

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

KUGYELKA RÉKA

**Diszulfidhidat tartalmazó peptid-
konjugátumok stabilitása a citoszolban –
szintézis, kémiai és spektrális jellemzés,
sejtfelvétel**

Témavezetők:

Dr. Bánóczy Zoltán, tudományos munkatárs

Dr. Hudecz Ferenc, egyetemi tanár

Szerves Kémiai Tanszék

ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport

——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———

——— Természettudományi Kar ——

— Budapest, 2011 —

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés.....	5
1.1. Kalpain	5
1.1.1. Kalpain enzimcsalád – szerkezet	5
1.1.2. A kalpain enzimek aktiválása és ennek szabályozása.....	7
1.1.3. Fiziológias funkciók.....	8
1.1.4. Betegségek kialakulásában játszott szerepük	9
1.1.5. Kalpasztatin	9
1.2. Sejtpenetráló peptidok.....	11
1.2.1. Penetratin.....	12
1.3. Fluoreszcens jelzés	13
1.4. Szilárd-fázisú peptidszintézis	18
2 Célkitűzés.....	22
3 Kísérleti rész	23
3.1 Peptidszintézis.....	23
3.1.1 Fluoresceinnel jelölt penetratin szintézise	23
3.1.2 CysKalpC peptid jelölése.....	25
3.1.3 Kettős jelölést tartalmazó konjugátum előállítása	26
3.2 Peptidszármazékok és konjugátum tisztítása.....	26
3.3 Az előállított peptidszármazékok és a konjugátum kémiai jellemzése	27
3.4 Spektroszkópiai vizsgálat.....	27
3.5 A konjugátum stabilitásának vizsgálata.....	27
3.6 Konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatok	28

4	Eredmények.....	29
4.1	A cf-penetratinCys-CysKalpC-rod konjugátum szintézise.....	29
4.1.1	cf-penetratinCys peptid szintézise	29
4.1.2	CysKalpC-rod.....	30
4.1.3	A cf-penetratinCys-CysKalpC-rod konjugátum előállítása	30
4.2	A konjugátum spektrális tulajdonságai	33
4.3	Stabilitásvizsgálat	35
4.4	A konjugátum sejtbejutásának vizsgálata konfokális mikroszkóppal.....	37
	Összefoglalás	41
	Köszönetnyilvánítás.....	42
	Irodalomjegyzék	43

Rövidítésjegyzék

Boc	<i>terc</i> -butiloxikarbonil-
BOP	benzotriazol-1-il-oxi-trisz-dimetil-amino-foszfónium hexafluoro-foszfát
^t Bu	<i>terc</i> -butil-
Bzl	benzil-
cf	5(6)-karboxifluoreszcein (további rövidítés: fluoreszcein)
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én
DCM	diklórmétán
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco módosított Eagle médium)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DTT	1,4-ditiotreitol
EDANS	<i>N</i> -(2-aminoetil)-5-amino-1-naftalinszulfonsav
EDT	1,2-etánditiol
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry (elektrospray ionizációs tömegspektrometria)
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil-
FRET	Förster Resonance Energy Transfer (Förster rezonancia energiatranszfer)
Hca	4-(7-hidroxikumaril)-ecetsav
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
RP-HPLC	reverse phase high performance liquid chromatography (fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)
MBHA	4-metilbenzhidrilamin (gyanta)
Npys	3-nitro-2-piridin-szulfenil-
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil-
rod	5(6)-karboxi-tetrametilrodamin (további rövidítés: rodamin)
TFA	trifluor-ecetsav
Trt	tritol-

1 Bevezetés

Az orvostudomány fejlődése eredményeképpen mára számos, korábban gyógyíthatatlannak hitt betegség kezelése vált elérhetővé. Azonban továbbra is vannak olyan megbetegedések, melyekre még keresik a gyógymódot. A gyógyszerfejlesztés egyik lehetséges módja új hatóanyagok keresése, ez azonban idő- és pénzigényes folyamat. További lehetőség a már meglévő hatóanyagok optimalizálása, például a szerkezet módosításával, vagy célzott bejuttatással. Utóbbi különböző hordozók segítségével lehetséges, például nanorészecskék, liposzómák, polimerek. A sejtpenetráló peptidek közelmúltbeli felfedezése után adódott a lehetőség, hogy a hatóanyagot ezekhez az oligopeptidekhez kapcsolják kovalens kötással, így fokozva annak célba jutását.

Jelenleg a sejtpenetráló peptidek sejtbefutásának pontos mechanizmusa nem ismert, azonban bővebb ismeretek birtokában, a hatóanyag - sejtpenetráló peptid konjugátumok tulajdonságainak célzott tervezésével a konstrukció hatékonysága tovább növelhető.

Munkám során sejtpenetráló peptideket tartalmazó konjugátumok vizsgálatával foglalkoztam, előállítottam a konjugátumokat, tanulmányoztam sejtbefutásuk módját, sejten belüli sorsukat.

1.1 Kalpain

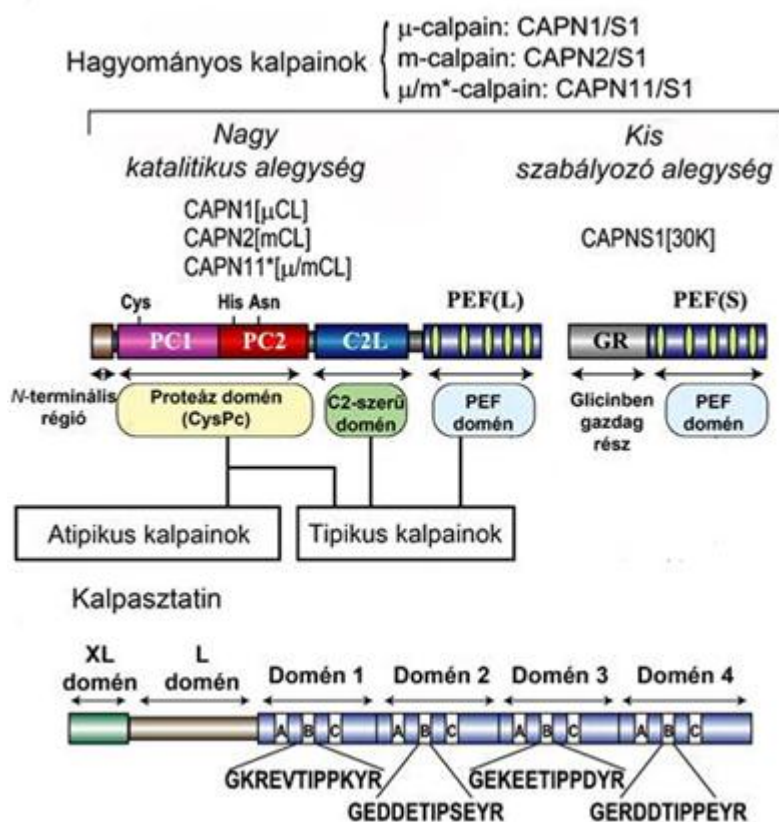
1.1.1 Kalpain enzimes család – szerkezet

A kalpain enzimes családot citoszolban található, Ca^{2+} -függő cisztein proteázok alkotják, melyek katalitikus helye hasonló a papain-szerű proteázokéhoz [1]. Először 1964-ben Guroff fedezett fel patkányagyban egy „neutrális, kalcium-aktivált proteázt”, melyet ma μ -kalpain néven ismerünk [2]. Tiszta kalpaint csak 1978-ban sikerült előállítani [3]. Jelenleg 15 gén ismert a humán genomban, mely különböző kalpain homológokat kódol [4]. Szekvencia-adatbázisokból (PDB, UniProt, GenBank) kiderül, hogy a kalpaint kódoló gének elterjedtek az élő szervezetek között. A legtöbb eukariótában jelen vannak, azonban az ismert genommal rendelkező baktériumok 95%-ában nem fordulnak elő (pl. *Escherichia Coli*, archeabaktériumok).

Hagyományos kalpainoknak nevezzük az m-és μ -kalpaint (CAPN1/S1 illetve CAPN2/S1), valamint a csirkéből izolált „m/ μ -kalpaint” (CAPN11/S1) [5]. Az m-és μ -kalpain neve az aktiváláshoz szükséges Ca^{2+} -koncentrációra utal, az m-kalpainnál ez millimól, a μ -kalpainnál mikromól nagyságrendű. A hagyományos kalpainok egy nagy katalitikus alegységből (kb. 80

kDa) és egy kis szabályozó alegységből (kb. 30 kDa) álló heterodimer fehérjék. A nagy katalitikus alegység 4 doménre osztható: *N*-terminális régió, proteáz domén (CysPc), C2-szerű domén (C2L) illetve egy „penta-EF-hand” domén (PEF(L)). A kis szabályozó alegység egy glicinben gazdag doménből (GR) és egy „penta-EF-hand” doménből (PEF(S)) áll.

A kalpain enzimeket csoportosíthatjuk szerkezetük, illetve expressziós profiljuk alapján (1. ábra). Szerkezetük szerint lehetnek tipikus, illetve atipikus kalpainok. Ezek közös szerkezeti eleme a nagy katalitikus alegységben található proteáz domén (CysPc). Az atipikus kalpainok nem tartalmazzak C2L és/vagy PEF domént. Az atipikus kalpainokon belül további alcsaládokat különböztetnek meg, eukariótákban ezek PalB, SOL és DEK1 alcsaládok.



1. ÁBRA: Kalpain enzimes család tagjainak vázlatos szerkezete ([4] módosítva)

A tipikus kalpainok szerkezete, melyek nem tartalmazzak kis szabályozó egységet, megegyezik a hagyományos kalpainok nagy katalitikus alegységének szerkezetével. Az emlősökben található kalpainok közül 9 enzim tipikus kalpain, az m-és μ -kalpain nagy katalitikus alegysége (CAPN1 illetve CAPN2) mellett a CAPN3, CAPN8, CAPN9, CAPN11, CAPN12, CAPN13 és a CAPN14.

Génexpressziós profil alapján szövetspecifikus, illetve minden szövetben jelen levő kalpainokat különböztetünk meg (1. táblázat). A 15, emlősökben megtalálható kalpain közül 6 szövetspecifikus: CAPN3 (vázizmok), CAPN6 (placenta és embrió harántcsíkolt izom), CAPN8 és CAPN9 (emésztőszervrendszer), CAPN11 (herék), CAPN12 (szórtüsző).

	gén	név	szerkezet	expresszió	kórkép
	<i>CAPN1</i>	CAPN1	tipikus	minden szövet	stroke, sclerosis multiplex
	<i>CAPN2</i>	CAPN2	tipikus	minden szövet (kivéve vörösvértest)	Alzheimer, Parkinson
	<i>CAPN3</i>	CAPN3	tipikus	vázizom	végtagövi izomdisztrófia
	<i>CAPN5</i>	CAPN5	atipikus	minden szövet	PCOS
	<i>CAPN6</i>	CAPN6	atipikus	placenta, embrió harántcsíkolt izom	nincs adat (n/a)
	<i>CAPN7</i>	CAPN7	atipikus	minden szövet	Huntington-kór
katalitikus alegység	<i>CAPN8</i>	CAPN8	tipikus	bélcsatorna	n/a
	<i>CAPN9</i>	CAPN9	tipikus	bélcsatorna	gyomorrák
	<i>CAPN10</i>	CAPN10	atipikus	minden szövet	diabetes mellitus
	<i>CAPN11</i>	CAPN11	tipikus	herék	n/a
	<i>CAPN12</i>	CAPN12	tipikus	szórtüsző	Alzheimer-kór
	<i>CAPN13</i>	CAPN13	tipikus	minden szövet	n/a
	<i>CAPN14</i>	CAPN14	tipikus	minden szövet	n/a
	<i>CAPN15</i>	CAPN15	atipikus	minden szövet	hályogképződés
	<i>CAPN16</i>	CAPN16	atipikus	minden szövet	n/a
kis alegység	<i>CAPNS1</i>	CAPNS1	-	minden szövet	n/a
	<i>CAPNS2</i>	CAPNS2	-	minden szövet	n/a

1. TÁBLÁZAT: A kalpain enzimcsalád tagjai ([12], átdolgozva)

1.1.2 A kalpain enzimek aktiválása és ennek szabályozása

A kalpain CysPc doménjében található a „katalitikus triád” – Cys105, His262, Asn286 [6]. A CysPc proteáz domén további két aldoménre (PC1 és PC2) osztható, a Cys105 a PC1 aldoménben, míg a His262 és az Asn286 a PC2 aldoménben található. Inaktív, Ca^{2+} -mentes állapotban a két aldomén távol van egymástól, a katalitikus triád tagjai nem tudják kialakítani az aktív centrumot. Az m-kalpain heterodimerben legalább 4 Ca^{2+} -kötő hely van, a PEF(L) és

PEF(S) kalmodulin-szerű domének, a C2L doménben található savas hurok régió, valamint a CysPc domén. A Ca^{2+} kötődésekor lejátszódó térbeli változások eredményeképpen a PC1 és PC2 aldomén közel kerül egymáshoz, az enzim aktiválódik. Az *in vitro* kutatások során mért, m- illetve μ -kalpain aktiválásához szükséges Ca^{2+} -koncentrációk sokkal nagyobbak, mint a sejtekben normál fiziológiás körülmények között elérhető 50-300 nM [1]. A jelenség magyarázatára többféle mechanizmust feltételeznek, melyek *in vivo* fokozzák az enzimek Ca^{2+} -érzékenységet, például az enzim autolízise [7], foszforilációja [8], valamint foszfolipidek [9] illetve aktivátor fehérjék [10] enzimhez kötődése.

