

Fluoreszcens koleszterin származékok szintézise fehérjék sejtmembránra történő horgonyzásához

PhD tézisei

Schäfer Balázs



Témavezető:

Dr. Tömböly Csaba

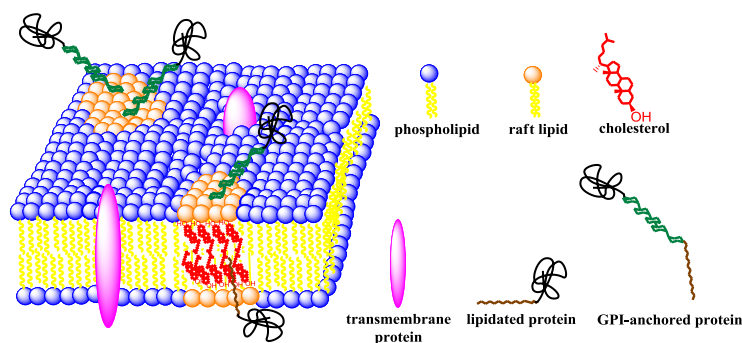
**Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont,
Biokémiai Intézet**

Szeged

2015

1. Bevezető

Az élő szervezetekben a membrán-asszociált fehérjék fontos szerepet töltenek be az életfunkciók fenntartásában. A membránfehérjék között található többek között receptorok, transzport fehérjék, enzimek, illetve sejtadhéziós molekulák. A membránfehérjék különböző módokon kapcsolódhatnak a sejtmembránhoz; ez alapján integrált, perifériás és lipid-horgonyzott fehérjék csoportját különböztethetjük meg. Utóbbi esetben a fehérje egy zsírsavláncon keresztül kötődik a sejtmembránhoz a Cys S-prenilációja vagy S-palmitoilizációja által, valamint az N-terminális Gly N-mirisztoilációjával, vagy a C-terminális amidációja által a glikozilfoszfátidilinozitol (GPI) horgonymolekulán keresztül (1.ábra). Ezek a fehérjék a sejtmembrán külső részéhez kötődnek a C-terminálisuk GPI amidációjával. A GPI horgony molekula egy glikozilált foszfátidilinozitol sztearil lánccal, amelyben a glikán váz tartalmaz egy glükóزامint és három mannózt, valamint egy terminális etanolamin foszfátot. A GPI-horgonyzott fehérjék (GPI-APs) képesek ideiglenesen kötődni a szfingolipidben és koleszterinben gazdag membrán részekhez, a lipid raftokhoz. A normál fiziológias funkciókon kívül a GPI-APs szerepet játszanak különböző betegségekben, mint például a paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-ban, karcinogenezisben, álmkórban, a Trypanosoma paraziták pathobiológiájában, valamint a prion betegségben. A normál celluláris prion protein (PrP^C) főleg α -hélixeket tartalmaz, funkciója eddig még nem ismert, azonban konformációs változásával egy főleg β -redőzött formát tartalmazó módosulata (PrP^{Sc}) jön létre, ami felelős a fertőző szivacsos agysorvadásért. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a GPI molekulának fontos szerepe van a patológiás prion konformer kialakulásában. A természetes GPI horgonymolekula komplexitása miatt a kémiai szintézise nehézkes, a bioszintézise még nem megoldott és a számos oligoszacharid vázában különböző származéka miatt egy fajta tiszta GPI kinyerése szintén nem lehetséges. Mindezek miatt horgonyzási funkcióikban azonos, de szerkezetileg egyszerűbb molekulákat dolgoztak ki, amelyekkel a PrP^C-t a lipid raftokba lehet juttatni.



1. ábra. Egy sejtmembránszelet ábrázolása

2. Célkitűzések

1. GPI horgony molekulát utánzó fluoreszcens koleszterinszármazékok szintézise.
2. A fehérje vízoldható koleszterin-horgonymolekulához történő konjugálásának optimalizálása.
3. A fluoreszcens horgony molekula és a protein konjugátumának sejtmembránba juttatása.
4. A sejtmembránba jutott horgonymolekulák mennyiségének meghatározása egy tríciummal jelzett horgonymolekula segítségével.
5. A teljes hosszúságú prion protein horgonyzása a sejtmembránhoz fluoreszcens horgonyolekulán keresztül.
6. Fehérjék sejtmembránba történő horgonyzása koleszterin horgonymolekulán keresztül sejt felszíni klikk reakcióval.

