületek alkalmasnak látszottak céljaink megvalósítására^{38,39}. Kísérleteink első fázisában ezért ezek alkalmazhatóságát teszteltük konfokális mikroszkópos módszerrel, amely során a sejtek dipólpotenciáljának méréséhez a di-8-ANEPPS fluorofórt használtuk egy excitációs rációmetrikus módszer segítségével^{39,68}. SKBR-3, A431 és HeLa sejteket jelöltünk di-8-ANEPPS-sel a dipólpotenciált módosító 6-ketocholestanol, illetve phloretin kezelés előtt vagy után, majd konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtek középsíkjának megfelelően. A festéket 458 és 514 nm-es hullámhosszon gerjesztettük és az emissziót 630 nm felett detektáltuk, a gerjesztési arány fluiditástól függő változásainak kiküszöbölése érdekében³⁸. A képek feldolgozása során egy kézzel kijelölt vízfeltöltéses algoritmus („manually seeded watershed algorithm”)²⁷¹ segítségével azonosítottuk a membrán pixeleket és ezekben meghatároztuk a kétféle gerjesztés esetén mért fluoreszcencia intenzitások átlagos arányát a háttérintenzitás levonása után.

Azt találtuk, hogy a várakozásoknak megfelelően a 6-ketocholestanol szignifikánsan növelte, míg a phloretin szignifikánsan csökkentette a di-8-ANEPPS excitációs intenzitás arányt, vagyis a sejtmembrán dipólpotenciáljának mértékét minden vizsgált sejtvonal esetén. Az, hogy a jelölést a dipólpotenciált módosító kezelés előtt vagy után alkalmaztuk, nem módosította az eredményeket. SKBR-3 sejtek esetén kapott reprezentatív eredményeket ábrázoltunk az 5.1.1 ábrán. A mikroszkópos eredményeink alapján a fluoreszcens indikátor akkumulációja kizárólagosan a sejtmembránban történt. Ezek alapján az állapítható meg, hogy a 6-ketocholestanol és a phloretin megváltoztatja a sejtmembrán dipólpotenciáljának nagyságát és így ezek a vegyületek használhatók a dipólpotenciál megváltoztatásának az ErbB receptorok klaszterizációjára és jelátviteli folyamataira gyakorolt hatásának tanulmányozása során.



5.1.1 ábra: A dipólpotenciál változásának rációmetrikus detektálása. A. A dipólpotenciál nagyságának kvantitatív meghatározása. SKBR-3 sejtekben phloretinnel csökkentettük és 6-ketocholestanollal növeltük a dipólpotenciált. Az „ANEPPS+ketocholestanol” és „ANEPPS+phloretin” jelű mintákat di-8-ANEPPS-sel jelöltük a dipólpotenciál módosítása előtt, míg a másik két minta esetén a jelölés a kezelés után történt. A kezelt és kontroll sejtek esetén a fluoreszcenciaintenzitás arányokat normáltuk a Pluronic-F127 detergenssel kezelt („kontroll”) mintára. Az ábrán a csillagok a „kontroll” mintához képest tapasztalt szignifikáns eltéréseket jelölik ($p < 0,05$, ANOVA után végzett Tukey-féle HSD teszt alapján). B-D. Kontroll (B), phloretinnel (C) és 6-ketocholestanollal (D) kezelt sejtekről készített reprezentatív felvételek. A kompozit színes képen a vörös és zöld csatornák rendre a 458 nm-es és az 514 nm-es gerjesztés esetén detektált fluoreszcencia intenzitásnak felelnek meg. A mindegyik képre érvényes skála 20 μm -nek felel meg.

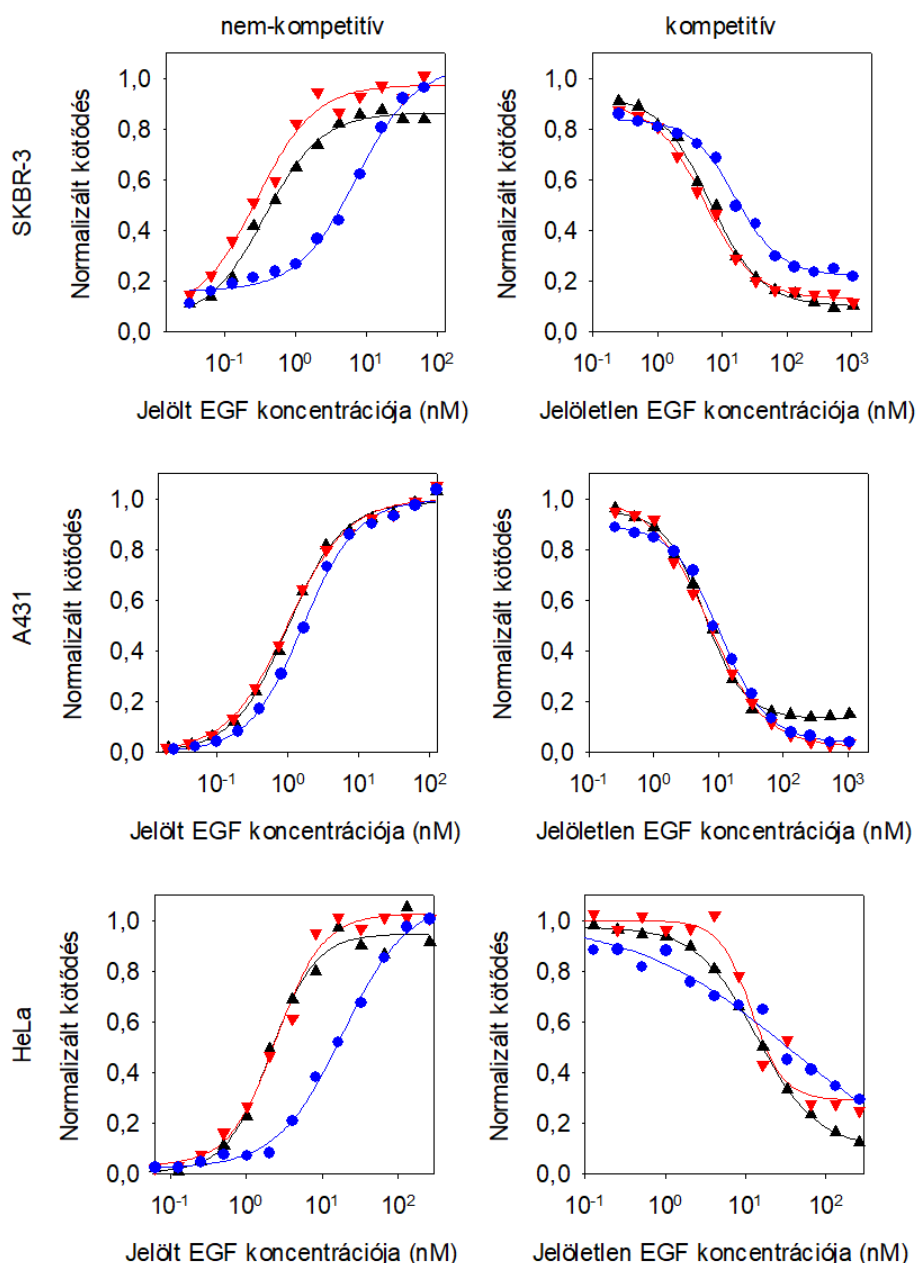
5.2. A dipólpotenciál növelése csökkenti az EGFR ligand iránti affinitását a sejtfelszíni expresszió változtatása nélkül

Mivel az EGFR funkcionális aktivációjának első lépése a ligand bekötődése a receptorhoz, megvizsgáltuk, hogy a dipólpotenciál változtatása befolyásolja-e a fehérje ligandkötési tulajdonságait. A dipólpotenciálnak az EGF ErbB1 iránti affinitására gyakorolt hatásának meghatározása során SKBR-3, A431 és HeLa sejteken előbb változtattuk a dipólpotenciál mértékét, majd a nem-kompetitív mérések során TAMRA-EGF törzsoldatából készített hígítási sor tagjaival jelöltük a sejteket és áramlási citométeren meghatároztuk azok fluoreszcenciaintenzitásait, végül az adatpontokra illesztett Hill-egyenlet analízisével meghatároztuk a K_d -t. A minták analízise során azt találtuk, hogy a dipólpotenciál növelése szignifikánsan csökkentette az EGF ErbB1 iránti affinitását (5.2.1 táblázat és 5.2.1 ábra).

Kezelés	SKBR-3			HeLa			A431		
	nem-kompetitív	kompetitív		nem-kompetitív	kompetitív		nem-kompetitív	kompetitív	
	K_d (jelölt) [nM]	IC50 [nM]	K_i [nM]	K_d (jelölt) [nM]	IC50 [nM]	K_i [nM]	K_d (jelölt) [nM]	IC50 [nM]	K_i [nM]
kontroll	0,37 ±0,07	6,44 ±0,94	0,44 ±0,10	2,10 ±0,12	13,90 ±1,65	4,10 ±0,31	0,99 ±0,10	6,10 ±0,80	1,00 ±0,15
phloretin	0,29 ±0,05	5,30 ±0,5	0,30 ±0,07	2,47 ±0,20	11,80 ±1,90	3,90 ±0,27	0,98 ±0,08	7,00 ±0,70	1,15 ±0,18
6-ketocholestanol	7,23* ±0,37	15,90* ±1,30	9,40* ±1,02	18,60* ±0,25	33,50* ±3,90	26,40* ±1,62	1,63* ±0,21	10,6* ±1,00	2,60* ±0,33

5.2.1 táblázat: Fluoreszcens és jelöletlen EGF ErbB1 iránti affinitása különböző nagyságú dipólpotenciálok esetén. Kontroll (Pluronic F-127-tel kezelt) vagy dipólpotenciált módosító vegyülettel (phloretinnel vagy 6-ketocholestanollal) kezelt sejteket inkubáltunk fluoreszcens EGF-ből készített hígítási sorral és az adatpontokra illesztett Hill-egyenlet analízisével meghatároztuk a K_d -t (nem-kompetitív módszer). A módszer alternatívájaként a sejteket jelöletlen EGF-ből készített hígítási sorral inkubáltuk állandó koncentrációjú fluoreszcens EGF jelenlétében. Illesztés segítségével meghatároztuk az $IC50$ értékeket, majd a korábban kapott K_d -k ismeretében kiszámoltuk a K_i paramétereket. Az eredeti kötődési görbék az 5.2.1 ábrán láthatók (* $p < 0,05$, a kontroll sejtekhez viszonyítva, ANOVA után végzett Tukey's HSD teszt alapján).

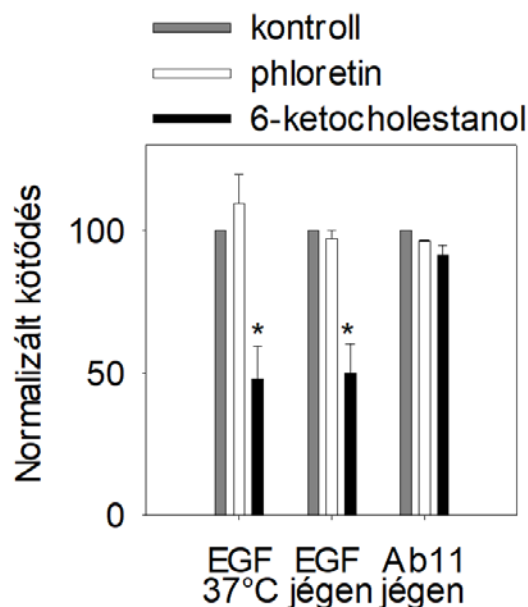
Mivel egy fluoreszcens festék inkorporációja esetlegesen megváltoztathatja az EGF dipólpotenciállal való kölcsönhatását, kompetitív kötődési kísérleteket végeztünk annak a lehetőségnek a kizárására, hogy a magas dipólpotenciál mellett megfigyelhető gátolt EGF kötődést a fluorofór jelenléte okozza. A mérések során a sejtek dipólpotenciáljának módosítása után azokat jelöletlen EGF-ből készített hígítási sorral inkubáltuk állandó koncentrációjú fluoreszcens EGF jelenlétében, majd áramlási citométerrel mértük a sejtek fluoreszcencia intenzitását. Az átlagos intenzitások számításával nyert adatpontok illesztésével meghatároztuk az $IC50$ értékeket, majd a korábban kapott K_d -k ismeretében kiszámoltuk a K_i paramétereket. A korábbi eredményeinkkel összhangban azt találtuk, hogy a jelöletlen EGF receptor iránti affinitását a magas dipólpotenciál hasonló mértékben csökkentette, mint a fluoreszcens EGF esetén (5.2.1 táblázat és 5.2.1 ábra).



5.2.1 ábra: A dipólpotenciál hatása az EGF receptor iránti affinitására. Kontroll (Pluronic F-127-tel kezelt) vagy dipólpotenciált módosító vegyülettel (phloretinnel vagy 6-ketocholestanollal) kezelt sejteket jelöltünk TAMRA-EGF-ből (nem-kompetitív módszer) vagy jelöletlen EGF-ből készített hígítási sorral, utóbbi esetben 5 nM koncentrációjú TAMRA-EGF jelenlétében (kompetitív módszer). A szemi-logaritmus grafikonokon a minták áramlási citométerrel mért átlagos fluoreszcencia intenzitásait ábrázoltuk. Az ábrázolt vonalakat az adatpontokra illesztett Hill-egyenlettel határoztuk meg. A számított K_d és K_i paraméterek az 5.2.1 táblázatban találhatóak.

Mivel későbbi kísérleteink során a dipólpotenciál receptorokra gyakorolt hatásait liganddal történő stimuláció mellett kívántuk vizsgálni, teszteltük a fluoreszcens EGF receptorhoz kötődését a későbbiekben a stimulációhoz használt kísérletes körülmények között is. A sejtek dipólpotenciálját módosítottuk, majd 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott fluoreszcens EGF jelenlétében történő

inkubáció után áramlási citométerrel mértük a sejtek átlagos fluoreszcenciaintenzitását, majd a háttérintenzitás levonása után meghatároztuk a mintára jellemző átlagos fluoreszcencia intenzitást. 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 attól, hogy a növekedési faktort jégen vagy 37°C-on alkalmaztuk (SKBR-3 sejtek esetén kapott reprezentatív eredmények láthatók az 5.2.2 ábrán). A mérések során tapasztalt változások jó egyezést mutattak a korábbi kötődési görbék alapján várt értékekkel. Jégen történő jelölés esetén az EGF kötődése a sejtmembránra korlátozódott, míg a 37°C-on történő inkubációnál a növekedési faktor receptor által mediált endocitózissal bejutott az intracelluláris kompartmentekbe.



5.2.2 ábra: A dipólpotenciál hatása az ErbB1 sejtfelszíni expressziójára és ligandkötésére. Éheztetett SKBR-3 sejteket kezeltünk phloretinnel és 6-ketocholestanollal Pluronic F-127 jelenlétében, amelyet 100 ng/ml (~16 nM) koncentrációjú TAMRA-EGF-fel történő jelölés követett 37°C-on 5 percig vagy jégen 30 percig, illetve a sejteket AlexaFluor546-tal konjugált ErbB1 ellenes Ab11 antitesttel jelöltük jégen 30 percig. Az áramlási citométerrel mért fluoreszcenciaintenzitásokat a háttérintenzitás levonásával történő korrekció után a (Pluronic F-127-tel kezelt) kontroll minták intenzitására normáltuk. Az ábrán három független mérés átlagait ábrázoltuk (\pm SEM). A kontroll mintához képest szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük ($p < 0,05$, ANOVA után végzett Tukey-féle HSD teszt alapján).

Mivel az EGF csökkent receptorhoz való kötődésének hátterében elvileg a sejtfelszíni ErbB1 expresszió csökkenése is állhat, meghatároztuk a receptor sejtfelszíni mennyiségét phloretin, illetve 6-ketocholestanol alkalmazása esetén. A dipólpotenciál változtatása után a sejteket AlexaFluor546-tal konjugált ErbB1 ellenes Ab11 elnevezésű monoklonális antitesttel jelöltük, majd áramlási citometriás módszerrel meghatároztuk a mintákon belül az átlagos fluoreszcencia intenzitás mértékét. Jóllehet a

dipólpotenciál módosítása jelentősen megváltoztatta az EGF receptor iránti affinitását, mindez az ErbB1 receptor változatlan sejtfelszíni expressziója mellett történt, amint azt az ErbB1 ellenes antitesttel végzett méréseink bizonyították, ugyanis a dipólpotenciál változtatása esetén sem változott a receptor sejtfelszíni mennyiségét jellemző átlagos fluoreszcencia intenzitás (5.2.2 ábra). Ezen kísérleteink meggyőzően alátámasztották, hogy a dipólpotenciál növelése szignifikánsan lecsökkentette az ErbB1 ligand iránti affinitását változatlan sejtfelszíni expresszió mellett.

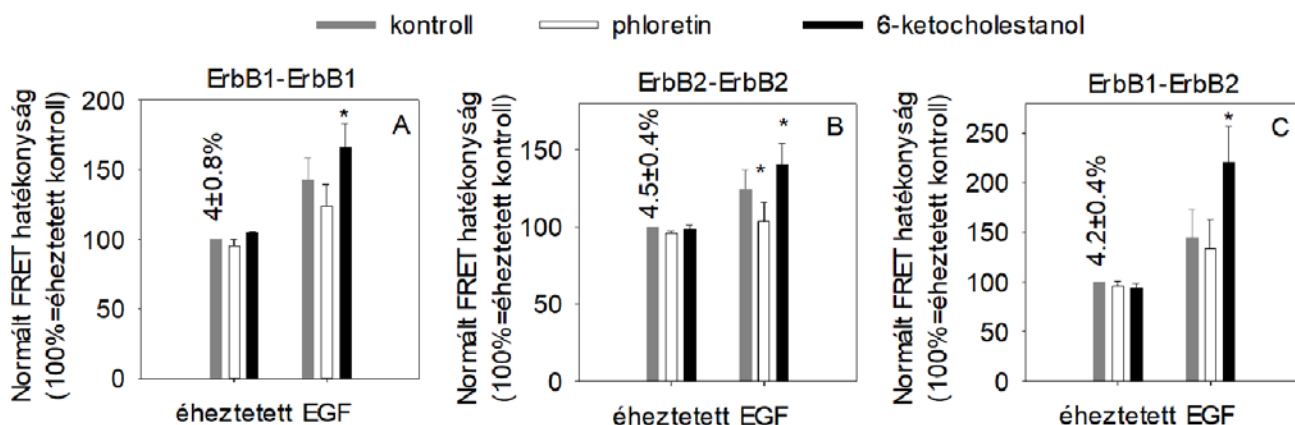
5.3. A dipólpotenciál növelése serkenti az ErbB1 és az ErbB2 klaszterizációját

Mivel a ligand indukált transzmembrán jelátvitel beindulását megelőzi az ErbB receptorok klaszterizációja, kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a dipólpotenciál megváltoztatása befolyásolja-e a receptorok oligomerizációját éheztetett 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 analízis segítségével. Az ErbB fehérjék asszociációjának FRET módszerrel való vizsgálata során transzfektálatlan SKBR-3 sejteket alkalmaztunk az ErbB2 homoasszociáció és ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció, valamint transzfektálatlan HeLa sejteket az ErbB1 homoasszociáció mérésére, mivel ezek sejtfelszíni receptor expressziója elég magas volt a mérésekhez. Az A431 sejtek extrém nagymértékű ErbB1 expressziója miatt azokban nagy mennyiségben találhatóak preformált ErbB1 dimerek, amelyek jelenléte megnehezíti az EGF ErbB1 klaszterizációra gyakorolt hatásának detektálást¹⁴². Emiatt A431 sejteket csak az EGF receptor iránti affinitásának meghatározása során használtunk, FRET méréseinket inkább SKBR-3 és HeLa sejtvonalakon végeztük. Emellett a neu homoasszociációjának meghatározására és a vad típusú variánssal történő összehasonlítására CHO sejteket transzfektáltunk elektroporációs módszerrel vad típusú fehérjét tartalmazó ErbB2-pcDNA3, illetve NeuT fehérjét kódoló pSV2neuNT plazmiddal. Az éheztetett sejteket a dipólpotenciált módosító kezelés és a minták egy részének EGF-fel történő stimulációja után a megfelelő festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel jelöltük (ErbB1 esetén Ab11 antitesttel, ErbB2 esetén pedig trastuzumabbal). Donor fluorofórként az antitestekhez konjugált AlexaFluor546-ot, míg akceptorként AlexaFluor647-et használtunk, majd a sejtek fluoreszcencia intenzitásait áramlási citométeren mértük. A mérések során mintánként és kísérletenként legalább 10-20000 sejt adataiból a ReFlex programmal a 3.12. fejezetben részletesen ismertetett módon meghatároztuk a FRET hatékonyságot a korrigált intenzitások alapján, a megfelelő korrekciós faktorok figyelembe vételével.

A FRET módszer alternatívjaként, a dipólpotenciál ErbB fehérjék asszociációjára gyakorolt hatásának elemzését elvégeztük N&B analízissel is. Az EGFR asszociációjának mérése során kísérleteinket egy módosított CHO eredetű sejtvonalon, az ErbB1-EGFP fúziós fehérjét stabilan expresszáló F1-4 sejtvonalon végeztük, míg az ErbB2 és a neu vizsgálata során HeLa sejteket transzfektáltunk pCDNA3.1

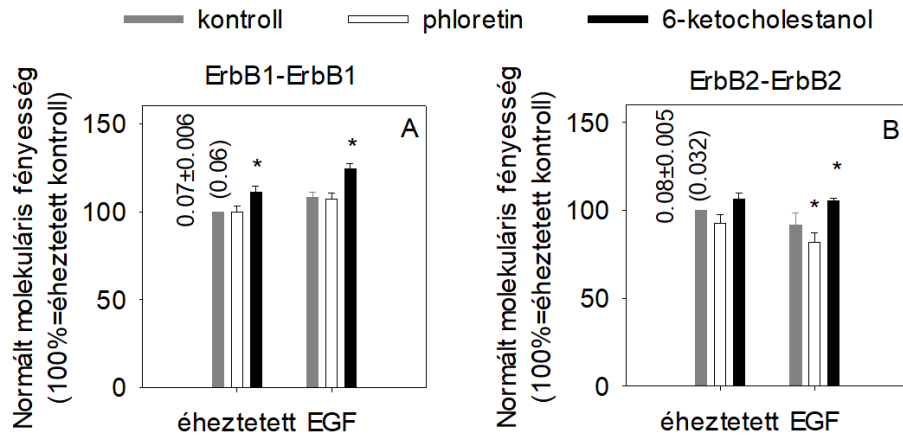
ErbB2-short-mYFP, illetve az általunk mutációval előállított pCDNA3.1 ErbB2 (Val659Glu)-shortmYFP plazmiddal. Az éheztetett sejtekről a dipólpotenciált módosító kezelés és a minták egy részének EGF-fel történő stimulációja után konfokális mikroszkópos felvételsorozatot készítettünk, majd a képek Matlab programban történő elemzésével a 3.13. fejezetben részletesen leírt módon meghatároztuk a molekuláris fényesség értékeit, amely a receptorok klaszterizációs állapotára, asszociációs fokára utalt.

Kísérleteink során mind az áramlási citométeren végzett FRET, mind pedig a konfokális mikroszkópos N&B méréseink eredményei azt mutatták (5.3.1, illetve 5.3.2 ábra, valamint 5.3.3 ábra a reprezentatív hisztogramokkal), hogy stimulálatlan sejtekben a dipólpotenciál módosítása csak kis változásokat eredményezett az ErbB1 és ErbB2 homoasszociációkban, amelyek közül egyedül a dipólpotenciál növelés hatására bekövetkező megnövekedett ErbB1 homoklaszterizáció bizonyult statisztikailag szignifikánsnak a N&B analízis során. A korábbi eredményekkel összhangban¹⁴² 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 transzmembrán doménben mutációt hordozó NeuT homoklaszterizációja szignifikánsan megnövekedett a dipólpotenciál növelésének hatására már nyugalomban levő sejtekben is mind a FRET, mind pedig a N&B mérések során (5.3.4 ábra B és C rész). Jóllehet vad típusú ErbB2-t tartalmazó plazmiddal transzfektált sejtekben 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%-kal, míg NeuT esetén 52%-kal nőtt a relatív FRET hatékonyság a 6-ketocholestanol kezelés hatására, $p < 0,05$).



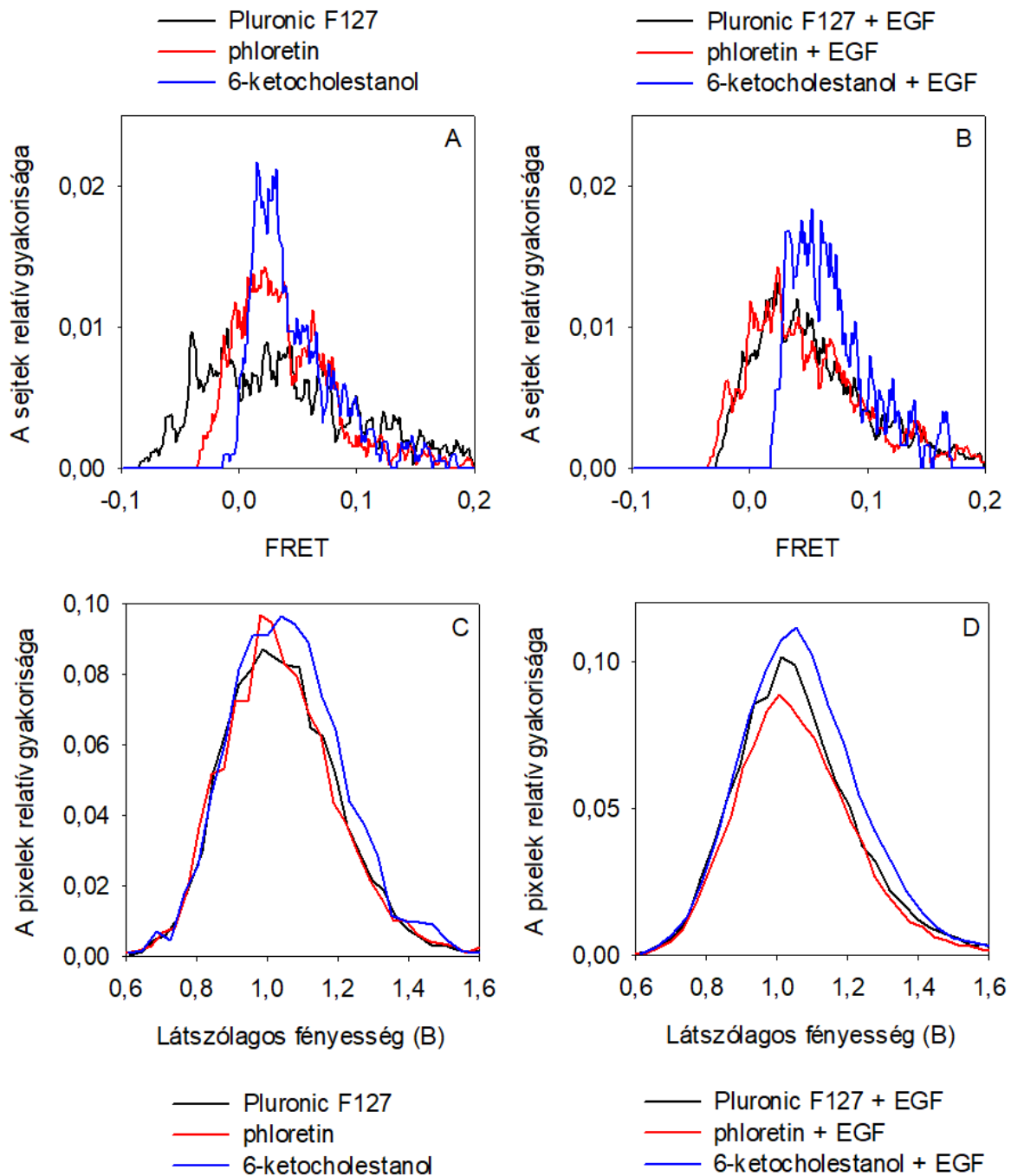
5.3.1 ábra: A dipólpotenciál hatása az ErbB1 és ErbB2 homo- és heteroasszociációira. Az ErbB1 homoasszociáció (A), az ErbB2 homoasszociáció (B) és az ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció (C) mértékét áramlási citométeres FRET módszerrel határoztuk meg kontroll, phloretinnel és 6-ketocholestanollal kezelt sejtekben. Minden mérés esetén a számított átlagos FRET hatékonyságokat normáltuk a Pluronic F127-tel kezelt (kontroll) sejtek esetén kapott átlagos FRET hatékonyságra. Az oszlopok feletti szám az éheztetett kontroll minta normálás nélküli átlagos FRET hatékonyságait (\pm SEM) mutatja. Az oszlopok magasságai és a hibavonalak négy független kísérlet adatainak átlagait és azok szórásait mutatják. A statisztikai elemzéshez kétszemponos variancia analízist (ANOVA, two-way analysis of variance), majd Tukey-féle HSD tesztet használtunk. Csillagokkal jelöltük a megfelelő kezelt minták kontrollhoz képest szignifikáns eltéréseit ($p < 0,05$). A grafikonon ábrázolt adatok számításához használt reprezentatív FRET hisztogramok az 5.3.3 ábrán láthatók.

