

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

PhD program:	Gyógyszeranalitika
Programvezető:	Prof. Dr. Ilisz István
Intézet:	Orvosi Vegytani Intézet
Témavezető:	Prof. Dr. Martinek Tamás

Dr. Imre Norbert

Fehérjék sejtbe juttatása endocitózis útvonalra irányító szekvenciákkal

Szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Dombi György

Tagok: Dr. Szakonyi Gerda

Dr. Szabó Pál

Bíráló bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szakonyi Zsolt

Opponensek: Prof. Dr. Buzás Edit

Dr. Horváti Kata

Tagok: Dr. Csupor Dezső

Dr. Ambrus Rita

A. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A gyógyszerfejlesztés egyik legnagyobb jelenkori kihívása a fehérjeméretű hatóanyagok hatékony sejtbe való juttatása, hiszen az emlősök sejtmembránja komoly akadályt állít ezen nagyméretű, hidrofil molekulák elé, amelyek specifikus, hatásos és biztonságos gyógyszerjelöltek lehetnének. Ezen molekulák internalizációja elérhető klatrin-független endocitózissal (például lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózissal), mely útvonalon gyakran közlekednek endogén fehérjék, bakteriális toxinok (kolera és tetanusz), illetve vírusok (egér poliómavírus és echovírus 1). Az útvonal előnye, hogy a képződött endoszómák csak nagyon hosszú idő után egyesülnek lizoszómákkal, sok esetben azonban ez el is marad. Ez az endocitotikus folyamat egy vonzó célpont a funkcionális, degradáció mentes fehérjebevitelre, hiszen a képződő „szivárgó” endoszómák lehetőséget biztosítanak a rakomány kiszabadulására. A lipid betüremkedések és kaveolák felszíne gazdagon borított glikoszfingolipidekkel, főként mono-, di-, és triszialotetrahexozilgangliozidokkal (GM1, GD1a, GT1b), amelyek a fő receptorai az így bejutó molekuláknak. A gangliozidokhoz való kötődés, és a gangliozidok kötegelése tehát olyan endocitotikus folyamatot indít el, ahol a lizoszómális lebomlás csekély, ezáltal lehetővé teszi a fehérjéknek, hogy eljussanak a sejt plazmába, vagy transzcitózissal más sejtekbe. A jelenleg elérhető sejtbejuttató rendszereknek számos hátrányát ismerjük: a rakomány lizoszómába kerül és lebomlik, esetleg az alkalmazandó koncentráció túl nagy, terápiásan tehát irreleváns. Megoldást jelenthet ezekre, ha megvizsgáljuk és megismerjük annak módját, miként váltanak ki a gangliozidok endocitózist, ezáltal empirikusan értelmezni tudjuk a glikán-kódot, és azt tudatosan alkalmazzuk későbbi sejtbejuttató rendszerek tervezésénél. A különböző gangliozid-kötő molekulák azonosítását célzó kutatások már munkánk előtt elkezdődtek, azonban a nagyaffinitású molekuláris felismerés még várat magára. A GM1 gangliozidhoz kötő molekulák különösen érdekesek lehetnek, mert bár számos emlőssejt expresszálja a molekulát, különféle tumorokban feldúsulnak. A fehérje alapú terápiákban az extracelluláris koncentrációtartomány jellemzően 100-500 nM, tehát egy nagyaffinitású kötődés szükséges ahhoz, hogy megfelelő sejtmembránban való dúsulást érijünk el, ezáltal lehetővé téve a hatóanyagok kellő mértékben való beáramlását.