3. Alkalmazott anyagok, módszerek

Vizsgálataink során analitikai tisztaságú vagy a kereskedelmi forgalomban elérhető legjobb minőségű reagenseket és oldószereket alkalmaztunk. Az analitikai vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatokat (TLC) 5×10 cm-es szilikagél 60 F₂₅₄-gyel borított üveg lemezekkel végeztük, a foltok előhívása UV fényel, ninhidrinnel vagy foszformolibdénsavval történt. A flash kromatográfiás tisztítások szilikagél 60-nal (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország) lettek végrehajtva. Az analitikai HPLC-s elválasztásokat és a szemipreparatív HPLC-s tisztításokat Meck-Hitachi LaChrom rendszerrel végeztük. Az optikai forgatásokat Optical Activity AA-5 automata polariméterrel 589.4 nm-en vizsgáltuk.

A szintetizált anyagok szerkezetmeghatározása 1D (¹H, ¹³C) és 2D (HSQC, HMBC) NMR spektrumok felvételével történt, melyeket Bruker Spectra DRX 500 MHz spektrométerrel rögzítettünk. A koleszterin proton és szén NMR hozzárendeléseit irodalom alapján végeztük. A szintetizált anyagok molekulatömegeit ESI-MS analízissel határoztuk meg Finnigan TSQ 7000 vagy Bruker reflex III MALDI-TOF tömegspektrométeren. A FT-IR spektrumokat Bio-Rad Digilab Division FTS-65A/896 FT-IR spektrométerrel rögzítettük 4000–400 cm⁻¹ közötti intervallumban, 4 cm⁻¹ optikai felbontással gyémánt ATR próbával vagy KBr pasztillában.

A gerjesztési és emissziós spektrumokat Agilent Cary Eclipse fluoreszcens spektrométeren vettük fel. Az ECD spektrumok elkészítéséhez Jasco (Tokyo, Japan) J815 spektropolarimétert alkalmaztunk Peltier hőmérséklet szabályozóval, 25°C-on 100 nm/s szken sebességgel és 1 mm-es fényúttávolsággal kvarz küvettával.

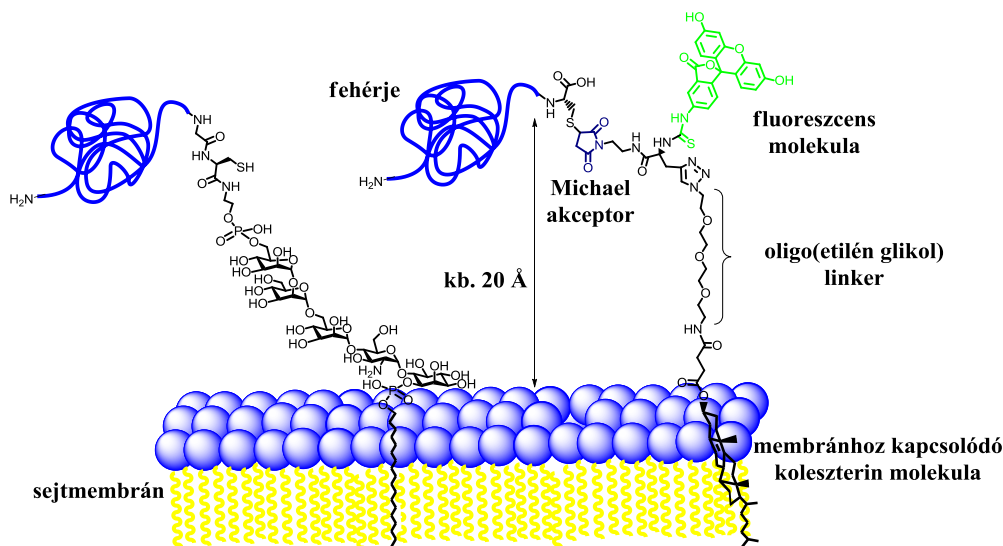
Az *in vitro* biológiai vizsgálatokat, SH-SY5Y (ATCC: CRL-2266) humán neuroblasztóma sejteken végeztük, amelyeket 37°C –on 5% CO₂-dal dúsított atmoszférában tartottunk fenn. A fluoreszcens horgonnyal és a horgony-fehérje konjugátumával kezelt sejteket Olympus IX81 konfokális mikroszkóppal és FluoView 500 szoftverrel vizsgáltuk. A fluoreszcens membrán festések vizsgálatához lyukanként 20000 sejtet tettünk 8 lyukú lemezre (Lab-Tek II Chambered coverglass), majd 48 h inkubációt követően, a sejteket 30 percig kezeltük a horgonnyal vagy horgony-fehérje konjugátummal. A kezelés és az inkubáció után a sejteket mostuk szérumentes médiummal, majd a sejtmagokat festettük DRAQ5-val 5 perces kezelés alatt.