A dipólpotenciál EGF indukált receptor klaszterizációra gyakorolt hatásának meghatározására a FRET hatékonyság és a molekuláris fényesség értékeket normálni kellett, hogy az értékek stimulálatlan sejtek esetén megfigyelhető variabilitását elimináljuk. A nyugalomban levő sejtekben megfigyelttel 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 (5.3.1 ábra A és B panelje, illetve 5.3.2 ábra). Jóllehet a dipól potenciál phloretinnel való csökkentésének a hatása kevésbé bizonyult jelentősnek, az ErbB2 EGF indukált homoklaszterizációja szignifikánsan csökkent phloretin hatására (5.3.1 ábra B része és 5.3.2 ábra B része). Az ErbB1 és ErbB2 N&B mérések esetén EGF stimulációt követően megfigyelt ellentétes viselkedése összhangban áll korábbi megfigyeléseinkkel, amelyek szerint az EGF oly módon vezet a megnövekedett ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció növekedéséhez, hogy az ErbB2-t a jelen levő nagyméretű ErbB2 homoklaszterekből rekrutálja, csökkentve ezáltal az ErbB2 homo-oligomerek méretét¹⁴².

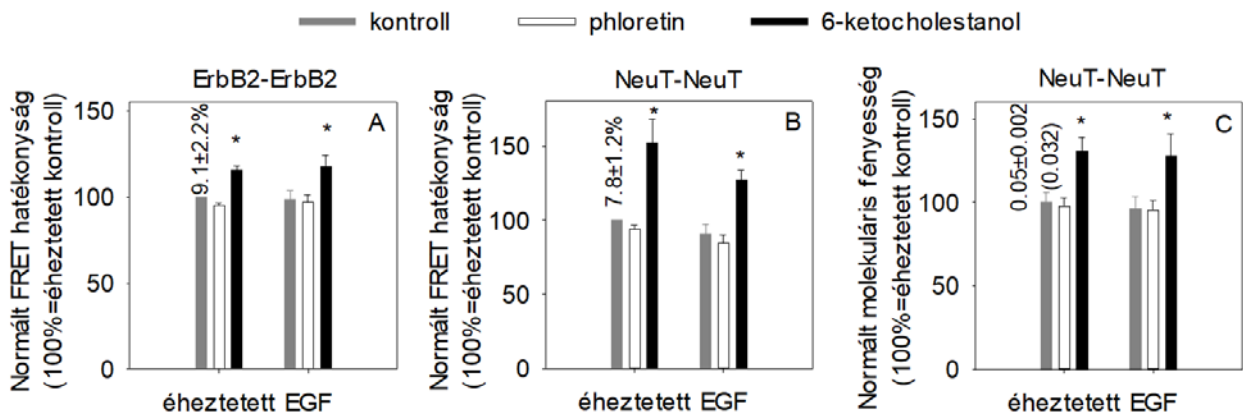


5.3.2 ábra: A dipólpotenciál hatása az ErbB1 és ErbB2 homoasszociációkra N&B analízis során. Az ErbB1 homoasszociációjának meghatározásához ErbB1-EGFP-t stabilan expresszáló F1-4 sejteket használtunk, míg az ErbB2 homoasszociáció mérése ErbB2-mYFP-t tartalmazó plazmiddal transzfektált HeLa sejteken történt. A meghatározott molekuláris fényesség értékeit normáltuk a Pluronic F-127-tel kezelt éheztetett kontroll minták molekuláris fényesség értékeinek átlagára. A grafikonon az ErbB1-EGFP és ErbB2-mYFP hat független kísérletből származó normált molekuláris fényesség értékeit ábrázoltuk (átlag ± SEM). Az oszlopok feletti számok az éheztetett kontroll minták normálás nélküli molekuláris fényességeinek átlagát mutatják (±SEM). A zárójelben szereplő értékek a monomer fluorofórok molekuláris fényességeit mutatják. Csillagokkal jelöltük a kezelt minták megfelelő kontrolljához képest szignifikáns eltéréseit ($p < 0,05$, ANOVA után végzett Tukey-féle HSD teszt alapján). A grafikonon ábrázolt adatok számításához használt reprezentatív fényesség hisztogramok az 5.3.3 ábrán láthatók.

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 értékeit pedig rendre 33%-kal, valamint 13%-kal a kétféle esetben (5.3.2 és 5.3.4 ábra, $p < 0,05$).



5.3.3 ábra: A FRET és N&B mérések során nyert reprezentatív hisztogramok. A-B: Az ErbB1 homoasszociációjának mértékét áramlási citometriás FRET módszerrel határoztuk meg a grafikonok jelmagyarázatnak megfelelő körülmények között EGF stimuláció nélkül, illetve annak jelenlétében. A grafikonokon a kísérletek során nyert reprezentatív FRET hatékonyság hisztogramok láthatók. C-D: Az ErbB2 homoasszociációjának mértékét N&B módszerrel határoztuk meg a grafikonok jelmagyarázatnak megfelelő körülmények között EGF stimuláció nélkül, illetve annak jelenlétében. A grafikonokon a kísérletek során nyert reprezentatív látszólagos fényesség hisztogramok láthatók.



5.3.4 ábra: A dipólpotenciál NeuT homoklaszterizációjára gyakorolt hatása. HeLa sejteket transzfektáltunk vad típusú ErbB2-t (A), NeuT-t (B), vagy mYFP-vel fuzionáltatott NeuT-t (C) tartalmazó plazmiddal és az így expresszált fehérjék homoklaszterizációit mértük áramlási citometriás FRET (A, B) vagy N&B analízis (C) módszerrel. A számított FRET hatékonyság, illetve molekularis fényesség értékeit normáltuk a Pluronic F-127-tel kezelt kontroll éheztetett sejtek esetén kapott értékek átlagára. A grafikonokon hat független kísérletből származó normált FRET hatékonyságokat és molekularis fényességeket ábrázoltunk (átlag ± SEM). A bal oldali oszlopok feletti számok az éheztetett kontroll minták normálás nélküli FRET hatékonyságainak és molekularis fényességeinek átlagát mutatják (±SEM). A zárójelben szereplő értékek a monomer fluorofór molekularis fényességét mutatja. Csillagokkal jelöltük a kezelt minták megfelelő kontrolljához képest szignifikáns eltéréseit ($p < 0,05$, ANOVA után végzett Tukey-féle HSD teszt alapján).

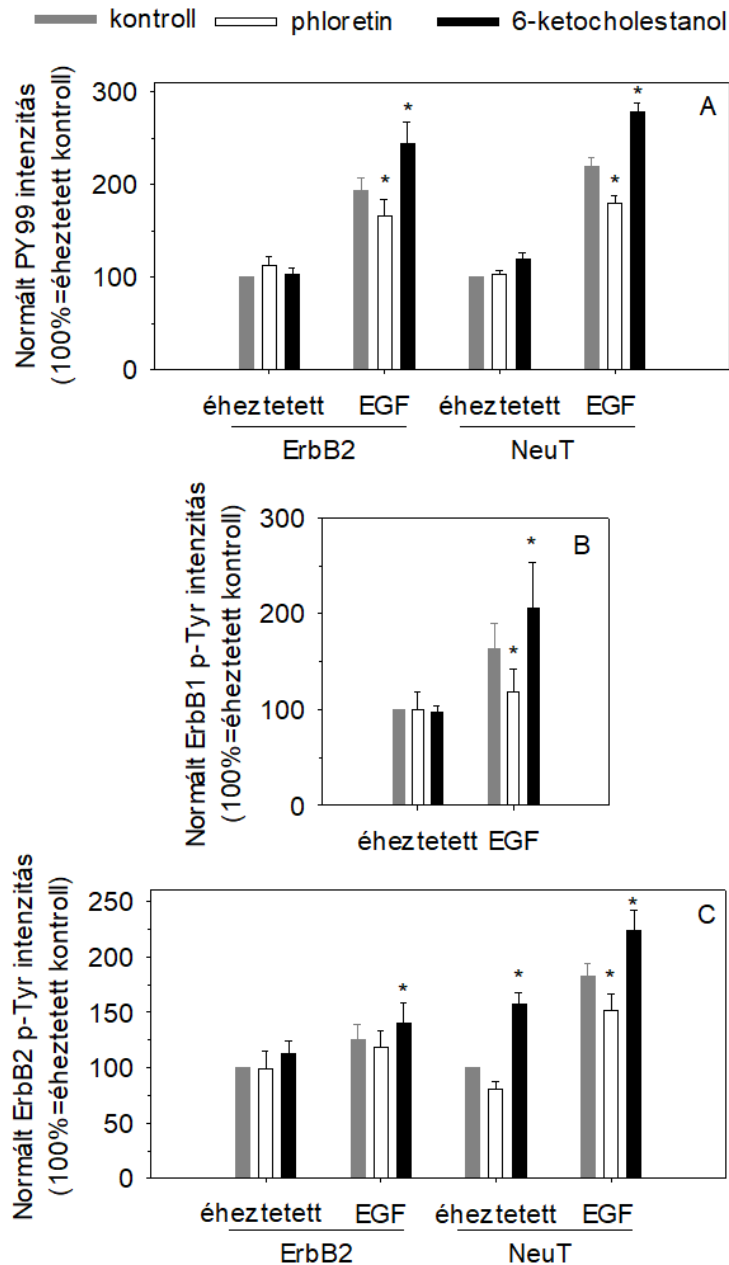
Mivel az ErbB2 az EGF által aktivált ErbB1 preferált heterodimerizációs partnere¹²⁹, a dipólpotenciál ErbB1 és ErbB2 klaszterekre gyakorolt hatásának elemzése nem lett volna teljes a közöttük létrejövő heteroasszociáció vizsgálata nélkül. Áramlási citometriás FRET méréseink alapján a dipólpotenciál nem befolyásolta az ErbB1 és ErbB2 heteroklaszterizációját nyugalomban levő sejteken, a két receptor kölcsönhatásának EGF indukált növekedése azonban szignifikánsan nagyobb volt azokban a sejtekben, amelyekben a dipólpotenciál nagyságát 6-ketocholestanollal növeltük (5.3.1 ábra C része). Mindezen eredményeink alapján leszűrhető, hogy az ErbB1 és ErbB2 homo- és heteroasszociációinak mértéke pozitív korrelációt mutat a dipólpotenciállal, elsősorban ligand stimuláció esetén.

5.4. A dipólpotenciál változtatása befolyásolja az EGF-indukált jelátvitelt

Az ErbB receptorok ligand által indukált klaszterizációja a receptorok tirozin oldalláncainak foszforilációjához és a tirozin foszforilációs szignál terjedéséhez vezet. Annak eldöntésére, hogy az ErbB1 és ErbB2 klaszterizációban a dipólpotenciál változtatására bekövetkező eltérések megnyilvánulnak-e a receptor általi jelátvitelben, éheztetett és EGF stimulált sejtekben meghatároztuk a tirozin foszforiláció szintjét általános foszfortirozin ellenes, az ErbB1 foszforilált Tyr1068-ja (1H12) és az ErbB2 foszforilált Tyr1248-ja (Ab18) elleni antitestek segítségével. Ehhez éheztetett SKBR-3 sejtek dipólpotenciáljának változtatása és a nem kontroll minták EGF stimulációja után azokat fixáltuk, majd

foszforilált tirozin ellenes antitestekkel jelöltük. Ezt követően az elsődleges antitesteket Alexa647-GAMIG másodlagos antitesttel vizualizáltuk és a sejtenkénti fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citométeren mértük, végül pedig a kiértékelés során meghatároztuk a mintákat jellemző átlagos intenzitásokat. Intracelluláris foszforilációs méréseinket megismételtük transzfektált HeLa sejteken is, amelyek során a sejteket elekroporáltuk plazmid nélkül, vad típusú fehérjét tartalmazó ErbB2-pcDNA3 plazmiddal, illetve NeuT fehérjét kódoló pSV2neuNT plazmiddal. A transzfektált sejteket két napig tenyésztettük, majd a fentieknek megfelelően meghatároztuk a foszforiláció mértékét.

A korábbi FRET és N&B kísérleteinkhez hasonlóan a tirozin foszforilációk stimulálatlan kontroll sejtekre való normálása eliminálta az aktiváció bazális szintjének variabilitását. A dipólpotenciál változtatása nem befolyásolta a stimulálatlan sejtek alacsony tirozinfoszforilációs alapszintjeit, míg az EGF stimulációra adott válasz mértéke korrelált a dipólpotenciál nagyságával (5.4.1 ábra). A FRET és N&B mérések során tapasztaltakkal összhangban a dipólpotenciál NeuT fehérjékre gyakorolt hatása sokkal kifejezettebb volt, mint vad típusú ErbB2 esetén. Ezek a kísérleteink bebizonyították, hogy a dipólpotenciál szignifikánsan módosította a sejtek növekedési faktor stimulációra adott tirozin foszforilációs válaszát.

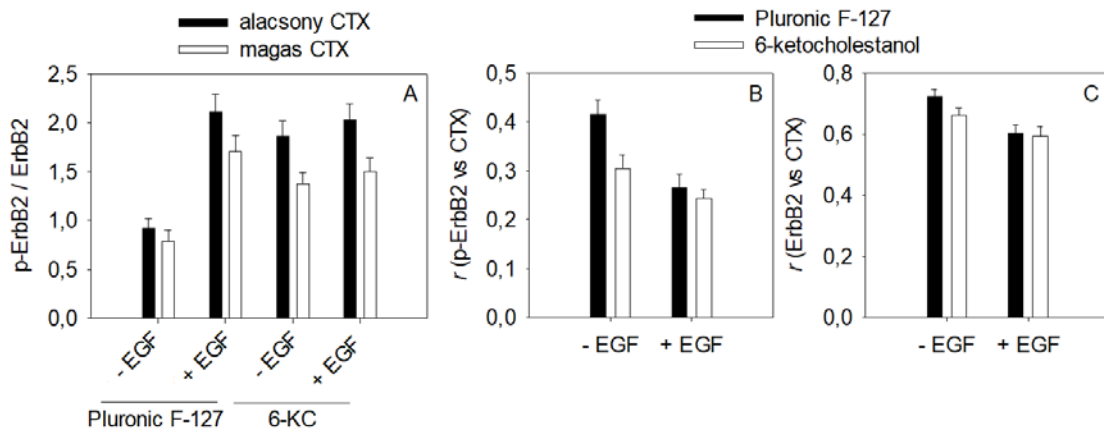


5.4.1 ábra: A dipólpotenciál hatása az EGF indukált tirozin foszforilációra áramlási citométeres mérések során. Az általános tirozin foszforiláció mértékét PY99 (A), az ErbB1 1068-as pozícióban levő tirozinjának foszforilációját 1H12 (B), míg az az ErbB2 1248-as pozícióban levő tirozinjának foszforilációját Ab18 (C) antitestekkel határoztuk meg. Az AlexaFluor647-GAMIG másodlagos antitesttel jelölt kontroll és EGF-fel kezelt minták átlagos fluoreszcencia intenzitásait a Pluronic F-127-tel kezelt kontroll minta átlagára normáltuk. A grafikonokon a négy független kísérlet adatiból számított átlagokat (\pm SEM) ábrázoltuk. A statisztikai elemzéshez kétszemponos variancia analízist (ANOVA, two-way analysis of variance), majd Tukey-féle HSD tesztet használtunk. Csillagokkal jelöltük a kezelt minták megfelelő kontrollokhoz képest szignifikáns eltéréseit ($p < 0,05$).

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

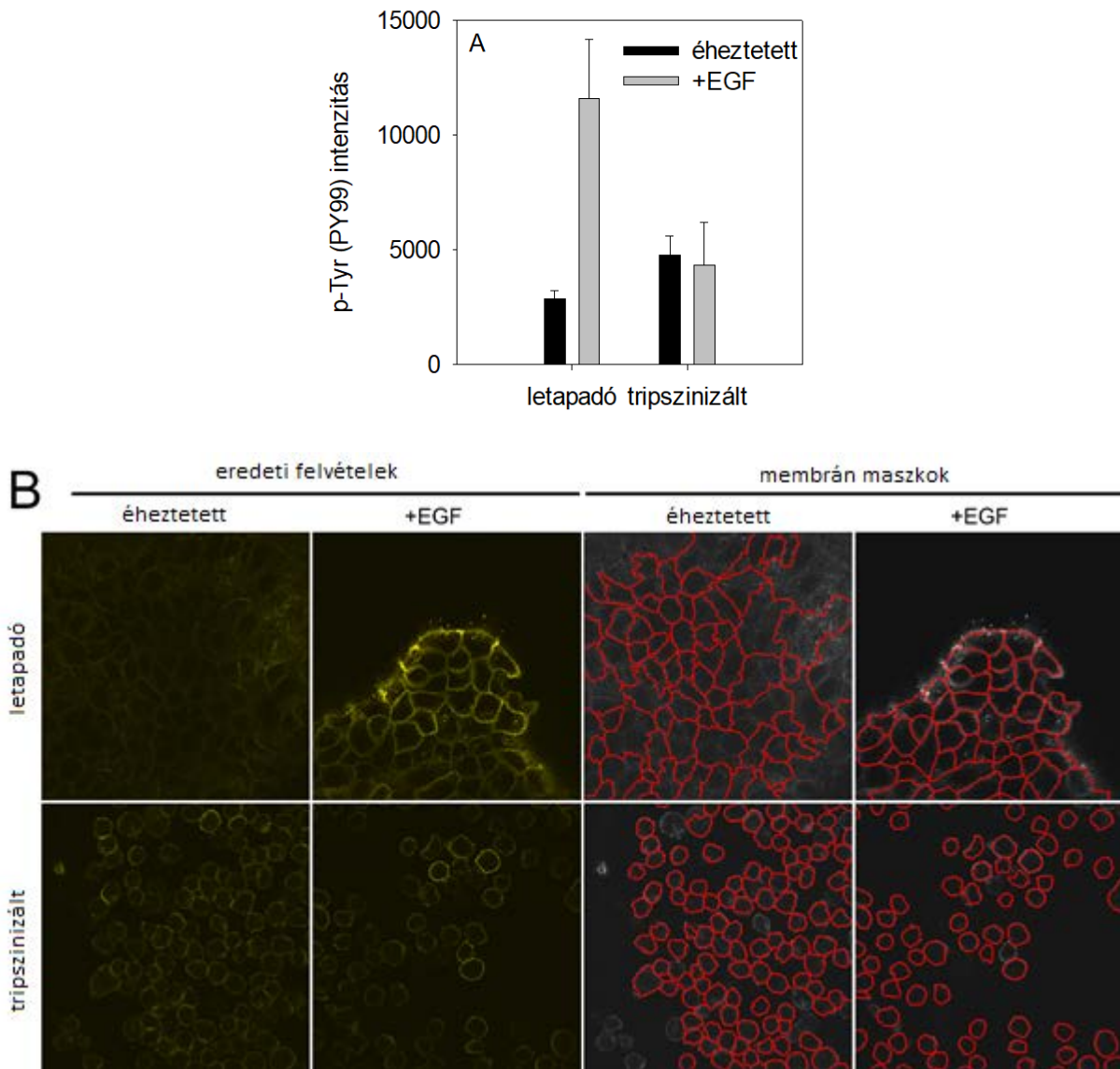
Mivel feltételezések szerint a dipólpotenciál nagysága különböző lehet a lipidtutajokban a membrán egyéb régióhoz képest, bizonyos mértékű korreláció várható az ErbB2 aktivációs állapota, raft lokalizációja és a dipólpotenciál között. Ennek vizsgálatára éheztetett sejtek egy részének dipólpotenciálját növeltük 6-ketocholestanol alkalmazásával, amelyet a minták egy részénél EGF stimuláció követett. Ezután a sejtek membránjában az ErbB2 fehérjét AlexaFluor546-trastuzumab, a lipidtutajokat AlexaFluor647-CTX-B segítségével jelöltük, majd fixálás után foszforilált ErbB2-ellenes Ab18 elsődleges és AlexaFluor488-GAMIG másodlagos antitesteket alkalmaztunk. A sejtek fedőlemezhez tapadó régiójáról konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk, majd a felvételek kiértékelése során a sejteket 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 sejt felszíni 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.

Kísérleteink során azokban a sejtekben, amelyekben a dipólpotenciált nem módosítottuk, nem találtunk lényeges különbséget az ErbB2 normált tirozin foszforilációjának mértékében a membrán raft és non-raft régiói között (5.5.1 ábra A része). A dipólpotenciál növelése az ErbB2 aktivációs szintjének emelkedését eredményezte, amely hatás jelentősebb mértékben a lipidtutajokon kívül volt megfigyelhető. Azon sejtekben, amelyekben nem módosítottuk a dipólpotenciált, az EGF stimuláció az ErbB2 tirozin foszforilációjának növekedését eredményezte mind a raftokban, mind pedig a non-raft régiókban, amely változás nagyobb volt a lipidtutajokon kívüli membrán régiókban. Az EGF stimuláció a 6-ketocholestanollal megnövelt dipólpotenciállal rendelkező sejtekben nem emelte tovább lényegesen az ErbB2 normált tirozin foszforilációjának mértékét.



5.5.1 ábra: Az ErbB2 aktivációja, lipidtutaj lokalizációja és a dipólpotenciál közötti korreláció konfokális mikroszkópos analízis során. SKBR-3 sejtek egy részében a dipólpotenciált 6-ketocholestanollal (6-KC) növeltük, míg a kontroll sejteket Pluronic F-127 jelenlétében inkubáltuk. A sejteket EGF-fel stimuláltuk, majd a membránban található össz-ErbB2 mennyiséget trastuzumabbal, a tirozin foszforilált ErbB2-t (p-ErbB2) Ab18 antitesttel és a lipidtutajokban található GM1 gangliozidokat koleratoxin B alegységgel (CTX) jelöltük. A membrán expresszióra normált ErbB2 tirozin foszforiláció mértékét (p-ErbB2/ErbB2) külön-külön meghatároztuk a magas, illetve alacsony CTX jelet mutató membrán régiókban (A). Minden minta esetén kiszámítottuk a p-ErbB2 és CTX közötti (B), valamint a totál-ErbB2 és CTX (C) közötti Pearson-féle korrelációs koeficiensek (r) átlagos értékét. A grafikonon látható hibavonalak a három független kísérlet során felvett 25 kép adataiból számított középértékek közepes hibáit mutatják.

Az EGF stimuláció hatásában a 5.4.1 és 5.5.1 ábrákon látható eredményekben megfigyelhető különbségek valószínűleg abból erednek, hogy az áramlási citométeres kísérleteinkben tripszinizált sejteket stimuláltunk (5.4.1 ábra), míg a 5.5.1 ábrán látható eredmények esetén letapadó sejteket vizsgáltunk. A tripszinizáció pedig önmagában is a jelátviteli útvonalak stimulációját eredményezheti, amely elfedheti a növekedési faktor által indukált hatásokat (5.5.2 ábra).



5.5.2 ábra: A tripszinizáció hatása a sejtek aktivációs állapotára. Az éheztetett SKBR-3 sejteket stimuláltuk EGF-fel a tripszinizáció előtt vagy a stimulációt szuszpendált sejtekben végeztük tripszinizáció után. A fixált és permeabilizált sejteket általános foszforilált tirozin ellenes PY99 antitesttel inkubáltuk, amelyet másodlagos antitest alkalmazása követett. A fluoreszcencia intenzitását a membránban végeztük, amelynek azonosítását kézzel kijelölt vízfeltöltéses algoritmus segítségével végeztük. A grafikonon az átlagos fluoreszcencia intenzitásokat (\pm SEM) ábrázoltuk három független kísérlet adatai alapján (A), valamint reprezentatív eredeti felvételek láthatók az ábrán a megfelelő membrán maszkokkal (B).

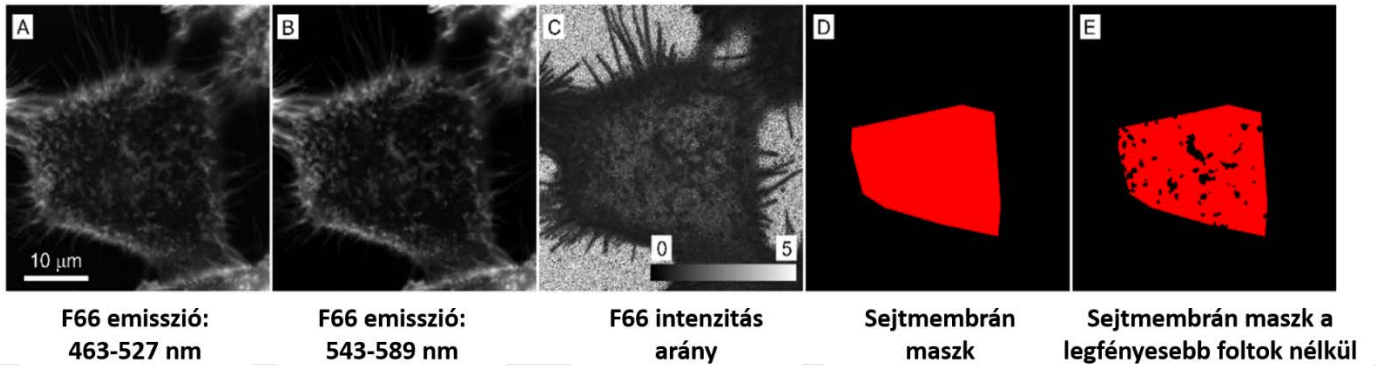
Eredményeink alapján a dipólpotenciál nagyságának a 6-ketocholestanol kezelés eredményeképpen létrejövő növekedése az ErbB2 tirozin foszforilációját jelentősebb mértékben befolyásolta a lipidtutajokon kívül. A megfigyelés, mely szerint az EGF stimuláció jobban növelte az ErbB2 tirozin foszforiláció mértékét a raftokon kívül arra utalhatott, hogy a növekedési faktor preferenciálisan a lipidtutajokon kívül elhelyezkedő ErbB2 molekulákat aktiválja, vagy az aktivált ErbB2 kikerül a raftokból. Ezt a feltételezést 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 (5.5.1 ábra B és C része). Ezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az EGF vagy megnövekedett dipólpotenciál által aktivált ErbB2 preferenciálisan a lipiddutajokon kívül található vagy azért, mert az aktiváció is itt történik, vagy azért, mert az esetleg lipiddutajban aktiválódó receptor elhagyja a raftokat.