Fő célunk a kutatással az volt, hogy nanomoláris koncentrációban juttassunk be fehérje méretű molekulákat lipid-raft mediált endocitózissal humán sejtekbe. Az endogén és exogén proteinek utánzó, nem toxikus peptid jelölőt kívántunk kifejleszteni, ezért kerestük azt a minimális szekvenciát, amely képes specifikusan, nagy affinitással kötődni a GM1 gangliozidhoz. Mivel a receptor molekulánk szerkezete jól ismert, alapos biofizikai jellemzést

kívántunk folytatni a kölcsönhatáson, ezáltal utat nyitva egy szerkezet-alapú tervezéshez, amely igen ritka a bejuttató rendszerek kutatásában. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a peptid szekvenciánk sejtbejuttató képességét, miközben szigorúan figyelemmel követtük lehetséges toxicitását, bejutási mechanizmusát és a lizozómákkal való egyesülésére való hajlamát. Klasszikus gyógyszerkéimiai megközelítéssel törekedtünk arra, hogy felállítsunk egy szerkezet-hatás összefüggést, ezáltal átfogóbb képet kaphassunk a kötődési mechanizmusról. Az elvégzett változtatások lehetőséget biztosítanak az enzimatis stabilitás növelésére, a nagy affinitás megtartásával.

B. MÓDSZEREK

Izotermális titráló kalorimetria (ITC)

A megszentizált peptidekkel, peptid-konjugátumokkal és a megcélzott gangliozidokkal (GM1, aszialo-GM1, GM3) izotermális titráló kalorimetriát végeztünk egy MicroCal VP-ITC kaloriméter segítségével. A gangliozid-dodecilszfokolin 1:5 bicellákat titráltuk a peptidekhez és konjugátumaikhoz pH 7.2, 35 °C-on, 15 µM gangliozid koncentrációt alkalmazva.

Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás és analízis (FACS)

A peptidek és peptid-komplexek internalizációját áramlásos citometriával mértük. A sejteket a peptidekkel, vagy nélkülük 37 °C-on inkubáltuk különböző időtartamokig. Ezután a sejteket mostuk, és tripszin-EDTA segítségével felszedtük a lemezekről. Sós foszfátpufferben tripánkék és propídium-jodid hozzáadása után mértük a sejteket egy FACSCalibur áramlási citométer segítségével. Az adatokat a FlowJo™ szoftver segítségével értékeltük ki. Az in vitro kompetíciós vizsgálathoz Jurkat sejteket kezeltünk a peptidekkel, miközben a hozzáadott galektin-1 koncentrációkat változtattuk. Az endocitózis inhibitorokkal való kísérletben a HeLa sejteket előinkubáltuk 37°C-on metil-β-ciklodextrinnel, wortmanninnal vagy klórpromazinnal. Ezután inkubáltuk a sejteket 60 percig a peptid komplexekkel, mielőtt a citometriás mérést elvégeztük volna rajtuk.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (CLSM)

A vizsgált sejteket a tanulmányozott komplexekkel különböző koncentrációk alkalmazása mellett, különböző időhosszokig inkubáltuk 37 °C-on. Ezután a sejteket mostuk, majd Hoechst 33342 sejtmagfestéssel 30 percig jelöltük. Némely kísérletben a Hoechst festés után a lizoszómákat LysoTracker Red festéssel jelöltük, a gyártó által megszabott protokollok szerinti eljárásban. A koleratoxin lokalizációs kísérletekben a sejteket a komplexek mellett FITC-jelölt koleratoxin B alegységgel is inkubáltuk. Az antitestek szerkezetét célzó kísérletekben a szokásos inkubáció után a sejteket fixáltuk paraformaldehiddel, majd permeabilizáltuk szaponinnal, végül pedig Atto488-konjugált galektin-1-gyel kezeltük őket 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. Az IgG komplexek méréséhez a sejtmembránokat FITC-jelölt WGA lektinnel jelenítettük meg. FITC-jelölt NeutrAvidin alkalmazásakor tripánkéket használtunk az extracelluláris fluoreszcencia kioltására. A rakomány lokalizációjának megfigyeléséhez a fluoreszcens festékekkel jelölt molekulákat egy Leica SP5 AOBS konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A Hoechst festéshez a 405 nm-es diódát, a FITC és Atto488

jelölésekhez a 488 nm-es argon lézert, az r-fikoeritrinhez és a LysoTrackerRed festékhez az 543 nm-es HeNe lézert, míg az Alexa Fluor 647-konjugátumokhoz a 633 HeNe lézert használtuk. Az emisszió detekciójára minden esetben a megfelelő spektrális szűrőt használtuk.