4. Az eredmények összefoglalása

4.1. Fluoreszcens koleszterin molekulák tervezése, szintézise és optimalása

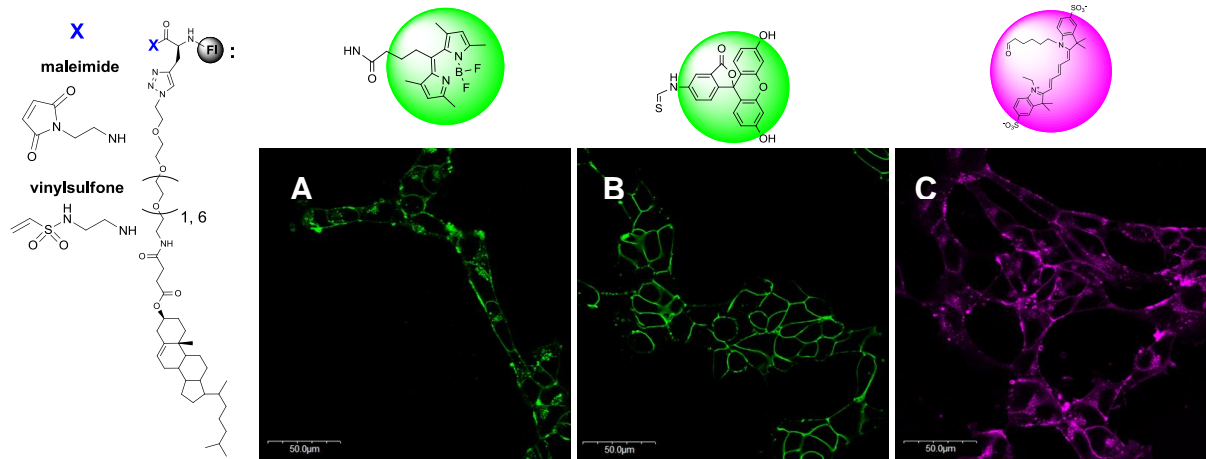
A munka fő célja egyszerű szerkezetű GPI horgony utánzó molekulák szintézise, valamint egy új technika kidolgozása a horgony-fehérje konjugátum kialakításához, továbbá a félszintetikus horgony-fehérje konjugátum élő sejtmembránba jutattása volt. Az elkészített lipidált fehérje hasznos lehet a membrán-horgonyzott fehérjék tanulmányozásához.

A cél elérése érdekében fluoreszcens koleszterin származékokat terveztünk és szintetizáltunk. A koleszterin alkalmazása mint a GPI molekula hidrofób membrán horgonya azzal az eredménnyel jár, hogy a fehérjekonjugátumot a koleszterinben gazdag lipid raftokba irányítja, ahol a GPI-APs-ok felhalmozódnak. A molekulát konvergens szintézissel készítettük; az egyik fő elem a molekula fejcsoportjában az ortogonális, trifunkciós linker propargil glicin (Pra) aminosav származék, a másik a horgony amfifil koleszterin származéka, ami egy koleszterin hemiszukcinát és amino-oligo(ethylene glikol) azid összekapcsolásával lett elkészítve. A poliéter hosszát úgy választottuk meg, hogy a horgony molekula hasonló legyen a GPI glikán vázához, mert ez a hidrofil szakasz felelős azért, hogy a horgonyzott fehérjét az extracelluláris térben megfelelő távolságra tartsa a membrántól (2. ábra). A szintézis során egy fluoreszcens molekulát kapcsolunk a Pra aminocsoportjához és egy Michael akzeptort a karboxilcsoportjához. A Michael akceptorhoz a C-terminális végén Cys-nel bővített fehérje tud kapcsolódni, a sejtmembránhoz horgonyzott koleszterines lipoprotein közvetlen fluoreszcens mikroszkópos tanulmányozását pedig a fluoreszcens rész teszi lehetővé. Végül a horgonyok a Pra alkin és a koleszterin azid közti azid-alkin cikloaddíciós reakción keresztül készültek el.



2. ábra. A GPI horgony összehasonlítása a tervezett félszintetikus analóggal.