5.6. Emissziós rációmetrikus festékek alkalmazhatók a dipólpotenciál mérésére

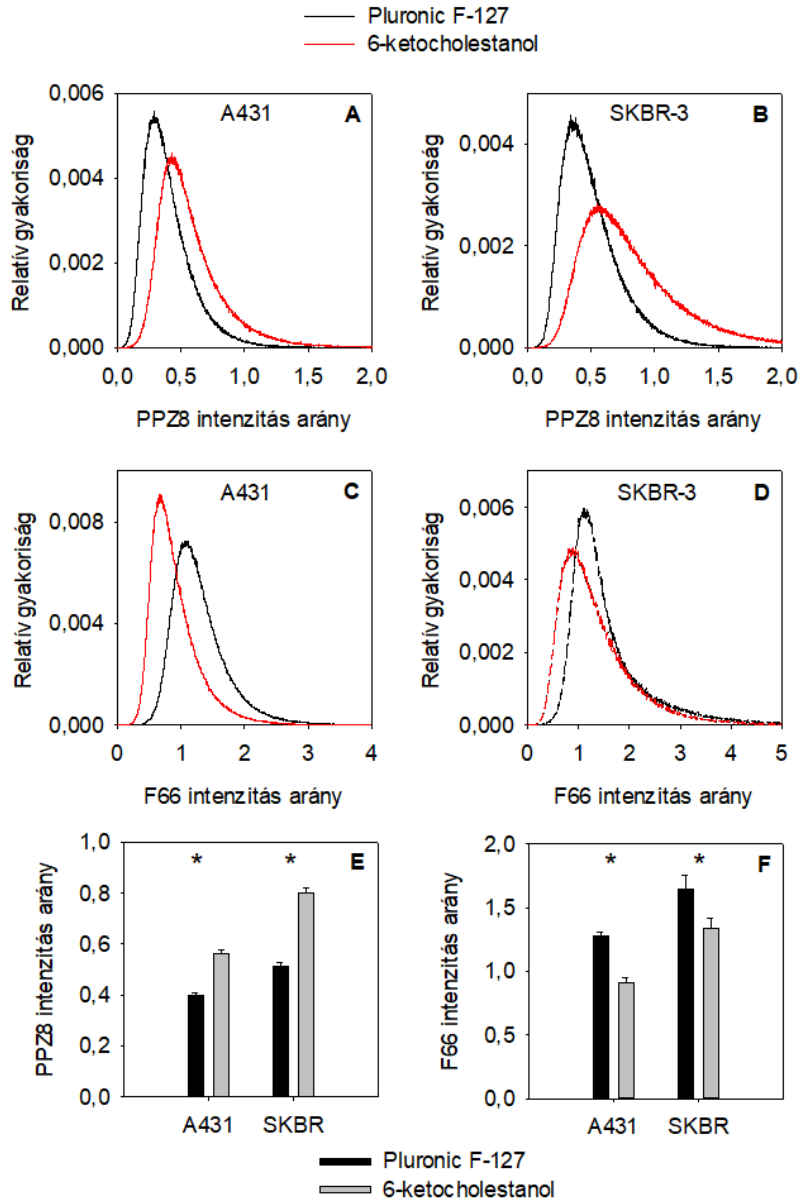
A dipólpotenciál ErbB fehérjékre gyakorolt hatásainak vizsgálata során nyert eredményeink (különös tekintettel az 5.5 fejezetben leírtakra) felvetették, hogy hatásmechanizmusában szerepet játszhat a lipiddutajok jelenléte, vagyis valamilyen kapcsolat lehet a dipólpotenciál és a lipiddutajok között. Bár azt már korábban felvetették, hogy a membránban található raft mikrodoménekben a speciális lipidösszetétel miatt a dipólpotenciál nagysága magasabb lehet, mint a membrán egyéb régióiban, ezt a feltevést még nem igazolták közvetlenül élő sejtekben. Kísérleteink második felében ezért célul tűztük ki, hogy igazoljuk ezt a hipotézist, azaz bebizonyítsuk élő sejtek membránjában, hogy a lipiddutajokban mérhető dipólpotenciál magasabb, mint non-raft régiókban. Ehhez azonban olyan megbízható mérési módszerre volt szükségünk, amellyel egyrészt kimutatható a két régió közötti különbség a dipólpotenciál nagyságát tekintve, másrészt pedig igazolható, hogy a tapasztalt különbséget nem valamilyen egyéb membránbiofizikai paraméter (például membránfluiditás) eltérései okozzák. Mivel a di-8-ANEPPS használata excitációs rációmetrikus technikák alkalmazásával önmagában erre a célra nem alkalmas (hiszen bizonyos körülmények között érzékeny lehet a fluiditás változásaira), egyéb módszerrel kellett kiegészíteni kísérleteinket. A dipólpotenciál változásainak kimutatására használhatóak az újonnan leírt 3-hidroxi-flavon-származékok emissziós rációmetrikus módszerek során a 2.1.6 fejezetben taglaltaknak megfelelően. Az ebbe a csoportba tartozó fluorofórok két tagja, a PPZ8 és az F66 különösen alkalmasak lehetnek erre a célra, ha a két molekulát egymással párhuzamosan alkalmazzuk a mérések során, hiszen membránbeli orientációjuk ellentétes volta miatt spektrális változásaik éppen ellentétesek a membránbeli elektromos erőtér módosulása esetén. Ha azonban valamilyen egyéb paraméter (például fluiditás) változása eredményezi a spektrum eltéréseit, az ugyanabba az irányba hat a két fluorofór esetén. Így amennyiben méréseink során a két vegyület esetén ellentétes változásokat kapunk, lényegében kijelenthetjük, hogy azok háttérben a dipólpotenciál eltérése áll. Kísérletes munkánk második fázisa kezdetén ezért teszteltük, hogy a két feszültség-szenzitív 3-hidroxi-flavon fluorofór, a PPZ8 és az F66 alkalmas-e a dipólpotenciál változásainak kimutatására élő sejtek membránjában. A festékek vizsgálata során A431 és SKBR-3 sejteket kezeltünk a dipólpotenciál nagyságát növelő 6-ketocholestanol vegyülettel, majd a sejtek jelölése után konfokális mikroszkóp segítségével a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó lapos régiójáról készítettünk

felvételeket (5.6.1 ábra). Az emittált fluoreszcencia nagyságát a festékek N* és T* állapotaihoz tartozó emissziós sávoknak megfelelő hullámhossztartományokban mértük és pixelenként meghatároztuk a két intenzitás arányát, amely a dipólpotenciál nagyságára utal.



5.6.1 ábra: A sejtek dipólpotenciál-szenzitív F66 indikátorral történő jelölését mutató reprezentatív képek. A431 sejteket kezeltünk Pluronic F-127-tel, majd jelöltünk F66-tal. A festéket 405 nm hullámhosszú fényel gerjesztettük, majd az emittált intenzitást két hullámhossztartományban, 463 és 527 nm között („kék csatorna”, A), valamint 543 és 589 nm között („zöld csatorna”, B) mértük. Az elemzés során egy emissziós arány képet készítettünk úgy, hogy pixelenként a kék csatornában mért intenzitást elosztottuk a zöld csatorna adott pixelben mért intenzitásával (C). Az arányértékeket csak egy manuálisan rajzolt maszkon belül határoztuk meg, amely a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó lapos régiójának felelt meg (D). A módszer alternatívájaként a kiértékelést elvégeztük a maszkon belül a legfényesebb foltok figyelembe vétele nélkül is (E). Az A részen látható, mindegyik képre érvényes skála 10 μm-nek felel meg.

Várakozásainknak megfelelően a 6-ketocholestanol kezelés szignifikánsan növelte az N*/T* intenzitásarányt PPZ8 esetén, míg F66-nál szignifikánsan csökkentette azt (5.6.2 ábra). 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.



5.6.2 ábra: A dipólpotenciál növekedésének hatása a PPZ8 és az F66 emisszió arányokra. A-D. A431 (A, C) és SKBR-3 (B, D) sejtek egy részét egy dipólpotenciált növelő szterollal, 6-ketocholestanollal kezeltünk, míg a kontroll sejteknél csak Pluronic F-127-et alkalmaztunk. A sejteket a két dipólpotenciál-szenzitív indikátor, PPZ8 és F66 egyikével jelöltük, majd pixelenként meghatároztuk a fluorofórok N* és T* állapotaihoz tartozó két emissziós sávban mért intenzitások arányát. A reprezentatív hisztogramok a számolt arányok pixelenkénti megoszlását mutatják. E-F. 20-30 kontroll (Pluronic F-127-tel kezelt), illetve 6-ketocholestanollal kezelt sejt adataiból számított átlagos intenzitás arányokat ábrázoltunk. A hibavonalak a középértékek közepes hibáit mutatják. A csillagok a kontroll és a 6-ketocholestanollal kezelt minták közötti, háromszempontos variancia analízis (ANOVA) és Tukey-féle HSD teszt elvégzése során kapott szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelzik.

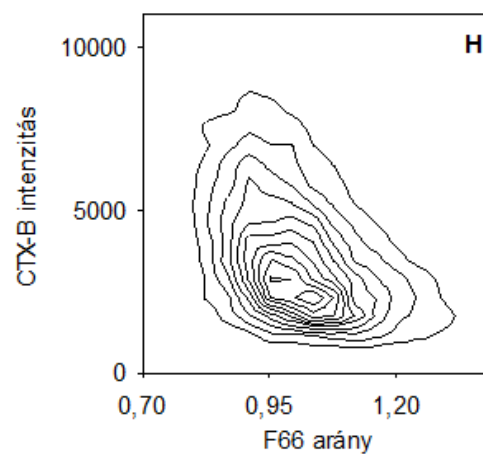
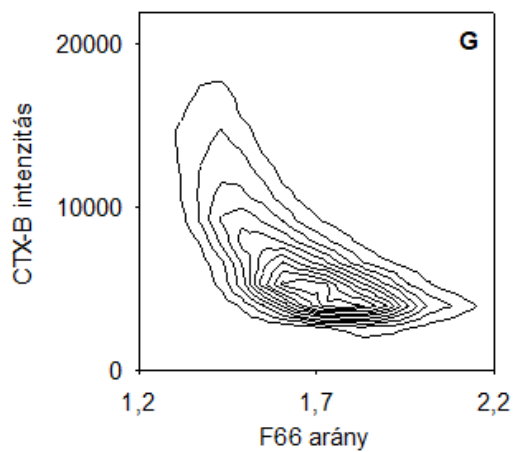
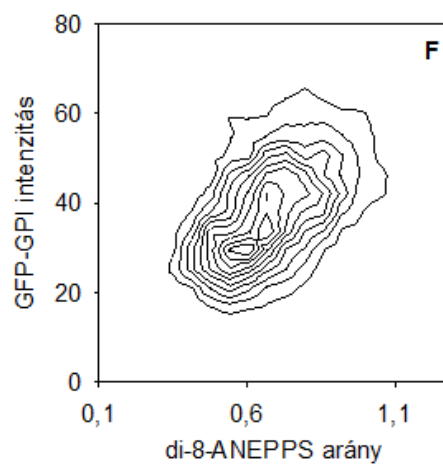
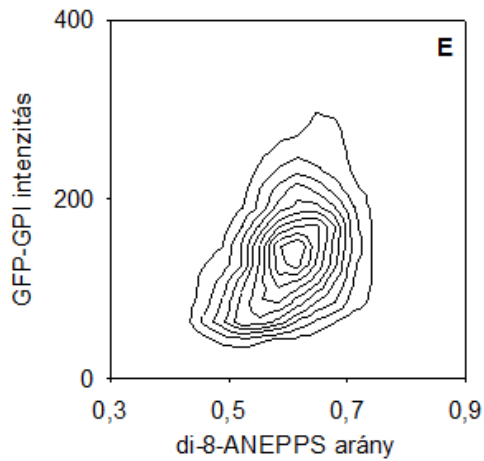
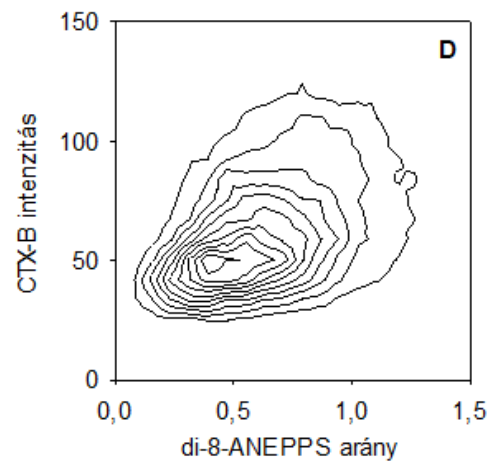
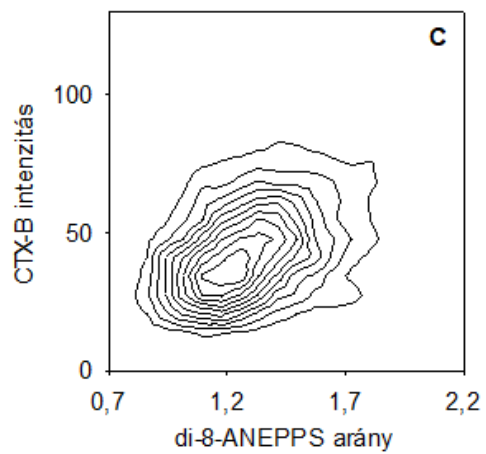
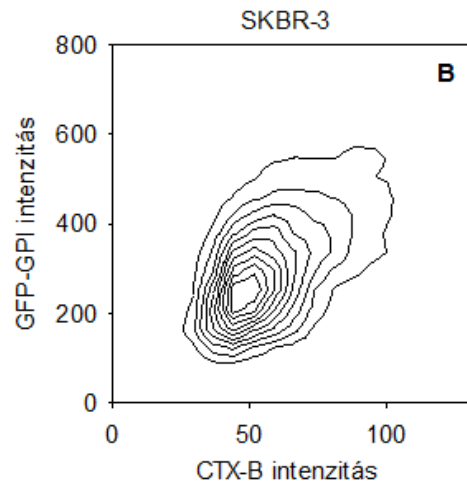
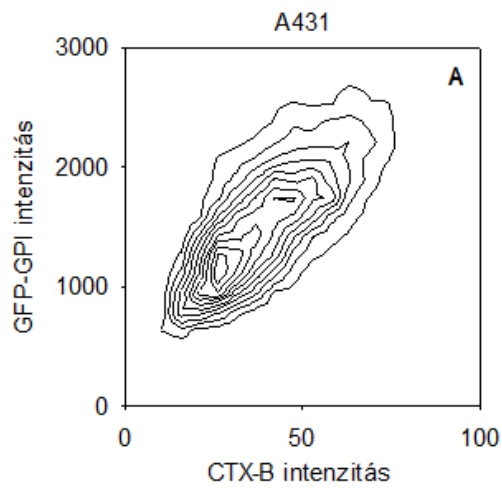
5.7. A dipólpotenciál nagysága korrelál raft és non-raft doménmarkerek megoszlásával

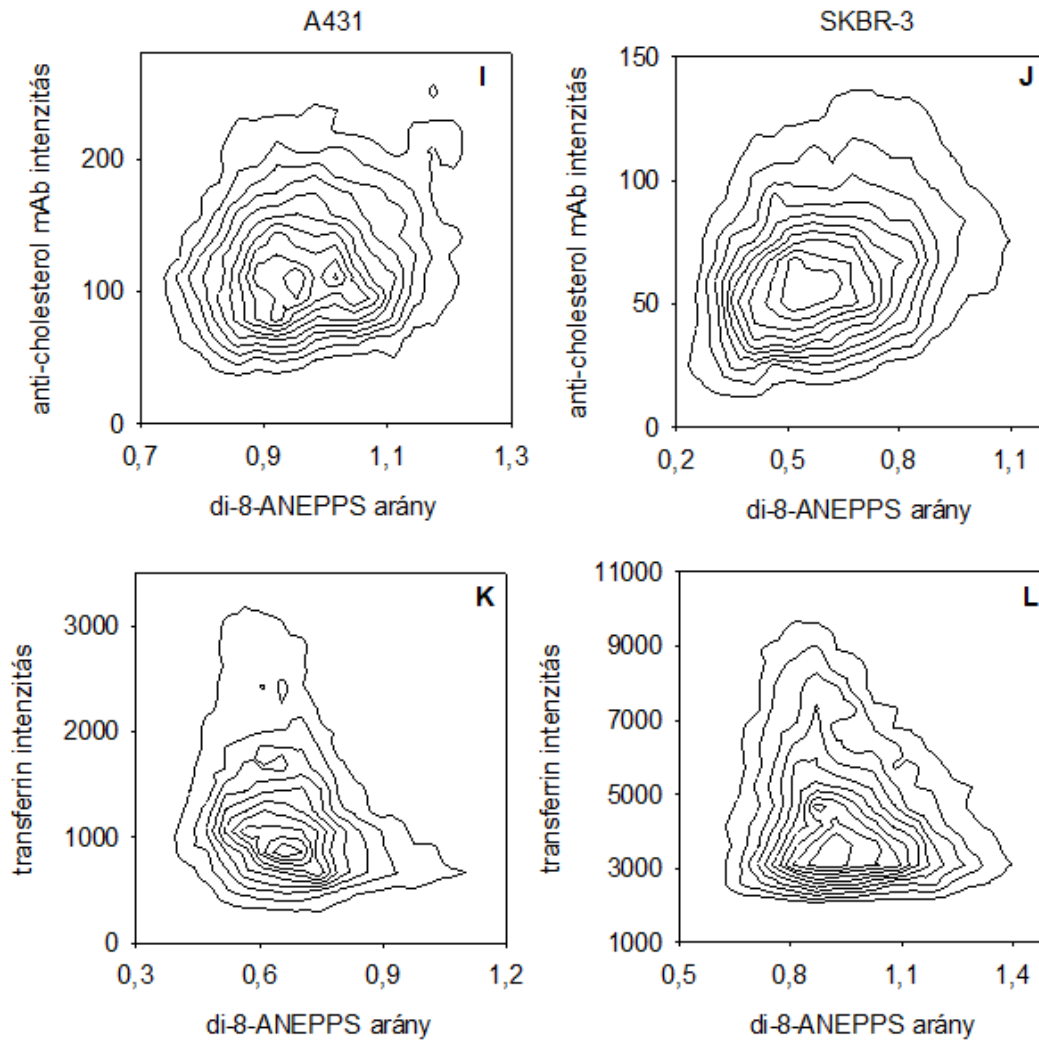
A következőkben azon hipotézisünket kívántuk vizsgálni, amely szerint a lipidtutajok jelentősen eltérő lipidösszetétele azt eredményezheti, hogy ezen raft mikrodoménekben a dipólpotenciál mértéke nagyobb lehet, mint a membrán egyéb régióiban. Ennek eldöntésére élő A431 és SKBR-3 sejtekben a három dipólpotenciál-szenzitív festék, a di-8-ANEPPS, a PPZ8 és az F66 rációmetrikus válasza és a lipidtutaj-markerek intenzitása közötti korrelációt határoztuk meg. Ehhez a feszültségszenzitív fluorofórok intenzitás arányai és néhány általánosan használt raft-marker, a fluoreszcensen jelzett koleratoxin B alegység (CTX-B), a GPI-horgonnyal fuzionáltatott GFP (GFP-GPI) és az anti-koleszterol AC8 antitest intenzitása közötti korrelációs koeficiens 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 koeficiens nagyságát határoztuk meg pozitív kontrollként. Sejteket transzfektáltunk GFP-GPI-t kódoló plazmiddal, majd jelöltünk CTX-B-vel és a sejtek fedőlemezhez tapadó alsó, lapos membránrégiójáról konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk. A két lipidtutaj-marker pixelenkénti intenzitásainak adataiból kiszámítottuk a Pearson-féle korrelációs koeficiens átlagos nagyságát, amely $0,55 \pm 0,04$ -nek adódott A431, míg $0,48 \pm 0,03$ -nek SKBR-3 sejtek esetén (5.7.1 táblázat). Az erős pozitív korrelációt alátámasztotta egyrészt az a tény, hogy a kapott korrelációs koeficiens jelentősen kívül estek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható konfidencia intervallum határain, másrészt pedig a megfelelő individuális pixelintenzitások megoszlását ábrázoló kontúr grafikonok alapján is nyilvánvaló volt a pozitív korreláció megléte. Ezen eredmények bebizonyították, hogy az általunk alkalmazott módszer alkalmas két szignál közötti korreláció vizsgálatára élő sejtekben (5.7.1 ábra A és B része).

	A431				SKBR-3			
	átlag±SEM	Konfidencia intervallum, ha $r=0$		n	átlag ±SEM	Konfidencia intervallum, ha $r=0$		n
CTX-B vs. GFP-GPI	0,55±0,04	-0,01	0,02	18	0,48±0,03	-0,01	0,02	19
CTX-B vs. GFP-GPI (fényes foltok nélkül)	0,29±0,04	-0,03	0,05	10	0,37±0,04	-0,01	0,02	10
di-8-ANEPPS arány vs. CTX-B	0,31±0,03	-0,02	0,03	14	0,32±0,02	-0,01	0,02	18
di-8-ANEPPS arány vs. CTX-B (fényes foltok nélkül)	0,17±0,05	-0,01	0,03	10	0,2±0,04	-0,01	0,03	10
di-8-ANEPPS arány vs. GFP-GPI	0,32±0,03	-0,01	0,01	16	0,32±0,03	-0,02	0,01	15
di-8-ANEPPS arány vs. GFP-GPI (fényes foltok nélkül)	0,18±0,05	-0,01	0,01	18	0,21±0,05	-0,02	0,01	18
di-8-ANEPPS arány vs. AC8 anti-cholesterol mAb	0,16±0,02	-0,02	0,03	10	0,21±0,02	-0,01	0,02	10
di-8-ANEPPS arány vs. transferrin	-0,25±0,02	-0,01	0,03	15	-0,22±0,02	-0,01	0,03	15
F66 arány vs. CTX-B	-0,54±0,02	-0,004	0,02	30	-0,50±0,02	-0,01	0,02	32
F66 arány vs. CTX-B (fényes foltok nélkül)	-0,47±0,03	-0,01	0,02	18	-0,41±0,03	-0,01	0,02	18
PPZ8 arány vs. CTX-B	-0,55±0,02	-0,01	0,01	22	-0,47±0,02	-0,01	0,02	38
PPZ8 arány vs. CTX-B (fényes foltok nélkül)	-0,45±0,05	-0,02	0,02	18	-0,39±0,03	-0,01	0,02	18

5.7.1 táblázat: A dipólpotenciál és a lipidtutaj-markerek közötti korreláció. A431 és SKBR-3 sejteket jelöltünk a táblázat első oszlopában szereplő fluoreszcens markerekkel, majd meghatároztuk a két jel közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens értékét. Az analízist elvégeztük az egész sejt esetén („Sejtmembrán maszk” az 5.6.1 ábrán), valamint a fényes foltok figyelembe vétele nélkül is („Sejtmembrán maszk a legfényesebb foltok nélkül” az 5.6.1 ábrán). Anti-koleszterin antitest, illetve transferrin alkalmazása esetén a sejtekről készült felvételek minősége nem tette lehetővé a fényes foltok nélkül végzett elemzést. A táblázatban az n darab különböző felvétel adataiból számított korrelációs koefficiensnek átlagait (\pm SEM), valamint a korreláció feltételezett hiánya ($r=0$) esetén meghatározott 95%-os konfidencia intervallumok átlagait ábrázoltuk.



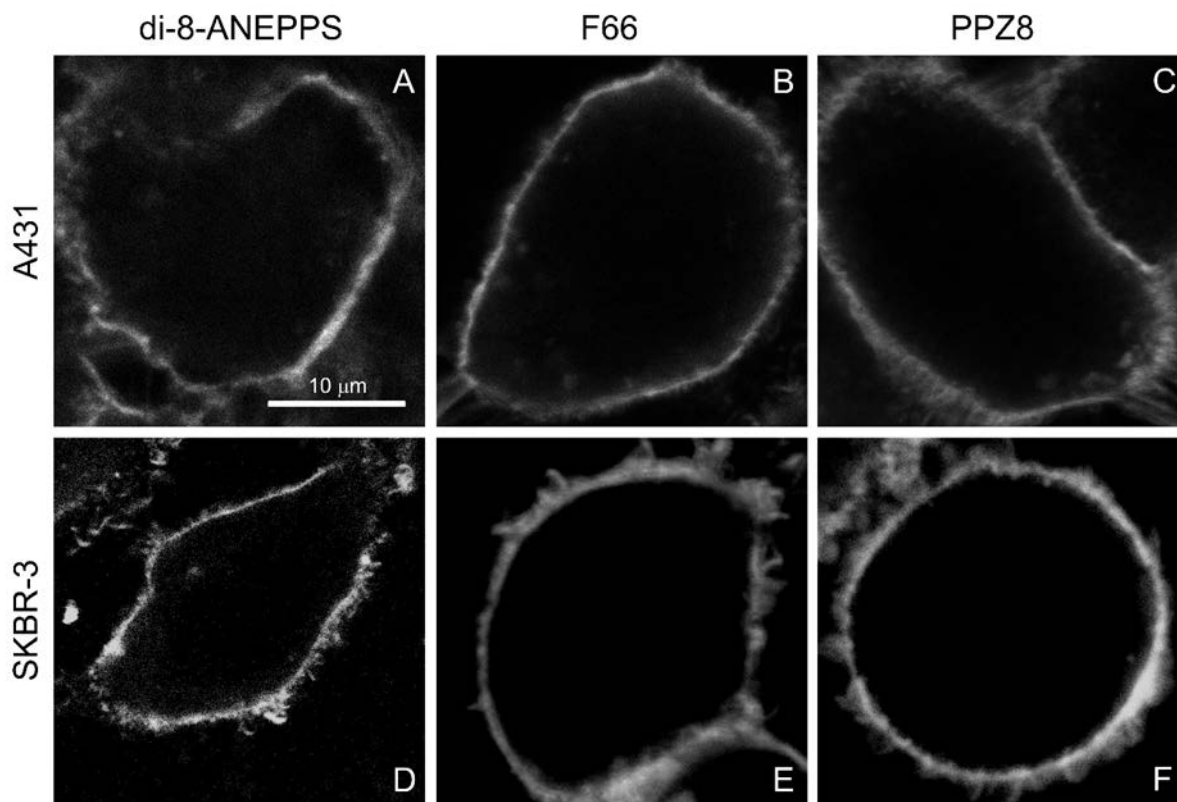


5.7.1 ábra: A dipólpotenciál és a lipidraft-markerek közötti korrelációt jellemző reprezentatív kontúrplotok. A-B. A431 (A) és SKBR-3 (B) sejteket transzfektáltunk GFP-GPI-t kódoló plazmiddal, majd jelöltünk AlexaFluor647-CTX-B-vel két nappal a transzfekció után. A paneleken a két lipidtutaj-marker intenzitása közötti korrelációt ábráztuk. C-L. A431 (C, E, G, I, K) és SKBR-3 (D, F, H, J, L) sejteket jelöltünk di-8-ANEPPS (C-F, I-L) vagy F66 (G, H) indikátorral a dipólpotenciál mérése céljából. Lipidutaj-markerként GFP-GPI-vel történő transzfekciót (E, F), AlexaFluor647-CTX-B-vel (C, D, G, H) vagy anti-koleszterin AC8 monoklonális antitesttel (I, J) történő jelölést használtunk. Utóbbi alternatívájaként a non-raft membrándoméneket AlexaFluor647-transzferrinnel jelöltük (K, L). A grafikonokon a dipólpotenciál szenzitív fluorofór fluoreszcencia intenzitás aránya és a membránmikrodomén-marker intenzitása közötti korrelációt ábráztuk. A kontúrplotokon szereplő adatok kvantitatív kiértékelésének eredményei az 5.7.1 táblázatban találhatóak.