1.1.3 Fiziológias funkciók

A kalpain enzimsalád fiziológiai funkciói sokfélék, de az egyes enzimek pontos szerepe nem minden esetben ismert. A kalpain enzimek a citoszolban, semleges közegben Ca^{2+} megkötésével csupán korlátozott számú helyen hasítanak, ezért a többi intracelluláris proteolitikus enzimrendszertől (ubiquitin-proteaszóma; lizoszóma; kaspázok) eltérően nem degradálják a szubsztrátjaikat, hanem inkább szabályozzák szerkezetüket és/vagy aktivitásukat (ún. modulátor proteázok).

Részt vesznek különböző kalcium-ion által szabályozott sejten belüli folyamatokban [11], mint például szignáltranszdukció, sejtosztódás és differenciálódás, membránfúzió, vérlemezke-aktiváció [12], sejtciklus [13] és génexpresszió szabályozása, apoptózis [14], exocitózis [15], fehérje turnover, sejt adhézió és mobilitás [11]. A kalpain szerepe leginkább az utóbbi két folyamatban ismert. Az enzim szubsztrátjai között sok, adhéziós komplexben fontos szerepet játszó fehérje is van. Így az enzim képes megszüntetni a sejtmembrán és a citoszkeleton közti kapcsolatot (sejtmozgáskor a sejt „hátlján” az adhéziós komplex bontásával), de mozgó (spreading) sejtekben egy integrin-tartalmú cluster létrehozásában is részt vehet, új adhéziós komplexet létrehozva. A két látszólag ellentétes folyamat molekuláris mechanizmusa nem ismert, de valószínű, hogy a mozgásban lévő polarizált sejtben a kalpain eloszlása aszimmetrikus a sejt „eleje” és „hátlja” között (részletes összefoglaló: [1, 11]).

A kalpain enzimek az egyedfejlődésben is fontos szerepet játszanak [5, 16]. CAPN4 génkiütött egereket vizsgálva megállapították, hogy ha fejlődés során se az m-, se a μ -kalpain nem fejeződik ki, az embrió 11 és fél napos korában elpusztul kardiovaszkuláris és vörösvértest-képződési zavarok miatt.

1.1.4 Betegségek kialakulásában játszott szerepük

Az előzőek alapján a kalpain enzimek megváltozott működése különböző kórképek kialakulásához vezethet (1. táblázat). A betegségek kialakulásában mind a kalpain alul-, mind a túlműködése (downregulation, upregulation) szerepet játszhat [12, 17].

Túlzott kalpain aktivitás esetén neuromuszkuláris és neurodegeneratív betegségek alakulhatnak ki, például Alzheimer-kór, Huntington-kór, Parkinson-kór, sclerosis multiplex, Duchenne és Becker muszkuláris disztrófia, végtagövi izomdisztrófia, hályogok képződése. Ischaemiás stroke, traumás agysérülés, illetve neurodegeneratív megbetegedések esetén a Ca^{2+} -szint jelentősen megemelkedik a sejtekben, így a különböző Ca^{2+} -függő proteázok, főként az m – és μ -kalpain túlaktiválódnak. Ennek hatására a sérült idegsejtekben elkezdődik a citoskeleton alkotó, és más citoszolban található fehérjék kontrollálatlan lebontása, ami végül apoptózist eredményezhet. Az Alzheimer-kór során az agyban neurofibrilláris kötegek (NFT) jelennek meg. Ezek egyik fő alkotója a τ -fehérje, melynek hiperfoszforilációját a kalpainok is elősegítik. A legtöbb izomdisztrófiás megbetegedés a Ca^{2+} -háztartás egyensúlyának felborulásával jár együtt. Duchenne és Becker muszkuláris disztrófia esetén a disztrofin (dystrophin) fehérje hibásan működik, ennek következményeként az izmokban megemelkedik a Ca^{2+} -szint, a „túlaktiválódott” kalpain pedig az izomsejtek elhalásához vezet. A kalpain csökkent működése kapcsolatba hozható 2-es típusú diabetes mellitus, policisztás ovárium szindróma (PCOS), a metabolikus szindróma, illetve különböző tumoros megbetegedések kialakulásával.

Sok karcinogenezissel összefüggésbe hozható gén (onkogének, tumorszurpresszorok) által kódolt fehérje szubsztrátja a kalpainnak, például a c-fos, c-jun, p53, p60scr, NF2, az ösztrogén-receptor, illetve a sejtadhézióban szerepet játszó integrin. [18]. Bizonyított, hogy a CALPN9 tumorszurpresszorként működik és összefüggésbe hozható a gyomorrák kialakulásának megakadályozásával [17].

1.1.5 Kalpasztatin

A hagyományos kalpainok egyetlen specifikus, endogén inhibitora a kalpasztatin [19]. A fehérje 4 ismétlődő inhibitor doménből áll (1. ábra), amelyek további három, körülbelül 20 aminosavból álló régióra oszthatók (A, B és C). Ismeretes, hogy a kalpain gátlásában csak a B régió vesz részt [20]. A kalpasztatin szekvenciája a különböző fajok között nem azonos, ezért sokáig nem sikerült megfejteni, hogy hogyan képes specifikusan gátolni a kalpain.

Az m-kalpain 3D szerkezetének felderítése azonban részben magyarázatot adott erre a kérdésre [21]. A kalpain aktív helyéhez a B régió szekvenciájának csupán egy, mind a 4 doménben azonos szakasza (TIPPxYR) köt. Az inhibitor domén nem vesz fel másodlagos szerkezetet, ezáltal a B régió többi részére „kilóg” az aktív helyről, így elkerüli a proteolízist. Az irodalomban már ismert volt, hogy az A és C régióknak nincs inhibitor hatása a kalpainra, azonban Friedrich és munkatársai [22] kimutatták, hogy az A és C régió szekvenciájával megegyező oligopeptidek aktiválják az izolált kalpait. Az SGKSGMDAALDDLITLLG (KalpA peptid) és SKIPIGPDDAIDALSSDFTS (KalpC peptid) régióknak megfelelő peptidek hatását humán vörösvértestből izolált m- és μ -kalpainon vizsgálták. Az enzim aktivitását spektrofotometriásan mérték a LysTyr-AMC szubsztrát segítségével. Az eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy mind az m-, mind a μ -kalpain aktivitását növelte a két peptid jelenléte külön-külön, de sokkal nagyobb aktivitásnövekedést mértek, ha az enzimhez a peptidek 1:1 arányú keverékét adták. A kalpasztatin nem csak inhibitora, hanem szubsztrátja is a kalpain enzimnek, hasítása során az inhibitor hatásért felelős B régió degradálódik, az A és C régió viszont többé-kevésbé változatlan formában visszamaradva kötődik a kalpainhoz [22]. Mivel ezen két fragmens hatására az enzim aktivitása megnő konstans Ca^{2+} -koncentráció mellett, elmondható, hogy a kalpasztatin közvetve képes fokozni a kalpain enzim Ca^{2+} -érzékenységét.

Ahhoz hogy a két izolált, kalpait aktiváló peptidet alkalmazni tudjuk sejten belüli vizsgálatok céljára, be kell őket juttatni a sejtbe, ugyanis a két peptid mérete és felépítése alapján nem képes a sejtek membránján átjutni. Az irodalomban több hivatkozás található a kalpasztatin fehérje inhibitor doménjének/régiójának sejtpenetráló peptid, illetve fúziós fehérjék által segített internalizációjáról [23, 24]. Ezen megfigyelésekből kiindulva Bánóczi és munkatársai előállították a két peptid sejtpenetráló peptiddel alkotott konjugátumait [25]. A KalpA és KalpC peptideket penetratinnal konjugálták amid-, tioéter- vagy diszulfidhid kötés kialakításával. Azt tanulmányozták, hogy a sejt felvétel és az intracelluláris kalpain aktiválás mértéke hogyan függ a komponensek közti kémiai kötés típusától. Az amid- és a tioéter kötés stabil a sejtben belül is, azonban a diszulfid kötéssel összekapcsolt konjugátum sorsa nem egyértelmű. A sejtben belül működő glutation-rendszer redukálhatja a diszulfidhidat [26]. A kalpain-aktivitás vizsgálatokból az derült ki, hogy a konjugáció során a két alkotórész között kialakított kémiai kötés milyensége nem befolyásolta a KalpA és KalpC m-kalpain aktiváló hatását, ugyanakkor a konjugátumok hatásosabbnak bizonyultak a szabad KalpA és KalpC peptideknél. A konjugátumok sejtbejutásának vizsgálatát COS-7 sejteken végezték, mely

mérésekhez fluoreszcensen jelölt konjugátumokat állítottak elő és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálták azok internalizációját. A jelölt konjugátumokban a fluoreszcens molekulát (4-(7-hidroxikumaril)-ecetsav, (Hca)) a penetratin *N*-terminális amino-csoportjához kapcsolták amid kötéssel keresztül. Mindhárom konjugátum internalizálódott, függetlenül a fragmentek között kialakított kémiai kötéstől. A konjugátumok a sejten belül homogén eloszlást mutattak. A diszulfidhíd stabilitásának vizsgálatához duplán jelölt konjugátumot készítettek, a penetratin *N*-terminálishoz ebben az esetben is Hca-t, míg a KalpC peptidben található Lys ϵ -amino-csoportjához 5(6)-karboxifluoresceint (fluorescein, cf) kapcsoltak. A COS-7 sejtekben mindkét fluoreszcens molekula jele megfigyelhető volt, és azonos eloszlását mutatott.

A KalpA és KalpC peptid kalpain aktiváló hatását *ex vivo* is vizsgálták patkányagy-szeleteken [27]. Ebben az esetben a két peptid *N*-terminálisára oktaarginint, mint sejtpenetráló peptidet építettek be. A patkány hippocampusz-szeleteket először egy sejtpenetráló, FRET (Förster Resonance Energy Transfer), elvén működő szubsztráttal kezeltek. A szubsztrátban található EDANS (*N*-(2-aminoetil)-5-amino-1-naftalinszulfonsav) molekula fluoreszcencia jelét csak akkor detektálhatjuk, ha a kalpain enzim elhasítja a szubsztrát molekulát. A csak szubsztráttal kezelt agyszövetek esetén fluoreszcenciát nem észleltek, ha azonban a szubsztráttal történő kezelés után KalpA és KalpC peptidek konjugátumaival is inkubálták az agyszövetet, akkor bizonyos sejtek fluoreszkáltak. Ez arra utal, hogy a sejtekbe jutott szubsztrát molekulát az aktiváló peptidek által aktivált kalpain elhasítja. Továbbá megfigyelték, hogy nagy koncentrációban (100 μ M) alkalmazva az aktiváló peptideket, azok szöveti károsodást okoztak a hippocampuszban, ennek oka valószínűleg a túlzott kalpain aktiválás.

1.2 Sejtpenetráló peptidek

Sejtpenetráló peptidnek azokat a természetes vagy szintetikus oligopeptideket nevezzük, melyek képesek a sejtek membránján áthatolni, és a hozzájuk kapcsolt vegyületeket a citoszolba juttatni [28]. Az első sejtpenetráló peptidet 1988-ban fedezték fel; a HIV-I Tat fehérje 86 aminosavból álló fragmente bejutott a sejtekbe [29]. 3 évvel később a *Drosophila* Antennapedia fehérjéjének homeodoménjéről (AntpHD), illetve annak egy 60 aminosav hosszú régiójáról bizonyosodott be, hogy képes bejutni idegsejtekbe [30]. A következő években számos sejtpenetráló peptidet azonosítottak, valamint kutatások kezdődtek még hatékonyabb sejtbejutási képességgel rendelkező szintetikus peptidek tervezésével.

A sejtpenetráló peptidek fontossága abban rejlik, hogy változatos molekulákat képesek sejtbe juttatni. Számos biológiailag aktív makromolekula és kisméretű hatóanyag sejtbe jutását akadályozza nagy méretük, vagy nem megfelelő szerkezetük, de sejtpenetráló peptidekhez kötve átjutnak a sejtmembránon és alkalmasak különböző intracelluláris folyamatok, mint például a sejtmigráció és az apoptózis szabályozására és vizsgálatára.

Kutatások folynak peptidek, fehérjék, antiszenz oligonukleotidok (ODN), peptidnukleinsavak (PNS), újabban kismolekulás terápiás szerek (például Taxol, cyclosporin A, methotrexate, daunomicin), kvantum pöttyök és MRI kontrasztanyagok sejtbejuttatásával kapcsolatosan. A különböző sejtpenetráló peptidek által szállított molekulákról részletesen beszámol a [28, 31, 32] hivatkozás.

A sejtpenetráló peptidek sejtbe jutásának mechanizmusa még nem tisztázott. Noha sok tulajdonságuk megegyezik, valószínűleg családonként eltérő módon jutnak be a sejtekbe. Bizonyítékok vannak az endocitózis és az energia-független internalizáció mellett is. A legújabb kutatások szerint [33] alacsony koncentrációban kétlépéses endocitózis a legvalószínűbb mechanizmus, először endocitotikus útvonalon a peptid bejut a sejtbe, majd az endoszómából „kiszabadulva” a citoszolba kerül. A sejtpenetráló peptidek bejutásának vizsgálatára leggyakrabban használt módszerek az áramlások citometria (FACS), a konfokális mikroszkópia és a tömegspektroszkópia.