A koleszterin horgony fiziokémiás tulajdonságainak optimalizációjához három különböző polaritású és spektrális tulajdonságú fluoreszcens molekulát próbáltunk ki (BODIPY, fluoreszcein és Cy5) (3. ábra). A horgonyok sejtmembrán festésre való alkalmazhatóságát fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk SH-SY5Y sejteken. A koleszterines horgonyok oldhatósága vizes pufferben döntő fontosságú volt mind a hatékony fehérje konjugációkhoz, mind a fehérje-horgony konjugátum sejtmembránba juttatásához. Az eredmények azt mutatták, hogy a fluorofórok hidrofíl karaktere felelős a horgonyok vízdoldhatóságáért, míg a poláris oligoéter távtartó méretének növelése csak csekély polaritás növekedést okoz. A BODIPY-jelzett horgonynak volt a legkisebb az oldhatósága poláris közegben, azonban homogén membránfestés volt elérhető a hidrofób koleszterin lipid poláris β -ciklodextrines zárványkomplexének kialakítása után. A fluoreszceinnel jelzett horgonymolekula diizopropilammónium fenolát só képzése után teljesen vízdoldható lett és így homogén sejtmembrán festés volt detektálható β -ciklodextrin alkalmazása nélkül. Azonban a fluoreszcein pH függő fluoreszcenciája és az alacsony fotostabilitás miatt kipróbáltuk a nagy polaritású, fotostabilitású és fényességű szulfonált Cy5 fluorszcens festéket is. A Cy5-horgonnyal homogén membránfestés volt detektálható százszor alacsonyabb koncentrációban, mint a fluoreszceines származék esetén. A fehérje konjugáció szempontjából két különböző Michael akceptort, a vinilszulfont és a maleimidet alkalmaztuk. A reaktivitásuk és szelektivitásuk különböző, ami azért hasznos, mert a különböző fehérjék horgonyhoz konjugálásához különbözően pufferált körülmények kellene. A Michael addíció egy Cys-t tartalmazó modell peptiden keresztül lett optimálva, melyből az látszott, hogy a maleimid sokkal reaktívabb pH 7.5 alatt, viszont a vinilszulfon sokkal szelektívebb Cys-re pH 7.5 felett.

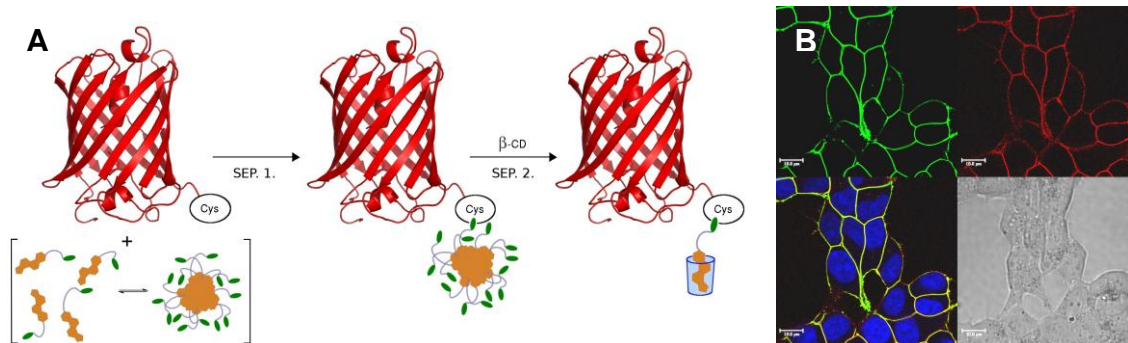


3. ábra. Asszociáció SH-SY5Y sejt membránnal A) BODIPY-jelzett horgony β -ciklodextrines zárványkomplexével, 1 μ M-os koncentrációban B) Fluoreszcein-jelzett horgony esetében 1 μ M-al C) Cy5-jelzett horgony esetében 10 nM –al.

Mielőtt fehérjéhez kapcsoltuk volna a horgonyt, fontos volt a koleszterin észter hidrolitikus stabilitásának vizsgálata. A koleszterin észter stabilnak bizonyult a hidrolízissel szemben fiziológias pH-n. Továbbá a membránfluoreszcencia állandó maradt a hosszabb ideig tartó kezelés esetén is, amiből az látszott, hogy az enzimatis hidrolízissel szemben is stabil a molekula.