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 lipidutaj-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 (5.7.1 táblázat és 5.7.1 ábra). Ezzel szemben az F66 esetén mért N^*/T^* emissziós arány negatívan korrelált az összes tutajjelölővel (5.7.1 táblázat és 5.7.1 ábra). Anti-koleszterin monoklonális antitest esetén alacsonyabb abszolút értékű korrelációs koefficienseket találtunk, amelynek hátterében valószínűleg a marker alacsonyabb fluoreszcenciaintenzitása és az ebből fakadó gyengébb képminőség állt. 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, azaz a két széles körben és elfogadottan használt raft-marker között. Az F66 intenzitás arány és a GFP-GPI, illetve anti-koleszterol antitest intenzitások közötti korrelációt nem határoztuk meg a festékek közötti spektrális átfedések miatt. Megvizsgáltuk ugyanakkor egy másik dipólpotenciál mérésre alkalmas fluorofór, a PPZ8 intenzitásaránya és a CTX-B tutajjelölő közötti kapcsolatot és negatív korrelációt találtunk (5.7.1 táblázat). Mivel F66 esetén a kromofór ellentétes orientációban található a membrán normáljához képest, mint a di-8-ANEPPS és a PPZ8 esetén, a dipólpotenciál nagysága a di-8-ANEPPS és a PPZ8 intenzitás arányával pozitív, míg az F66 emissziós arányával negatív korrelációt mutat. Ebből az következik, hogy a két ellentétes orientációjú dipólpotenciál-szenzitív fluorofór, a di-8-ANEPPS és az F66 használatával kapott eredményeink azt mutatták, hogy a dipólpotenciál nagysága pozitívan korrelált a raft mikrodomének jelenlétével, míg a PPZ8 segítségével nyert eredmények ellentmondtak ennek a konklúciónak. Ennek magyarázatát a következő fejezetben, illetve a Megbeszélés részben adjuk meg.

Jóllehet a lipidtutajok és a dipólpotenciál közötti korreláció elemzéséhez konfokális mikroszkópos felvételeinket a fedőlemezhez tapadó lapos membránrégióról volt célszerű elkészíteni, ez a módszer magában foglalta annak a veszélyét, hogy a sejtmembránból eredő jelet kontaminálhatta az intracelluláris organelumokból származó fluoreszcencia is. Az internalizált fluoreszcens festékmolekulák mért intenzitásokhoz való esetleges hozzájárulásának becslésére a sejtek középsíkjának megfelelő konfokális szeleteiről is felvételeket készítettünk. Ezek azt mutatták, hogy a dipólpotenciál-szenzitív festékek a kísérletek időtartama alatt a membránban maradtak, így internalizált festékmolekulák nem járultak hozzá érdemben a fedőlemez melletti membránrégióról készített felvételek esetén a mért fluoreszcenciaintenzitásokhoz (5.7.2 ábra).



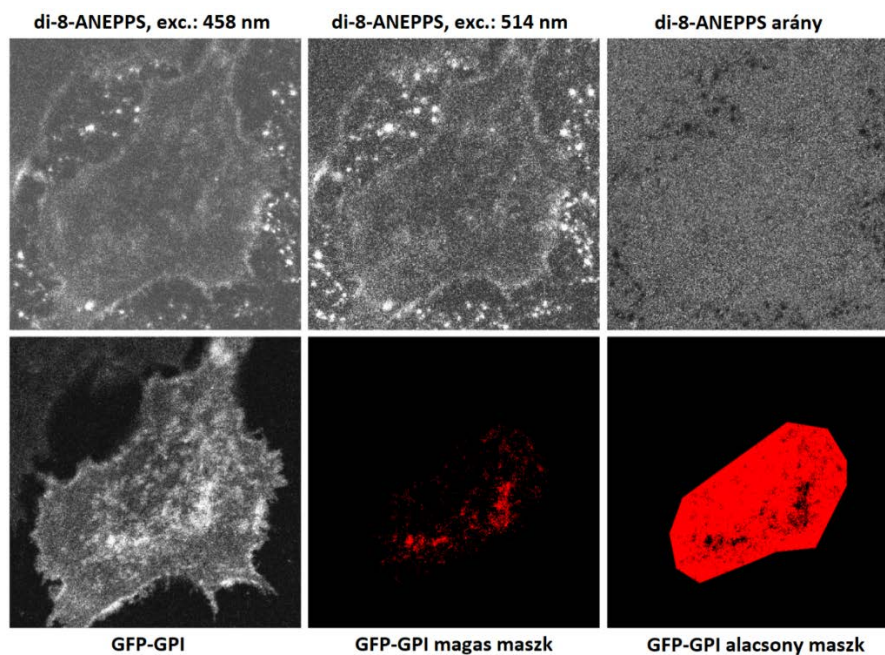
5.7.2 ábra: A dipólpotenciál szenzitív festékek membrán lokalizációja. A431 (A-C) és SKBR-3 (D-F) sejteket jelöltünk di-8-ANEPPS (A, D), F66 (B, E), illetve PPZ8 (C, F) fluorofórokkal, majd a sejtek középsíkjának megfelelő szeletről készítettünk konfokális felvételeket. Az A részen látható, mindegyik képre érvényes skála 10 μm -nek felel meg.

Eredményeink független megerősítése céljából megvizsgáltuk a dipólpotenciál és egy non-raft marker, a transferrin receptor²²² közötti kapcsolatot is. Korábbi méréseink eredményeit megerősítve 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 (5.7.1 táblázat és 5.7.1 ábra).

Mivel attól féltünk, hogy a meghatározott Pearson-féle korrelációs koefficiensek értékeit jelentősen befolyásolta a raftmarkerek fényes foltjainak jelenléte a membránban, a dipólpotenciál és a tutajjelölők közötti korrelációkat kiszámítottuk a fényes foltok figyelembe vétele nélkül is (5.6.1 ábra E része). Az így nyert eredmények szintén megerősítették, hogy a dipólpotenciál mértéke korrelált a lipidtutajok jelenlétével, még akkor is, ha figyelmen kívül hagytuk a raftok nagy klasztereit (5.7.1 táblázat).

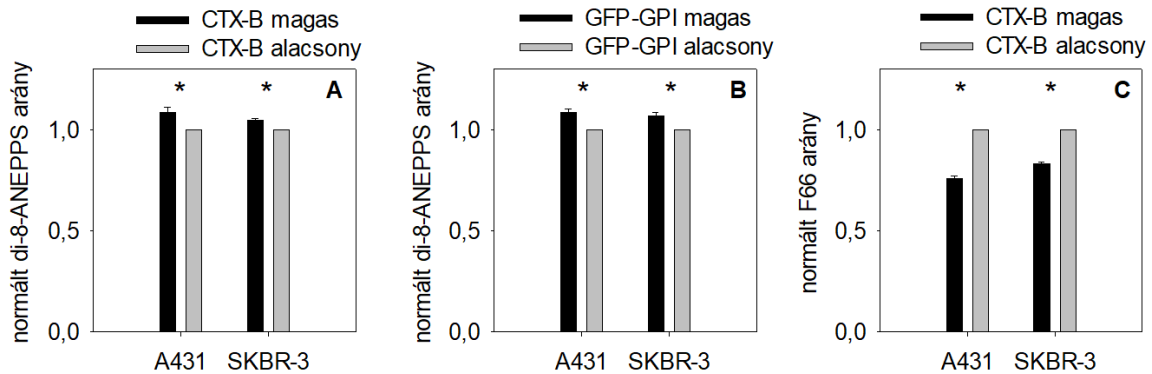
5.8. A dipólpotenciál magasabb a lipidtutajokban, mint az egyéb membránrégiókban

Bár az 5.7 fejezetben ismertetett 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 festéket alkalmaztunk. A sejtek alsó régiójáról készült konfokális felvételeinket raft és non-raft régiókra szegmentáltuk a GFP-GPI, illetve CTX-B intenzitások alapján a 3.17. fejezetben részletesen leírt módon. Az átlagos di-8-ANEPPS, illetve F66 intenzitás arányt 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 (5.8.1 ábra).



5.8.1 ábra: A dipólpotenciál nagyságában a lipidtutajokon belül, illetve kívül megfigyelhető különbségének analízisét bemutató reprezentatív felvételek. SKBR-3 sejteket transzfektáltunk GFP-GPI-vel, majd két nappal a transzfekció után jelöltünk di-8-ANEPPS festékkel. A fluorofórt két különböző hullámhosszon (458 és 514 nm-en) gerjesztettük és az emissziót 584 és 686 nm között mértük. A két gerjesztés esetén kapott intenzitásokat elosztottuk egymással („di-8-ANEPPS arány”). A GFP-GPI fluoreszcenciáját egy harmadik felvételen rögzítettük, amelyet a maxentropy algoritmussal szegmentáltuk. A szegmentációval azonosított magas intenzitású klaszterek és a manuálisan rajzolt sejtmaszk metszetét tekintettük tutajmaszknak („GFP-GPI magas maszk”). A GFP-GPI képeken az alacsony intenzitású területek és a sejtmaszk metszete pedig a non-raft maszkot jelentette („GFP-GPI alacsony maszk”). A di-8-ANEPPS arány átlagos nagyságát külön-külön határoztuk meg a két maszkban.

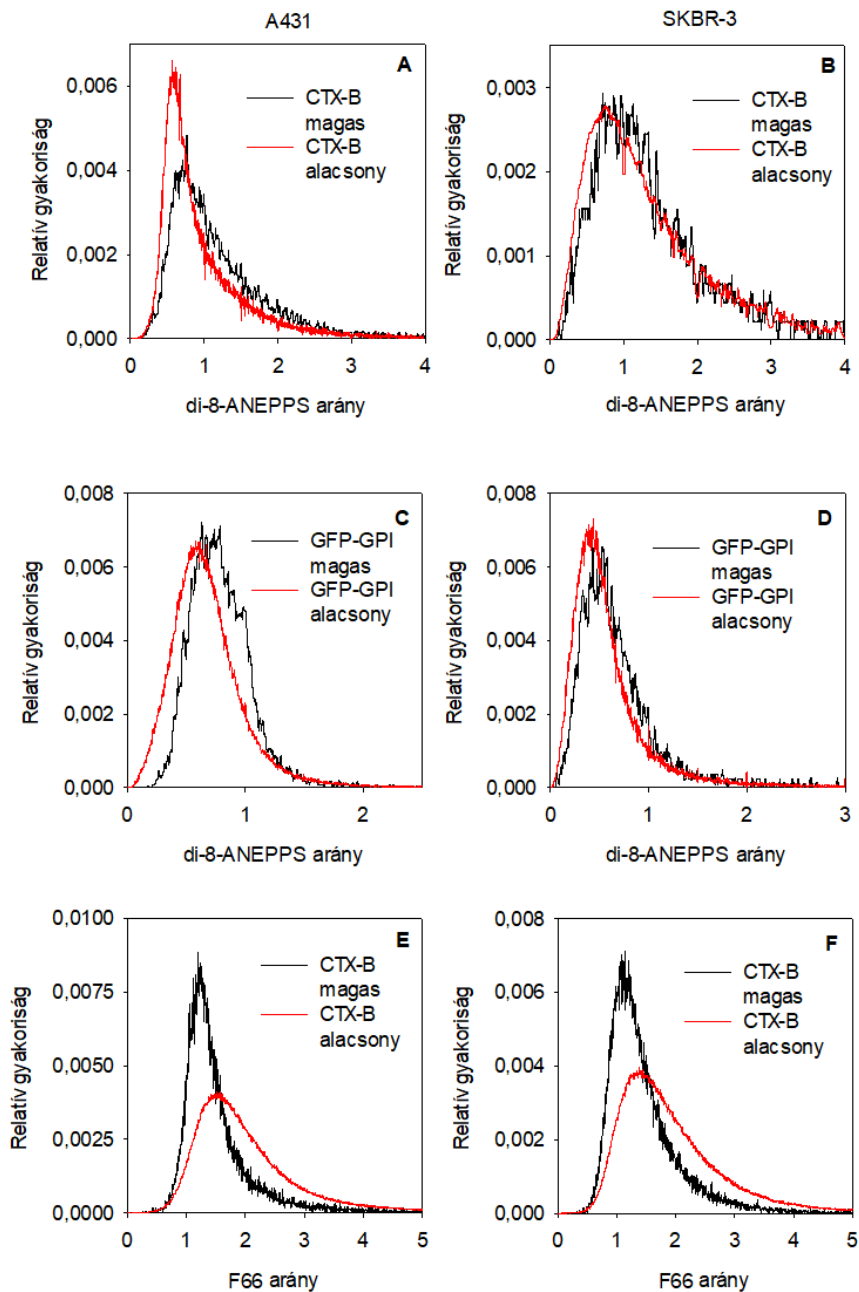
A korábban tapasztaltaknak megfelelően a di-8-ANEPPS excitációs arány szignifikánsan magasabb volt a tutajokban a non-raft régiókhoz képest mind A431, mind SKBR-3 sejtekben, míg az F66 emissziós arány esetén ellentétes különbség volt megfigyelhető, az arány ugyanis szignifikánsan alacsonyabb volt a raftokban, mint az egyéb membránterületeken (5.8.2 ábra). A két dipólpotenciál-szenzitív festék egymáshoz képest ellentétes membránbeli orientációját figyelembe véve ez azt jelentette, hogy a dipólpotenciál nagysága magasabb a tutajokban, mint a membrán non-raft régióiban.



5.8.2 ábra: A dipólpotenciál nagyságának meghatározása a lipidtutajokon belül és kívül.

SKBR-3 és A431 sejteket transzfektáltunk GFP-GPI-vel vagy jelöltünk AlexaFluor647-CTX-B-vel. A dipólpotenciál szenzitív flurofórokkal (A, B – di-8-ANEPPS, C – F66) történő festést két nappal a transzfekeció után vagy a CTX-B-vel való jelöléssel párhuzamosan végeztük. A felvételeket raft („CTX-B magas”, „GFP-GPI magas”) és non-raft („CTX-B alacsony”, „GFP-GPI alacsony”) régiókra szegmentáltuk az 5.8.1 ábrán ismertetett módon és a dipólpotenciál nagyságára jellemző intenzitásarányokat a két maszkban külön-külön határoztuk meg. Minden egyes sejt esetén az intenzitásarányokat normáltuk a nem-tutaj területekre kapott értékekre. A grafikonokon 20-30 sejt adatainak átlagát ábrázoltuk, a hibavonalak a középértékek közepes hibáit mutatják. A csillagok a lipidtutajokon belül és kívül kapott intenzitás arányok közötti, kétszemponos variancia analízis (ANOVA) és Tukey-féle HSD teszt elvégzése során kapott szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelzik.

A tutaj és nem-tutaj területek közötti különbség meglétéről további bizonyítékot szolgáltatottak a dipólpotenciál-szenzitív festékek intenzitásarányainak megoszlási hisztogramjai a raftokon belül, illetve kívül. A di-8-ANEPPS gerjesztési arány ugyanis a magasabb értékek felé tolódott el a „CTX-B magas” és „GFP-GPI magas” doménekben, míg az F66 emissziós arány hisztogramja a „CTX-B magas” területeken az alacsonyabb tartományokban helyezkedett el, mint a non-raft régiók esetén (5.8.3 ábra).



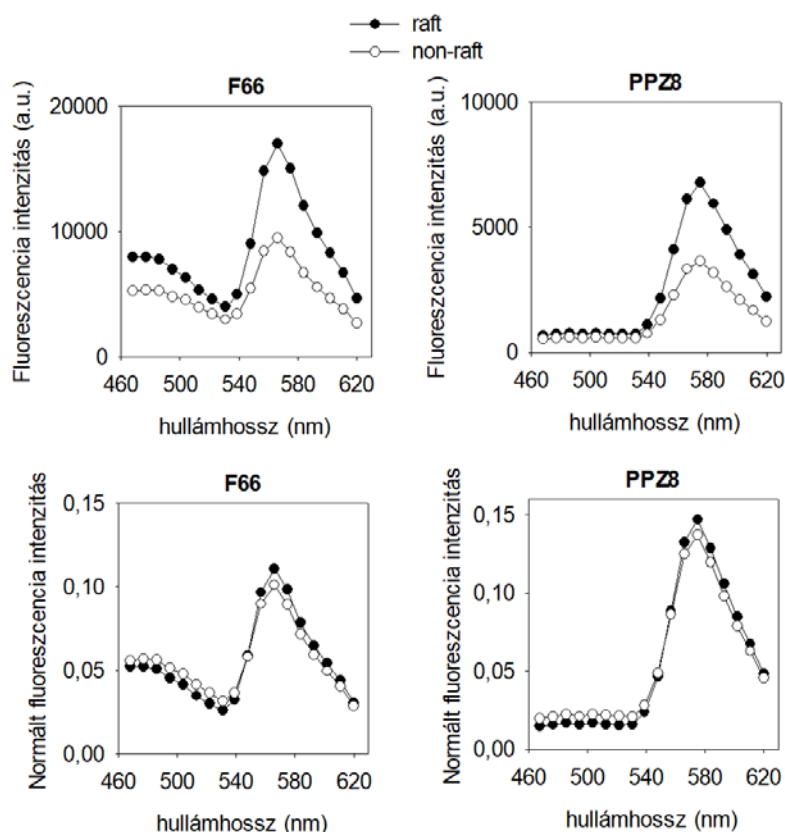
5.8.3 ábra: A dipólpotenciál nagysága a lipidtutajokon belül és kívül. A431 (A, C, E) és SKBR-3 (B, D, F) sejteket jelöltünk dipólpotenciál szenzitív di-8-ANEPPS (A-D) vagy F66 (E, F) festékkel. A lipidtutajokat CTX-B festéssel (A, B, E, F) vagy GFP-GPI transzfekcióval (C, D) jelöltük. A tutajmarkerekből készült felvételeket az 5.8.1 ábrán bemutatott módszerrel raft és non-raft maszkokba szegmentáltuk aszerint, hogy a jelölők intenzitása magas, illetve alacsony volt. A di-8-ANEPPS gerjesztési és az F66 emissziós arányokat a tutajokon belül és kívül külön elemeztük és azok pixelenkénti megoszlását ábrázoltuk a grafikonokon.

Mindezen eredmények megerősítették hipotézisünket, hogy a dipólpotenciál nagysága magasabb a lipidtutaj mikrodoménekben, mint az élő sejtek membránjának egyéb területein.

5.9. 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, hogy becsüljük a spektrális változások mértékét. A sejteket a korábbiakhoz hasonlóan jelöltük, majd konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk a membrán fedőlemezhez tapadó régiójáról. A membránnak megfelelő területeken a 3.17. fejezetben leírtak szerint meghatároztuk az emissziós spektrumot minden egyes egyedi pixelben, majd azokat külön átlagoltuk a raft és a non-raft régióknak megfelelő pixeleken (5.9.1 ábra). A spektrumok között a legnyilvánvalóbb különbség a non-raft területeken megfigyelhető szignifikánsan alacsonyabb intenzitás volt a tutajpixelekhez képest, valószínűleg a raft mikrodoménekben a fluoreszcencia víz indukált kioltásának következtében (részletesebben lásd Megbeszélés fejezet). Emellett fontos különbségnek bizonyult a két fluorofór között, 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 hullámhossztartományban gyakorlatilag nem volt megfigyelhető emissziós csúcs. Ez a jelenség magyarázhatja, hogy miért nem volt képes a PPZ8 megbízhatóan kimutatni a dipólpotenciál különbségét a tutajokon belül, illetve kívül.

Emellett a továbbiakban az N* és T* állapotoknak megfelelő spektrális tartományban az emissziós spektrumok integrálásával meghatároztuk az F66 emissziós arányt a raftokon belül, illetve kívül 6-ketocholestanol kezelés mellett, valamint anélkül (5.9.1 táblázat). A kapott eredmények alapján a 6-ketocholestanol az F66 emissziós arányt hasonló mértékben változtatta meg a tutajokon belül, valamint az egyéb membrán régiókban, amely arra utalt, hogy a vegyület a dipólpotenciált hasonlóan növelte mindkét membrán mikrodoménben.



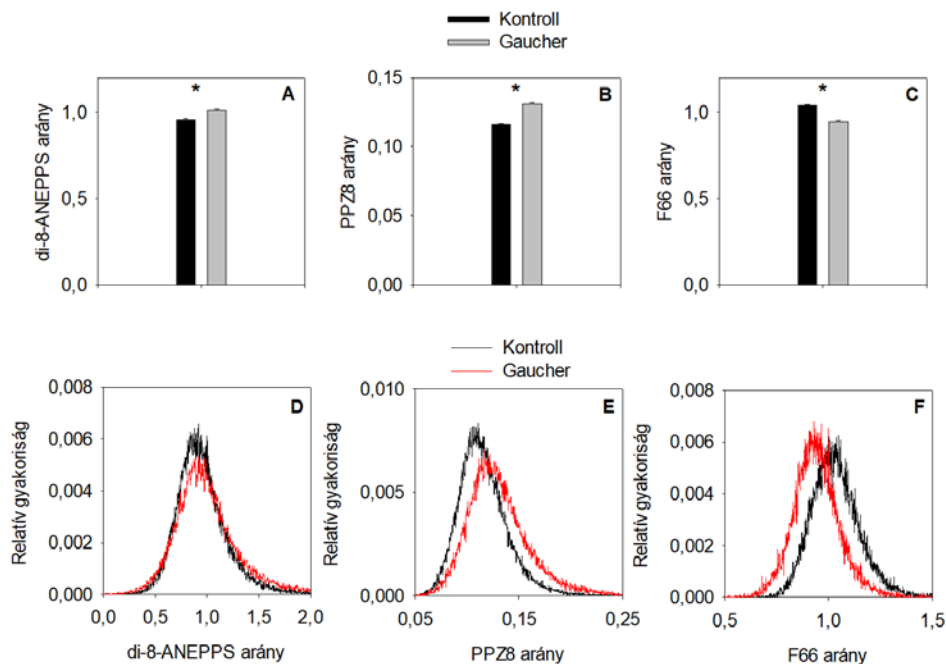
5.9.1 ábra: Az F66 és a PP2B emissziós spektruma a lipidtutajokon belül és kívül. SKBR-3 sejteket jelöltünk F66 vagy PP2B dipólpotenciál-szenzitív fluofórokkal és a lipidtutaj-marker AlexaFluor647-CTX-B-vel. A membránnak megfelelő területeken pixelenként felvettük az emissziós spektrumot. A CTX-B képeken azonosítottuk a lipidraftoknak megfelelő magas intenzitással rendelkező területeket. Az emissziós spektrumokat külön-átlagoltuk a raft és a non-raft régióknak megfelelő pixelekben. Az ábra felső paneljein a normálás nélküli spektrumokat ábrázoltuk. A víz által történő fluoreszcencia kioltás hatásainak kiküszöbölése érdekében a spektrumokat normáltuk a teljes fluoreszcencia emisszió mennyiségére és ezeket a normált görbéket az ábra alsó paneljein ábrázoltuk.

F66 N*/T* emissziós arány		
	raft (CTX-B magas)	non-raft (CTX-B alacsony)
Pluronic F-127	0,54±0,01	0,67±0,02
6-ketocholestanol	0,37±0,02	0,46±0,04

5.9.1 táblázat: A dipólpotenciál nagysága a lipidtutajokban és azokon kívül 6-ketocholestanol jelenlétében, illetve hiányában. SKBR-3 sejteket 6-ketocholestanollal kezeltünk vagy kontroll minták esetén Pluronic F-127 jelenlétében inkubáltunk, majd jelöltünk F66 dipólpotenciál-szenzitív festékekkel és a lipidtutaj-marker AlexaFluor647-CTX-B-vel. A dipólpotenciál nagyságára jellemző F66 emissziós arányt külön-külön kiszámítottuk a CTX-B felvételen a korábbiakban ismertetett módon meghatározott tutaj és nem-tutaj membrán régiókban. A táblázat a mintánként ~10 sejt adataiból számított átlagos intenzitás arányokat (±SEM) tartalmazza.

5.10. 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^{252,253,281}, 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 (5.10.1 ábra).



4.10.1 ábra: A szfingolipid felhalmozódás dipólpotenciálra gyakorolt hatása a Gaucher-kór egyik in vitro modellrendszerében. THP-1 monocitákat differenciáltattunk makrofággá PMA segítségével CBE hiányában (kontroll), illetve jelenlétében (Gaucher), majd jelöltünk a három különböző dipólpotenciál szenzitív festék egyikével (A, D – di-8-ANEPPS, B, E – PPZ8, C, F – F66). Az oszlopdiagramokon (A-C) 20-30 sejt adataiból meghatározott átlagos intenzitás arányokat (\pm SEM) ábrázoltuk. Az ábra D-F részén a pixelenkénti fluoreszcencia arányok megoszlásaira jellemző reprezentatív hisztogramok láthatók. A csillagok a kontroll és Gaucher-fenotípusú sejtek közötti, kétszemponos variancia analízis (ANOVA) és Tukey-féle HSD teszt elvégzése során kapott szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelzik.

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 lipidösszetételben bekövetkező eltérések megváltoztathatják a dipólpotenciál nagyságát az élő sejtek membránjában, amely akár ezen betegségek patomechanizmusában is szerepet játszhat.

6. Megbeszélés

6.1. 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 potenciál a három közül¹⁻⁵. Különböző transzmembrán fehérjék esetén kimutatták, hogy a dipólpotenciál nagysága befolyásolja azok szerkezetét és funkcióját, valószínűleg transzmembrán doménjeik stabilitásának és konformációs változásainak befolyásolásán keresztül^{13-16,20-26}. Sőt, a dipólpotenciál hatását felvetették G-fehérjéhez kapcsolt receptorok esetén is³², receptor tirozin kinázok működésére gyakorolt hatásait azonban ezidáig nem vizsgálták. Ugyanakkor mivel az utóbbi időben felmerült a transzmembrán domén ErbB fehérjék funkciójában játszott jelentős szerepe^{95,156-162}, logikus a feltételezés, mely szerint a dipólpotenciál a TMD-n keresztül befolyásolhatja az ErbB fehérjék működését.