1.2.1 Penetratin

Az egyik legtöbbet tanulmányozott és használt sejtpenetráló peptid a penetratin. Joliot és munkatársai idegsejtek morfogenezisének tanulmányozásakor vették észre, hogy a *Drosophila* Antennapedia fehérje homeodoménjének megfelelő 60 aminosavból álló peptid átjut az idegsejtek membránján, majd a sejtmagban lokalizálódik [30]. A meglepő felfedezést tovább vizsgálva, pontmutációkat végezve a peptiden kiderült, hogy a három α -hélixből álló homeodomén harmadik hélixében található a bejutásért felelős régió [34]. Különböző szintetikus peptidek vizsgálatával megállapították, hogy a hélix 16 aminosavból álló része ($^{43}\text{RQIKIWFQNRRMKWKK}^{58}$) is képes bejutni idegsejtekbe, ezt a peptidet nevezzük penetratinnak. Az internalizációt az N-terminális amino-csoporthoz 5-amino-pentánsav spaceren keresztül kapcsolt biotinnal követték. Az ezután elvégzett szisztematikus vizsgálatok eredményeinek részletes leírása az [28] összefoglalóban olvasható, melyek fő eredménye egy

minimális szekvencia, a $^{52}\text{RRMKWKK}^{58}$ heptamer kiválasztása, amely szükséges és elégséges HaCaT humán fibroblaszt és A549 humán tüdőrák sejtekbe való bejutáshoz.

A penetratin sejtbe jutásának mechanizmusát ma is vizsgálják, egyértelmű választ csakúgy, mint a többi sejtpenetráló peptid esetén, még nem sikerült kapni. A szerkezeti elemek bejutást befolyásoló szerepére biológiai rendszerekben végzett szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatokból következtetnek (bővebben [35]), míg a peptid-lipid kölcsönhatást főként mesterséges modelleken vizsgálják [36]. A legújabb eredmények [36, 37, 32] azt valószínűsítik, hogy a penetratin sejtbejutása az extracelluláris koncentrációtól függően kétféle módon történhet: alacsony, $2\ \mu\text{M}$ alatti extracelluláris koncentráció esetén a többi sejtpenetráló peptiddal ellentétben direkt transzlokációval, ennél magasabb koncentráció esetén pedig a direkt transzlokáció mellett szialsav-, illetve glükózaminoglikánok által mediált endocitózissal internalizálódik.

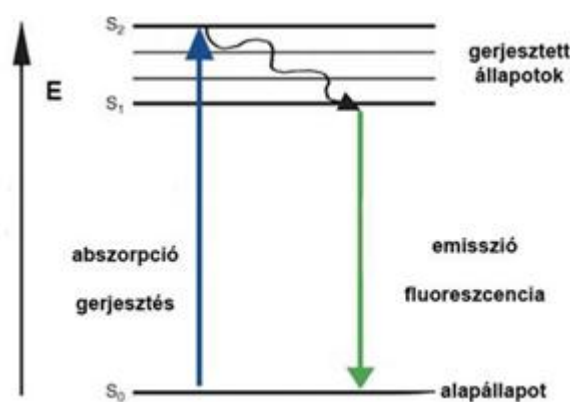
A penetratint és a belőle származtatott peptideket felfedezésük óta sikeresen alkalmazzák hatóanyagok, fehérjék, peptidek, oligonukleotidok, peptidnukleinsavak és kis interferáló RNS (siRNS) sejtbe juttatására. A különböző bejuttatott molekulákról részletes leírás található az irodalomban [28, 35]. Noha található hivatkozás fehérjékről [38, 39], melyekhez penetratint fuzionáltattak, a módszer nem túl elterjedt, mivel a sejtekbe jutás mértéke alacsony. Rendkívül elterjedt viszont az a módszer, mikor a bejuttatni kívánt vegyületet, mely csak a fehérje azon részét tartalmazza, mely a hatásért felelős, kovalens kötással kapcsolják a penetratinhoz. Ezen esetekben a molekula a penetratin *C* - vagy *N*-terminálisához kapcsolódik, leggyakrabban amid kötéssel. Egy másik lehetséges módszer mikor a konjugátumot diszulfidhíddal kapcsolják össze, ekkor a penetratin *N*-terminálisára egy ciszteint építenek be. Ekkor a szállítandó molekulában is ki kell alakítani egy tiolcsoportot, ha nincs benne. Peptidek esetén a penetratinhoz hasonlóan járnak el, oligonukleotidokban pedig az 5'-foszfát-csoportot módosítják.

1.3 Fluoreszcens jelzés

A fluoreszcens jelzőtechnikák lehetővé teszik különböző komplex biomolekuláris folyamatok megfigyelését nagy érzékenységgel, ezért rendkívül népszerűek a modern biológiai kutatásokban.

Fluoreszcenciát általában poliaromás szénhidrogének és heterociklusok mutatnak. A fluoreszcencia egy háromlépéses folyamat (2. ábra). Első lépésként elektromágneses sugárzás

hatására a fluorofór molekula(részlet) egyik, vegyértékhéjon található elektronja $h\nu_{\text{gerjesztési}}$ energia elnyelésével S_0 alapállapotából egy S_1 gerjesztett állapotba kerül, majd ütközések során hő formájában átadja energiaeleslegének egy részét a környező molekuláknak, így az S_1 gerjesztett állapot legalacsonyabb energiaszintjére kerül. Hogy visszakerüljön alapállapotába, a két energiaszint közötti különbségnek megfelelő energiájú fotont bocsát ki, tehát a molekula fényt emittál. Az energiamegmaradás törvénye alapján az emittált fény $h\nu_{\text{emissziós}}$ energiája mindig kisebb, azaz hullámhossza nagyobb, mint a gerjesztő sugárzásé. A két energia közti különbséget Stokes-shiftnek (Stokes-eltolódás) nevezzük. Nagy intenzitású megvilágítás esetén a fluorofór molekula elveszítheti fluoreszcens képességét (photobleaching), ez problémát okozhat időfüggő mikroszkópos vizsgálatoknál.



2. ÁBRA: A fluoreszcencia jelenségének kialakulása Jablonski-diagramon szemléltetve [40]

A fluoreszcens jelzés történhet kémiai vagy géntechnológiai módszerrel [41]. Utóbbi módszer során olyan fúziós fehérjét készítenek, mely genetikai kódja tartalmaz egy fluoreszcens fehérjedomén kódot is a megjelölni kívánt fehérje kódja mellett. A sejtekben így termelődő vizsgálandó fehérje a beépített fluoreszcens domén segítségével vizsgálható. Leggyakrabban a GFP (green fluorescent protein), YFP (yellow fluorescent protein) illetve RFP (red fluorescent protein) genetikai kódját használják. Előnyük, hogy fotostabilak, magas a kvantumhasznosítási tényezőjük, hátrányuk azonban, hogy gyakran asszociátumokat hoznak létre, érzékenyek a környezeti hatásokra (pH, hőmérséklet, O_2 -koncentráció, stb.), egyes fehérjék esetén pedig a fluoreszcencia megjelenése lassú, akár 30 órát is igénybe vehet. Nem célszerű a jelölés ezen típusát alkalmazni, ha a megjelölni kívánt fehérje vagy peptid sokkal kisebb méretű, hiszen ekkor az eredményeket befolyásolhatja a nagyméretű jelzőmolekula jelenléte.

Kémiai jelölést fehérjéknél (peptideknél), nukleinsavaknál és membránoknál alkalmaznak főként. A jelölő anyagokat megkülönböztethetjük aszerint, hogy eredetileg a jelölendő

molekula részei-e (természetes fluorofórok), vagy egy kémiai reakció segítségével építjük be őket vizsgálendő molekulába (extrinsic fluorofórok). Természetes fluorofórok például a fehérjékben előforduló aromás aminosavak (fenilalanin, tirozin, triptofán), illetve az enzim kofaktorok (NADH, FAD, porfirinek). A külső fluorofórok között vannak nem kovalens kötéssel kapcsolódóak is (8-anilino-1-naftalinszulfonsav (ANS), 2-(p-toluidinil)-naftalén-6-szulfonsav (2,6-TNS)), de a legtöbb jelzőmolekula kovalens kötéssel kapcsolódik a jelölni kívánt molekulához.

Ma már az egész spektrumot lefedik a forgalomban lévő fluorofórok, mind gerjesztési, mind emissziós hullámhosszban, sőt adott hullámhossz tartományon belül is rendkívül sok vegyület közül válogathatunk. A fluorofór molekulákban kialakítanak egy reaktív csoportot is, ez alakítja ki a kötést a jelölendő fehérje vagy peptid megfelelő reaktív csoportjával. Aszerint, hogy milyen funkciós csoporthoz kapcsolódnak, megkülönböztethetünk pl. tiol- és amino-reaktív fluorofórokat [42]. Az előbbieken alkil-halid, jodoacetamid, maleimid reaktív csoportokat építenek ki leggyakrabban, de rengeteg más származék is létezik.

Peptidek, fehérjék esetében főként amino-reaktív fluorofór-származékokat használnak, de már vásárolhatók jelölt aminosav-származékok is, így nem kell külön végrehajtani a konjugációt, a peptid felépítésekor egyben a jelölés is megtörténik. Az amino-reaktív fluorofórok leggyakrabban karbonsav, szukcinimidil-észter vagy szulfonil-klorid származékok, de vannak forgalomban például tetrafluorfenil-észter, izotiocianát és aldehid származékok is.

Fluorofórok jellemzése leggyakrabban a gerjesztési és emissziós hullámhossztartományok, a Stokes-shift, a fluoreszcens élettartam, a moláris extinkciós koefficiens (ϵ), és a kvantumhatásfok megadásával történik. Ezen adatok és az irodalmi előzmények alapján lehet kiválasztani a kísérleti körülményekhez leginkább megfelelő jelző molekulát/molekulapárt (2. táblázat).

rövidítés	név	$\lambda_{\text{gerjesztési}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{emissziós}} / \text{nm}$
cf	5(6)-karboxifluoreszcein	492	520
rod	5(6)-karboxi-tetrametil-rodamin	565	580
Cy7®	-	743	767
EDANS	N-(2-aminoetil)-5-amino-1-naftalinszulfonsav	335	493
Hca	4-(7-hidroxikumaril)-ecetsav	353	442

2. TÁBLÁZAT: Néhány gyakran használt fluoreszcens jelzőmolekula gerjesztési és emissziós hullámhossza [42]

A technológia fejlődésével sorra születnek az újabb és újabb fluoreszcens technikák, melyek egyre nagyobb felbontást és szelektivitást tesznek lehetővé, ezzel kiszolgálva a biológiai kutatásokat [43]. Ilyenek például a FRET, FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy), FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), FIONA (Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy), és a fluoreszcens anizotrópia.

Rendkívül elterjedtek a fluorofór-fluorofór kölcsönhatást kihasználó technikák, leginkább a FRET [42]. Ekkor a donor fluorofór gerjesztett elektronja az alapállapotba történő visszatérés során nem emittál fényt, energiáját sugárzásmentes módon egy szomszédos molekulának (akceptor) adja át. A FRET létrejöttének feltétele, hogy a donor emissziós spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma között átfedés legyen, és a donor és az akceptor bizonyos távolságon (10 – 100 Å) belül legyen közel párhuzamos dipólus-orientációval. Azt a távolságot, ahol az energiatranszfer 50%-os hatékonysággal játszódik le, a Förster-sugárnak nevezzük, mértéke a donor és akceptor spektrális tulajdonságaitól függ.

A FRET-et használják az akceptor és donor közti távolság mérésére, például fehérjék másodlagos szerkezetének jellemzésére [44]. A biológiai kutatásokban főként asszociációs illetve disszociációs reakciók követésére alkalmazzák, ekkor nincs szükség a távolság pontos mérésére. Az irodalomban főként DNS-analitikai eredmények (PCR, DNS-hez való kötődés vizsgálata) elérhetőek [45], de fehérjék felgombolyodását, hidrolízisét [46], membránok fúzióját, receptor-ligandum kölcsönhatásokat [47] is sikerrel vizsgáltak már FRET segítségével.

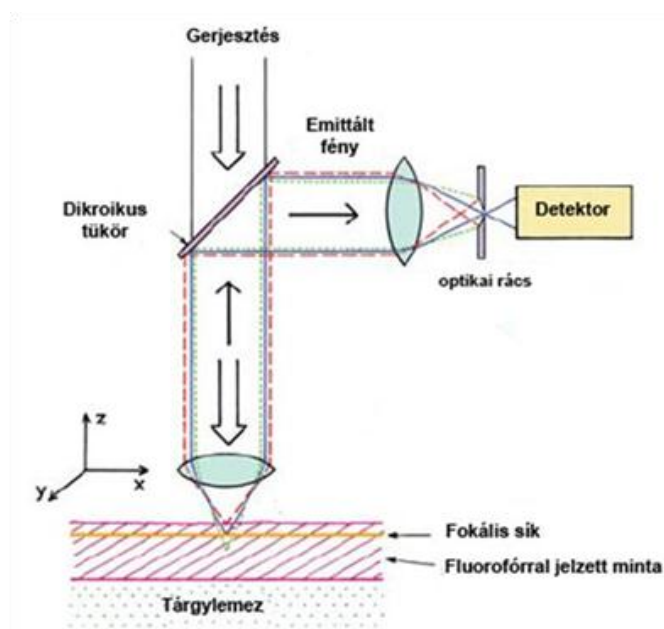
A FRET sikeres kihasználásához szükséges, hogy az alkalmazni kívánt módszernek megfelelő donor-akceptor párt találjunk, illetve a jelölendő molekulán/molekulákon belül a fluorofórokat jó helyre építsük be. Ez gyakran meglehetősen nehéz feladat. A választott donor emissziós spektrumának átfedésben kell lennie az akceptor abszorpciós spektrumával, viszont problémát jelent, ha a gerjesztéshez használt hullámhosszon a donor elnyelése is jelentős.

Erre megoldást jelenthet ún. dark quencher molekulák akceptorként való használata. Ezek a vegyületek a donor energiáját elnyelik (quenchelik), de saját fluoreszcenciával nem rendelkeznek, fényt nem emittálnak, hő formájában szabadulnak meg az energiafeleslegtől.