4.2 A koleszteril-mCherry előállítása és sejtmembránhoz irányítása

A fehérje Michael addícióval végbemenő konjugációját a fluoreszcens horgonymolekulához a C-terminálisán Cys-nel bővített rekombináns mCherry fluoreszcens fehérjén keresztül vizsgáltuk. Az mCherry egy piros fluoreszcens fehérje, aminek a zöld fluoreszcens horgonyhoz történő konjugációja kettős fluoreszcens lipoproteint eredményez. Az mCherry egy érzékeny szerkezetű fehérje, ami ha megsérül, elveszíti fluoreszcenciáját. Ha a konjugátum a sejtmembránba juttatható úgy, hogy a piros és a zöld fluoreszcencia együttesen detektálható, akkor a fehérjét a természetes szerkezetének megőrzése mellett sikeresen horgonyoztuk a zöld fluoreszcens horgonymolekulán keresztül a sejtmembránhoz. Az mCherry horgonyhoz kapcsolásával egy vegyes micellás konjugátum jött létre, mert az amfifil koleszterines horgony micellás formában oldódik vizes közegben. A tiszta horgony-fehérje konjugátumot egy kétlépéses mértékizárásos kromatográfia alkalmazásával lehetett elkészíteni β -ciklodextrin alkalmazásával, ami szétbontja a vegyes micellás asszociátumokat. Az így elkészített β -ciklodextrines mCherry-horgony zárványkomplexben a koleszterin lipid

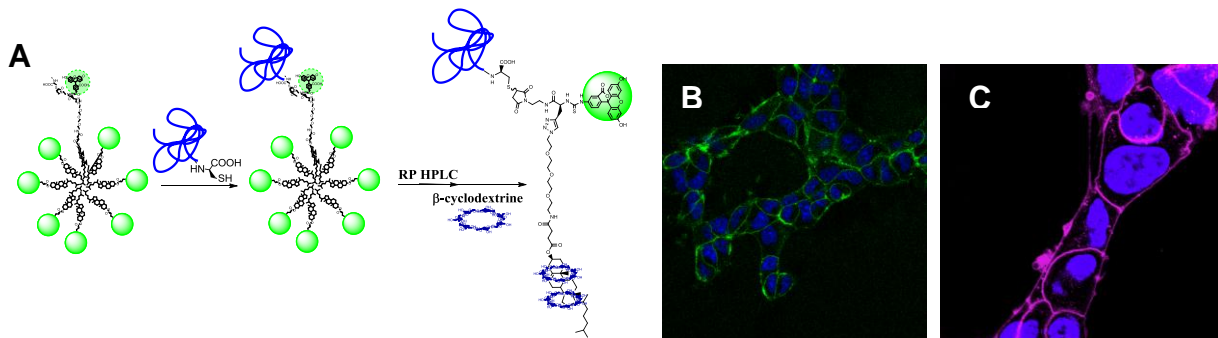


4. ábra. (A) A tiszta, lipid felesleg nélküli mCherry-horgony konjugátumának előállítás. A sematikus ábrán a zöld fejcsoportok a fluoreszcens horgony molekulát reprezentálják, a β -ciklodextrint a kék pohár szimbolizálja, SEP.1. és SEP.2. a méretkizárásos kromatográfia lépései. B) SH-SY5Y sejtek konfokális lézer scanning és differenciál interferencia kontraszt (DIC; jobb alsó kép) képe 30 perces kezelést követően, 37°C-on, 1 μ M –os koncentrációban az mCherry-horgony β -ciklodextrinnel alkotott zárványkomplexével. A képeken a fluoreszcein zöld, az mCherry piros, a sejtmagok pedig kék színben láthatóak. Az egymásra vetített (bal alsó) képen a sárgás szín reprezentálja az mCherry és a fluoreszcein jelenék kolokalizációját.

rész oldatban marad a sejttenyésztő médiumban és a fehérjét nem denaturálja. A fehérje-horgony konjugátum tisztaságát SDS-gélelektroforézissel bizonyítottuk, a CD spektroszkópiás mérések pedig a fehérje természetes szerkezetének jelenlétét igazolták. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok, elsősorban a zöld és piros fluorofórok kolokalizációja igazolta, hogy a piros fluoreszcens mCherry fehérje a zöld fluoreszcens horgonymolekulán keresztül a sejtmembránhoz horgonyzódott (4. ábra).