Kísérleteink első részében ezért a dipólpotenciál ErbB fehérjék funkcióira gyakorolt hatásait vizsgáltuk és megmutattuk áramlási citometriás FRET mérések és konfokális mikroszkóp segítségével végzett number&brightness analízis használatával, hogy a dipólpotenciál nagysága szignifikánsan korrelál az ErbB1 és ErbB2 (homo- és hetero)klaszterizációjának mértékével. A hatás szisztematikusan megjelent EGF stimulált sejtekben, míg stimulálatlan sejtekben a dipólpotenciál változtatása nem fejtett ki lényeges hatást az ErbB1 és ErbB2 fehérjékre. Az ErbB receptorok dipólpotenciál-emelkedés hatására bekövetkező megnövekedett növekedési faktor indukált asszociációja jelátviteli aktivációval társult a receptorok foszforiláltsági szintjének meghatározása során, amely egybeesik a jelenleg elfogadott nézetrel, mely szerint a dimerek vagy klaszterek jelentik a receptor jelátvitel szempontjából aktív formáját. Azonban váratlan volt az a megfigyelésünk, hogy a dipólpotenciál emelkedése esetén megfigyelt nagyobb mértékű jelátviteli aktiváció a ligandkötődés csökkenésével társult. Ha figyelembe vesszük a megnövekedett dipólpotenciál esetén megfigyelt csökkent ligand kötődést, az EGF hatás dipólpotenciál által történő felerősítése még nagyobbak adódik, hiszen alacsonyabb mennyiségű kötött ligand eredményezte az ErbB1 és ErbB2 klaszterizáció és foszforiláció jelentősebb növekedését. Ez a látszólagos ellentmondás feloldható, ha feltételezzük, hogy a magasabb dipólpotenciál kedvező a transzmembrán domén dimerek aktív konformációjának kialakulása szempontjából, amely az extra- és intracelluláris domének konformációjának változását indukálhatja. Ez a változás hasonlíthat arra a folyamatra, amelyet a növekedési faktor bekötődése indít el (vagy akár meg is egyezhet vele). Ennek a gondolatmenetnek a fényében magasabb dipólpotenciál esetén alacsonyabb mennyiségű kötött ligand is erőteljesebb jelátviteli aktivációt indukálhat, hiszen mind a növekedési faktor kötődése, mind pedig a dipólpotenciál növekedése olyan konformációváltozásokat indukál, amely a receptorok aktivációjához vezet.

Az EGF kötődési affinitás megfigyelt csökkenése összhangban áll a dipólpotenciál által az extracelluláris doménben okozott konformációváltozásokkal. Azt már korábban kimutatták, hogy az ErbB1 dimerekben a ligandkötő hely zárt szerkezetű^{282,283}. Ebből fakadóan a receptor dimerek ligandfüggetlen, dipólpotenciál által okozott képződése összenyomott ligandkötő zseb és ezáltal csökkent affinitás kialakulását eredményezheti.

A lipidtutajok fontosak lehetnek az EGF által mediált jelátviteli folyamatokban, hiszen mind az ErbB1-ről²⁸⁴, mind pedig az ErbB2-ről^{285,286} kimutatták, hogy a tutajokban található. A raftokról azt feltételezik, hogy kettős szerepet játszanak az ErbB fehérjék klaszterizációjában és jelátvitelében. Egyrészt gátolják a ligand kötődését^{224,226,287}, másrészt viszont potenciózzák a növekedési faktor által kiváltott jelátvitelt²⁸⁴⁻²⁸⁶. Mivel korábbi feltételezések és saját eredményeink szerint a dipólpotenciál nagyobb a lipidtutajokban, mint a membrán egyéb régióiban², ezt a tényezőt is mindenképpen figyelembe kell venni a raftok receptorfunkciókra gyakorolt hatásainak elemzésekor. Ezzel összhangban eredményeink azt mutatták, hogy a dipólpotenciál gátolja a ligand kötődését, ugyanakkor potenciózza az EGF mediált jelátvitelt, amely pontosan tükrözi a lipidtutajok ErbB receptorokra gyakorolt kettős hatását. A dipólpotenciál növelése az ErbB2 aktivációjára nagyobb hatást gyakorolt a tutajokon kívül, míg az 5.9.1 táblázat tanúsága szerint a dipólpotenciál-változás relatív mértéke körülbelül megegyezett a raft és non-raft doménekben. Ennek egyik lehetséges magyarázata az, hogy a tutajokban már 6-ketocholestanol kezelés nélkül is olyan magas a dipólpotenciál értéke, amely a transzmembrán doméneket permisszív, a dimerizációt elősegítő konformációban tartja, így itt a további dipólpotenciál-növekménynek kisebb hatása lesz. Ezzel szemben a tutajokon kívüli alacsony dipólpotenciál nem elég a transzmembrán domének 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 csak permisszív hatást gyakorol, amely nem elég erős ahhoz, hogy a gyenge és tranziens konstitutív dimerekre és oligomerekre érdemi hatást fejtsen ki.
2. Irodalmi adatok alapján azt feltételezik, hogy a konstitutív dimerek és oligomerek azáltal jönnek létre, hogy a citoskeleton összereli, összezárja a receptorokat¹⁴⁴, míg a jelátviteli szempontból aktív receptorklaszterek fehérje-fehérje kölcsönhatások révén jönnek létre^{288,289}. Mivel az valószínűtlen, hogy a dipólpotenciál a citoskeleton általi kialakított átmeneti behatárolódást befolyásolja, hatásait inkább csak a ligandindukált klaszterekre fejtheti ki.

3. A membránt egyszeresen átérő transzmembrán fehérjék TMD-jében elhelyezkedő, jellemzően 20-24 darab aminosav az energetikailag legkedvezőbb speciális α -helikális szerkezetet hozza létre²⁹⁰⁻²⁹², amely meghatározásában a peptidkötések jelentős dipólmomentuma miatt döntő jelentőségűek az atomok által generált elektromos erők közötti elektrosztatikus kölcsönhatások²⁹³. A szerkezeti stabilitás mellett a TMD-kről az is kiderült, hogy elsősorban specifikus dimerizációs motívumaik (és azok aminosavai között kialakuló hidrogénkötések és van der Waals-kölcsönhatások) révén a fehérjék asszociációs folyamataiban és ezáltal azok aktivációjában is fő szerepet játszanak, amint azt kimutatták először a vörösvértetek membránjában található glikoforin A²⁹⁴⁻²⁹⁸, majd az inzulin receptor²⁹⁹, a fibroblaszt növekedési faktor receptorok³⁰⁰⁻³⁰², integrinek³⁰³⁻³⁰⁶, az erythropoietin receptor³⁰⁷⁻³⁰⁹ és egyéb citokin receptorok³¹⁰⁻³¹² esetén is. Bár a klasszikus allosztérikus aktivációs modell nem feltételezte, a TMD asszociációban játszott aktív szerepe ErbB fehérjék esetén is körvonalazódni látszott az ott található mutációk hatásainak, illetve a TMD-k asszociációs tendenciáinak vizsgálata alapján^{95,157,159,313-319}. A jelenség hátterében szintén egy dimerizációs szekvencia, a 2.2.4 fejezetben leírt Sternberg-Gullick GxxxG asszociációs konszenzus szekvencia jelentősége ábrázolódott, az ott található aminosavak között kialakuló kölcsönhatások révén. Amennyiben a motívum kialakításában valamilyen mutáció révén Glu (mint a Neu fehérje esetén), Asp, Gln vagy Asn is részt vesz, az az asszociációs tendencia jelentős fokozódását eredményezi ezen aminosavaknak a membrán alacsony dielektromos állandójú közegében megfigyelhető protonált formájára jellemző megnövekedett hidrogénkötést kialakító képessége miatt, amely a fehérjék túlzott és szabályozatlan asszociációi révén tumoros transzformációt eredményezhet^{136,160,320,321}. A GxxxG motívum (illetve néhány) homológja nemcsak az ErbB receptorokban fordul elő, fehérje adatbázisokban a lehetséges szekvenciák vizsgálata során ugyanis erősen felülreprezentáltak bizonyult^{303,322,323}.

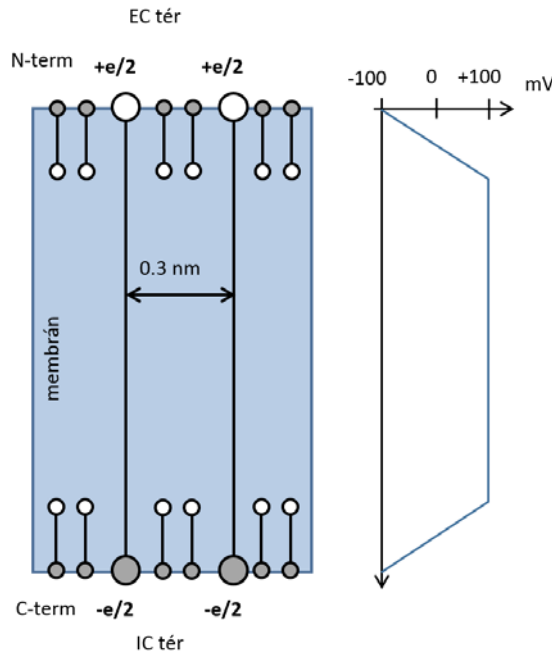
Az ErbB fehérjék TMD-jének szekvenciájában (az ErbB3 kivételével) két darab GxxxG motívum található, az egyik a domén N-, a másik a C-terminális közelében. A két motívum dimerizációban játszott szerepét alátámasztotta, hogy szekvenciájának módosítása az asszociációk csökkenéséhez vezetett. A két motívum által mediált két különböző kapcsolódás eredményeképpen két eltérő konformációjú dimer jöhet létre, amelyek relatíve könnyen, energetikailag kedvezőtlen intermedier állapot nélkül egy 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. Ezek alapján a receptorok esetén a monomer, inaktív és aktív dimer állapotok között egyensúlyi állapot lehet, amelyet fiziológiásan nyugalmi állapotban az első két

forma dominál. Aktiváció (például ligand kötődése) esetén az egyensúly eltolódik az aktív dimerek irányába, amely a receptor alegységek intracelluláris doménjeinek aktiválódásához vezet. Ez a folyamat nemcsak azonos alegységek, hanem különböző ErbB monomerek között is lejátszódhat, heterodimerek kialakulását eredményezve. Ez az ErbB aktiváció újabb, rotációs aktivációs modellje. A család tagjai onkogén szerepének magyarázata az lehet, hogy például a Neu esetén a TMD-ben levő pontmutáció eredményeképpen a Glu aminosav eltolhatja az előbbi formák közötti egyensúlyi állapotot, míg a vad típusú fehérje túlexpressziója esetén (például génamplifikáció révén) az aktív dimerek abszolút száma nő meg az egyensúly eltolódása nélkül^{158,161,165,168,324-326}.

Kísérletes eredményeink szervesen illeszkedhetnek ebbe a rotációs aktivációs elméletbe. A dipólpotenciál fehérjeasszociációkra gyakorolt hatásainak háttérében ugyanis az állhat, hogy a membránt egyszeresen átérő transzmembrán fehérjékben található parallel α -hélixek taszító elektrosztatikus erőt fejtenek ki egymásra³²⁷. Az α -hélixben található dipól tulajdonságú peptidegységek úgy rendeződnek ugyanis a térben, hogy általában dipólmomentumuk a hélix hossz tengelyének irányába mutat. Ezáltal ezen szerkezeti elemek lényegében egy makrodipólt alakítanak ki, amelyben a hélix N-terminális része a pozitív, a C-terminális része pedig a negatív pólusnak tekinthető. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a negatív töltéssel rendelkező aminosavak inkább a hélix N-, míg a negatívak inkább a C-terminálisának közelében dúsulnak³²⁸⁻³³¹. Mivel a hélixekben a peptidkötések dipólmomentuma $\approx 3,5$ debye nagyságú és a momentumok a hélix hossz tengelyének irányába mutatnak, a teljes hélix dipólmomentuma $n \cdot 3,5$ debye lehet. Ezek alapján minden aminosavra $3,5$ debye = $0,5 e^- \cdot 1,5 \text{ \AA}$ dipólmomentum jut és ha figyelembe vesszük, hogy az egyes aminosavakhoz tartozó hélixemelkedés $\approx 1,5 \text{ \AA}$, akkor azt mondhatjuk, hogy minden töltés kioltódik, kivétel, amelyek a hélix terminusain található. Így bár ezzel kapcsolatosan felmerültek ellentmondások, a hélix ésszerűen közelíthető egy olyan makrodipóllal, amelyben egy fél egységnyi pozitív ponttöltést helyezünk a hélix N-terminális, míg ugyanekkora negatív ponttöltést a C-terminális végére^{327,332-335}.

Eredményeink magyarázatára a fentieknek megfelelően egy szemikvantitatív modellt alkottunk (6.1.1 ábra), amely alapján a membrán dipólpotenciáljának nagysága összemérhető a hélix terminusok közötti taszítást eredményező elektromos potenciálkülönbség mértékével. A membrán dipólpotenciáljának növelése jobban 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 dipólpotenciálhoz képest ellentétes orientációban elhelyezkedő C-terminális dimerizációs motívumokra. Mivel a dimerizációs motívumokról kimutatták, hogy kölcsönhatásuk specifikus, a dipólpotenciál csak a kölcsönhatások erősségét befolyásolhatja.

Az, hogy a dipólpotenciál jelentősebb hatást fejt ki a NeuT fehérjére, mint a vad típusú ErbB2-re egybecseng ezzel a gondolatmenettel, hiszen a mutánsban található Val → Glu mutáció az aktív dimereket stabilizáló N-terminális dimerizációs motívumok közötti kölcsönhatás számára kedvező.



6.1.1 ábra: A membrán dipólpotenciáljának kölcsönhatása a transzmembrán domének eredő dipóljával. A transzmembrán α -hélixek eredő dipólja közelíthető a hélix N- és C-terminusaira helyezett fél egységnyi elemi töltésekkel. A membrán dipólpotenciálja a membrán felszínének közelében elhelyezkedő dipólok rendezett orientációjából ered. Mivel a dipólpotenciál pozitív a membrán belsejében, az ábrán szürke gömbökkel jelzett negatív töltéseknek kell lenniük a membrán felszínén, míg az ábrán fehér gömbökkel jelölt pozitív töltések mélyebben a membrán belsejében helyezkednek el. A membrán dipólpotenciáljának nagysága és profilja megegyezik a Flewelling által leírtakkal⁴⁷. A lipidek feji régiójára jellemző dielektromos állandó (ϵ_r , relatív permittivitás) értékét 10-nek becsültük³³⁶. Ezen körülmények között az N-terminálnál elhelyezkedő pozitív fél egységnyi töltés által generált elektromos potenciál különbség a másik transzmembrán domén helyének nagyjából megfelelő $r=0,3$ nm-es távolságban

$$U = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{0.5e}{r} = 8.9 \cdot 10^8 \frac{0.5 \cdot 1.6 \cdot 10^{-19}}{0.3 \cdot 10^{-9}} = 237 \text{ mV} \quad (5.1.1).$$

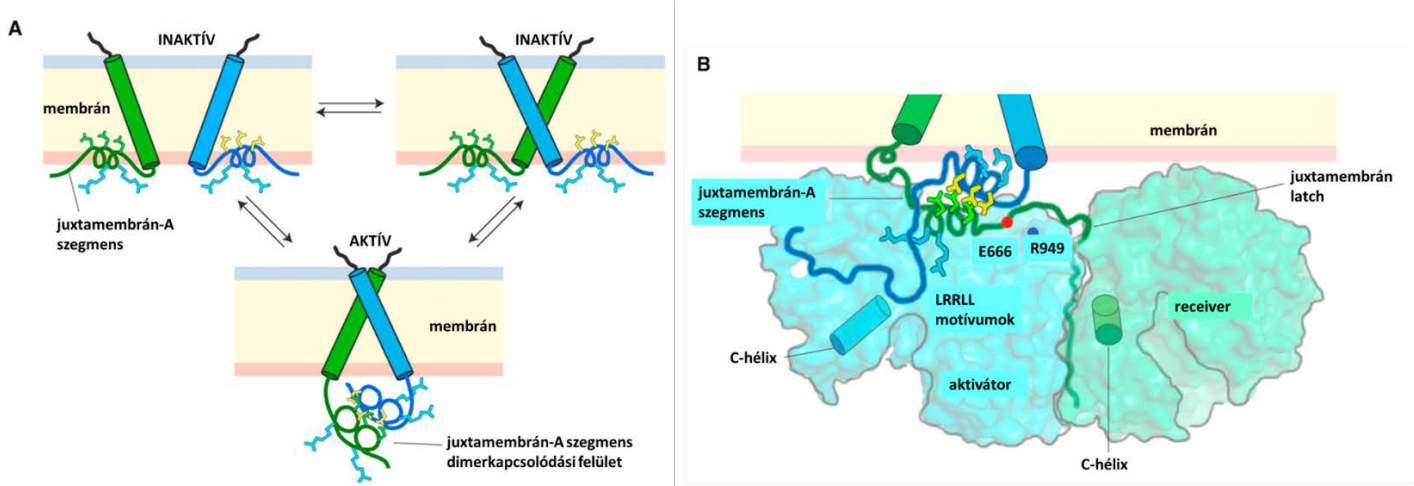
Bár a számítás leegyszerűsített, látható, hogy a potenciálkülönbség nagyságrendileg hasonló a membrán dipólpotenciáljának nagyságához. Mivel az N-terminálison a dipólpotenciál előjele ellentétes ehhez a potenciálkülönbséghez képest, ellensúlyozhatja az α -hélixek közötti taszító hatást. Ezzel szemben az α -hélixek dipólmomentumai által keltett elektromos tér és a dipólpotenciál felerősítik egymás hatását a C-terminusnál.

Ennek eredményeképpen a dipólpotenciál a transzmembrán domének közötti elektromos taszítást ellensúlyozhatja az N-terminusnál, elősegítve az N-terminális dimerizációs motívumok által stabilizált aktív dimerek képződését, míg nincs ilyen hatása a C-terminális dimerizációs motívumok által stabilizált inaktív dimerek kialakulására.

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 terminusairól azt is kimutatták, hogy a vizes fázis felé történő expozíciójuk az ún. „szolvens screening” jelensége miatt a dipólmomentumaik csökkenéséhez és ezáltal a közöttük megfigyelhető tasztítás csökkenéséhez vezet^{335,337}. Ennek következményeképpen, amennyiben a dipólpotenciál növekedése a membrán vastagság csökkenésével jár együtt, a TMD-k közötti alacsonyabb mértékű tasztítás kedvező lenne a receptorklaszterizáció számára, amely szintén magyarázhatná eredményeinket. Ennek azonban ellentmondanak azon vizsgálatok, amelyek során kimutatták, hogy sem a phloretin, sem pedig a 6-ketocholestanol nem befolyásolja érdemben a membránvastagságot, vagyis eredményeink ezen magyarázata valószínűtlen^{40,42}.
5. A rotációs aktivációs elmélettel összhangban kimutatták az ErbB fehérjék juxtamembrán doménjének (JMD) szerepét a homo-, illetve heterodimerizáció, illetve a következményes aktiváció folyamatában. Az ErbB fehérjékben a kináz domének aktivációjához szükséges, hogy azok egy megfelelő szerkezetű aszimmetrikus dimert képezzenek^{149,150}. Az utóbbi időben felvetették egyrészt, hogy az ErbB receptorok JMD-jében található pozitív töltésű lizin és arginin aminosavak és a sejtmembrán belső rétegében elhelyezkedő negatív töltésű lipidek (például foszfatidilszerin, illetve foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát) között elektrosztatikus kölcsönhatás alakulhat ki, amely a JMD membránhoz horgonyzódását eredményezheti^{338,339}; másrészt, hogy a JMD nélkülözhetetlen a kináz domén aktivációjához, hiszen JMD-t nem tartalmazó vagy a régióban mutációt hordozó EGFR fehérjék foszforilációs aktivitása drámaian lecsökkent, valamint röntgen krisztallográfiás vizsgálatok alapján aktív formában a „receiver” receptor monomer JMD-jének C-terminális része (JM-B szegmens) kiterjedt kapcsolatot alakít ki az „activator” kináz doménjének C-terminálisával^{340,341}. Az aktív aszimmetrikus kináz dimer kialakításához és stabilizációjához szükséges a receptor monomerek JMD régiójában a TMD dimerhez csatoltan az N-terminális, α -helikális szerkezetet kialakító részek (JM-A szegmens) közötti antiparallel orientációjú dimer kapcsolódás létrejötte, amely biztosítja a kináz domének egymáshoz képest megfelelő orientációját^{166,167,342}. Ezzel összhangban kimutatták, hogy a kináz domén inaktivitását eredményezi, amennyiben ez a domén a membránhoz horgonyzódik, ekkor ugyanis a JM-A régiók dimerizálódása nem jön létre, így nem alakulhat ki az intracelluláris domének aszimmetrikus dimerje. A membránhorgonyzás hátterében a JM-A szegmensben és a kináz doménben található pozitívan töltött aminosavak és a sejtmembrán

belső rétegében található negatívan töltött lipidek közötti kölcsönhatás áll, amely egyben a JM-A antiparallel dimer kialakulását, vagyis a receptor aktiválódását is lehetetlenné teszi. A JMD ErbB fehérjék esetén is szoros szerkezeti és funkcionális kapcsolatban állhat a TMD-nel. Amennyiben ugyanis (például ligand kötődés esetén) a monomerek kölcsönhatásával vagy a preformált inaktív dimerek konformációváltozásával kialakul a TMD-k között az N-terminális GxxxG motívum által mediált asszociáció, az a dimerben a transzmembrán hélixek C-terminális végeinek egymástól való eltávolodását és a JM-A szegmensek membránnal való kapcsolódásának szétválasztását eredményezi, amely által lehetővé válik a JM-A antiparallel dimerek és végső soron az aktív, aszimmetrikus kináz domének kialakulása. Az extracelluláris domén 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 pedig felszabadítja a gátlás alól a TMD-eket, lehetővé téve az aktív TMD dimer, ezáltal a kináz aktiváció létrejöttét (6.1.2 ábra) ^{165,168}.



6.1.2 ábra: Az ErbB fehérjék TMD és JMD régióinak szerepe a kináz domének aktivációjában (az ábra a ¹⁶⁸ referenciából származik). A. Monomer és a TMD-k C-terminális GxxxG motívumai közötti kölcsönhatások által stabilizált inaktív dimer formában a JMD-k pozitív töltésű aminosavai a membrán belső rétegében található negatívan töltött lipidekkel hoznak létre elektrosztatikus kölcsönhatást, amely gátolja a JM-A régiók közötti antiparallel dimer kialakulását. Amennyiben a TMD-k N-terminális dimerizációs motívumain keresztül képződik a dimer, létrejöhet a JM-A régiók asszociációja. B. A JM-A szegmensek antiparallel kapcsolódása az aktív aszimmetrikus kináz dimer formációját eredményezi^{165,168}. A dipólpotenciál növekedése az aktív forma kialakulását segítheti, egyrészt a TMD-k N-terminális GxxxG motívumai közötti kölcsönhatás elősegítése révén (6.2.1 ábra), másrészt azért, hogy a dipólpotenciál pozitívításának növekedése a JM-A szegmensben található pozitív aminosavak taszításának fokozódását, így a gátló konformáció stabilitásának csökkenését eredményezi.

A dipólpotenciál jelentősen befolyásolhatja ezt a folyamatot, egyrészt mivel a korábban leírtaknak megfelelően elősegítheti a TMD-ek N-terminális dimerizációs motívumainak

kölcsönhatását. Másrészt viszont közvetlen módon a JMD-ek konformációját is módosíthatja. A dipólpotenciál pozitivitása ugyanis taszíthatja a JM-A szegmensben található pozitív aminosavakat, ezáltal a 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. Mivel a lipidekkel való kölcsönhatások befolyásolják az ErbB fehérjék konformációját, a dipólpotenciál változásai, illetve az ennek következtében a lipid-fehérje kölcsönhatásokban bekövetkező eltérések megváltoztathatják az ErbB receptorok raft és non-raft membrándomének közötti megoszlását. Az eddigi vizsgálatok többsége azt találta, hogy a lipidtutajok gátolják az ErbB1 ligandkötését és az általa kiváltott jelátviteli folyamatokat és az ErbB1 aktivációjával párhuzamosan a receptor kijuthat a raftokból^{226,343}, bár ennek ellentmondó elméletek is születtek²⁸⁴. Az általunk kapott eredmények alapján az ErbB2 EGF általi aktivációja preferenciálisan a lipidtutaj doméneken kívül történik és a dipólpotenciál növelése ezt a jelenséget utánozza. Ezek alapján pedig a receptorok dipólpotenciál által indukált redisztribúciója szintén növelheti azok asszociációját és serkenetheti azok jelátviteli folyamatait.

A fentebb leírt mechanizmus(ok) hatására az ErbB fehérjék monomerjeinek dimerizációs hajlama megnő a dipólpotenciált növelő 6-ketocholestanol kezelés hatására. Ezáltal több monomer lesz képes homo- és heterodimerek létrehozására növekedési faktor stimuláció esetén. Emiatt az ErbB1-ErbB2 heterodimerek EGF indukált képződése nem vezet az ErbB1 és ErbB2 homoasszociációinak csökkenéséhez, mivel a dimerek a megnövekedett dimerizációs hajlammal rendelkező monomerekből alakulnak ki.

A dipólpotenciálnak jelentősége lehet akár a tumorok kialakulásában és kezelésében is. A tumoros sejtekre jellemző a koleszterinben gazdag lipidtutajok megnövekedett sűrűsége³⁴⁴. Mivel a dipólpotenciál nagyobb a raftokban, mint a membrán egyéb régióiban², ez hozzájárulhat a receptor tirozin kinázok aktivációjához a tumorsejtekben. Ezzel összhangban kimutatták, hogy a 2-hidroxilált telítetlen zsírsavak csökkentik a dipólpotenciál nagyságát, amelynek kedvező hatása volt tumorok és gyulladásos betegségek kezelése során³⁴⁵. Ez pedig magában foglalja annak a lehetőségét, hogy a dipólpotenciál csökkentése a jelátviteli folyamatok gyengítésén keresztül akár terápiás szempontból is hasznosítható lehet.

Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy kísérleteink alapján a dipólpotenciál szignifikáns hatást gyakorol az ErbB fehérjék ligandkötésére, klaszterizációjára és jelátviteli folyamataira. Azt

gondoljuk, hogy a dipólpotenciál elsősorban a TMD-n keresztüli receptordimerizációt befolyásolja. A megnövekedett dipólpotenciál által indukált dimerizáció egy TMD által kiváltott receptoraktivációt eredményez, ez pedig a csökkent növekedési faktor iránti affinitás mellett megnövekedett jelátviteli aktivitáshoz vezet, amelyet az extracelluláris domének és a TMD-ben található, aktív dimereket stabilizáló dimerizációs motívumok közötti kölcsönhatások által stabilizált dimerek mediálnak, összhangban az ErbB fehérjék aktivációját leíró rotációs aktivációs modellel¹⁵⁸. Megfigyeléseink azt hangsúlyozzák, hogy a dipólpotenciál hatásait nem szabad figyelmen kívül hagyni olyan esetekben, amelyekben a membránkörnyezet receptor klaszterizációjára gyakorolt hatásait elemzik.