Kereskedelmi forgalomban számos ilyen tulajdonságú vegyület elérhető, például DABCYL (4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoesav), DANSYL (5-(dimetilamino)-1-naftalinszulfonil-klorid), Black Berry®, QSY® és BHQ® család.

Előnyük például konfokális fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során, hogy az akceptor emissziója nem zavarja a mérést, hátrányuk viszont, hogy kolokalizáció vizsgálatára nem alkalmasak, mivel csak az egyik komponens hollétéről kapunk információt a fluoreszcencia alapján.

Vegyületek eloszlásának, lokalizációjának meghatározására alkalmas a konfokális fluoreszcens mikroszkóp [48], mellyel több fókális síkban készíthetünk felvételeket, ezért pontosabb helymeghatározást tesz lehetővé, mint a hagyományos fluoreszcens mikroszkóp. Utóbbival az egész minta fluoreszcenciáját egyben látjuk, azonban a konfokális mikroszkóp használatakor a minta „felszeletelésével” pontosan látható, hogy az érzékelt fluoreszcencia honnan érkezik. Megkülönböztethető például, hogy a vegyület fluoreszcenciája a membránról, illetve a sejten belülről érkezik-e. A bejuttatott anyag sejten belüli eloszlása is vizsgálható, de az egyes síkok összeszerkesztésével a minta 3 dimenziós képét is megkaphatjuk. A konfokális optika (3. ábra) alkalmazásakor a megvilágítás főlülről történik, majd a tárgylemezen lévő minta különböző fókális síkjaiból érkező fényt egy rés pozíciójának megváltoztatásával tudjuk kiválasztani. A mintából érkező fényből optikai rács segítségével választhatjuk ki azt a keskeny hullámhossz-tartományt, amit vizsgálni szeretnénk. Mivel a módszer kis területet vizsgál egyszerre, nagy intenzitású gerjesztésre van szükség a megfelelő fluoreszcens jel detektálásához, ezért az ilyen mikroszkópokban lézergyerjesztést alkalmaznak.



3. ÁBRA: A konfokális optika működési elve [49]

Az egyik leggyakrabban használt donor-akceptor pár a fluoreszcein és a 5(6)-karboxitetrametilrodamin (rodamin, rod). Népszerűségük oka, hogy mindkettő gerjesztése megoldható a konfokális mikroszkópoknál használt lézerekkel, Förster-sugaruk pedig relatív nagy, 50 Å. Az irodalomban leggyakrabban DNS-komplexek asszociációjának vizsgálatakor alkalmazzák ezt a FRET-párt [41,45].

1.4 Szilárd-fázisú peptidszintézis

Peptidek előállíthatók génexpresszióval és kémiai szintézissel. Előbbivel csak genetikai kóddal rendelkező aminosavakból álló, kellő hosszúságú lineáris peptidek hozhatók létre. Kémiai szintézissel azonban D-, vagy más nem természetes aminosavakat tartalmazó, elágazásos és ciklikus peptidek, valamint fluoreszcens vagy izotópjelzett származékok is készíthetők.

A kémiai szintéziskor a peptidkötés kialakítása két aminosav-származék kondenzációjával történik. A nem kívánatos termékek keletkezését meggátolhatjuk amino-, karboxil-, valamint oldallánc védőcsoportok használatával.

A kémiai szintézisen belül két nagy módszer különböztető meg, az oldatfázisú és a szilárdfázisú peptidszintézis. Laboratóriumi kutatások során főként a szilárd fázisú szintézist (SPPS) használják, oldatfázisú szintézisek az iparban jellemzőek. A SPPS nagy előnye, hogy gyorsan, viszonylag nagy tisztaságú peptidet lehet vele előállítani hosszadalmas tisztítási műveletek nélkül. A műveletek automatizálhatóak, léteznek peptidszintetizátor készülékek, melyek néhány esetben képesek kiváltani a laboratóriumi manuális munkát. Hátránya viszont, hogy mivel a szintézis sikerességéhez minden egyes aminosav kapcsolásának legalább 99,5%-os konverzióval kell lezajlania, az aminosav-származékokat nagy (3-10-szeres) feleslegben kell alkalmazni, ez pedig jelentősen megdrágítja a módszert.

A szilárd fázisú peptidszintézis alapelvét Robert Bruce Merrifield publikálta 1963-ban [50], mely felfedezését 1984-ben Nobel-díjjal ismerték el. A módszer során a C-terminális felől haladunk az N-terminális felé a peptid felépítésekor. (Voltak próbálkozások a természetben a riboszómákon lejátszódó fehérjeszintézis irányának megfelelő N-terminális → C-terminális irányú szintézisre is, de ekkor a racemizáció jelentős volt.)

A szilárd fázisú szintézis során először az első, amino-csoportján védett aminosavat karboxil-csoportján keresztül egy szilárd hordozóhoz (gyanta) kapcsoljuk, majd az α -amino-csoportról

eltávolítva a védőcsoportot a következő, szintén védett aminosavat az előző aminosav szabaddá vált amino-csoportjához kapcsoljuk.

A szilárd-fázisú szintézisnek két módszerét különböztetjük meg, a peptid szekvenciájától függ, hogy melyik alkalmazása előnyösebb:

A Boc/Bzl stratégia [51] alapja, hogy az α -amino-csoportot védő (átmeneti) és az oldalláncot védő (állandó) védőcsoport különböző erősségű savakra hasad. Az α -amino-csoportot védő *tert*-butiloxikarbonil (Boc) csoport közepesen erős savakkal (pl. trifluorecetsav, TFA) hasítható, lúgokkal és nukleofil reagensekkel szemben azonban ellenálló. Az oldalláncokban található funkciós csoportokat főként benzil-védőcsoporttal (Bzl), illetve származékaival védjük (3. táblázat), mivel ezek csak erős savval távolíthatók el. Az első aminosav és a gyanta közötti kötésnek savstabilnak kell lennie, hogy az átmeneti Boc-védőcsoport hasításakor a peptid ne hasadjon le a gyantáról. A Boc védőcsoport hasításakor az α -amino-csoport sót képez a trifluor-ecetsavval, ezért az átmeneti védőcsoport hasítása után egy semlegesítési lépés következik 5-10 V/V%-os *N,N*-diizopropil-etilamin (DIEA)/diklór-metán (DCM) oldattal. A szintézis befejezésekor a peptidet a gyantáról ezért csak erős savakkal (hidrogén-fluorid (HF), trifluormetánszulfonsav (TFMSA), trimetil-szilil-triflát (TMSOTf)) lehet eltávolítani, ekkor az oldallánc védőcsoportok is hasadnak.

A módszer hátránya, hogy a HF-os hasítás csak speciális készülékben történhet. Savas környezetre, oxidációra és alkileződésre hajlamos aminosavat (Tyr, Cys, Met, Trp) tartalmazó szekvenciák esetén még gyökfogók és redukálószer (leggyakrabban *p*-krezol, tioanizol, 1,4-ditiotreitol (DTT)) alkalmazásakor is gyakoriak a mellékreakciók.

Az Fmoc/^tBu stratégia [52] ortogonális védőcsoportokat használ. Az átmeneti védőcsoport a 9-fluorenilmetoxikarbonil (Fmoc) csoport, mely rezisztens savakra, de gyenge szerves bázisok (piperidin, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-én (DBU)) hasítják. Az állandó védőcsoportok sokfélék lehetnek (3. táblázat), például *tert*-butil- (^tBu), tritil- (Trt), Boc, stb. azonban közös tulajdonságuk, hogy savlabilisak. A peptidet a gyantáról általában TFA-val hasítják, ezzel egyben a védőcsoportok is eltávolíthatók. Hasításkor reaktív karbokationok keletkeznek, az alkileződés elkerülésének érdekében gyökfogókat (scavenger) adnak a hasítóelegyhez (fenol, 1,2-etánditiol (EDT), tioanizol).

A módszer előnye, hogy olyan szekvenciák is elkészíthetők, melyek Boc/Bzl technikával nem, mivel savra érzékeny, oxidációra és alkileződésre hajlamos aminosavakat (Trp, Cys, Met, Tyr) tartalmaznak. Az Asp-Pro kötés savlabilis, ezért szintén előnyösebb Fmoc/ ^tBu stratégiát használni, ha előfordul ez a részlet a szekvenciában. További előny, hogy nincs HF-

os hasítás, tehát nincs szükség speciális készülékre. Hátránya azonban, hogy a szintézishez használt gyanta és aminosav-származékok drágábbak.

védendő csoport	Boc/Bzl		Fmoc/ ^t Bu	
	rövidítés	név	rövidítés	név
hidroxil	Bzl	benzil-	^t Bu	<i>terc</i> -butil-
szulfhidril	Meb	4-metilbenzil-	Trt	tritol-
amino	2-ClZ	2-klór-benziloxikarbonil-	Boc	<i>terc</i> -butiloxikarbonil-
karboxil	OcHex	ciklohexil-észter-	O ^t Bu	<i>terc</i> -butil-észter-
amid	Xan	xantil-	Trt	tritol-
imidazol	Bom (^α N)	beziloximetil-	Bum (^α N)	<i>terc</i> -butiloximetil-
	Dnp (^γ N)	dinitrofenil-	Trt (^γ N)	tritol-
guanidino	Mts	2,3,6-trimetil-benzénszulfonil-	Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-6-szulfonil-
indol	Hoc	ciklohexiloxikarbonil-	Boc	<i>terc</i> -butiloxikarbonil-

3. TÁBLÁZAT: SPPS során leggyakrabban használt oldallánc védőcsoportok [55]

Mindkét stratégia során aktivált aminosav-származékokat használunk a kapcsoláshoz. Többféle módszer ismert a karboxil-csoport aktiválásra (azidos, sav-kloridos, vegyes-anhidrides, szimmetrikus-anhidrides, Leuchs-anhidrides, karbodiimides), azonban szilárd fázisú szintéziseknél leggyakrabban az *in situ* aktív-észteres aktiválást alkalmazzák. Boc/Bzl technikánál *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid (DCC) és 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) hozzáadásával keletkezik az aktív-észter, Fmoc/^tBu technikánál *N,N'*-diizopropil-karbodiimid (DIC) és HOBt kapcsolószereket használnak.

A kapcsolási reakciók sikerességét ellenőrizni kell, erre jelenleg két, színreakción alapuló módszer terjedt el. A Kaiser- vagy ninhidrin-teszt [53] alapja, hogy a szabad primer-amino-csoporttal rendelkező vegyületek ninhidrinnel kékes színű vegyületet képeznek. A szekunder-amino-csoporttal rendelkező prolin esetében azonban a keletkező vegyület ugyanolyan sárga, mint a szintézishez alkalmazott gyanta, ezért a prolin utáni aminosav kapcsolásának eredményességét izatin teszttel vizsgálják [54]. Sikertelen kapcsolat esetén a gyantaszemek vörösesbarnára színeződnek.

A szilárd hordozó (gyanta) leggyakrabban polisztrén-1,2-divinilbenzol kopolimer alapú. A legfontosabb elvárások a gyantával szemben, hogy funkcionálisni lehessen, mechanikailag stabil legyen, a szintézis során alkalmazott összes reagenssel szemben inert legyen, valamint

hogy a használt oldószerekben duzzadjon, így a gyanta belsejében található funkciós csoportok is hozzáférhetőek legyenek. Az első, Merrifield által kifejlesztett, később róla elnevezett gyanta klórmetil funkciós csoportokat tartalmazott polisztirén-1,4-divinilbenzol kopolimerhez kötve. Később ezen a területen is óriási fejlődés ment végbe, sorra jelentek meg az újabb, egyre jobb tulajdonságokkal bíró gyanták. Megkülönböztethetünk például peptid-amid, peptid-észter, peptid-alkohol, peptid-sav, peptid-tioészter, peptid-aldehidet eredményező gyantákat aszerint, hogy a gyantáról való hasítás után a kapott peptid C-terminálisán milyen funkciós csoport található. Biológiai kutatásokhoz általában peptid-amidokat használnak, stabilitásuk, valamint amiatt, hogy a legtöbb biológiailag aktív peptid egy hosszabb szekvenciának a részeként található meg a természetben, ezért az amid-vég utánozza legjobban az eredeti szerkezetet.

2 Célkitűzés

A kalpain enzimesalád tagjai számos sejten belüli folyamatban vesznek részt, mint modulátor proteázok, azonban a szabályozásban betöltött pontos szerepük kevésbé ismert. A kalpasztatinból származtatott, de enzimaktiváló hatású KalpA és KalpC peptidek kiválóan alkalmazhatóak lehetnek ezen fiziológiás funkciók vizsgálatára, mivel ellentétben a legtöbb inhibitorral, specifikusak a kalpainra nézve. A kalpainok csökkent működése miatt kialakuló betegségek kezelésében szintén fontos szerepe lehet ezen kalpain aktiváló vegyületeknek.

A KalpA és KalpC peptidek önmagukban nem képesek bejutni a sejtekbe. Ugyanakkor az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban végzett vizsgálatok bizonyították, hogy penetratinnal konjugált származékaik lényegében függetlenül a kialakított kötés típusától (amid-, tioéter- vagy diszulfid kötés) sikeresen internalizálódtak és aktiválták az izolált kalpint.

Munkám során azt kívántuk vizsgálni, hogy mi történik a sejtbejutás után a diszulfidhidat tartalmazó penetratin konjugátummal; a citoszolban vajon felnyílik-e a diszulfidhíd, és ha igen, a két (sejtpenetráló és kalpain aktiváló) peptid lokalizációjában van-e különbség. E kérdések megválaszolása érdekében olyan konjugátumot terveztünk előállítani, melyben mindkét peptidet egy-egy, különböző spektrális tulajdonságokkal rendelkező fluorofórral jelöltük meg, úgy megválasztva a fluorfor párt, hogy azok FRET jelenséget mutassanak. További szempont volt alkalmasságuk arra, hogy konfokális fluoreszcens mikroszkóppal követni lehessen a konjugátum a sejten belüli eloszlását és a diszulfidhíd stabilitását. Terveztük még a konjugátum kémiai, spektrális jellemzését, valamint a stabilitásának vizsgálatát abban a közegben, melyben a sejtbejutási vizsgálatokat végezzük.