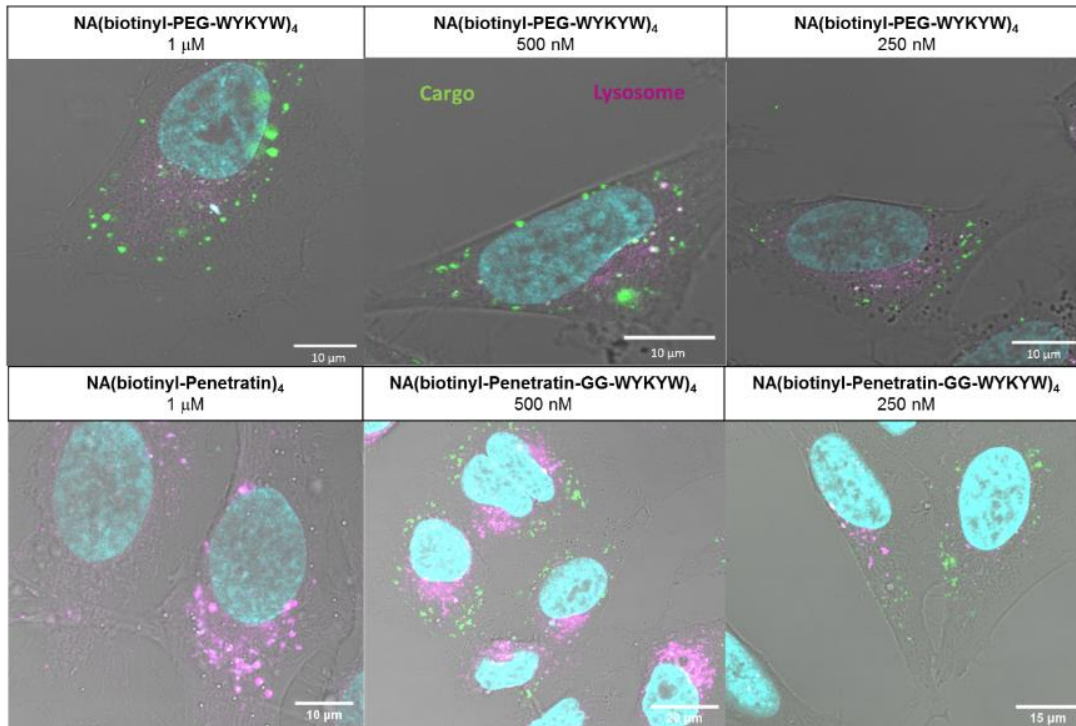
C. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. Szintetizáltunk egy vezérmolekulát (WYKYW peptid), melynek megmértük különböző gangliozidokkal (GM1, aszialo-GM1, GM3) való kölcsönhatását. Kimutattuk, hogy a szekvencia magas affinitással ($K_D = 23.8$ nM), specifikusan kötődött a GM1 gangliozidhoz. Megmutattuk, hogy a GM1 gangliozid bármilyen formában való megváltoztatása csökkentette, vagy teljesen meggátolta a kötődést.
2. Megállapítottuk, hogy a fluoreszcens jelölés a pentapeptid közelében rontotta a gangliozidkötés hatékonyságát. Két új összekötő szekvenciát vezettünk be a szekvencia meghosszabbítására: egy PEG-alapút és egy sejtpenetráló peptidet (penetratin). Kimutattuk, hogy mindkét konstrukt megtartotta nagy affinitását a GM1 gangliozidhoz.
3. Gyógyszerkémiai megközelítést alkalmaztunk, hogy felállítsunk egy szerkezet-hatás összefüggést a szekvencia aminosavai és a szekvencia gangliozidkötő képessége között. Megmutattuk, hogy minden aminosav oldallánca és eredeti konfigurációja is fontos a kötődéshez. Gerinc homologizálással azonosítottunk olyan szekvenciákat, amelyek kötési erőssége összevethető volt a vezérmolekuláéval (1. táblázat).