6.2. A dipólpotenciál és a lipidtutajok kapcsolata

Jóllehet a dipólpotenciál nagyon erős elektromos erőteret hoz létre a sejtmembránban, hatásait jórészt elhanyagolják, illetve figyelmen kívül hagyják, mivel élő sejtekben történő mérése rendkívül nehéz. Mivel kimutatták, hogy a koleszterin, a membrán tömörsége, valamint a lipidek rendezettsége mind befolyásolja a dipólpotenciált, 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 felvetettek élő sejtekben is, ezt a korrelációt még soha nem bizonyították direkt és kvantitatív módon élő sejtek membránja esetén^{2,5,45}. 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 lipidösszetételében 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 erőter érzékeny festékek (di-8-ANEPPS és F66) dipólpotenciál-szenzitív intenzitásarányai közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens kvantitatív meghatározása segítségével kimutattuk, hogy a dipólpotenciál pozitívan korrelált a raftok jelenlétével (5.7.1 táblázat). A dipólpotenciál lipidtutajokon belül és kívül tapasztalható nagysága közötti eltéréseket független módon megerősítették azon kísérleteink, amelyek során a non-raft doméneket jelöltük fluoreszcensen jelölt transzferrin segítségével és azt találtuk, hogy a dipólpotenciál szignifikánsan gyengébb a transzferrinnel jelölt nem-tutaj régiókban, mint a raftokban. Ezen eredményeink szignifikanciáját két módon is meghatároztuk. A metodikai vagy technikai szignifikanciát megerősítette az a tény, hogy a korrelációs koefficiens mindig a korreláció feltételezett hiánya esetén számított 95%-os konfidencia intervallumon 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 tutajjelölők és a dipólpotenciál közötti korrelációs koefficiens értéke összemérhető volt a pozitív kontroll, vagyis a két raft marker esetén tapasztaltakkal, leszűrhető a következtetés, hogy a megfigyelt korrelációk erősek és biológiai szempontból is relevánsnak tekinthetők.

A dipólpotenciál-szenzitív fluorofórok intenzitásarányainak a lipidtutajokon belüli, illetve kívüli részekben 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 jelenti⁶⁸, az excitációs arány ~7%-os különbsége, amelyet a lipidtutajok és az azokon kívüli membránrégiók

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 egy megbízhatóbb festék, az F66 használatával meghatároztuk a dipólpotenciál mértékét, illetve annak 6-ketocholestanol kezelésre történő változását a raftokon belül, illetve kívül (5.9.1 táblázat). 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 mikrodoméneken és az egyéb membrán régiókban. Korábbi méréseink alapján a 6-ketocholestanol alkalmazása a di-8-ANEPPS gerjesztési arány ~25%-os növekedését eredményezte (5.1.1 ábra), amely a Zhang által leírt kalibráció⁶⁸ 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 intenzitás arány ~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 két fenti becslésünk által meghatározott értékek elfogadható mértékű egyezést mutatnak.

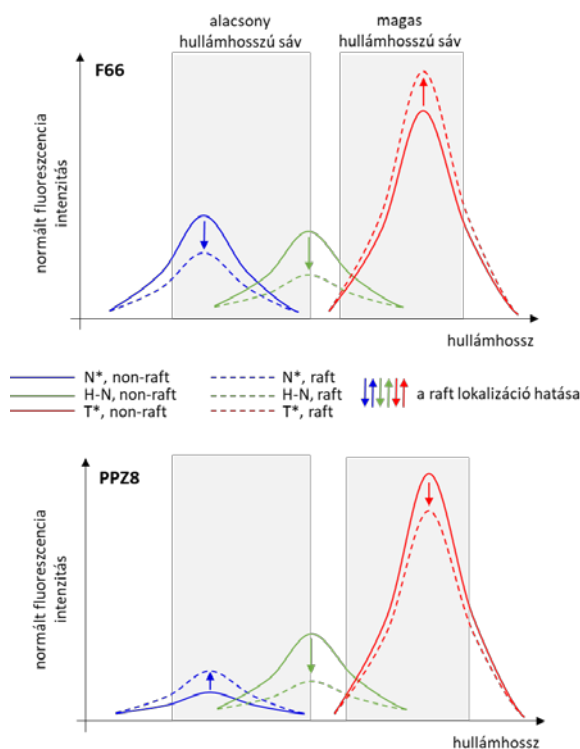
Jóllehet az általunk alkalmazott mérések és kiértékelési algoritmusok során a lipidtutajok és a dipólpotenciál közötti kapcsolatot erősítette a membránban található nagy kiterjedésű, tutajszerű domének jelenléte, a korreláció akkor is mutatkozott, amikor ezen aggregált foltokat figyelmen kívül hagytuk számításaink során. Ha a nagy, tutajszerű foltokat nem vettük figyelembe, a dipólpotenciál és a raft lokalizáció közötti korrelációs koefficiensek nagysága az aggregált lipidtutajok elemzésbe történő bevonása esetén számított értékek ~50-80%-ának feleltek meg. Bár a raftok definíció szerint apró, tranziens és dinamikus entitások¹⁸⁴, a sejtek aktivációja során a tutajok aggregációja következhet be¹⁸⁵. Ezek alapján biológiai szempontból relevánsak lehetnek a dipólpotenciál és a lipidraftok közötti korrelációk értékei akkor is, ha a számítások során a nagy, aggregált doméneket figyelembe vesszük és akkor is, ha az elemzést azok nélkül végezzük.

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 festékkel nyert eredmények a többi fluorofórral kapott adatokkal jelentős ellentmondást mutattak (5.7.1 táblázat). Ezen ellentmondás magyarázatához figyelembe kell vennünk a 3-hidroxiflavon festékek, vagyis az F66 és a PPZ8 fotofizikai paramétereit³⁴⁶. Ezek a fluorofórok kétféle különböző alapállapotban fordulnak elő: 1) egy hidrogén-kötött (hidrált, H-N); és 2) egy nem-hidrogén-kötött alakban. Utóbbi forma egy

ún. gerjesztett állapotú intramolekuláris proton transzfer (ESIPT: excited state proton transfer) 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 vízmolekulák milyen mélységbe tudnak penetrálni a membránban és ott az indikátorral hidrogén-kötéseket létesíteni; 2) a membrán hidrációja mindhárom molekuláris forma fluoreszcenciájának kioltását eredményezheti³⁴⁷. Az F66 esetén a dipólpotenciál növekedése a T^* forma emissziójának relatív növekedéséhez vezet az N^* kárára (6.2.1 ábra). 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 (5.9.1 ábra). A folyékony rendezett doménekben a membrán hidrációjának alacsonyabb voltát alátámasztották Laurdannel végzett mérések is³⁴⁸. 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 hullámhossz tartományban, 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 háttérintenzitás levonásakor a korrekció mértékének meghatározását és így a specifikus fluoreszcencia intenzitás becslését; 2) másrészt a lipidtutajokban a magasabb dipólpotenciál és az alacsonyabb membránhidráció 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 által 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. Mivel a fenti modell csak szemikvantitatív magyarázatot nyújtott a megfigyelt eredményeinkre, megpróbáltuk a spektrum komponensekre bontását egy Klymchenko által leírt illesztési eljárással³⁴⁹, valamint szinguláris érték dekompozíciós (SVD, singular value decomposition)³⁵⁰ módszerrel is, egyik sem volt

azonban képes feloldani az N*, T* és H-N formák individuális spektrumait, valószínűleg mert a mikroszkóppal felvett emissziós spektrumok nem tartalmaztak elég adatpontot az analízisekhez.



6.2.1 ábra: A 3-hidroxi-flavon festékek emissziós sajátosságainak a lipidtutajokban bekövetkező változásai. A 3-hidroxi-flavon festékek emissziója a molekulák három különböző állapotából ered. Az N* és T* formák átalakulnak egymásba egy gerjesztett állapotú intramolekuláris proton transzfer (ESIPT) reakció során és ezek aránya érzékeny a dipólpotenciál mértékére. A harmadik, H-N állapot a festék hidrogén-kötött formája. F66 esetén az N* állapot relatív frakciója csökken a dipólpotenciál növekedése esetén, míg a PPZ8-nál fordított változások történnek a fluorofór ellentétes membránbeli orientációja miatt. A lipidtutajok nemcsak megnövekedett dipólpotenciállal, hanem kompaktabb lipidszerkezettel is rendelkeznek, amely a membrán csökkent hidrációjához és ennek következtében a H-N forma emisszióhoz történő alacsonyabb relatív hozzájárulásához és általában véve mindhárom állapot esetén alacsonyabb mértékű fluoreszcencia kioltáshoz vezet. A víz általi kioltás hatásait nem ábrázoltuk a grafikonon, mivel a spektrumokat a festékek teljes emissziójára normáltuk. Az alacsonyabb hullámhosszú tartományban mért emisszióhoz hozzájárul mind a N*, mind pedig a H-N forma. Ha feltételezzük, hogy a dipólpotenciál mértéke nagyobb a lipidtutajokban, mint a membrán egyéb régióiban, akkor a N* és H-N formák emissziója F66 esetén ugyanolyan irányban, míg PPZ8-nál ellentétesen változik. Emiatt PPZ8 esetén az emissziós arány, vagyis az alacsonyabb hullámhossztartományban mért emisszió intenzitása osztva a magasabb hullámhossztartományban kapott értékkel, nem mutatja megbízható módon a raft és non-raft membrán régiók közötti különbségeket.

A dipólpotenciálról kimutatták, hogy nagysága biológiai jelenségek széles körét befolyásolja, mivel az általa keltett nagyon erős elektromos erőter különböző membrán fehérjék konformációját és klaszterizációját módosíthatja^{10,14,20,23,26,29}. A dipólpotenciál nagyságrendjét általában a 200-500 mV tartományba teszik a különböző módszerekkel végzett vizsgálatok^{3,47}. 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 transzmembrán transzport, a jelátvitel és a membrán trafficking folyamatait, illetve az azokban tapasztalható különbségeket aszerint, hogy azok a 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^{252,253,281} a kialakuló szfingolipid eltérések következtében létrejövő dipólpotenciál-emelkedés nagyságrendje hasonlóan bizonyult, mint a lipidtutajok és az egyéb membránrégiók dipólpotenciálja között talált különbség mértéke (5.8.2 és 5.10.1 ábrák). 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 egérmodellben találtak^{252,281,351}, a kapott eredmények arra utaltak, hogy az általánosságban humán betegségekben, illetve különös tekintettel a Gaucher-kórban a sejtmembrán lipidtartalmában megfigyelhető patológiás változások a dipólpotenciál nagyságának szignifikáns eltéréseit eredményezhetik. Ezek pedig a membránfehérjék funkcióinak jelentős módosításai révén hozzájárulhatnak a betegségekben megfigyelhető tünetek kifejlődéséhez is.

Kísérleteink második fázisának eredményeit összegezve elmondhatjuk, hogy kimutattuk, hogy a dipólpotenciál mértéke szignifikánsan nagyobb a lipidtutaj mikrodoménekben a membrán egyéb régióihoz képest. A különbség nagysága elég lehet ahhoz, a fehérjék transzmembrán doménjeinek konformációját megváltoztassa, amikor azok a tutajokba kerülnek, illetve elhagyják azokat. Ennek következtében a lipidtutajok jelenlétéhez köthető biológiai hatások létrejöttéhez hozzájárulhat a raft mikrodoménekben megfigyelhető emelkedett dipólpotenciál is.

7. Összefoglalás

A membránpotenciál legkevésbé ismert komponense, a dipólpotenciál a membránt alkotó lipidek karbonil csoportjainak és a membránhoz asszociálódó vízmolekulák dipólmomentumainak rendezett orientációja révén alakul ki. A dipólpotenciál az egyéb membránpotenciáloknál jóval erősebb elektromos erőteret generál, amely révén befolyásolja számos fehérje transzmembrán doménjének (TMD) feszültségfüggő konformációváltozásait. Bár az ErbB receptorok (ErbB1-4) aktivációja az intermolekuláris kölcsönhatások által mediált oligomerizáción keresztül történik, a TMD szerepe nem ismert a folyamatban. Bár a dipólpotenciál megváltoztathatja a transzmembrán peptidek konformációját, ErbB fehérjékre gyakorolt hatása azonban még ismeretlen.

Kísérleteink során áramlási citometriás Förster rezonancia energia transzfer (FRET) mérések és konfokális mikroszkópos felvételeken végzett number and brightness (N&B) analízis segítségével kimutattuk, hogy a dipólpotenciál növekedése felerősíti az ErbB1 és ErbB2 receptorok közötti homo- és heteroasszociációk epidermális növekedési faktor (EGF) hatására bekövetkező növekedését. Ezen hatások még jelentősebbeknek bizonyultak a TMD-ben egy aktiváló Val → Glu mutációt hordozó ErbB2 (NeuT) esetén. Az receptorok jelátviteli kapacitása korrelált a dipólpotenciál nagyságával. Mivel a dipólpotenciál növekedése csökkentette az EGF ErbB1 iránti affinitását, a növekedési faktor felerősített hatásai csökkent receptortelítettség mellett következtek be. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a megnövekedett dipól potenciál által indukált dimerizáció a TMD-n keresztül a receptor aktivációjához vezet az extracelluláris domének 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 lipidösszetételében bizonyos betegségek esetén bekövetkező eltérések a dipólpotenciál jelentős megváltozását eredményezhetik.

8. Summary

A largely unknown component of the membrane potential, the dipole potential, is generated by the ordered orientation of lipid carbonyl and membrane-attached water dipole moments. The dipole potential, generating an electric field much stronger than any other type of membrane potential, influences a wide array of phenomena including voltage-dependent conformational changes of the transmembrane domains (TMD) of proteins. Although activation of ErbB receptors (ErbB1-4) is driven by oligomerization mediated by intermolecular interactions, the TMD has been largely neglected in this regard. The dipole potential alters the conformation of transmembrane peptides, but its effect on ErbB proteins was unknown.

In our experiments, we showed using flow cytometric Förster resonance energy transfer (FRET) and number and brightness (N&B) analysis in confocal microscopy that the epidermal growth factor (EGF)-induced increase in the homoassociation of ErbB1 and ErbB2 and their heteroassociation are augmented by increasing the dipole potential. These effects were even more pronounced for ErbB2 harboring an activating Val → Glu mutation in the transmembrane domain (NeuT). The signaling capacity of ErbB1 and ErbB2 was also correlated with the dipole potential. Since the dipole potential decreased the affinity of EGF to ErbB1, the augmented growth factor-induced effects at an elevated dipole potential were actually induced at lower receptor occupancy. We concluded that dimerization induced by an elevated dipole potential will bring about TMD-driven receptor activation leading to increased signaling mediated by dimers stabilized by interactions among the extracellular domains and the TMDs. The dipole potential may play a permissive role in the clustering of ErbB receptors, and the effects of lipid rafts on receptor tyrosine kinases can be partially attributed to the dipole potential.

Theoretical considerations and indirect experimental evidence obtained in model membranes suggested that the dipole potential is larger in liquid-ordered domains believed to correspond to lipid rafts in cell membranes. Using three different dipole potential-sensitive fluorophores and four different labeling approaches of raft and non-raft domains we showed by quantitative confocal image analysis that the dipole potential is indeed stronger in lipid rafts than in the rest of the membrane. The magnitude of this difference seemed to be large enough so that the conformation of the TMD is altered when proteins move into or out of lipid rafts. The magnitude of this difference was similar to that observed between the dipole potential in control and sphingolipid-enriched cells characteristic of Gaucher's disease, pointing to a potential pathophysiological role for these findings. Our results established that the heterogeneity of the dipole potential in living cell membranes was correlated with lipid rafts and implied that alterations in the lipid composition of the cell membrane in human diseases can lead to substantial changes in the dipole potential.

9. Irodalomjegyzék

- 1 O'Shea, P. Intermolecular interactions with/within cell membranes and the trinity of membrane potentials: kinetics and imaging. *Biochemical Society transactions* **31**, 990-996, doi:10.1042/ (2003).
- 2 O'Shea, P. Physical landscapes in biological membranes: physico-chemical terrains for spatio-temporal control of biomolecular interactions and behaviour. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **363**, 575-588, doi:10.1098/rsta.2004.1509 (2005).
- 3 Brockman, H. Dipole potential of lipid membranes. *Chemistry and physics of lipids* **73**, 57-79 (1994).
- 4 Wang, L. Measurements and implications of the membrane dipole potential. *Annual review of biochemistry* **81**, 615-635, doi:10.1146/annurev-biochem-070110-123033 (2012).
- 5 Richens, J. L., Lane, J. S., Bramble, J. P. & O'Shea, P. The electrical interplay between proteins and lipids in membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1848**, 1828-1836, doi:10.1016/j.bbamem.2015.03.017 (2015).
- 6 Demchenko, A. P. & Yesylevskyy, S. O. Nanoscopic description of biomembrane electrostatics: results of molecular dynamics simulations and fluorescence probing. *Chemistry and physics of lipids* **160**, 63-84, doi:10.1016/j.chemphyslip.2009.05.002 (2009).
- 7 Duggan, J. *et al.* Functional imaging of microdomains in cell membranes. *European biophysics journal : EBJ* **37**, 1279-1289, doi:10.1007/s00249-008-0349-1 (2008).
- 8 Liberman, E. A. & Topaly, V. P. [Permeability of bimolecular phospholipid membranes for fat-soluble ions]. *Biofizika* **14**, 452-461 (1969).
- 9 Lauger, P. & Stark, G. Kinetics of carrier-mediated ion transport across lipid bilayer membranes. *Biochimica et biophysica acta* **211**, 458-466 (1970).
- 10 Andersen, O. S. & Fuchs, M. Potential energy barriers to ion transport within lipid bilayers. Studies with tetraphenylborate. *Biophysical journal* **15**, 795-830, doi:10.1016/S0006-3495(75)85856-5 (1975).
- 11 Seoh, S. A. & Busath, D. Gramicidin tryptophans mediate formamidineum-induced channel stabilization. *Biophysical journal* **68**, 2271-2279, doi:10.1016/S0006-3495(95)80409-1 (1995).
- 12 Girshman, J., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., 2nd & Andersen, O. S. Gramicidin channels in phospholipid bilayers with unsaturated acyl chains. *Biophysical journal* **73**, 1310-1319, doi:10.1016/S0006-3495(97)78164-5 (1997).
- 13 Rokitskaya, T. I., Antonenko, Y. N. & Kotova, E. A. Effect of the dipole potential of a bilayer lipid membrane on gramicidin channel dissociation kinetics. *Biophysical journal* **73**, 850-854, doi:10.1016/S0006-3495(97)78117-7 (1997).
- 14 Rokitskaya, T. I., Kotova, E. A. & Antonenko, Y. N. Membrane dipole potential modulates proton conductance through gramicidin channel: movement of negative ionic defects inside the channel. *Biophysical journal* **82**, 865-873, doi:10.1016/S0006-3495(02)75448-9 (2002).
- 15 Ostroumova, O. S., Efimova, S. S., Mikhailova, E. V. & Schagina, L. V. The interaction of dipole modifiers with amphotericin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition. *European biophysics journal : EBJ* **43**, 207-215, doi:10.1007/s00249-014-0946-0 (2014).
- 16 Ostroumova, O. S., Efimova, S. S. & Schagina, L. V. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. *PloS one* **7**, e30261, doi:10.1371/journal.pone.0030261 (2012).

- 17 Zhang, J., Loew, L. M. & Davidson, R. M. Faster voltage-dependent activation of Na⁺ channels in growth cones versus somata of neuroblastoma N1E-115 cells. *Biophysical journal* **71**, 2501-2508, doi:10.1016/S0006-3495(96)79443-2 (1996).
- 18 Bedlack, R. S., Jr., Wei, M. D., Fox, S. H., Gross, E. & Loew, L. M. Distinct electric potentials in soma and neurite membranes. *Neuron* **13**, 1187-1193 (1994).
- 19 Park, J. B., Kim, H. J., Ryu, P. D. & Moczydlowski, E. Effect of phosphatidylserine on unitary conductance and Ba²⁺ block of the BK Ca²⁺-activated K⁺ channel: re-examination of the surface charge hypothesis. *The Journal of general physiology* **121**, 375-397, doi:10.1085/jgp.200208746 (2003).
- 20 Pearlstein, R. A., Dickson, C. J. & Hornak, V. Contributions of the membrane dipole potential to the function of voltage-gated cation channels and modulation by small molecule potentiators. *Biochimica et biophysica acta* **1859**, 177-194, doi:10.1016/j.bbamem.2016.11.005 (2017).
- 21 Klodos, I., Fedosova, N. U. & Plesner, L. Influence of intramembrane electric charge on Na,K-ATPase. *The Journal of biological chemistry* **270**, 4244-4254 (1995).
- 22 Ganea, C. *et al.* Hofmeister effects of anions on the kinetics of partial reactions of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophysical journal* **77**, 267-281, doi:10.1016/S0006-3495(99)76888-8 (1999).
- 23 Starke-Peterkovic, T., Turner, N., Else, P. L. & Clarke, R. J. Electric field strength of membrane lipids from vertebrate species: membrane lipid composition and Na⁺-K⁺-ATPase molecular activity. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **288**, R663-670, doi:10.1152/ajpregu.00434.2004 (2005).
- 24 Clarke, R. J. Dipole-Potential-Mediated Effects on Ion Pump Kinetics. *Biophysical journal* **109**, 1513-1520, doi:10.1016/j.bpj.2015.08.022 (2015).
- 25 Luker, G. D. *et al.* MDR1 P-glycoprotein reduces influx of substrates without affecting membrane potential. *The Journal of biological chemistry* **276**, 49053-49060, doi:10.1074/jbc.M105192200 (2001).
- 26 Davis, S. *et al.* alpha-Tocopherols modify the membrane dipole potential leading to modulation of ligand binding by P-glycoprotein. *Journal of lipid research* **56**, 1543-1550, doi:10.1194/jlr.M059519 (2015).
- 27 Cladera, J. & O'Shea, P. Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide. *Biophysical journal* **74**, 2434-2442, doi:10.1016/S0006-3495(98)77951-2 (1998).
- 28 Cladera, J., Martin, I., Ruyschaert, J. M. & O'Shea, P. Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the simian immunodeficiency virus with membranes. Role of the membrane dipole potential. *The Journal of biological chemistry* **274**, 29951-29959 (1999).
- 29 Asawakarn, T., Cladera, J. & O'Shea, P. Effects of the membrane dipole potential on the interaction of saquinavir with phospholipid membranes and plasma membrane receptors of Caco-2 cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 38457-38463, doi:10.1074/jbc.M103269200 (2001).
- 30 Zhan, H. & Lazaridis, T. Influence of the membrane dipole potential on peptide binding to lipid bilayers. *Biophysical chemistry* **161**, 1-7, doi:10.1016/j.bpc.2011.10.002 (2012).
- 31 Hertel, C. *et al.* Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9412-9416 (1997).
- 32 Singh, P., Haldar, S. & Chattopadhyay, A. Differential effect of sterols on dipole potential in hippocampal membranes: implications for receptor function. *Biochimica et biophysica acta* **1828**, 917-923, doi:10.1016/j.bbamem.2012.11.022 (2013).

- 33 Starke-Peterkovic, T. & Clarke, R. J. Effect of headgroup on the dipole potential of phospholipid vesicles. *European biophysics journal : EBJ* **39**, 103-110, doi:10.1007/s00249-008-0392-y (2009).
- 34 Shinoda, K., Shinoda, W., Baba, T. & Mikami, M. Comparative molecular dynamics study of ether- and ester-linked phospholipid bilayers. *The Journal of chemical physics* **121**, 9648-9654, doi:10.1063/1.1806791 (2004).
- 35 Orsi, M., Michel, J. & Essex, J. W. Coarse-grain modelling of DMPC and DOPC lipid bilayers. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* **22**, 155106, doi:10.1088/0953-8984/22/15/155106 (2010).
- 36 Andersen, O. S., Finkelstein, A., Katz, I. & Cass, A. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. *The Journal of general physiology* **67**, 749-771 (1976).
- 37 Franklin, J. C. & Cafiso, D. S. Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles. *Biophysical journal* **65**, 289-299, doi:10.1016/S0006-3495(93)81051-8 (1993).
- 38 Clarke, R. J. & Kane, D. J. Optical detection of membrane dipole potential: avoidance of fluidity and dye-induced effects. *Biochimica et biophysica acta* **1323**, 223-239 (1997).
- 39 Gross, E., Bedlack, R. S., Jr. & Loew, L. M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. *Biophysical journal* **67**, 208-216, doi:10.1016/S0006-3495(94)80471-0 (1994).
- 40 Bechinger, B. & Seelig, J. Interaction of electric dipoles with phospholipid head groups. A 2H and 31P NMR study of phloretin and phloretin analogues in phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* **30**, 3923-3929 (1991).
- 41 Efimova, S. S., Malev, V. V. & Ostroumova, O. S. Effects of Dipole Potential Modifiers on Heterogenic Lipid Bilayers. *J Membr Biol* **249**, 97-106, doi:10.1007/s00232-015-9852-3 (2016).
- 42 Simon, S. A., McIntosh, T. J., Magid, A. D. & Needham, D. Modulation of the interbilayer hydration pressure by the addition of dipoles at the hydrocarbon/water interface. *Biophysical journal* **61**, 786-799, doi:10.1016/S0006-3495(92)81883-0 (1992).
- 43 Smondyrev, A. M. & Berkowitz, M. L. Effects of oxygenated sterol on phospholipid bilayer properties: a molecular dynamics simulation. *Chemistry and physics of lipids* **112**, 31-39 (2001).
- 44 Starke-Peterkovic, T. *et al.* Cholesterol effect on the dipole potential of lipid membranes. *Biophysical journal* **90**, 4060-4070, doi:10.1529/biophysj.105.074666 (2006).
- 45 Haldar, S., Kanaparthi, R. K., Samanta, A. & Chattopadhyay, A. Differential effect of cholesterol and its biosynthetic precursors on membrane dipole potential. *Biophysical journal* **102**, 1561-1569, doi:10.1016/j.bpj.2012.03.004 (2012).
- 46 Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Poolman, B. & Schwille, P. Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* **278**, 28109-28115, doi:10.1074/jbc.M302969200 (2003).
- 47 Flewelling, R. F. & Hubbell, W. L. The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes. *Biophysical journal* **49**, 541-552, doi:10.1016/S0006-3495(86)83664-5 (1986).
- 48 Schamberger, J. & Clarke, R. J. Hydrophobic ion hydration and the magnitude of the dipole potential. *Biophysical journal* **82**, 3081-3088, doi:10.1016/S0006-3495(02)75649-X (2002).