3 Kísérleti rész

3.1 Peptidszintézis

A konjugátumok felépítéséhez szükséges, fluoreszceinnel jelölt, C-terminálisán ciszteinnel hosszabbított penetratint szilárd fázisú peptidszintézissel állítottam elő. A diszulfidhidat tartalmazó konjugátum másik építőeleme, az N-terminálisán ciszteinnel hosszabbított KalpC (CysKalpC) peptid rendelkezésemre állt hasított formában, ezért csak a nyerstermék tisztítását és fluorofórral történő jelölését végeztem el.

3.1.1 Fluoreszceinnel jelölt penetratin szintézise

A C-terminálisán ciszteinnel meghosszabbított, fluoreszceinnel jelölt penetratin (cf-RQIKIWFQNRRMKWKKC-NH₂, cf-penetratinCys) előállítását Fmoc/^tBu stratégiával végeztem Rink Amide MBHA gyantán (0,296 g, 0,64 mmol/g).

	művelet	oldószer/reagens	ismétlés	időtartam
1	mosás	DMF	3x	0,5-1 perc
2	Fmoc-csoport hasítása	2% piperidin + 2% DBU/DMF	1x	2+2+5+10 perc
3	mosás	DMF	8x	0,5 perc
4	kapcsolás	3 ekv. aminosav-származék 3 ekv. DIC, HOBt/DMF	1x	60 perc
5	mosás	DMF	2x	1 perc
6	mosás	DCM	3x	1 perc
7	ninhidrin teszt	fenol/absz. EtOH	1x	3 perc
		KCN/deszt.víz		
		ninhidrin/absz.EtOH		
	izatin teszt	3% izatin 5% Boc-Phe-OH ninhidrin/absz. EtOH	1x	3perc

4. TÁBLÁZAT: Fmoc/^tBu stratégia protokollja

A szintézis során először eltávolítottam a gyantán található amino-csoportok Fmoc-védőcsoportját a protokoll (4. táblázat) szerint, azaz *N,N*-dimetil-formamidban (DMF) való duzzasztás (3x1 perc) után 2% piperidin + 2% DBU/DMF összetételű eleggyel. A hasítóelegyet DMF oldószerrel mostam ki a gyantáról. Az aminosavak kapcsoláshoz a védett aminosav-származékot és kapcsolószereket (DIC, HOBt) a gyantakapacitás és a gyanta tömegéből számolt anyagmennyiséghez képest háromszoros feleslegben (0,568 mmol) adtam a gyantához minimális mennyiségű, kb. 0,5 ml DMF-ban feloldva (5. táblázat).

elnevezés		moláris tömeg g/mol	bemérendő tömeg g
kapcsolószer	HOBt · H ₂ O	153,1	0,087
	DIC	156,6 ml/mol	0,089 ml
aminosav-származék	Fmoc-Cys(Trt)-OH	587,7	0,333
	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5	0,266
	Fmoc-Trp-OH	426,5	0,242
	Fmoc-Met-OH	371,5	0,211
	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	649,0	0,369
	Fmoc-Asp(Trt)-OH	596,6	0,351
	Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,7	0,347
	Fmoc-Phe-OH	387,45	0,220
	Fmoc-Ile-OH	353,4	0,200
fluorofőr	5(6)-karboxifluoreszcein	376	0,214

5. TÁBLÁZAT: A cf-penetratinCys szintéziséhez alkalmazott reagensek és beméréseik

A kapcsolási reakció szobahőmérsékleten 60 percig tartott, ennek leteltével a gyantát DMF-dal és diklórmetánnal (DCM) mostam. A kapcsolat sikerességét ninhidrin-reakcióval ellenőriztem minden esetben, mivel a szekvencia nem tartalmazott prolint. Ha a teszt negatív volt, azaz nem kaptam kék elszíneződést, akkor a szintézist a művelet sor első pontjától folytattam a következő aminosav beépítésével. Pozitív ninhidrin-reakció esetén a protokoll 4. pontjától indulva újra megismételtem az aminosav kapcsolását.

Az *N*-terminális aminosav beépítése és az *N*^α-Fmoc-csoport eltávolítása után fluoreszceint kapcsoltam a szilárd hordozón kiépített peptidlánchoz, ugyanolyan körülmények között, mint az aminosav-származékok esetén (3 ekvivalens, DIC és HOBt kapcsolószerek

alkalmazásával). Az így felépített és jelölt peptidet 10 ml TFA-val hasítottam a gyantáról 0,5 ml desztillált víz, 750 mg fenol, 0,5 ml tioanizol és 0,25 ml EDT gyökfogók jelenlétében. A peptidszármazék hasítását állandó kevertetés mellett 90 percig végeztem szobahőmérsékleten. A nyersterméket 100 ml hideg dietil-éterbe szűrtem, ahol a peptidszármazék sárga csapadékként kivált. A jelölt peptidet centrifugálással nyertem ki az éterből, majd háromszor dietil-éterrel mostam. Végül a nyersterméket 100 ml 10%-os ecetsavban feloldottam, bepárlással eltávolítottam a visszamaradt dietil-étert, majd a terméket liofilizáltam. A peptidszármazék tisztítását félpreparatív fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) végeztem, kémiai jellemzése analitikai RP-HPLC-val és elektropray ionizációs tömegspektrometriás módszerrel történt (ESI-MS) (3.3 fejezet).

3.1.2 CysKalpC peptid jelölése

A tisztított, a cisztein tiol-csoportján Npys védőcsoportot tartalmazó CysKalpC peptidet (Ac-C(Npys)SKPIGPDDAIDALSSDFTS-NH₂) rodaminnal jelöltem oldatfázisban. A konjugáció során a rendelkezésre álló peptid anyagmennyiségét vettem egységnyiinek.

rövidítés	anyagmennyiség μmol	ekvivalens	molekulatömeg g/mol	bemérés mg
CysKalpC			2234	20
rod	8,95	1	430,5	3,9
HOBt			153,1	1,4
BOP			442,3	4,0
DIEA	8,95	1	156,6 ml/mol	1,6 μl
	17,90	2		3,1 μl

6. TÁBLÁZAT: A CysKalpC jelöléséhez alkalmazott reagensek és beméréseik

A megadott mennyiségű (6. táblázat) rodamint, HOBt-t, benzotriazol-1-il-oxi-trisz-dimetil-amino-foszfónium hexafluoro-foszfátot (BOP) Eppendorf-csőbe bémértem, feloldottam 250 μl DMF-ban majd 2 ekvivalensnyi DIEA bázist pipettáztam az oldatba. A CysKalpC peptidet 0,5 ml DMF-ban oldottam, majd 1 ekvivalens DIEA bázist pipettáztam hozzá.

A rodamint 10 percig előaktiváltam, majd oldatához adtam a CysKalpC és DIEA DMF-ban készült oldatát. A jelölési reakció 90 percen át zajlott szobahőmérsékleten, kevertetés mellett.

A jelölt peptidet félpreparatív RP-HPLC-val izoláltam a reakcióelegyből, kémiai jellemzése analitikai RP-HPLC-val és ESI-MS-val történt (3.3. fejezet).

3.1.3 Kettős jelölést tartalmazó konjugátum előállítása

Az Npys védőcsoportot tartalmazó CysKalpC-rod és a cf-penetratinCys peptidek konjugálását oldatfázisban, 0,16 M- foszfát pufferben (pH=6) végeztem. 3,2 mg (1,2 μ mol) CysKalpC peptidet 5 ml pufferben feloldottam, majd kevertetés közben, szobahőmérsékleten összesen 7 mg ($\sim$ 2,4 μ mol) cf-penetratinCys peptidet adagoltam hozzá kis részletekben, 20 percenként. A reakció során kivált csapadékot 100 μ l ecetsav hozzáadásával feloldottam. A diszulfid kötést tartalmazó konjugátumot félpreparatív RP-HPLC-val izoláltam a reakcióelegyből, kémiai jellemzése analitikai RP-HPLC-val és ESI-MS-val történt (3.3. fejezet).

3.2 Peptidszármazékok és konjugátum tisztítása

A peptidszármazékok és a konjugátum tisztítására Phenomenex Jupiter C18 (250x10 mm, 10 μ m, 300 Å) félpreparatív oszlopot használtam. Az elválasztáshoz használt áramlási sebesség 4 ml/perc volt, a detektálás UV detektorral λ =220 nm-en történt szobahőmérsékleten. Az „A” eluens minden esetben 0,1% TFA/desztillált víz, a „B” eluens pedig 0,1% TFA-t tartalmazó acetonitril-víz (80:20, V/V) elegy volt. Az elválasztás során gradiens elúciót alkalmaztam. Az egyes anyagok elválasztásánál alkalmazott gradienseket a 7. táblázat tartalmazza. A megfelelő frakciókat bepároltam, majd liofilizáltam.

	0 perc B%	5 perc B%	50 perc B%
cf-penetratinCys	0	30	70
CysKalpC	0	35	70
CysKalpC-rod	0	35	75
konjugátum	0	55	100

7. TÁBLÁZAT: Az egyes vegyületek tisztításánál alkalmazott gradiensek

3.3 Az előállított peptidszármazékok és a konjugátum kémiai jellemzése

A tisztított peptidszármazékok, illetve a konjugátum homogenitását analitikai fordított fázisú HPLC-val vizsgáltam. Az alkalmazott oszlop Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm, 5 μ m, 100 Å), az áramlási sebesség 1ml/perc volt. „A” eluensként 0,1% TFA/desztillált víz, „B” eluensként pedig 0,1% TFA-t tartalmazó acetonitril-víz (80:20, V/V) elegyet használtam. A kromatogram felvétele lineáris gradiens elúcióval (0 perc 0% B; 5 perc 0% B; 50 perc 90% B) történt, λ = 220 nm-en detektálva.

A peptidszármazékok és a konjugátum azonosítása pozitív ion elektropray ionizációs tömegspektrometriás módszerrel (ESI-MS) történt Bruker Esquire 3000 plus (Germany) készüléken. A mintákat 0,1% ecetsavat tartalmazó acetonitril-víz (50:50, V/V), elegyben oldottuk fel.

3.4 Spektroszkópiai vizsgálat

A konjugátum spektrális tulajdonságainak vizsgálatát Dr. Csík Gabriella docenssel végeztük a SOTE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében FluoroLog-3 fluoriméterrel (Jobin Yvon, Longjumeau, Franciaország). A konjugátumot desztillált vízben oldottuk. A 100 μ M-os törzsoldat százszorosára hígításával kapott 1 μ M -os oldatot használtuk a vizsgálatokhoz. A fluoreszcein emissziójának vizsgálatához a mintát λ =450 nm-en gerjesztettük, az emissziós spektrumot pedig λ =500-700 nm között vettük fel. A rodamin-emissziós vizsgálatnál a gerjesztés λ =550 nm-en történt, a spektrum felvételére pedig λ =560-700 nm közötti tartományban került sor. A fluoreszcein és a rodamin spektrális tulajdonságait megvizsgáltuk olyan körülmények között is, amelyet a diszulfidhíd redukálásához használtunk, azaz 1,4-ditiotreitol (DTT) jelenlétében.

3.5 A konjugátum stabilitásának vizsgálata

A cf-penetratinCys-CysKalpC-rod konjugátum stabilitását a sejtbejutás vizsgálatához használt szérummentes Dulbecco módosított Eagle médiumban (DMEM), analitikai RP-HPLC-val vizsgáltuk. A konjugátumból c=10 μ M oldatot készítettünk, ehhez 30 μ g cf-penetratinCys-CysKalpC-rod-t 50 μ l desztillált vízben feloldottunk, majd 527 μ l szérummentes DMEM médiumot adtunk hozzá. Az elkészült oldatot 37 °C-on inkubáltuk. Elsőként felvettük a

médium kromatogramját, majd a médium hozzáadása utáni 1. és 3. órákban vett mintákat injektáltuk. Ezután ecetsavat adtunk az oldathoz és vizsgáltuk a mintát. Legvégül DTT hozzáadása után is felvettünk kromatogramot.

3.6 Konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatok

Az MCF-7 humán emlőkarcinóma sejteket 10% magzati borjú szérumot (FBS), 2 mM glutamint, 1 mM piruvátot, 160 µg/ml gentamicint és nem esszenciális aminosavakat tartalmazó DMEM sejttenyésztő médiumban tartottuk fenn (37°C, 5% CO₂). A sejteket a mérést megelőző napon 8 lyukú sejttenyésztő lemezekbe osztottuk ki (Lab-Tek Chambered Borosilicate Coverglass System; 20000 sejt/lyuk) és a mérésig termosztátban tartottuk (37°C, 5% CO₂). A sejttenyésztő médium eltávolítása után a vizsgálni kíván vegyületek 1, illetve 10 µM koncentrációjú oldatával kezeltük a sejteket; a kezelési idő három óra volt. Ezt követően a sejteket szérummentes médiummal mostuk és Olympus IX81 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A gerjesztés $\lambda=488$ nm-en (fluoreszcein) és $\lambda=543$ nm-en (rodamin) történt.