1. táblázat A szekvenciaanalógok kötési erősségei (K_D). A kötési sztöchiometria (n_1) 0.5 volt minden esetben.

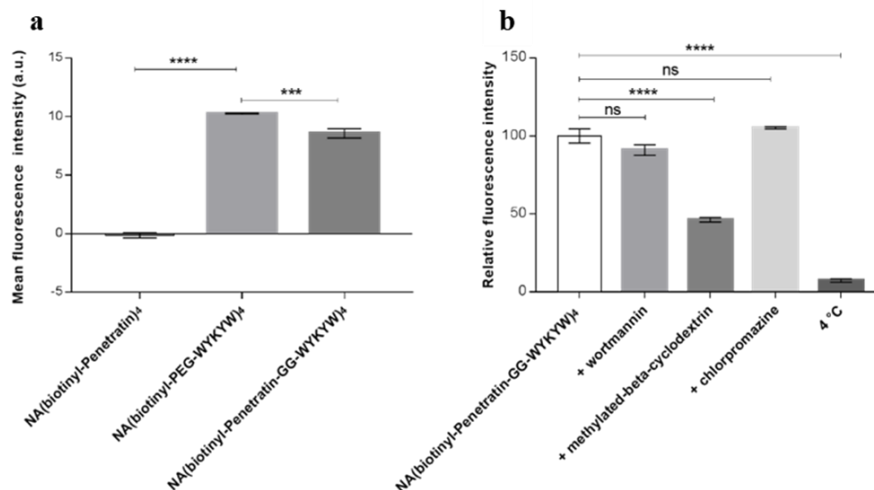
	^NW	Y	K	Y	^WC
vezérmolekula			23.8		
Ala-scan	N/A	5755	10467	1694	1060
β-scan	4.3	60	332	40	86
D-scan	881	892	4523	3243	3926

4. Rávilágítottunk a membrán kitüntetett szerepére a kötődésben. Megmértük mind a triptofánok membránba való beilleszkedését, mind a kötés során lecsökkent aromás „face-to-edge” kölcsönhatásokat.
5. Megmutattuk, hogy a WYKYW jelölő képes volt szubmikromoláris koncentrációkban az endocitózis kiváltására és egy 63 kDa méretű fehérje bejuttatására a lizoszómák elkerülésével (1., 2a ábra).