4.3 A teljes hosszúságú PrP konjugálása a fluoreszcens horgonyhoz

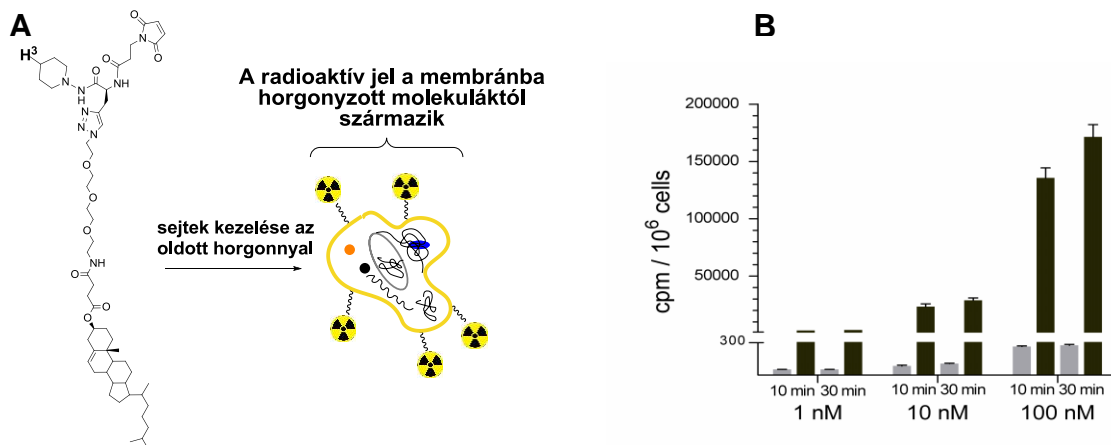
Az egyik leginkább vizsgált GPI horgonyzott fehérje a prion protein (PrP), melyet a fluoreszcens horgonyhoz kapcsolunk, valamint vizsgáltuk, hogy ez a horgonymolekula alkalmas-e a PrP-horgony konjugátumának sejtmembránba juttatására. Ez a modell rendszer azért fontos, hogy a PrP eddig még nem ismert funkcióit, különösen a prionbetegséget okozó membrán horgonyzott PrP konformációs változását vizsgálni lehessen, valamint fontos lenne megtudni, hogy mi a GPI horgony szerepe ebben a betegségben. Ezért a rekombináns teljes hosszúságú egér PrP-t konjugáltuk a fluoreszcens horgonymolekulához, majd következett a konjugátum tisztítása és sejtmembránba juttatása (5. ábra). A PrP-fluoreszcens horgony konjugátumának tisztaságát az SDS-gélelektroforézis, a fehérje szerkezetét pedig a CD spektroszkópiás mérések igazolják.



5. ábra. A) A tiszta mPrP-horgony konjugátum elkészítése. B)-C): Konfokális lézer scanning mikroszkópos képek SH-SY5Y sejtekről B) tiszta S231C mPrP(23-231)-fluoresceines horgony konjugátummal történő 30 perces kezelést követően ($3 \mu\text{M}$ -os koncentrációban), C) S231C mPrP(23-231)-Cy5 horgony konjugátummal történő kezelést követően (10 nM -os koncentrációban).

4.4 A sejtmembránba horgonyzott molekulák mennyiségi meghatározása

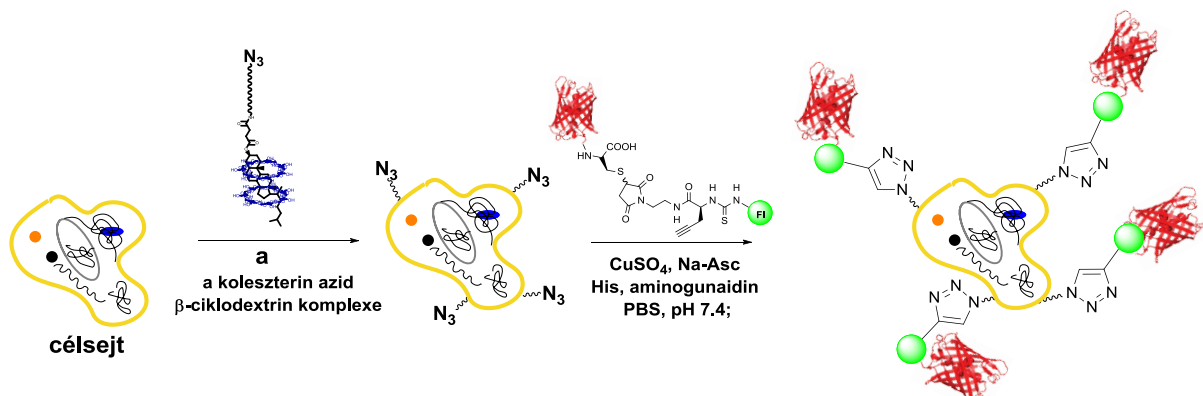
A sejtmembránba horgonyzott molekulák mennyiségi meghatározása céljából egy tríciummal jelzett horgony analógot készítettünk el. Hasonlóan a fluoreszcens horgonymolekulákhoz a radioaktív jelzés is a horgony fejcsoportján helyezkedik el. A szintézis után lemértük a triciált horgony speciális aktivitását, ami 1.37 TBq/mmol -nak adódott. Amikor az SH-SY5Y sejteket $[^3\text{H}]$ koleszterin horgonnyal kezeltük, egy koncentráció- és időfüggő membránba épülés volt megfigyelhető (6. ábra).