4 Eredmények

A diszulfidhíddal összekapcsolt penetratinCys-CysKalpC konjugátum sejtbe jutását korábban Bánóczi és munkatársai már vizsgálták [25]. A Hca és fluoreszcein kettős jelzéssel ellátott származékkal kezelve a sejteket kiderült, hogy a konjugátum bejut a sejtbe. Ugyanakkor e vizsgálatok nem terjedtek ki a konjugátum sejtben belüli eloszlásának, illetve a diszulfid kötés intracelluláris stabilitásának tanulmányozására. E kérdések megválaszolására, figyelembe véve a fluoreszcens mikroszkópia módszerének követelményeit, kettős jelzéssel ellátott konjugátumot állítottam elő.

A konjugátum és komponenseinek sorsa a sejtben belül fontos új szempontokra hívhatja fel a figyelmet a konjugátumok új generációjának kialakításánál. Ahhoz, hogy részletesebb képet kapjunk a sejtbejutás utáni eseményekről, konfokális fluoreszcens mikroszkóppal kívántuk vizsgálni a sejteket a konjugátummal történő kezelés után. Mivel ez a módszer lézergyújtást használ, a rendelkezésre álló gerjesztési hullámhosszoknak megfelelő abszorpciós csúccsal rendelkező fluorofórokat kellett választanunk. A két fluorofór, az irodalomban gyakori FRET párként alkalmazott fluoreszcein-rodamin alkalmas arra, hogy a konjugátum diszulfidhídjának stabilitását FRET segítségével vizsgáljuk. Első lépésben úgy terveztük meg a jelölést, hogy annak helye megegyezzen a korábban vizsgált származékban alkalmazottal. Azaz a fluoreszceint a penetratin *N*-terminális amino-csoportjához, míg a rodamin a CysKalpC peptidben található egyetlen lizin aminosav ϵ -amino-csoportjához kívántuk kapcsolni. Ebben az esetben ugyanis már tudtuk, hogy a fluorofórok nem zavarják a konjugátum sejtbejutását.

4.1 A cf-penetratinCys-CysKalpC-rod konjugátum szintézise

4.1.1 cf-penetratinCys peptid szintézise

A fluoreszcens jelöléssel ellátott, *C*-terminálisán ciszteinnel bővített cf-penetratinCys peptidet Fmoc/^tBu stratégiával állítottam elő Rink Amide MBHA gyantán. Az aminosav-származékok kapcsolását DIC, HOBt kapcsolószerekkel, az Fmoc-csoport hasítását 2% piperidin + 2% DBU/DMF összetételű eleggyel végeztem.

A fluoreszceint az aminosavakkal megegyező körülmények között kapcsoltam a peptid *N*-terminális amino-csoportjához. A szintézis befejezése után TFA/deszt. víz/EDT/tioanizol

eleggyel hasítottam a peptidet a gyantáról, félpreparatív RP-HPLC-val tisztítottam, majd a terméket analitikai RP-HPLC-val és ESI-MS-val jellemeztem (8. táblázat).

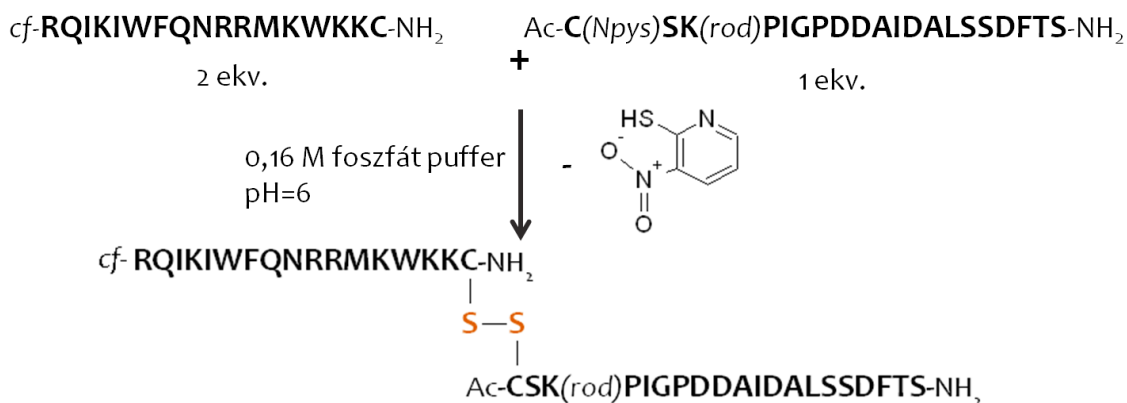
4.1.2 CysKalpC-rod

Az aszimmetrikus diszulfid-dimer kialakításához 3-nitro-2-piridin-szulfenil (Npys) védőcsoporttal védett ciszteint alkalmaztunk, mely a Boc/Bzl technikával készült KalpC peptid *N*-terminálisra lett beépítve. A témavezetőm, Dr. Bánóczy Zoltán által korábban készített CysKalpC peptidet félpreparatív RP-HPLC-val tisztítottam, és analitikai RP-HPLC-val és ESI-MS-val jellemeztem (8. táblázat).

Mivel a CysKalpC peptid csak egy lizint tartalmaz ezért ennek ϵ -amino-csoportja oldatfázisban jelölhető rodaminnal. A reakció során a rodamin karboxil-csoportja és a lizin ϵ -amino-csoportja között amid kötés alakult ki. A rodamin karboxil-csoportját a peptid hozzáadása előtt 10 percig előaktiváltam HOBt és BOP kapcsolószerekkel. A reakció befejezése után, a nyerterméket közvetlenül a reakcióelegyből félpreparatív RP-HPLC-val tisztítottam és analitikai RP-HPLC-val és ESI-MS-val jellemeztem (8. táblázat).

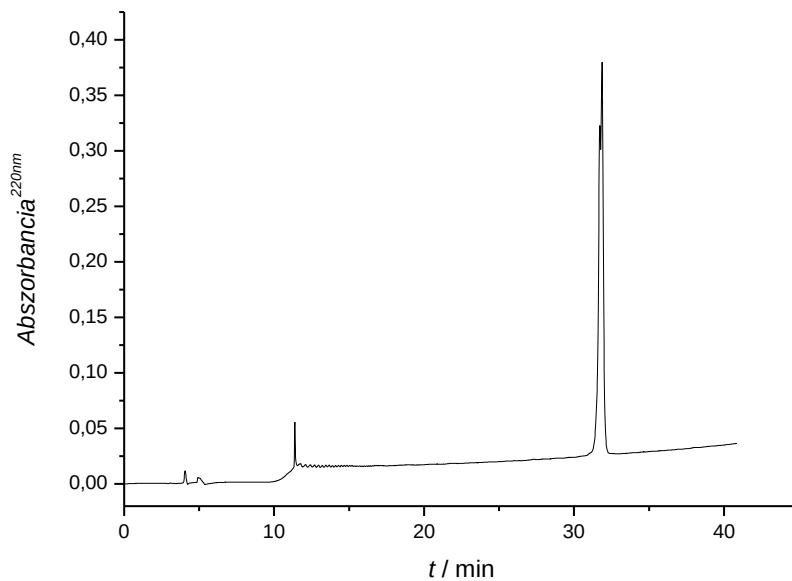
4.1.3 A cf-penetratinCys-CysKalpC-rod konjugátum előállítása

A diszulfid kötést tartalmazó heterodimer konjugátum kialakítása oldatfázisban történt. A cf-penetratinCys peptidet 2 ekvivalens mennyiségben alkalmaztunk a CysKalpC-rod peptidhez képest. A cf-penetratinCys peptid homodimerjének képződését úgy akadályoztam meg, hogy a peptidet egyszerre csak kis mennyiségben, húsz perces időközönként adtam a kevertetett reakcióelegyhez. A reakcióelegyből a konjugátum lila csapadékként vált ki (4. ábra). A reakció 0,16 M foszfát pufferben (pH=6) zajlott, ugyanis az Npys-védett ciszteint és a szabad tiolecsoporttal rendelkező ciszteint tartalmazó peptidekből felépülő heterodimerek kialakításához savas közeg (pH 5-6) az optimális, semleges és bázikus pH-n a homodimerekké történő átalakulás preferált.



4. ÁBRA: A konjugációs reakció vázlata

A reakció lezajlása után a konjugátumot félpreparatív RP-HPLC-val tisztítottam, analitikai RP-HPLC-val és ESI-MS-val jellemeztem (5. ábra, 8. táblázat). A tisztított konjugátum kromatogramján látható két csúcs a jelölés során keletkezett izomer-származékoknak felel meg. Ugyanis a jelölésre használt cf két izomer elegye; a karboxil-csoport vagy az „5”-ös vagy a „6”-os szénatomhoz kapcsolódik a molekulában. Habár a keletkezett izomer származékok analitikai RP-HPLC-n elválnak egymástól, a tisztításra használt félpreparatív oszlop elválasztása azonban nem ilyen jó, ezért nem tudtam izolálni a két izomert. Ez azonban nem okoz gondot, mivel feltételezésünk szerint a karboxil-csoport helyzete a fluoreszcens molekulában nem befolyásolja a jelölt peptid sejtbejutását.



RP-HPLC; oszlop: Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm, 5 μ m, 100 Å) Lineáris gradiens: 0 perc 0% B, 5 perc 0% B, 50 perc 90% B alkalmazása mellett. A eluens 0,1% TFA/víz és B eluens 0,1% TFA acetonitril:víz (80:20 V/V) Áramlási sebesség 1 ml/perc. Csúcsok detektálása 220 nm-en történt UV-detektorral

5. ÁBRA: A tisztított cf-penetratinCys-CysKalpC-rod konjugátum analitikai RP-HPLC-val felvett kromatogramja

vegyület rövidítése	szekvencia	M ^a várt [mért]	R _t ^b (min)
CysKalpC	Ac-C(Npys)SKPIGPDDAIDALSSDFTS-NH ₂	2234,0 [2233,8]	31,68
cf-penetratinCys	cf-RQIKIWFQNRRMKWKKC-NH ₂	2706,3 [2707,6]	29,12
CysKalpC-rod	Ac-C(Npys)SK(rod)PIGPDDAIDALSSDFTS-NH ₂	2647,1 [2648,4]	35,52
cf-penetratinCys-CysKalpC-rod	$\begin{array}{c} \text{cf-RQIKIWFQNRRMKWKKC-NH}_2 \\ \text{Ac-CSK(rod)PIGPDDAIDALSSDFTS-NH}_2 \end{array}$	5196,8 [5197,2]	31,87

^a ESI-MS analízist Brucker Esquire 3000 plus készüléken végeztük. A mintákat acetonitril-víz (50-50, V/V%) 0,1 % ecetsavat tartalmazó elegyében oldottuk.

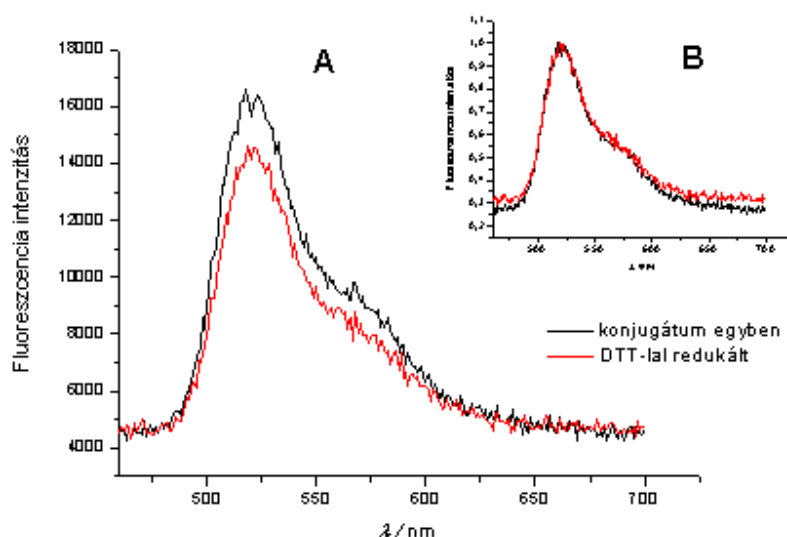
^b RP-HPLC retenciós idő; oszlop: Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm, 5 μ m, 100 Å) Lineáris gradiens: 0 perc 0% B, 5 perc 0% B, 50 perc 90% B alkalmazása mellett. A eluens 0,1% TFA/víz és B eluens 0,1% TFA acetonitril:víz (80:20 V/V) Áramlási sebesség 1 ml/perc . Csúcsok detektálása 220 nm-en történt UV-detektorral

8. TÁBLÁZAT: Az előállított vegyületek jellemzése

4.2 A konjugátum spektrális tulajdonságai

A cf-penetratinCys-CysKalpC-rod konjugátum kettős jelölésével az volt a célunk, hogy a sejtbejutás után a diszulfidhíd stabilitását, a konjugátum alkotórészeinek sorsát FRET jelenségen keresztül vizsgáljuk. Ha a jelenség fennáll, a diszulfidhíddal összekapcsolt konjugátumban a két fluorofór között energiatranszfer játszódik le. Ha a fluoreszcein fluorofórt gerjesztjük, akkor fluoreszcenciájának intenzitása lecsökken, és a rodamin is fluoreszkálni fog. A diszulfidhíd felbomlása esetén a fluorofórok eltávolodnak egymástól, a FRET jelenség nem játszódik le, a fluoreszcein fluoreszcencia-intenzitása megnő és a rodamin fluoreszcenciája megszűnik.