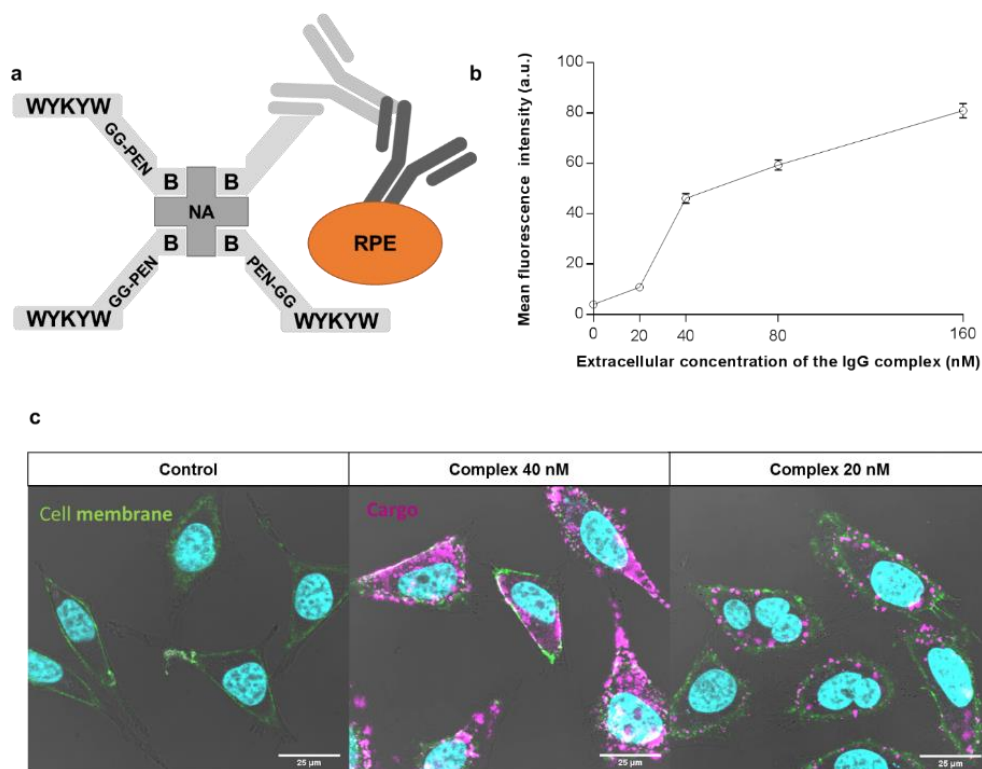
1. ábra Különböző konstruktok bejutása HeLa sejtekbe különböző koncentrációkban, 6 órás inkubáció után. A képek konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készültek. A FITC-jelölt NeutrAvidin a képen zöld színnel, a Hoechst 33342-jelölt sejtmagok cian színnel, a LysoTracker Reddel festett lizoszómák magenta színnel láthatóak.

6. Bizonyítottuk, hogy a peptid-NeutrAvidin komplex bejutása energiafüggő folyamat, amelyet a metil-β-ciklodextrin szignifikánsan blokkolt, rávilágítva a lipid-raft mediált mechanizmusra (2b ábra).



2. ábra (a) A konstruktok bejutása 1 μM koncentrációban HeLa sejtekbe 1 óras inkubáció után. (b) Az endocitózis inhibitor molekulák hatása a bejutásra.

7. Kimutattuk, hogy a peptidek internalizációja összefüggést mutat a sejtek GM1 gangliozid tartalmával.
8. Elvégeztünk egy in vivo leszorítási titrálást a GM1-kötő galektin-1 felhasználásával, amellyel a szekvencia bejutása visszaszorítható volt az összekötő szekvencia szintjére. A komplex és a koleratoxin B alegység kolokalizációjával megmutattuk a sejtbejutás biomimetikus viselkedését.
9. Kimutattuk, hogy a WYKYW-jelölt szekvenciák képesek bejuttatni antitest komplexeket (580 kDa) alacsony nanomoláris koncentrációk alkalmazásával humán sejtekbe. Szemmel látható diffúz fluoreszcenciát mutattunk ki a citoplazmában, melyet a mesterséges intelligenciával segített kvantitatív kiértékelés is megerősített (3. ábra).



3. ábra (a) Sematikus reprezentációja az általunk tervezett moduláris konstruktnak. (b) Mesterséges intelligencia által segített kvantitatív analízise a felvett CLSM képeknek. A HeLa sejtek 6 órán keresztül voltak inkubálva különböző koncentrációban a tervezett IgG komplex molekulával. (c) Az IgG komplex sejtbejutása különböző koncentrációkban 3 órás inkubációt követően. Az r-fikoeritrin-konjugált másodlagos antitestet magenta színnel, a FITC-WGA jelölt membrán zöld színnel, a sejtmagok cian színnel vannak megjelenítve. Delivery of the IgG complex into HeLa cells at various concentrations after 3 hours. A kontroll sejtekhez r-fikoeritrin-konjugált másodlagos antitestet adtunk 160 nM koncentrációban 3 órás inkubációban.