6. ábra. A) A triciált horgonyt sejtenyésztő médiumban oldottuk fel, majd a sejtekhez adtuk. A kezelés után a sejteket lemostuk friss médiummal és a sejtmembránba horgonyzott molekulák a kettősrétegben maradtak. Ezután a sugárzás detektálható volt a membránba horgonyzott molekuláktól. (B) A $[^3\text{H}]$ koleszterines horgony SH-SY5Y sejtmembránba jutása. A sejteket inkubáltuk a $[^3\text{H}]$ aminopiperidinnel (szürke oszlopok) különböző koncentrációban és a $[^3\text{H}]$ koleszterines horgonnyal (fekete oszlopok) $10 \mu\text{M}$ β -ciklodextrin jelenlétében. Ezután folyadék scintillációs méréseket hajtottunk végre a mosott és tripszinezett sejtekkel. A szórások három párhuzamos mérés SEM értékét reprezentálják. A kezelés 100 nM -os koncentrációban 30 perces inkubációval történt és azt tapasztaltuk, hogy 2×10^6 $[^3\text{H}]$ koleszterin horgony molekula jutott a SH-SY5Y sejtek membránjába.

4.5 Fehérje horgonyzása a membránkettősréteghez sejtfelszíni klikk reakcióval

Hogy elkerüljük a koleszterines lipoproteinek vegyes micellás asszociátumainak tisztítását és hogy minimalizáljuk a fehérje kicsapódásának kockázatát, egy alternatív konvergens szintézisutat dolgoztunk ki. Ebben a módszerben először a fluoreszcens Pra linkert konjugáltuk a fehérje C-terminálisához, majd ezt követte egy rézkatalizált acid-alkin cikloaddíciós reakció (CuAAC) a sejtfelszínén található, már előre a membránba jutott koleszterin aziddal. Ebben az esetben a fluoreszcens lipoprotein *in situ* képződik a sejtfelszínen. Hasonlóan a β -ciklodextrines lipoprotein membránba juttatásához, el nem reagált fluoreszcens lipid nem lesz a plazmamembránban és a fluoreszcens jel minden kétséget kizáróan csak a sejtfelszínen előállított horgonyzott lipofehérjétől származik. Ezzel a technikával sikeresen horgonyoztuk a membránhoz az mCherry piros fluoreszcens fehérjét (7. ábra). A His és aminoguanidin mint reakciósebesség gyorsító ágensek használatával az élő sejteket megvédtük a CuAAC reakció citotoxikus hatásaitól és ezen a körülményen az mCherry protein látszólag nem denaturálódott.



7. ábra. A CuAAC reakció sematikus ábrázolása. Az azidokoleszterin SH-SY5Y sejtmembránba juttatása (a) 30 μ M koleszterin azid- β -ciklodextrines zárványkomplexében, szérumentes médiumban RT, 30 perc, ezek után 60 μ M-os inkubáció mCherry-fluoreszcens alkin konjugátummal 50 μ M CuSO₄, 500 μ M NaAsc, 100 μ M His, 500 μ M aminoguanidin jelenlétében, PBS (pH7.4), 30 perc.

5. Összefoglalás

Doktori értekezésem témája néhány fluoreszcens GPI horgony analóg molekula szintézise és fehérjéhez kapcsolása. A fehérjék lipidációja után a fehérje-horgony konjugátumok tisztítása következett, majd horgonyzásuk az élő sejtmembránhoz oly módon, hogy a természetes funkciójuk és szerkezetük megmaradjon.