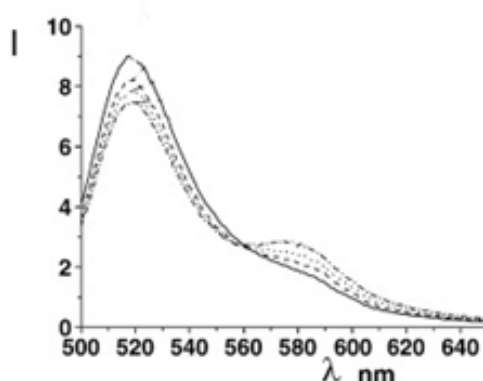
A jelölésre alkalmazott fluorofórok, valamint a konjugátum és annak DTT-lal redukált formájának emissziós spektrumait FluoroLog-3 fluoriméterben (Jobin Yvon, Longjumeau, Franciaország) vettük fel. A DTT mint redukálószer felbontja a diszulfid kötést a konjugátumban és a két jelzett peptidfragmens elválik egymástól. A cf gerjesztésével felvett emissziós spektrumokon (6/A. ábra) látható, hogy jelentős fluoreszcein emissziót kapunk, melynek válla van $\lambda=550-600$ nm között. Ha DTT-lal redukált mintát nézzük, akkor hasonló intenzitású spektrumot kapunk, amelyen nem olyan intenzív a váll megjelenése. Azonban a két spektrum normálás után teljesen azonos volt (6/B. ábra).



6. ÁBRA: A cf emissziós spektruma az egyben lévő (fekete), illetve DTT-lal redukált (piros) konjugátumban (A), illetve a normált spektrumok (B)

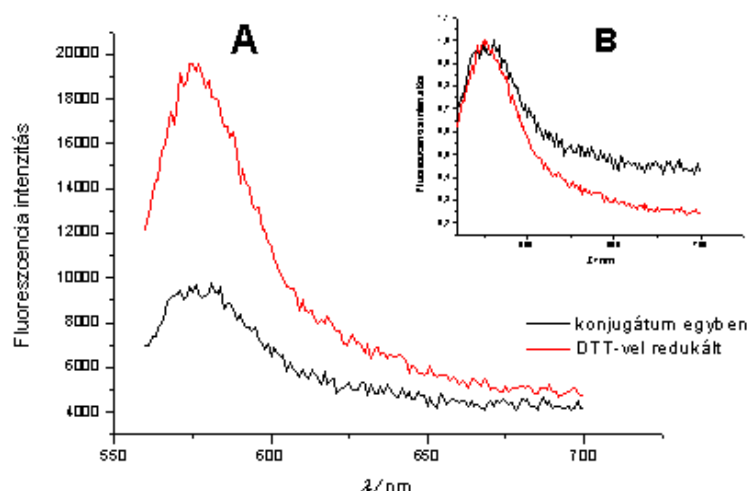
FluoroLog-3 fluoriméter (Jobin Yvon, Longjumeau, Franciaország), gerjesztés $\lambda=450$ nm, scan: $\lambda=500-700$ nm

Az irodalomból [56] átvett spektrumon (7. ábra) jól látszik, hogy ha a fluoreszcein és a rodamin között létrejön a FRET akkor az $\lambda=565-612$ nm között intenzitás növekedést eredményez. (Az adott példában DNS és restrikciós endonukleáz komplex asszociációját követték fluoreszcein-rodamin FRET párral.) Ezek alapján megállapítható, hogy a konjugátumban nem tapasztalható FRET jelenség a két fluorofór között. Ennek oka az lehet, hogy a fluorofórok egymástól mért távolsága meghaladja a Förster-sugarat.



7. ÁBRA: A FRET jelenség fluoreszcein és rodamin között ([56] módosítva)

A rodamin gerjesztésével kapott emissziós spektrum a 8/A. ábrán látható. Figyelemre méltó, hogy a DTT hozzáadása után a rodamin fluoreszcenciájának jele kb. duplájára emelkedett. Ez valószínűleg annak a következménye, hogy a konjugátumban és a szabad CysKalpC-rod peptidben más a rodamin környezete, és az utóbbi kedvezőbb a fluoreszcencia szempontjából. Az eltérő környezetre vezethető vissza, hogy a normalizált spektrumokat összevetve a konjugátumban a rodamin emissziója sokkal szélesebb hullámhossz-tartományban történik (12/B. ábra). Jelentős intenzitásbeli eltérés tapasztalható $\lambda=610-700$ nm között.



8. ÁBRA: A rodamin emissziós spektruma az egyben lévő (fekete), illetve DTT-lal redukált (piros) konjugátumban (A), illetve a normált spektrumok (B)

FluoroLog-3 fluoriméter (Jobin Yvon, Longjumeau, Franciaország), gerjesztés $\lambda=450$ nm, scan: $\lambda=500-700$ nm

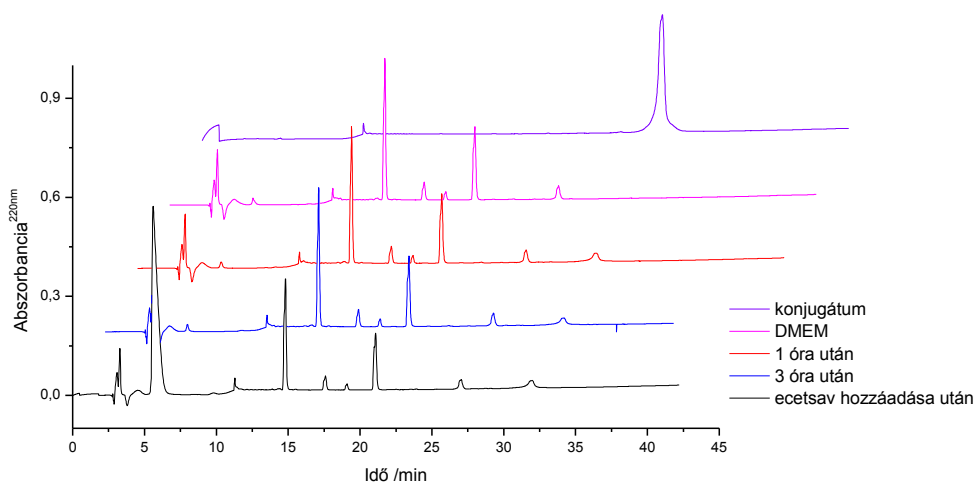
4.3 Stabilitásvizsgálat

Az élő sejtekkel végzett kísérletek előtt megvizsgáltuk, hogy a konjugátum stabil-e ezen vizsgálatok során alkalmazott médiumban. Ehhez elkészítettük a konjugátum DMEM szérummentes médiummal készült oldatát a sejtes kísérleteknél alkalmazott koncentrációban ($10 \mu\text{M}$) és a sejtbefutás vizsgálata során alkalmazott hőmérsékleten, 37°C -on inkubáltuk az oldatot. Az oldatkészítés során a konjugátumot a végtérfogat 10 %-ának megfelelő mennyiségű desztillált vízben oldottuk és csak ezután adtuk hozzá a médiumot. Tisztán a médiumban nem sikerült feloldani a konjugátumot. A mintavételek a médium hozzáadása után 1 illetve 3 órával később történtek, utóbbi megegyezik a kezelés időtartamával az *in vitro* méréseknél. A kromatogramban (9. ábra) számos csúcs látható, melyek a médiumból származnak, azonban ezek egyike sem esik egybe a vizsgált konjugátum csúcsával, így a választott kromatográfiás rendszer alkalmas a konjugátum stabilitásának vizsgálatára. A konjugátum csúcsa $R_t=31,95$ perc retenciós idővel jelenik meg a kromatogramban, azonban az alkalmazott koncentrációban csak igen kis intenzitású csúcsot adott ($\text{Abs}=0,0413$).

Az 1 órás inkubálás után mért csúcsterülethez ($\text{AUC} = 0,0118$) képest a 3 óra után vett mintákban a konjugátum csúcsának mérete csökken ($\text{AUC} = 0,00972$), melyet a csúcs alatti területek összehasonlítása (AUC) is megerősített. A csökkenés mintegy 20%-os. Mivel a csökkenéssel egy időben új csúcs(ok) nem jelentek meg, illetve azt tapasztaltuk, hogy a konjugátum tiszta médiumban nem oldódik tökéletesen, arra gondoltunk, hogy a csökkenés a

konjugátum kicsapódásának tudható be. A konjugálási reakció után kivált csapadék ecetsav hozzáadására oldódott, ezért itt is ecetsavat adtunk a mintához és megnéztük, hogy az eredetivel megegyező területű csúcsot kapunk-e. Mivel a kapott csúcs integrálja ($AUC = 0,01104$) hibahatáron belül megegyezett az 1 óra után kapottal, elmondhatjuk, hogy a konjugátum stabil az alkalmazott médiumban, azonban lassú csapadékképződés zajlik le a 3 óra alatt.

Az inkubált oldathoz az utolsó mintavétel után DTT-t adtunk, redukálendő a diszulfidhidat. Ekkor a kromatogramon a vártan megfelelően a konjugátum csúcsa mellett további csúcsok jelentek meg: a fluoreszcenciával jelölt penetratinCys és a rodaminnal jelölt CysKalpC peptidek csúcsai. Tehát a DTT megfelelő redukálószer a konjugátum diszulfidhídjának felnyitásához.



RP-HPLC; oszlop: Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm, 5 μ m, 100 Å) Lineáris gradiens: 0 perc 0% B, 5 perc 0% B, 50 perc 90% B. A eluens 0,1% TFA/víz; B eluens 0,1% TFA acetonitril:víz (80:20 V/V). Áramlási sebesség 1 ml/perc. Csúcsok detektálása 220 nm-en történt UV-detektorral

9. ÁBRA: cf-penetratinCys-CysKalpC-rod konjugátum (10 μ M) stabilitásvizsgálat

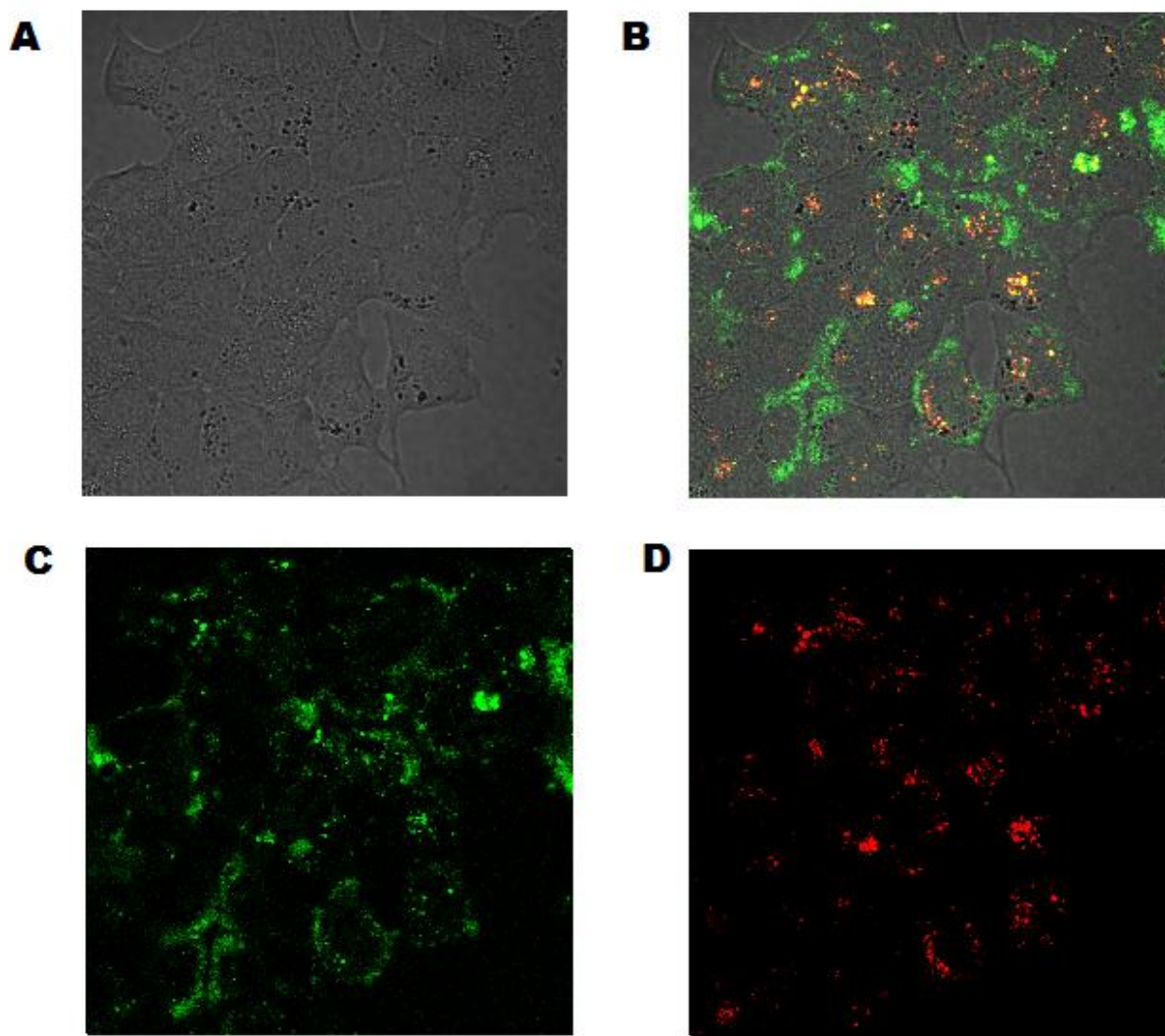
4.4 A konjugátum sejtbejutásának vizsgálata konfokális mikroszkóppal

Mivel az emissziós spektrumok felvételekor kiderült, hogy a konjugátumban nem lép fel a FRET a két fluorofór között, a sejtekben csak kolokalizációt és eloszlást vizsgáltunk. A felvételeken a fluoreszcein jele zöld színnel, míg a rodamin jele piros színnel látható. Ahol a két fluorofór egy helyen található (kolokalizáció), az egymásra vetített felvételeken sárga színt látunk.