10. Megmutattuk, hogy az elsődleges és másodlagos antitestek közötti molekuláris felismerést nem befolyásolta negatívan a peptid jelölőnk. Bizonyítottuk, hogy a bejuttatott elsődleges antitest strukturális integritása megmaradt.

11. Kimutattuk, hogy a szekvencia analógok képesek voltak IgG komplexek bejuttatására. Megállapítottuk, hogy a gyengébb kötési erősségű szekvenciák alkalmasak voltak az internalizációra, amennyiben a konstrukt aviditását megnöveltük. Megmutattuk, hogy a peptid jelölő triptofán tartalmának csökkentése jótékony hatással volt a bejutásra.

ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓ ÉS SZABADALOM

- I. N. Imre, A. Hetényi, E. Szabó, B. Bodnár, A. Szkalistry, I. Gróf, A. Bocsik, M. A. Deli, P. Horvath, Á. Czibula, É. Monostori, T. A. Martinek (2020). Routing Nanomolar Protein Cargoes to Lipid Raft-Mediated/Caveolar Endocytosis through a Ganglioside GM1-Specific Recognition Tag. *Advanced Science*, 7, 1902621
IF (2019): 15.84
- II. N. Imre, A. Hetényi, E. Szabó, B. Bodnár, A. Szkalistry, I. Gróf, A. Bocsik, M. A. Deli, P. Horvath, Á. Czibula, É. Monostori, T. A. Martinek. ENDOCYTOSIS ROUTING SEQUENCE PEPTIDE FOR CELL DELIVERY SYSTEMS, Patent Application, Patent Number: P1900205, IP share: 20%

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

- III. R. Ismail, T. Sovány, A. Gácsi, R. Ambrus, G. Katona, N. Imre, I. Csóka (2019). Synthesis and Statistical Optimization of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Encapsulating GLP1 Analog Designed for Oral Delivery. *Pharmaceutical Research*, 36, 99
IF: 3.242
- IV. A. Bocsik, I. Gróf, L. Kiss, F. Ötvös, O. Zsíros, L. Daruka, L. Fülöp, M. Vastag, Á. Kittel, N. Imre, T. A. Martinek, C. Pál, P. Szabó-Révész, M. A. Deli (2019). Dual Action of the PN159/KLAL/MAP Peptide: Increase of Drug Penetration across Caco-2 Intestinal Barrier Model by Modulation of Tight Junctions and Plasma Membrane Permeability. *Pharmaceutics*, 11, 73.
IF: 4.421
- V. Zs. Hegedüs, I. Makra, N. Imre, A. Hetényi, I. M. Mándity, É. Monostori, T. A. Martinek (2016). Foldameric probes for membrane interactions by induced β -sheet folding. *Chemical Communications*, 52, 1891
IF: 6.319

ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

1. N. Imre, A. Hetényi, E. Szabó, B. Bodnár, A. Szkalicity, I. Gróf, A. Bocsik, M. A. Deli, P. Horvath, Á. Czibula, É. Monostori, T. A. Martinek

IgG bejuttatása specifikus GM1 gangliozid felismerő szekvenciával

MTA Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium

Kecskemét, 2019. szeptember 5-6.

2. N. Imre, A. Hetényi, E. Szabó, B. Bodnár, A. Szkalicity, I. Gróf, A. Bocsik, M. A. Deli, P. Horvath, Á. Czibula, É. Monostori, T. A. Martinek

IgG bejuttatása specifikus GM1 gangliozid felismerő szekvenciával

MTA Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése

Balatonszemes, 2019. május 27-29.

3. N. Imre, B. Bodnár, E. Szabó, É. Monostori, T. A. Martinek

Gangliozid-mediált sejtpenetráció

MTA Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése

Balatonszemes, 2018. május 28-30.