- 49 Wang, L., Bose, P. S. & Sigworth, F. J. Using cryo-EM to measure the dipole potential of a lipid membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18528-18533, doi:10.1073/pnas.0608714103 (2006).
- 50 Mashl, R. J., Scott, H. L., Subramaniam, S. & Jakobsson, E. Molecular simulation of dioleoylphosphatidylcholine lipid bilayers at differing levels of hydration. *Biophysical journal* **81**, 3005-3015, doi:10.1016/S0006-3495(01)75941-3 (2001).
- 51 Harder, E., Mackerell, A. D., Jr. & Roux, B. Many-body polarization effects and the membrane dipole potential. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 2760-2761, doi:10.1021/ja806825g (2009).
- 52 Ding, W., Palaiokostas, M., Wang, W. & Orsi, M. Effects of Lipid Composition on Bilayer Membranes Quantified by All-Atom Molecular Dynamics. *The journal of physical chemistry. B* **119**, 15263-15274, doi:10.1021/acs.jpcc.5b06604 (2015).
- 53 Ronnest, A. K., Peters, G. H., Hansen, F. Y., Taub, H. & Miskowiec, A. Structure and dynamics of water and lipid molecules in charged anionic DMPG lipid bilayer membranes. *The Journal of chemical physics* **144**, 144904, doi:10.1063/1.4945278 (2016).
- 54 Yang, Y., Mayer, K. M., Wickremasinghe, N. S. & Hafner, J. H. Probing the lipid membrane dipole potential by atomic force microscopy. *Biophysical journal* **95**, 5193-5199, doi:10.1529/biophysj.108.136507 (2008).
- 55 Shrestha, R., Cardenas, A. E., Elber, R. & Webb, L. J. Measurement of the membrane dipole electric field in DMPC vesicles using vibrational shifts of p-cyanophenylalanine and molecular dynamics simulations. *The journal of physical chemistry. B* **119**, 2869-2876, doi:10.1021/jp511677j (2015).
- 56 Shrestha, R., Anderson, C. M., Cardenas, A. E., Elber, R. & Webb, L. J. Direct Measurement of the Effect of Cholesterol and 6-Ketocholestanol on the Membrane Dipole Electric Field Using Vibrational Stark Effect Spectroscopy Coupled with Molecular Dynamics Simulations. *The journal of physical chemistry. B* **121**, 3424-3436, doi:10.1021/acs.jpcc.6b09007 (2017).
- 57 Cohen, L. B. *et al.* Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J Membr Biol* **19**, 1-36 (1974).
- 58 Waggoner, A. Optical probes of membrane potential. *J Membr Biol* **27**, 317-334 (1976).
- 59 Loew, L. M., Bonneville, G. W. & Surow, J. Charge shift optical probes of membrane potential. Theory. *Biochemistry* **17**, 4065-4071 (1978).
- 60 Loew, L. M., Scully, S., Simpson, L. & Waggoner, A. S. Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential. *Nature* **281**, 497-499 (1979).
- 61 Loew, L. M. & Simpson, L. L. Charge-shift probes of membrane potential: a probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophysical journal* **34**, 353-365, doi:10.1016/S0006-3495(81)84854-0 (1981).
- 62 Waggoner, A. S. Dye indicators of membrane potential. *Annu Rev Biophys Bioeng* **8**, 47-68, doi:10.1146/annurev.bb.08.060179.000403 (1979).
- 63 Loew, L. M., Cohen, L. B., Salzberg, B. M., Obaid, A. L. & Bezanilla, F. Charge-shift probes of membrane potential. Characterization of aminostyrylpyridinium dyes on the squid giant axon. *Biophysical journal* **47**, 71-77, doi:10.1016/S0006-3495(85)83878-9 (1985).
- 64 Gross, D., Loew, L. M. & Webb, W. W. Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields. *Biophysical journal* **50**, 339-348, doi:10.1016/S0006-3495(86)83467-1 (1986).

- 65 Fluhler, E., Burnham, V. G. & Loew, L. M. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* **24**, 5749-5755 (1985).
- 66 Montana, V., Farkas, D. L. & Loew, L. M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. *Biochemistry* **28**, 4536-4539 (1989).
- 67 Rohr, S. & Salzberg, B. M. Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale. *Biophysical journal* **67**, 1301-1315, doi:10.1016/S0006-3495(94)80602-2 (1994).
- 68 Zhang, J., Davidson, R. M., Wei, M. D. & Loew, L. M. Membrane electric properties by combined patch clamp and fluorescence ratio imaging in single neurons. *Biophysical journal* **74**, 48-53, doi:10.1016/S0006-3495(98)77765-3 (1998).
- 69 Clarke, R. J. Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et biophysica acta* **1327**, 269-278 (1997).
- 70 Efimova, S. S. & Ostroumova, O. S. Modifiers of the Dipole Potential of Lipid Bilayers. *Acta naturae* **7**, 70-79 (2015).
- 71 Bullen, A. & Saggau, P. High-speed, random-access fluorescence microscopy: II. Fast quantitative measurements with voltage-sensitive dyes. *Biophysical journal* **76**, 2272-2287, doi:10.1016/S0006-3495(99)77383-2 (1999).
- 72 Vitha, M. F. & Clarke, R. J. Comparison of excitation and emission ratiometric fluorescence methods for quantifying the membrane dipole potential. *Biochimica et biophysica acta* **1768**, 107-114, doi:10.1016/j.bbamem.2006.06.022 (2007).
- 73 Przybylo, M., Borowik, T. & Langner, M. Fluorescence techniques for determination of the membrane potentials in high throughput screening. *Journal of fluorescence* **20**, 1139-1157, doi:10.1007/s10895-010-0665-6 (2010).
- 74 Duportail, G., Klymchenko, A., Mely, Y. & Demchenko, A. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes. *FEBS letters* **508**, 196-200 (2001).
- 75 Klymchenko, A. S., Duportail, G., Mely, Y. & Demchenko, A. P. Ultrasensitive two-color fluorescence probes for dipole potential in phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11219-11224, doi:10.1073/pnas.1934603100 (2003).
- 76 Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Duportail, G., Demchenko, A. P. & Mely, Y. Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1712**, 128-136, doi:10.1016/j.bbamem.2005.03.015 (2005).
- 77 M'Baye, G., Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Mely, Y. & Duportail, G. Membrane dipole potential as measured by ratiometric 3-hydroxyflavone fluorescence probes: accounting for hydration effects. *Journal of fluorescence* **16**, 35-42, doi:10.1007/s10895-005-0022-3 (2006).
- 78 Darwich, Z. *et al.* Rational design of fluorescent membrane probes for apoptosis based on 3-hydroxyflavone. *Methods and Applications in Fluorescence* **1**, 025002 (2013).
- 79 Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 127-137, doi:10.1038/35052073 (2001).
- 80 Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. & Hynes, N. E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO journal* **19**, 3159-3167, doi:10.1093/emboj/19.13.3159 (2000).

- 81 Jones, F. E. & Stern, D. F. Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* **18**, 3481-3490, doi:10.1038/sj.onc.1202698 (1999).
- 82 Cohen, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *The Journal of biological chemistry* **237**, 1555-1562 (1962).
- 83 Holbro, T., Civenni, G. & Hynes, N. E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental cell research* **284**, 99-110 (2003).
- 84 Hynes, N. E. & MacDonald, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current opinion in cell biology* **21**, 177-184, doi:10.1016/j.ceb.2008.12.010 (2009).
- 85 Baselga, J. & Swain, S. M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature reviews. Cancer* **9**, 463-475, doi:10.1038/nrc2656 (2009).
- 86 Schlessinger, J. & Ullrich, A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**, 383-391 (1992).
- 87 Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117-1134, doi:10.1016/j.cell.2010.06.011 (2010).
- 88 Hollenberg, M. D. & Cuatrecasas, P. Epidermal growth factor: receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 2964-2968 (1973).
- 89 Ushiro, H. & Cohen, S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *The Journal of biological chemistry* **255**, 8363-8365 (1980).
- 90 Cohen, S., Carpenter, G. & King, L., Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *The Journal of biological chemistry* **255**, 4834-4842 (1980).
- 91 Downward, J. *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* **307**, 521-527 (1984).
- 92 Schechter, A. L. *et al.* The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* **312**, 513-516 (1984).
- 93 King, C. R., Kraus, M. H. & Aaronson, S. A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* **229**, 974-976 (1985).
- 94 Coussens, L. *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230**, 1132-1139 (1985).
- 95 Bargmann, C. I., Hung, M. C. & Weinberg, R. A. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* **45**, 649-657 (1986).
- 96 Stern, D. F., Heffernan, P. A. & Weinberg, R. A. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Molecular and cellular biology* **6**, 1729-1740 (1986).
- 97 Plowman, G. D. *et al.* Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4905-4909 (1990).

- 98 Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. & Aaronson, S. A. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 9193-9197 (1989).
- 99 Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A. & Carraway, K. L., 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8132-8136 (1994).
- 100 Carraway, K. L., 3rd *et al.* The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *The Journal of biological chemistry* **269**, 14303-14306 (1994).
- 101 Plowman, G. D. *et al.* Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* **366**, 473-475, doi:10.1038/366473a0 (1993).
- 102 Plowman, G. D. *et al.* Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 1746-1750 (1993).
- 103 Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A. & Riese, D. J., 2nd. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther* **122**, 1-8, doi:10.1016/j.pharmthera.2008.11.008 (2009).
- 104 Harris, R. C., Chung, E. & Coffey, R. J. EGF receptor ligands. *Experimental cell research* **284**, 2-13 (2003).
- 105 Olayioye, M. A. *et al.* ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Molecular and cellular biology* **18**, 5042-5051 (1998).
- 106 Schulze, W. X., Deng, L. & Mann, M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* **1**, 2005 0008, doi:10.1038/msb4100012 (2005).
- 107 Marmor, M. D., Skaria, K. B. & Yarden, Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 903-913, doi:10.1016/j.ijrobp.2003.06.002 (2004).
- 108 Garrett, T. P. *et al.* The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Molecular cell* **11**, 495-505 (2003).
- 109 Schechter, Y., Hernaez, L., Schlessinger, J. & Cuatrecasas, P. Local aggregation of hormone-receptor complexes is required for activation by epidermal growth factor. *Nature* **278**, 835-838 (1979).
- 110 Greenfield, C. *et al.* Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *The EMBO journal* **8**, 4115-4123 (1989).
- 111 Yarden, Y. & Schlessinger, J. Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **26**, 1443-1451 (1987).
- 112 Yarden, Y. & Schlessinger, J. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* **26**, 1434-1442 (1987).
- 113 Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C. & Pawson, T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668-674 (1991).
- 114 Honegger, A. M., Schmidt, A., Ullrich, A. & Schlessinger, J. Evidence for epidermal growth factor (EGF)-induced intermolecular autophosphorylation of the EGF receptors in living cells. *Molecular and cellular biology* **10**, 4035-4044 (1990).

- 115 Boni-Schnetzler, M. & Pilch, P. F. Mechanism of epidermal growth factor receptor autophosphorylation and high-affinity binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 7832-7836 (1987).
- 116 Sorokin, A., Lemmon, M. A., Ullrich, A. & Schlessinger, J. Stabilization of an active dimeric form of the epidermal growth factor receptor by introduction of an inter-receptor disulfide bond. *The Journal of biological chemistry* **269**, 9752-9759 (1994).
- 117 Redemann, N. *et al.* Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Molecular and cellular biology* **12**, 491-498 (1992).
- 118 Kashles, O., Yarden, Y., Fischer, R., Ullrich, A. & Schlessinger, J. A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Molecular and cellular biology* **11**, 1454-1463 (1991).
- 119 Akiyama, T., Saito, T., Ogawara, H., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. Tumor promoter and epidermal growth factor stimulate phosphorylation of the c-erbB-2 gene product in MKN-7 human adenocarcinoma cells. *Molecular and cellular biology* **8**, 1019-1026 (1988).
- 120 Wada, T., Qian, X. L. & Greene, M. I. Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell* **61**, 1339-1347 (1990).
- 121 Sliwkowski, M. X. *et al.* Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *The Journal of biological chemistry* **269**, 14661-14665 (1994).
- 122 Soltoff, S. P., Carraway, K. L., 3rd, Prigent, S. A., Gullick, W. G. & Cantley, L. C. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Molecular and cellular biology* **14**, 3550-3558 (1994).
- 123 Kim, H. H., Sierke, S. L. & Koland, J. G. Epidermal growth factor-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with the erbB3 gene product. *The Journal of biological chemistry* **269**, 24747-24755 (1994).
- 124 Cohen, B. D., Green, J. M., Foy, L. & Fell, H. P. HER4-mediated biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. Evidence for HER1-HER4 heterodimers. *The Journal of biological chemistry* **271**, 4813-4818 (1996).
- 125 Karunagaran, D. *et al.* ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *The EMBO journal* **15**, 254-264 (1996).
- 126 Lenferink, A. E. *et al.* Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *The EMBO journal* **17**, 3385-3397, doi:10.1093/emboj/17.12.3385 (1998).
- 127 Beerli, R. R. & Hynes, N. E. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *The Journal of biological chemistry* **271**, 6071-6076 (1996).
- 128 Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. & Hynes, N. E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO journal* **16**, 1647-1655, doi:10.1093/emboj/16.7.1647 (1997).
- 129 Tzahar, E. *et al.* A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and cellular biology* **16**, 5276-5287 (1996).

- 130 Holbro, T. *et al.* The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8933-8938, doi:10.1073/pnas.1537685100 (2003).
- 131 Bagossi, P., Horvath, G., Vereb, G., Szollosi, J. & Tozser, J. Molecular modeling of nearly full-length ErbB2 receptor. *Biophysical journal* **88**, 1354-1363, doi:10.1529/biophysj.104.046003 (2005).
- 132 Ferguson, K. M. Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. *Biochemical Society transactions* **32**, 742-745, doi:10.1042/BST0320742 (2004).
- 133 Cho, H. S. & Leahy, D. J. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* **297**, 1330-1333, doi:10.1126/science.1074611 (2002).
- 134 Ogiso, H. *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775-787 (2002).
- 135 Lemmon, M. A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Experimental cell research* **315**, 638-648, doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.024 (2009).
- 136 Cao, H., Bangalore, L., Dompe, C., Bormann, B. J. & Stern, D. F. An extra cysteine proximal to the transmembrane domain induces differential cross-linking of p185neu and p185neu. *The Journal of biological chemistry* **267**, 20489-20492 (1992).
- 137 Gadella, T. W., Jr. & Jovin, T. M. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *The Journal of cell biology* **129**, 1543-1558 (1995).
- 138 Webb, S. E. *et al.* Single-molecule imaging and fluorescence lifetime imaging microscopy show different structures for high- and low-affinity epidermal growth factor receptors in A431 cells. *Biophysical journal* **94**, 803-819, doi:10.1529/biophysj.107.112623 (2008).
- 139 Keating, E., Nohe, A. & Petersen, N. O. Studies of distribution, location and dynamic properties of EGFR on the cell surface measured by image correlation spectroscopy. *European biophysics journal : EBJ* **37**, 469-481, doi:10.1007/s00249-007-0239-y (2008).
- 140 Clayton, A. H. *et al.* Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *The Journal of biological chemistry* **280**, 30392-30399, doi:10.1074/jbc.M504770200 (2005).
- 141 Clayton, A. H., Tavarnesi, M. L. & Johns, T. G. Unligated epidermal growth factor receptor forms higher order oligomers within microclusters on A431 cells that are sensitive to tyrosine kinase inhibitor binding. *Biochemistry* **46**, 4589-4597, doi:10.1021/bi700002b (2007).
- 142 Nagy, P., Claus, J., Jovin, T. M. & Arndt-Jovin, D. J. Distribution of resting and ligand-bound ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases in living cells using number and brightness analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16524-16529, doi:10.1073/pnas.1002642107 (2010).
- 143 Kozer, N. *et al.* Exploring higher-order EGFR oligomerisation and phosphorylation—a combined experimental and theoretical approach. *Molecular bioSystems* **9**, 1849-1863, doi:10.1039/c3mb70073a (2013).
- 144 Low-Nam, S. T. *et al.* ErbB1 dimerization is promoted by domain co-confinement and stabilized by ligand binding. *Nature structural & molecular biology* **18**, 1244-1249, doi:10.1038/nsmb.2135 (2011).
- 145 Nagy, P. *et al.* Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *Journal of cell science* **112 (Pt 11)**, 1733-1741 (1999).

- 146 Szabo, A., Horvath, G., Szollosi, J. & Nagy, P. Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements. *Biophysical journal* **95**, 2086-2096, doi:10.1529/biophysj.108.133371 (2008).
- 147 Yang, S. *et al.* Mapping ErbB receptors on breast cancer cell membranes during signal transduction. *Journal of cell science* **120**, 2763-2773, doi:10.1242/jcs.007658 (2007).
- 148 Park, E., Baron, R. & Landgraf, R. Higher-order association states of cellular ERBB3 probed with photo-cross-linkable aptamers. *Biochemistry* **47**, 11992-12005, doi:10.1021/bi8004208 (2008).
- 149 Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. & Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137-1149, doi:10.1016/j.cell.2006.05.013 (2006).
- 150 Qiu, C. *et al.* Mechanism of activation and inhibition of the HER4/ErbB4 kinase. *Structure* **16**, 460-467, doi:10.1016/j.str.2007.12.016 (2008).
- 151 Macdonald-Obermann, J. L., Piwnica-Worms, D. & Pike, L. J. Mechanics of EGF receptor/ErbB2 kinase activation revealed by luciferase fragment complementation imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 137-142, doi:10.1073/pnas.1111316109 (2012).
- 152 Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212 (1990).
- 153 Kashles, O. *et al.* Ligand-induced stimulation of epidermal growth factor receptor mutants with altered transmembrane regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 9567-9571 (1988).
- 154 Carpenter, C. D. *et al.* Structural analysis of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* **266**, 5750-5755 (1991).
- 155 Bessman, N. J. & Lemmon, M. A. Finding the missing links in EGFR. *Nature structural & molecular biology* **19**, 1-3, doi:10.1038/nsmb.2221 (2012).
- 156 Mi, L. Z. *et al.* Simultaneous visualization of the extracellular and cytoplasmic domains of the epidermal growth factor receptor. *Nature structural & molecular biology* **18**, 984-989, doi:10.1038/nsmb.2092 (2011).
- 157 Segatto, O., King, C. R., Pierce, J. H., Di Fiore, P. P. & Aaronson, S. A. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Molecular and cellular biology* **8**, 5570-5574 (1988).
- 158 Fleishman, S. J., Schlessinger, J. & Ben-Tal, N. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15937-15940, doi:10.1073/pnas.252640799 (2002).
- 159 Xie, D. *et al.* Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 412-417 (2000).
- 160 Sternberg, M. J. & Gullick, W. J. Neu receptor dimerization. *Nature* **339**, 587, doi:10.1038/339587a0 (1989).
- 161 Gerber, D., Sal-Man, N. & Shai, Y. Two motifs within a transmembrane domain, one for homodimerization and the other for heterodimerization. *The Journal of biological chemistry* **279**, 21177-21182, doi:10.1074/jbc.M400847200 (2004).

- 162 Duneau, J. P., Vegh, A. P. & Sturgis, J. N. A dimerization hierarchy in the transmembrane domains of the HER receptor family. *Biochemistry* **46**, 2010-2019, doi:10.1021/bi061436f (2007).
- 163 Arpel, A. *et al.* Transmembrane domain targeting peptide antagonizing ErbB2/Neu inhibits breast tumor growth and metastasis. *Cell reports* **8**, 1714-1721, doi:10.1016/j.celrep.2014.07.044 (2014).
- 164 Matsushita, C. *et al.* Transmembrane helix orientation influences membrane binding of the intracellular juxtamembrane domain in Neu receptor peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 1646-1651, doi:10.1073/pnas.1215207110 (2013).
- 165 Arkhipov, A. *et al.* Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* **152**, 557-569, doi:10.1016/j.cell.2012.12.030 (2013).
- 166 Jura, N. *et al.* Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* **137**, 1293-1307, doi:10.1016/j.cell.2009.04.025 (2009).
- 167 Jura, N. *et al.* Catalytic control in the EGF receptor and its connection to general kinase regulatory mechanisms. *Molecular cell* **42**, 9-22, doi:10.1016/j.molcel.2011.03.004 (2011).
- 168 Endres, N. F. *et al.* Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell* **152**, 543-556, doi:10.1016/j.cell.2012.12.032 (2013).
- 169 Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
- 170 Simons, K. & van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-6202 (1988).
- 171 Brown, D. A. & Rose, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544 (1992).
- 172 Brown, D. A. & London, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology* **14**, 111-136, doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.111 (1998).
- 173 Brown, D. A. & London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *The Journal of biological chemistry* **275**, 17221-17224, doi:10.1074/jbc.R000005200 (2000).
- 174 Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572, doi:10.1038/42408 (1997).
- 175 Pike, L. J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research* **47**, 1597-1598, doi:10.1194/jlr.E600002-JLR200 (2006).
- 176 Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50, doi:10.1126/science.1174621 (2010).
- 177 Lorent, J. H. & Levental, I. Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chemistry and physics of lipids* **192**, 23-32, doi:10.1016/j.chemphyslip.2015.07.022 (2015).
- 178 Munro, S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388 (2003).
- 179 Hancock, J. F. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 456-462, doi:10.1038/nrm1925 (2006).
- 180 Carquin, M., D'Auria, L., Pollet, H., Bongarzone, E. R. & Tyteca, D. Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: From rafts to submicrometric domains. *Progress in lipid research* **62**, 1-24, doi:10.1016/j.plipres.2015.12.004 (2016).

- 181 Sevcsik, E. & Schutz, G. J. With or without rafts? Alternative views on cell membranes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **38**, 129-139, doi:10.1002/bies.201500150 (2016).
- 182 Eggeling, C. *et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 1159-1162, doi:10.1038/nature07596 (2009).
- 183 Honigsmann, A. *et al.* Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nature communications* **5**, 5412, doi:10.1038/ncomms6412 (2014).
- 184 Kraft, M. L. Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. *Molecular biology of the cell* **24**, 2765-2768, doi:10.1091/mbc.E13-03-0165 (2013).
- 185 Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**, 31-39, doi:10.1038/35036052 (2000).
- 186 Simons, K. & Ehehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of clinical investigation* **110**, 597-603, doi:10.1172/JCI16390 (2002).
- 187 Varma, R. & Mayor, S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798-801, doi:10.1038/29563 (1998).
- 188 Ritchie, K., Iino, R., Fujiwara, T., Murase, K. & Kusumi, A. The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review). *Molecular membrane biology* **20**, 13-18 (2003).
- 189 Saha, S., Anilkumar, A. A. & Mayor, S. GPI-anchored protein organization and dynamics at the cell surface. *Journal of lipid research* **57**, 159-175, doi:10.1194/jlr.R062885 (2016).
- 190 Gowrishankar, K. *et al.* Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules. *Cell* **149**, 1353-1367, doi:10.1016/j.cell.2012.05.008 (2012).
- 191 Fishman, P. H. Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol* **69**, 85-97 (1982).
- 192 Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. & Simons, K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *The Journal of cell biology* **141**, 929-942 (1998).
- 193 MacKenzie, C. R., Hiramata, T., Lee, K. K., Altman, E. & Young, N. M. Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *The Journal of biological chemistry* **272**, 5533-5538 (1997).
- 194 Lauer, S., Goldstein, B., Nolan, R. L. & Nolan, J. P. Analysis of cholera toxin-ganglioside interactions by flow cytometry. *Biochemistry* **41**, 1742-1751 (2002).
- 195 Hammond, A. T. *et al.* Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6320-6325, doi:10.1073/pnas.0405654102 (2005).
- 196 Day, C. A. & Kenworthy, A. K. Functions of cholera toxin B-subunit as a raft cross-linker. *Essays Biochem* **57**, 135-145, doi:10.1042/bse0570135 (2015).
- 197 Raghunathan, K. *et al.* Glycolipid Crosslinking Is Required for Cholera Toxin to Partition Into and Stabilize Ordered Domains. *Biophysical journal* **111**, 2547-2550, doi:10.1016/j.bpj.2016.11.008 (2016).
- 198 Alving, C. R., Swartz, G. M., Jr. & Wassef, N. M. Naturally occurring autoantibodies to cholesterol in humans. *Biochemical Society transactions* **17**, 637-639 (1989).

- 199 Veres, A. *et al.* Relationship of anti-60 kDa heat shock protein and anti-cholesterol antibodies to cardiovascular events. *Circulation* **106**, 2775-2780 (2002).
- 200 Horvath, A. *et al.* Anti-cholesterol antibodies (ACHA) in patients with different atherosclerotic vascular diseases and healthy individuals. Characterization of human ACHA. *Atherosclerosis* **156**, 185-192 (2001).
- 201 Swartz, G. M., Jr., Gentry, M. K., Amende, L. M., Blanchette-Mackie, E. J. & Alving, C. R. Antibodies to cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 1902-1906 (1988).
- 202 Dijkstra, J. *et al.* Interaction of anti-cholesterol antibodies with human lipoproteins. *J Immunol* **157**, 2006-2013 (1996).
- 203 Perl-Treves, D., Kessler, N., Izhaky, D. & Addadi, L. Monoclonal antibody recognition of cholesterol monohydrate crystal faces. *Chem Biol* **3**, 567-577 (1996).
- 204 Kruth, H. S. *et al.* Monoclonal antibody detection of plasma membrane cholesterol microdomains responsive to cholesterol trafficking. *Journal of lipid research* **42**, 1492-1500 (2001).
- 205 Ong, D. S. *et al.* Extracellular cholesterol-rich microdomains generated by human macrophages and their potential function in reverse cholesterol transport. *Journal of lipid research* **51**, 2303-2313, doi:10.1194/jlr.M005660 (2010).
- 206 Freeman, S. R. *et al.* ABCG1-mediated generation of extracellular cholesterol microdomains. *Journal of lipid research* **55**, 115-127, doi:10.1194/jlr.M044552 (2014).
- 207 Biro, A. *et al.* Novel anti-cholesterol monoclonal immunoglobulin G antibodies as probes and potential modulators of membrane raft-dependent immune functions. *Journal of lipid research* **48**, 19-29, doi:10.1194/jlr.M600158-JLR200 (2007).
- 208 Beck, Z. *et al.* New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production. *Journal of lipid research* **51**, 286-296, doi:10.1194/jlr.M000372 (2010).
- 209 Izsepi, E. *et al.* The AC8 IgG3 monoclonal anti-cholesterol antibody modulates uptake and presentation of antigens for T cell activation. *Immunol Lett* **143**, 106-115, doi:10.1016/j.imlet.2012.01.009 (2012).
- 210 Prinetti, A. *et al.* Changes in the lipid turnover, composition, and organization, as sphingolipid-enriched membrane domains, in rat cerebellar granule cells developing in vitro. *The Journal of biological chemistry* **276**, 21136-21145, doi:10.1074/jbc.M010666200 (2001).
- 211 Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J. & Johnson, E. M., Jr. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* **25**, 412-417 (2002).
- 212 Saarma, M. GDNF recruits the signaling crew into lipid rafts. *Trends Neurosci* **24**, 427-429 (2001).
- 213 Paratcha, G. & Ibanez, C. F. Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 542-549 (2002).
- 214 Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I. & Schachner, M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *The Journal of cell biology* **169**, 341-354, doi:10.1083/jcb.200409127 (2005).
- 215 Decker, L., Baron, W. & Ffrench-Constant, C. Lipid rafts: microenvironments for integrin-growth factor interactions in neural development. *Biochemical Society transactions* **32**, 426-430, doi:10.1042/BST0320426 (2004).