A későbbi GPI horgonyzott fehérjék tanulmányozása érdekében fontos szempont lehet, hogy ismerjük a membránba jutott horgonymolekulák pontos mennyiségét, ezért egy trícíált horgony analógot készítettünk el, majd megvizsgáltuk az idő- és koncentrációfüggő membránba épülését. A detektált radioaktív jelből meg tudtuk határozni, hogy mennyi horgonymolekula került a sejtmembránba.

A fehérje horgonyzását a sejtmembránra egy egyszerűbb úton, sejtfelszíni klikk reakció által is megvalósítottuk. Ebben a folyamatban nincs szükség több tisztítási lépésre, amely növelné a fehérje denaturációjának kockázatát. Ebben a módszerben a fluoreszcens hidrofíl alkin molekulát kapcsoltuk a fehérjéhez és ezt a konjugátumot reagáltattuk CuAAC reakcióval a már sejtmembránba horgonyzott koleszterin aziddal, így megkaptuk a horgonyzott fehérjét.

A fő előnyei a módszereinknek hogy a β -ciklodextrin alkalmazása lehetővé teszi, hogy a lipid rész ne denaturálja a fehérjéket, és így sejtekre lehessen juttatni a konjugátumot membránt degradáló detergensnek használata nélkül. Továbbá a fluoreszcens vagy a radioaktív jelek egyértelműen a horgonyzott molekulához rendelhetőek, így a horgonyzott fehérjék tanulmányozhatóak.

Összességében ez az értekezés komplett fehérje sejtmembrán horgonyzásokat mutat be, amelyekkel később hatékonyan lehet vizsgálni a GPI horgonyzott PrP és más fehérjék tulajdonságait.

Az értékezés alapjául szolgáló publikációk:

- I. **Schäfer B.**, Orbán E., Borics A., Huszár K., Nyeste A., Welker E. and Tömböly C. (2013) Preparation of Semisynthetic Lipoproteins with Fluorescent Cholesterol Anchor and Their Introduction to the Cell Membrane with Minimal Disruption of the Membrane. *Bioconjugate Chemistry* 24, 1684-1697.

- II. **Schäfer B.**, Orbán E., Kele Z., Tömböly Cs. (2015): Tritium labeling of a cholesterol amphiphile designed for cell membrane anchoring of proteins. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 58, 7-13.

- III. **Schäfer B.**, Németh D., Orbán E., Corbani M., Borics A., Hunyadi-Gulyás É. and Tömböly C. (2015) Fluorescent Cholesterol Amphiphils are Efficient Cell Surface Engineering Agents and GPI Anchor Mimetics. (beküldve)

Poszterek, konferenciakiadványok:

Schäfer, B., Fodor, E., Welker, E., Tömböly, Cs. Synthesis of a glycosylphosphatidylinositol mimetic for prion protein anchoring. Joint Meeting on Medicinal Chemistry, 24-27 June 2009, Budapest, Hungary, pp 217.

Schäfer, B., Fodor, E., Zoltán, K., Welker, E., Tömböly, Cs. Synthesis of a glycosylphosphatidylinositol mimetic molecules. Conference of Hungarian Chemists, 31 June-2 July 2010, Hajdúszoboszló, Hungary. pp 137.

Schäfer, B., Majer, M., Welker, E., Tömböly, Cs. Semisynthesis of membrane associated proteins. Conference of Chemists, 22-25 May 2011, Sopron, Hungary. pp 191.

Tömböly, Cs., Majer, M., **Schäfer, B.**, Welker, E. Semisynthesis of cell membrane anchorable Prion Protein derivatives. 2011. Conference of Chemists, 22-25 May 2011, Sopron, Hungary. pp 72.

Majer, M., **Schäfer, B.**, Welker, E., Tömböly, Cs. Membrane anchoring of the prion protein with synthetic GPI-mimetics. European Conference on Chemistry for Life Sciences, 31 August-3 September 2011, Budapest, Hungary. pp 311.

Schäfer, B., Orbán, E., Vincze, N., Tömböly, Cs. 2012. Preparation of fluorescent cholesterol derivatives as GPI anchor substitutes EMBL Conference, 26-29 September 2012, Heidelberg, Germany. pp 86.

Schäfer, B., Orbán, E., Vincze, Cs., Borics, A., Tömböly, Cs. Protein lipidation with fluorescent cholesterol amphiphils: a useful tool for visualising membrane associated proteins EMBL Conference, 26-29 September 2012, Heidelberg, Germany. pp 268.