- 216 Ichikawa, N. *et al.* Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *Journal of cell science* **122**, 289-299, doi:10.1242/jcs.030338 (2009).
- 217 Tooze, S. A., Martens, G. J. & Huttner, W. B. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends in cell biology* **11**, 116-122 (2001).
- 218 Vyas, A. A. *et al.* Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8412-8417, doi:10.1073/pnas.072211699 (2002).
- 219 Bremer, E. G., Hakomori, S., Bowen-Pope, D. F., Raines, E. & Ross, R. Ganglioside-mediated modulation of cell growth, growth factor binding, and receptor phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **259**, 6818-6825 (1984).
- 220 Song, W. X., Vacca, M. F., Welti, R. & Rintoul, D. A. Effects of gangliosides GM3 and De-N-acetyl GM3 on epidermal growth factor receptor kinase activity and cell growth. *The Journal of biological chemistry* **266**, 10174-10181 (1991).
- 221 Yoon, S. J., Nakayama, K., Hikita, T., Handa, K. & Hakomori, S. I. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18987-18991, doi:10.1073/pnas.0609281103 (2006).
- 222 Pike, L. J., Han, X. & Gross, R. W. Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. *The Journal of biological chemistry* **280**, 26796-26804, doi:10.1074/jbc.M503805200 (2005).
- 223 Waugh, M. G., Minogue, S., Anderson, J. S., dos Santos, M. & Hsuan, J. J. Signalling and non-caveolar rafts. *Biochemical Society transactions* **29**, 509-511 (2001).
- 224 Roepstorff, K., Thomsen, P., Sandvig, K. & van Deurs, B. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *The Journal of biological chemistry* **277**, 18954-18960, doi:10.1074/jbc.M201422200 (2002).
- 225 Wang, X. Q., Sun, P. & Paller, A. S. Ganglioside GM3 blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites. *The Journal of biological chemistry* **278**, 48770-48778, doi:10.1074/jbc.M308818200 (2003).
- 226 Coskun, U., Grzybek, M., Drechsel, D. & Simons, K. Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 9044-9048, doi:10.1073/pnas.1105666108 (2011).
- 227 Inokuchi, J. Membrane microdomains and insulin resistance. *FEBS letters* **584**, 1864-1871, doi:10.1016/j.febslet.2009.10.012 (2010).
- 228 Kabayama, K. *et al.* Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13678-13683, doi:10.1073/pnas.0703650104 (2007).
- 229 Levental, I. & Veatch, S. The Continuing Mystery of Lipid Rafts. *J Mol Biol* **428**, 4749-4764, doi:10.1016/j.jmb.2016.08.022 (2016).
- 230 Butters, T. D. Gaucher disease. *Current opinion in chemical biology* **11**, 412-418, doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.035 (2007).
- 231 Beutler E, G. G. in *The metabolic and molecular bases of inherited diseases* Vol. III (ed Beaudet AL Scriver CR, Sly WS, Valle DS) 3635-3668 (McGraw-Hill, 2001).

- 232 Grabowski, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* **372**, 1263-1271, doi:10.1016/S0140-6736(08)61522-6 (2008).
- 233 Grabowski, G. A., Petsko G. A., Kolodny E. H. in *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (ed Beaudet A. Valle D., Vogelstein B., Kinzler K., Antonarakis S., Ballabio A.) Ch. 146., (McGraw-Hill Medical, 2010).
- 234 Sidransky, E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discovery medicine* **14**, 273-281 (2012).
- 235 Simons, K. & Gruenberg, J. Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends in cell biology* **10**, 459-462 (2000).
- 236 Westbroek, W., Gustafson, A. M. & Sidransky, E. Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism. *Trends in molecular medicine* **17**, 485-493, doi:10.1016/j.molmed.2011.05.003 (2011).
- 237 Tsuchiya, S. *et al.* Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer research* **42**, 1530-1536 (1982).
- 238 Qin, Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* **221**, 2-11, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003 (2012).
- 239 Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology* **23**, 37-45, doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002 (2014).
- 240 Mumford, R. A., Raghavan, S. S. & Kanfer, J. N. Hydrolytic and transglucolytic activities of a partially purified calf brain beta-glucosidase. *Journal of neurochemistry* **27**, 943-948 (1976).
- 241 Kanfer, J. N., Legler, G., Sullivan, J., Raghavan, S. S. & Mumford, R. A. The Gaucher mouse. *Biochemical and biophysical research communications* **67**, 85-90 (1975).
- 242 Marshall, J. *et al.* Demonstration of feasibility of in vivo gene therapy for Gaucher disease using a chemically induced mouse model. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **6**, 179-189 (2002).
- 243 Xu, Y. H. *et al.* Dependence of reversibility and progression of mouse neuronopathic Gaucher disease on acid beta-glucosidase residual activity levels. *Molecular genetics and metabolism* **94**, 190-203, doi:10.1016/j.ymgme.2008.01.013 (2008).
- 244 Marshall, J. *et al.* CNS-accessible Inhibitor of Glucosylceramide Synthase for Substrate Reduction Therapy of Neuronopathic Gaucher Disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **24**, 1019-1029, doi:10.1038/mt.2016.53 (2016).
- 245 Korkotian, E. *et al.* Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *The Journal of biological chemistry* **274**, 21673-21678 (1999).
- 246 Mucci, J. M. *et al.* Uncoupling of osteoblast-osteoclast regulation in a chemical murine model of Gaucher disease. *Gene* **532**, 186-191, doi:10.1016/j.gene.2013.09.072 (2013).
- 247 Berger, J. *et al.* Glucocerebrosidase deficiency dramatically impairs human bone marrow haematopoiesis in an in vitro model of Gaucher disease. *British journal of haematology* **150**, 93-101, doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08214.x (2010).

- 248 Xu, Y. H. *et al.* Multiple pathogenic proteins implicated in neuronopathic Gaucher disease mice. *Human molecular genetics* **23**, 3943-3957, doi:10.1093/hmg/ddu105 (2014).
- 249 Yatziv, S., Newburg, D. S., Livni, N., Barfi, G. & Kolodny, E. H. Gaucher-like changes in human blood-derived macrophages induced by beta-glucocerebrosidase inhibition. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **111**, 416-420 (1988).
- 250 Newburg, D. S., Yatziv, S., McCluer, R. H. & Raghavan, S. beta-Glucosidase inhibition in murine peritoneal macrophages by conduritol-B-epoxide: an in vitro model of the Gaucher cell. *Biochimica et biophysica acta* **877**, 121-126 (1986).
- 251 Hein, L. K., Duplock, S. & Fuller, M. Selective reduction of bis(monoacylglycero)phosphate ameliorates the storage burden in a THP-1 macrophage model of Gaucher disease. *Journal of lipid research* **54**, 1691-1697, doi:10.1194/jlr.M038232 (2013).
- 252 Hein, L. K., Duplock, S., Hopwood, J. J. & Fuller, M. Lipid composition of microdomains is altered in a cell model of Gaucher disease. *Journal of lipid research* **49**, 1725-1734, doi:10.1194/jlr.M800092-JLR200 (2008).
- 253 Hein, L. K., Meikle, P. J., Hopwood, J. J. & Fuller, M. Secondary sphingolipid accumulation in a macrophage model of Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism* **92**, 336-345, doi:10.1016/j.ymgme.2007.08.001 (2007).
- 254 Trajkovic-Bodenec, S., Bodenec, J. & Futerman, A. H. Phosphatidylcholine metabolism is altered in a monocyte-derived macrophage model of Gaucher disease but not in lymphocytes. *Blood cells, molecules & diseases* **33**, 77-82, doi:10.1016/j.bcmd.2004.03.001 (2004).
- 255 Chen, C. S., Patterson, M. C., Wheatley, C. L., O'Brien, J. F. & Pagano, R. E. Broad screening test for sphingolipid-storage diseases. *Lancet* **354**, 901-905, doi:10.1016/S0140-6736(98)10034-X (1999).
- 256 Puri, V. *et al.* Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nature cell biology* **1**, 386-388, doi:10.1038/14084 (1999).
- 257 Puri, V. *et al.* Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage. *The Journal of biological chemistry* **278**, 20961-20970, doi:10.1074/jbc.M300304200 (2003).
- 258 Sillence, D. J. *et al.* Glucosylceramide modulates membrane traffic along the endocytic pathway. *Journal of lipid research* **43**, 1837-1845 (2002).
- 259 Bodenec, J., Pelled, D., Riebeling, C., Trajkovic, S. & Futerman, A. H. Phosphatidylcholine synthesis is elevated in neuronal models of Gaucher disease due to direct activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by glucosylceramide. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1814-1816, doi:10.1096/fj.02-0149fje (2002).
- 260 Fuller, M. *et al.* Glucosylceramide accumulation is not confined to the lysosome in fibroblasts from patients with Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism* **93**, 437-443, doi:10.1016/j.ymgme.2007.11.011 (2008).
- 261 Gulbins, E. & Li, P. L. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **290**, R11-26, doi:10.1152/ajpregu.00416.2005 (2006).
- 262 Goni, F. M. & Alonso, A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 169-177, doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.002 (2009).

- 263 Castro, B. M., Prieto, M. & Silva, L. C. Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Progress in lipid research* **54**, 53-67, doi:10.1016/j.plipres.2014.01.004 (2014).
- 264 Westerlund, B. & Slotte, J. P. How the molecular features of glycosphingolipids affect domain formation in fluid membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 194-201, doi:10.1016/j.bbamem.2008.11.010 (2009).
- 265 Varela, A. R. *et al.* Effect of glucosylceramide on the biophysical properties of fluid membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1828**, 1122-1130, doi:10.1016/j.bbamem.2012.11.018 (2013).
- 266 Varela, A. R. *et al.* Pathological levels of glucosylceramide change the biophysical properties of artificial and cell membranes. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **19**, 340-346, doi:10.1039/c6cp07227e (2016).
- 267 Brock, R., Hamelers, I. H. & Jovin, T. M. Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. *Cytometry* **35**, 353-362 (1999).
- 268 Lee, R. J. *et al.* Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Molecular and cellular biology* **20**, 672-683 (2000).
- 269 Lojewska, Z. & Loew, L. M. Insertion of amphiphilic molecules into membranes is catalyzed by a high molecular weight non-ionic surfactant. *Biochimica et biophysica acta* **899**, 104-112 (1987).
- 270 Loew, L. M., Benson, L., Lazarovici, P. & Rosenberg, I. Fluorometric analysis of transferable membrane pores. *Biochemistry* **24**, 2101-2104 (1985).
- 271 Gonzalez, R. C., Woods, R. E., & Eddins, S. L. in *Digital Image Processing Under Matlab* (ed R. C. Gonzalez, Woods, R. E., & Eddins, S. L.) Ch. 10.5, 417-425. (Pearson Prentice Hall, 2004).
- 272 Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual review of biochemistry* **47**, 819-846, doi:10.1146/annurev.bi.47.070178.004131 (1978).
- 273 Dale, R. E., Eisinger, J. & Blumberg, W. E. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophysical journal* **26**, 161-193, doi:10.1016/S0006-3495(79)85243-1 (1979).
- 274 van der Meer, B. W. Kappa-squared: from nuisance to new sense. *Journal of biotechnology* **82**, 181-196 (2002).
- 275 Szollosi, J., Damjanovich, S., Nagy, P., Vereb, G. & Matyus, L. Principles of resonance energy transfer. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.] Chapter 1*, Unit1 12, doi:10.1002/0471142956.cy0112s38 (2006).
- 276 Szentesi, G. *et al.* Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Computer methods and programs in biomedicine* **75**, 201-211, doi:10.1016/j.cmpb.2004.02.004 (2004).
- 277 Nagy, P., Vereb, G., Damjanovich, S., Matyus, L. & Szollosi, J. Measuring FRET in flow cytometry and microscopy. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.] Chapter 12*, Unit12 18, doi:10.1002/0471142956.cy1208s38 (2006).
- 278 Digman, M. A., Dalal, R., Horwitz, A. F. & Gratton, E. Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophysical journal* **94**, 2320-2332, doi:10.1529/biophysj.107.114645 (2008).

- 279 Digman, M. A., Wiseman, P. W., Choi, C., Horwitz, A. R. & Gratton, E. Stoichiometry of molecular complexes at adhesions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2170-2175, doi:10.1073/pnas.0806036106 (2009).
- 280 Costes, S. V. *et al.* Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical Journal* **86**, 3993-4003, doi:10.1529/biophysj.103.038422 (2004).
- 281 Hattersley, K. J., Hein, L. K. & Fuller, M. Lipid composition of membrane rafts, isolated with and without detergent, from the spleen of a mouse model of Gaucher disease. *Biochemical and biophysical research communications* **442**, 62-67, doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.009 (2013).
- 282 Alvarado, D., Klein, D. E. & Lemmon, M. A. Structural basis for negative cooperativity in growth factor binding to an EGF receptor. *Cell* **142**, 568-579, doi:10.1016/j.cell.2010.07.015 (2010).
- 283 Tynan, C. J. *et al.* Human epidermal growth factor receptor (EGFR) aligned on the plasma membrane adopts key features of Drosophila EGFR asymmetry. *Molecular and cellular biology* **31**, 2241-2252, doi:10.1128/MCB.01431-10 (2011).
- 284 Hofman, E. G. *et al.* EGF induces coalescence of different lipid rafts. *Journal of cell science* **121**, 2519-2528, doi:10.1242/jcs.028753 (2008).
- 285 Nagy, P. *et al.* Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *Journal of cell science* **115**, 4251-4262 (2002).
- 286 Zhou, W. & Carpenter, G. Heregulin-dependent translocation and hyperphosphorylation of ErbB-2. *Oncogene* **20**, 3918-3920, doi:10.1038/sj.onc.1204517 (2001).
- 287 Miljan, E. A. & Bremer, E. G. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2002**, re15, doi:10.1126/stke.2002.160.re15 (2002).
- 288 Kusumi, A., Suzuki, K. G., Kasai, R. S., Ritchie, K. & Fujiwara, T. K. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends in biochemical sciences* **36**, 604-615, doi:10.1016/j.tibs.2011.08.001 (2011).
- 289 Nagy, P., Balogh, A., Szöllősi, J. & Matkó, J. in *Reviews in Fluorescence 2009* (ed D. Chris Geddes) 193-224 (Springer, 2011).
- 290 Engelman, D. M., Steitz, T. A. & Goldman, A. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **15**, 321-353, doi:10.1146/annurev.bb.15.060186.001541 (1986).
- 291 Deber, C. M. & Li, S. C. Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. *Biopolymers* **37**, 295-318, doi:10.1002/bip.360370503 (1995).
- 292 Bormann, B. J. & Engelman, D. M. Intramembrane helix-helix association in oligomerization and transmembrane signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 223-242, doi:10.1146/annurev.bb.21.060192.001255 (1992).
- 293 Ripoll, D. R., Vila, J. A. & Scheraga, H. A. On the orientation of the backbone dipoles in native folds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 7559-7564, doi:10.1073/pnas.0502754102 (2005).
- 294 Silverberg, M., Furthmayr, H. & Marchesi, V. T. The effect of carboxymethylating a single methionine residue on the subunit interactions of glycophorin A. *Biochemistry* **15**, 1448-1454 (1976).
- 295 MacKenzie, K. R., Prestegard, J. H. & Engelman, D. M. A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* **276**, 131-133 (1997).

- 296 Lemmon, M. A., Treutlein, H. R., Adams, P. D., Brunger, A. T. & Engelman, D. M. A dimerization motif for transmembrane alpha-helices. *Nat Struct Biol* **1**, 157-163 (1994).
- 297 Lemmon, M. A. *et al.* Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *The Journal of biological chemistry* **267**, 7683-7689 (1992).
- 298 Brosig, B. & Langosch, D. The dimerization motif of the glycophorin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci* **7**, 1052-1056, doi:10.1002/pro.5560070423 (1998).
- 299 Longo, N., Shuster, R. C., Griffin, L. D., Langley, S. D. & Elsas, L. J. Activation of insulin receptor signaling by a single amino acid substitution in the transmembrane domain. *The Journal of biological chemistry* **267**, 12416-12419 (1992).
- 300 Webster, M. K. & Donoghue, D. J. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *The EMBO journal* **15**, 520-527 (1996).
- 301 Shiang, R. *et al.* Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* **78**, 335-342 (1994).
- 302 Rousseau, F. *et al.* Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* **371**, 252-254, doi:10.1038/371252a0 (1994).
- 303 Gottschalk, K. E., Adams, P. D., Brunger, A. T. & Kessler, H. Transmembrane signal transduction of the alpha(IIb)beta(3) integrin. *Protein Sci* **11**, 1800-1812, doi:10.1110/ps.4120102 (2002).
- 304 Adair, B. D. & Yeager, M. Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIbbeta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14059-14064, doi:10.1073/pnas.212498199 (2002).
- 305 Luo, B. H., Carman, C. V., Takagi, J. & Springer, T. A. Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3679-3684, doi:10.1073/pnas.0409440102 (2005).
- 306 Li, R. *et al.* Activation of integrin alphallbbeta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* **300**, 795-798, doi:10.1126/science.1079441 (2003).
- 307 Remy, I., Wilson, I. A. & Michnick, S. W. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**, 990-993 (1999).
- 308 Livnah, O. *et al.* Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**, 987-990 (1999).
- 309 Constantinescu, S. N. *et al.* Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4379-4384, doi:10.1073/pnas.081069198 (2001).
- 310 Onishi, M. *et al.* Identification of an oncogenic form of the thrombopoietin receptor MPL using retrovirus-mediated gene transfer. *Blood* **88**, 1399-1406 (1996).
- 311 Jenkins, B. J., D'Andrea, R. & Gonda, T. J. Activating point mutations in the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors suggest the involvement of beta subunit dimerization and cell type-specific molecules in signalling. *The EMBO journal* **14**, 4276-4287 (1995).

- 312 Forbes, L. V. *et al.* An activating mutation in the transmembrane domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia. *Oncogene* **21**, 5981-5989, doi:10.1038/sj.onc.1205767 (2002).
- 313 Weiner, D. B., Liu, J., Cohen, J. A., Williams, W. V. & Greene, M. I. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* **339**, 230-231, doi:10.1038/339230a0 (1989).
- 314 Kuraoka, K. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the transmembrane domain coding region of HER-2 is associated with development and malignant phenotype of gastric cancer. *Int J Cancer* **107**, 593-596, doi:10.1002/ijc.11450 (2003).
- 315 Millikan, R. *et al.* HER2 codon 655 polymorphism and risk of breast cancer in African Americans and whites. *Breast Cancer Res Treat* **79**, 355-364 (2003).
- 316 Bennisroune, A. *et al.* Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling. *Molecular biology of the cell* **15**, 3464-3474, doi:10.1091/mbc.E03-10-0753 (2004).
- 317 Jones, D. H., Rigby, A. C., Barber, K. R. & Grant, C. W. Oligomerization of the EGF receptor transmembrane domain: a 2H NMR study in lipid bilayers. *Biochemistry* **36**, 12616-12624, doi:10.1021/bi970547z (1997).
- 318 Miloso, M., Mazzotti, M., Vass, W. C. & Beguinot, L. SHC and GRB-2 are constitutively by an epidermal growth factor receptor with a point mutation in the transmembrane domain. *The Journal of biological chemistry* **270**, 19557-19562 (1995).
- 319 Tzahar, E. *et al.* Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *The EMBO journal* **16**, 4938-4950, doi:10.1093/emboj/16.16.4938 (1997).
- 320 Smith, S. O., Smith, C. S. & Bormann, B. J. Strong hydrogen bonding interactions involving a buried glutamic acid in the transmembrane sequence of the neu/erbB-2 receptor. *Nat Struct Biol* **3**, 252-258 (1996).
- 321 Garnier, N., Genest, D., Duneau, J. P. & Genest, M. Molecular modeling of c-erbB2 receptor dimerization: coiled-coil structure of wild and oncogenic transmembrane domains--stabilization by interhelical hydrogen bonds in the oncogenic form. *Biopolymers* **42**, 157-168, doi:10.1002/(SICI)1097-0282(199708)42:2<157::AID-BIP5>3.0.CO;2-M (1997).
- 322 Senes, A., Gerstein, M. & Engelman, D. M. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* **296**, 921-936, doi:10.1006/jmbi.1999.3488 (2000).
- 323 Kim, S. *et al.* Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14278-14283, doi:10.1073/pnas.0501234102 (2005).
- 324 Mendrola, J. M., Berger, M. B., King, M. C. & Lemmon, M. A. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *The Journal of biological chemistry* **277**, 4704-4712, doi:10.1074/jbc.M108681200 (2002).
- 325 Bocharov, E. V. *et al.* Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *The Journal of biological chemistry* **283**, 6950-6956, doi:10.1074/jbc.M709202200 (2008).
- 326 Mineev, K. S. *et al.* Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases. *J Mol Biol* **400**, 231-243, doi:10.1016/j.jmb.2010.05.016 (2010).

- 327 Sheridan, R. P., Levy, R. M. & Salemme, F. R. alpha-Helix dipole model and electrostatic stabilization of 4-alpha-helical proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 4545-4549 (1982).
- 328 Wada, A. The alpha-helix as an electric macro-dipole. *Adv Biophys*, 1-63 (1976).
- 329 Shoemaker, K. R., Kim, P. S., York, E. J., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. Tests of the helix dipole model for stabilization of alpha-helices. *Nature* **326**, 563-567, doi:10.1038/326563a0 (1987).
- 330 Shoemaker, K. R. *et al.* Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 2349-2353 (1985).
- 331 Nicholson, H., Becktel, W. J. & Matthews, B. W. Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with alpha-helix dipoles. *Nature* **336**, 651-656, doi:10.1038/336651a0 (1988).
- 332 Hol, W. G. The role of the alpha-helix dipole in protein function and structure. *Progress in biophysics and molecular biology* **45**, 149-195 (1985).
- 333 Hol, W. G., van Duijnen, P. T. & Berendsen, H. J. The alpha-helix dipole and the properties of proteins. *Nature* **273**, 443-446 (1978).
- 334 Sheridan, R. P. & Allen, L. C. The electrostatic potential of the alpha helix (electrostatic potential/alpha-helix/secondary structure/helix dipole). *Biophysical chemistry* **11**, 133-136 (1980).
- 335 Sengupta, D., Behera, R. N., Smith, J. C. & Ullmann, G. M. The alpha helix dipole: screened out? *Structure* **13**, 849-855, doi:10.1016/j.str.2005.03.010 (2005).
- 336 Sengupta, D., Meinhold, L., Langosch, D., Ullmann, G. M. & Smith, J. C. Understanding the energetics of helical peptide orientation in membranes. *Proteins* **58**, 913-922, doi:10.1002/prot.20383 (2005).
- 337 Ben-Tal, N. & Honig, B. Helix-helix interactions in lipid bilayers. *Biophysical journal* **71**, 3046-3050, doi:10.1016/S0006-3495(96)79498-5 (1996).
- 338 McLaughlin, S., Smith, S. O., Hayman, M. J. & Murray, D. An electrostatic engine model for autoinhibition and activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB) family. *The Journal of general physiology* **126**, 41-53, doi:10.1085/jgp.200509274 (2005).
- 339 Sato, T., Pallavi, P., Golebiewska, U., McLaughlin, S. & Smith, S. O. Structure of the membrane reconstituted transmembrane-juxtamembrane peptide EGFR(622-660) and its interaction with Ca²⁺/calmodulin. *Biochemistry* **45**, 12704-12714, doi:10.1021/bi061264m (2006).
- 340 Thiel, K. W. & Carpenter, G. Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19238-19243, doi:10.1073/pnas.0703854104 (2007).
- 341 Red Brewer, M. *et al.* The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Molecular cell* **34**, 641-651, doi:10.1016/j.molcel.2009.04.034 (2009).
- 342 Scheck, R. A., Lowder, M. A., Appelbaum, J. S. & Schepartz, A. Bipartite tetracysteine display reveals allosteric control of ligand-specific EGFR activation. *ACS Chem Biol* **7**, 1367-1376, doi:10.1021/cb300216f (2012).
- 343 Lambert, S., Vind-Kezunovic, D., Karvinen, S. & Gniadecki, R. Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 954-962, doi:10.1038/sj.jid.5700168 (2006).

- 344 Li, Y. C., Park, M. J., Ye, S. K., Kim, C. W. & Kim, Y. N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *The American journal of pathology* **168**, 1107-1118; quiz 1404-1105, doi:10.2353/ajpath.2006.050959 (2006).
- 345 Khmelinskaia, A. *et al.* Changes in membrane organization upon spontaneous insertion of 2-hydroxylated unsaturated fatty acids in the lipid bilayer. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **30**, 2117-2128, doi:10.1021/la403977f (2014).
- 346 Demchenko, A. P., Mely, Y., Duportail, G. & Klymchenko, A. S. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophysical journal* **96**, 3461-3470, doi:10.1016/j.bpj.2009.02.012 (2009).
- 347 Dobretsov, G. E., Syrejschikova, T. I. & Smolina, N. V. [On mechanisms of fluorescence quenching by water]. *Biofizika* **59**, 231-237 (2014).
- 348 Gaus, K., Zech, T. & Harder, T. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Molecular membrane biology* **23**, 41-48, doi:10.1080/09687860500466857 (2006).
- 349 Klymchenko, A. S., Duportail, G., Demchenko, A. P. & Mely, Y. Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers. *Biophysical journal* **86**, 2929-2941, doi:10.1016/S0006-3495(04)74344-1 (2004).
- 350 Tsurui, H. *et al.* Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **48**, 653-662, doi:10.1177/002215540004800509 (2000).
- 351 Sinclair, G. B. *et al.* Generation of a conditional knockout of murine glucocerebrosidase: utility for the study of Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism* **90**, 148-156, doi:10.1016/j.ymgme.2006.09.008 (2007).

10. Tárgyszavak

Tárgyszavak:

- Sejtmembrán
- Membrán dipólpotenciál
- ErbB fehérjék
- Ligand kötődés
- Dimerizáció
- Foszforiláció
- Lipidutajok
- Gaucher-kór
- Feszültség szenzitív fluorofórok
- Konfokális mikroszkópia
- Digitális képelemzés
- Áramlási citometria

Keywords:

- Cell membrane
- Membrane dipole potential
- ErbB proteins
- Ligand binding
- Dimerization
- Phosphorylation
- Lipid rafts
- Gaucher's disease
- Voltage sensitive fluorophores
- Confocal microscopy
- Digital image processing
- Flow cytometry

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöettel tartozom Prof. Dr. Nagy Péternek, hogy témavezetőként gyakorlati és elméleti tanácsaival 2005 szeptembere óta folyamatosan támogatta és segítette fejlődésemet, előrehaladásomat, valamint doktori értekezésem elkészítését.

Szeretném megköszönni a Biofizikai és Sejtbiológia Intézet vezetőjének, Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, hogy lehetőséget adott arra, hogy az Intézetben dolgozhassam és biztosította számomra a folyamatos magas színvonalú munka és szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönet illeti Vágóné Toldi Hajnalka, Farkasné Sánta Gyöngyi és Szilágyi Anikó kollégáimat, valamint kollaborációs partnereimet, Dr. Zákány Florinát, Dr. Batta Gyulát, Hajdu Tímeát, Dr. Szabó Ágnes, Dr. Váradit Tímeát és Csomós Istvánt a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségükért, tanácsaikért, baráti támogatásukért.

Végezetül szeretném megköszönni Családomnak, Édeasnyámnak, Édesapámnak, Nagymamámnak és életem legfontosabb „kollaborációs társának”, Menyasszonyomnak, Dr. Zákány Florinának azt a mérhetetlen szeretetet, támogatást és türelmet, amelyet a munkám során kaptam és amely nélkül ez a disszertáció nem valósult volna meg.

A disszertáció elkészítéséhez szükséges kísérletek elvégzését támogatta a Emberi Erőforrások Minisztériumának Új Nemzeti Kiválóság Programja, a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K103906, K120302, NK101337, GINOP-2.3.2-15-2016-00020, GINOP-2.3.2-15-2016-00044), az Európai Unió és az Európai Szociális Alap (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025).

12. Függelék



**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 mitogenic 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.01.12.