1 μM koncentrációban alkalmazva a konjugátumot a fluoreszcein zöld jele főleg a sejtmembránhoz közel található, diffúz eloszlásban (10. ábra). A citoszolban a diffúz eloszlású területektől eltérő helyen csak kisebb mértékű fluoreszcein jelet látunk szinte teljes mértékű kolokalizációban a rodamin jelével (sárga), pontszerű eloszlásban. A rodamin jele kizárólag a citoszolban található külön (piros), vagy a fluoreszcein jelével kolokalizálva (sárga), szintén pontszerű eloszlásban. A 10 μM -os koncentrációjú oldattal kezelt sejtek esetén (11. ábra) a felvételek sokkal nagyobb mértékű internalizációt mutatnak. A fluoreszcein diffúz eloszlású zöld jele a teljes sejtben megtalálható és már pontszerű képződményekben is látható. Ezzel egyidejűleg a pontszerű piros és sárga képződmények száma is megnövekedett.

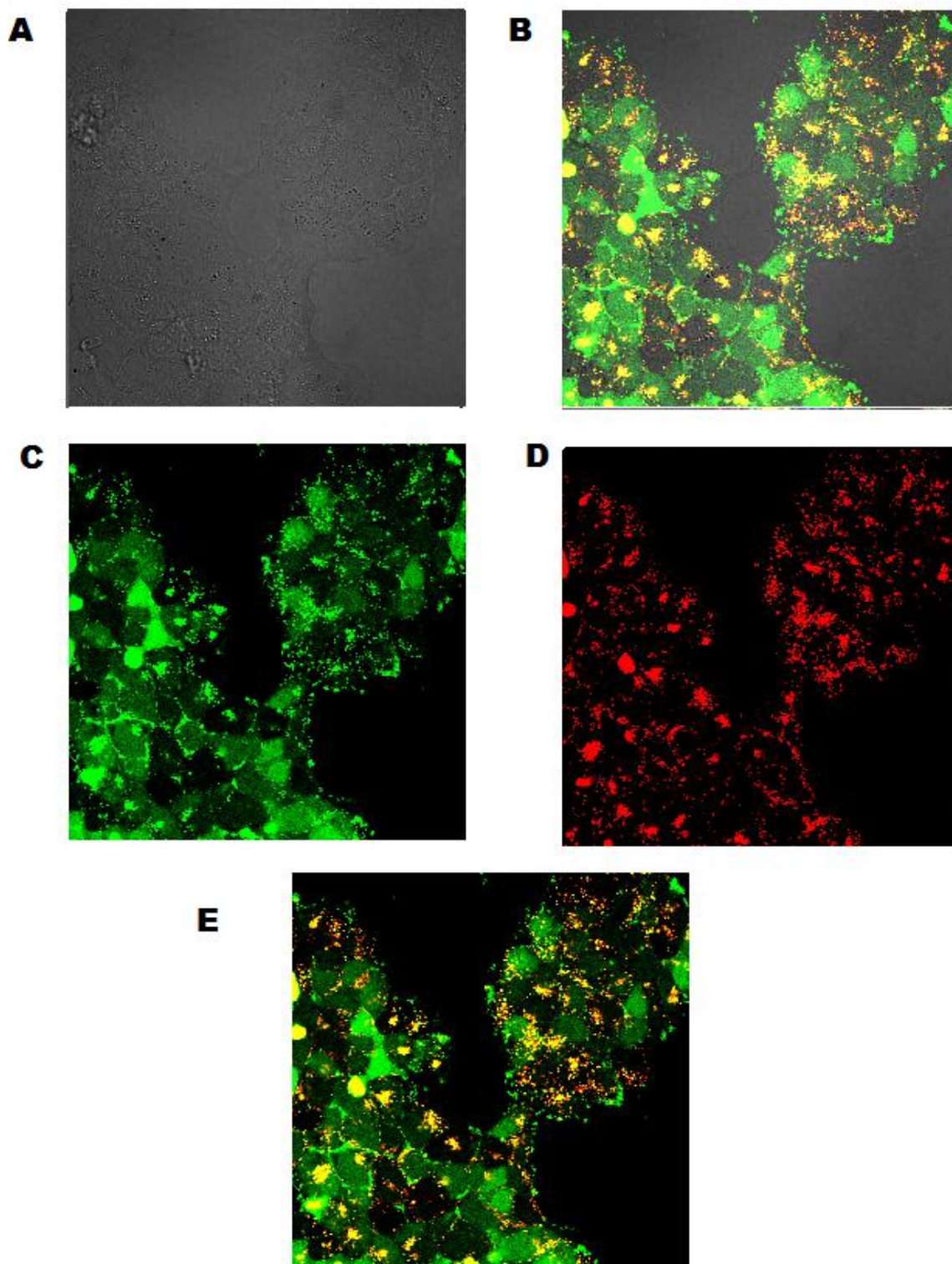
A zöld és piros szín megjelenése a felvételeken egyértelműen a diszulfidhíd felbomlására és az így keletkező cf-penetratinCys és CysKalpC-rod fragmensek egymástól való eltávolodására utal. A sárga szín esetén nem tudjuk megmondani, hogy a diszulfidhíd felhasadt-e a fragmensek között, csak azt, hogy a két peptid fragmens azonos térrészben találhatóak a sejten belül.

A konjugátum illetve az egyes fragmensek lokalizációjának jobb meghatározása céljából magfestést is alkalmaztunk, azonban az alkalmazott jelző molekula kölcsönhatott a konjugátum jelölésére alkalmazott fluorofórokkal és csökkentette azok fluoreszcencia-intenzitását. Így a kapott adatok alapján nem tudjuk tovább finomítani az ismereteinket a konjugátum sejten belüli sorsáról.



10. ÁBRA: MCF-7 sejtek konfokális fluoreszcens mikroszkóppal készült felvételei 1 μ M koncentrációjú oldattal történő 180 perces kezelés esetén

A, sejtek áteső fény mellett, B, sejtek, fluoreszcein és rodamin jele együtt C, fluoreszcein D, rodamin
Olympus IX81 konfokális mikroszkóp. A gerjesztés $\lambda=488$ nm-en (fluoreszcein) és $\lambda=543$ nm-en (rodamin)



11. ÁBRA MCF-7 sejtek konfokális fluoreszcens mikroszkóppal készült felvételei 10 μ M koncentrációjú oldattal történő 180 perces kezelés esetén

A, sejtek áteső fény mellett, B, sejtek, fluoreszcein és rodamin együtt C, fluoreszcein D, rodamin E fluoreszcein és rodamin jele együtt

Olympus IX81 konfokális mikroszkóp. A gerjesztés $\lambda=488$ nm-en (fluoreszcein) és $\lambda=543$ nm-en (rodamin)

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a konjugátum már alacsony koncentrációban bejut a MCF-7 sejtekbe, habár az internalizáció mértéke sokkal nagyobb a 10 μM -os kezelési koncentrációban. Mindkét koncentráció esetén történik diszulfidhíd-hasadás, megjelenik önállóan a rodamin (piros) és a fluoreszcein (zöld) jele. A felbomlott, de egy helyen tartózkodó fragmensek, illetve az egyben maradt konjugátum sárga jele pontszerűen helyezkedik el a sejtben, ez arra utalhat, hogy a konjugátum sejtbejutása endocitózis útján valósul meg mindkét kezelési koncentráció esetén, majd utána vezikulákban található meg a sejtben belül. A diffúz, zöld fluoreszcein jel magyarázata az lehet, hogy az endocitózis során a vezikulában felhasad a diszulfidhíd, a penetratin pedig kijut a vezikulából és a citoszolban egyenletesen eloszlik. Mivel a rodaminnal jelölt CysKalpC-rod vezikuláris eloszlást mutat, feltételezzük, hogy ez a peptid nem képes a vezikulákból kiszabadulni, mint ahogy a sejtmembránon sem átjutni. Az eredeti cél olyan konjugátum kialakítása volt, ahol a két fragmenst összekötő diszulfidhíd elhasad, a penetratin pedig nem akadályozza a CysKalpC célenzimhez jutását. Az elgondolás alátámasztásaként a diszulfidhíddal összekötött konjugátum intracelluláris kalpain aktiváló hatását eddig még nem vizsgálták. Vizsgálataink azonban felvetik a kérdést, hogy az alkalmazott módszer tényleg alkalmas-e a CysKalpC peptid ilyen módon való sejtbe juttatására. Ha ugyanis a CysKalpC nem képes kijutni a vezikulából, akkor nem képes aktiválni a citoszolban található kalpaint sem. Segíthetne a kérdés megválaszolásában, ha olyan konjugátum(ok) lokalizációját vizsgálnánk, amelyek a citoszolban nem felbomló kötést (amid, tioéter) tartalmaznak és mindkét építőelem jelölve van.

Noha a tervezett konjugátumban a FRET jelenség nem működik a két fluorofór között, a fragmensek eltérő lokalizációja bizonyítja, hogy a diszulfidhíd bizonyos mértékben felhasadt, így közelebb kerültünk az általunk feltett kérdés megválaszolásához.

Összefoglalás

A kalpain enzimaktiváló hatással rendelkező KalpC peptid a KalpA peptiddel egyetemben két okból is tudományos érdeklődésre tarthat számot. Egyrészt, mivel specifikus a kalpainra nézve, segíthet az enzimesalád szabályozásban betöltött szerepének pontosabb megértésében, másrészt, mivel aktiválja az enzimet, a csökkent kalpain működéssel járó betegségek elleni küzdelemben is felhasználható.

TDK-munkám során olyan új, irodalomban nem ismert konjugátumot készítettem, amelyben a kalpain enzimeket aktiváló CysKalpC peptid diszulfidhíddal kapcsolódik a PenetratinCys sejpenetráló peptidhez. A célom elsősorban a diszulfid kötés sejten belüli stabilitásának és a fragmensek sorsának vizsgálata volt. Ennek érdekében a konjugátum mindkét alkotóelemét fluoreszcens jelzőmolekulával jelöltem (CysKalpC-rod illetve cf-penetratinCys), hogy konfokális fluoreszcens mikroszkóppal figyeljem meg a sejten belüli történéseket. A fluorofór párt úgy választottam meg, hogy FRET jelenség játszódjon le köztük, ezzel ugyanis a diszulfidhíd felhasadását a fluoreszcens jel intenzitásának változásából egyértelműen tudtam volna igazolni. A spektrális vizsgálatok során azonban kiderült, hogy a konjugátumban nem lép fel FRET, valószínűleg - térszerkezeti okokból - a távolság a két fluorofór között nagyobb a jelenség fellépéséhez szükségesnél. A konjugátum stabilitását analitikai RP-HPLC-val vizsgáltam. A konjugátum stabilnak bizonyult a sejtbejutás vizsgálatokhoz alkalmazott médiumban és hőmérsékleten. Igazoltam továbbá azt is, hogy megfelelő redukálószerrel a diszulfidhíd felnyitható a konjugátumban és ekkor a két kiindulási peptidet kapjuk vissza. A konfokális fluoreszcens mikroszkóppal végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a konjugátum már 1 μM -os koncentrációban is bejut a sejtekbe, de az internalizáció mértéke sokkal nagyobb 10 μM -os kezelési koncentrációnál. Az eredmények arra utalnak, hogy a konjugátum endocitózissal jut be a sejtekbe, és ott a diszulfidhíd felnyílása után a két peptid térben is eltávolodik egymástól.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Hudecz Ferenc tanszékvezető egyetemi tanárnak, az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport vezetőjének, hogy témavezetőként lehetővé tette munkámat a kutatócsoportban és felhívta a figyelmemet a témára.

Köszönöm Dr. Bánóczy Zoltán tudományos munkatársnak, témavezetőmnek, hogy megismertette velem a szilárd fázisú peptidszintézis alapjait, segített a téma kidolgozásában, a TDK dolgozat megírásában. Külön köszönöm, hogy mindig számíthattam lelkesítésére, ha rászorultam.

A spektroszkópai vizsgálatok elvégzéséért Dr. Csík Gabriella egyetemi docensnek, a SOTE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet munkatársának mondok köszönetet.

Hálával tartozok Dr. Orbán Erika tudományos segédmunkatársnak a konfokális mikroszkóppal készített felvételek elkészítéséért, az eredmények értelmezésében nyújtott segítségéért.

Továbbá köszönöm családomnak, hogy mindig támogattak munkám során.

Irodalomjegyzék

- [1] Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., Cong, J., *Physiological Reviews*, 83, 731-801 (2003)
- [2] Guroff, G., *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 149-155 (1964)
- [3] Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K., Imahori, K., *Journal of Biochemistry*, 84, 225-230 (1978)
- [4] Ono, Y., Sorimachi, H., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824, 224-236 (2011)
- [5] Sorimachi, H., Hata, S., Ono, Y., *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87, 287-327 (2011)
- [6] Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., Sorimachi, H., *Diabetes*, 53, S12-18 (2004)
- [7] Cong, J., Goll, D. E., Peterson, A. M., Kapprell, H. P. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 10096-10103 (1989)
- [8] Kuo, W. N., Ganesan, U., Davis, D. L., Walbey, D. L., *Molecular and Cellular Biochemistry*, 136, 157-161 (1994)
- [9] Arthur, J.S.C., Crawford, C., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1293, 201-206 (1996)
- [10] Michetti, E., Viotti, P. L., Melloni, E., Pontremoli, S., *European Journal of Biochemistry*, 202, 1177-1180 (1991)
- [11] Glading, A., Lauffenburger D. A., Wells, A., *Trends in Cell Biology*, 12, 46-54 (2006)
- [12] Saez, M. E., Ramirez-Lorca, R., Moron, F. J., Ruiz, A., *Drug Discovery Today*, 11, 917-923 (2006)
- [13] Jánossy, J., Ubieto, P., Apáti, Á., Magócsi, M., Tompa, P., Friedrich, P., *Biochemical Pharmacology*, 67, 1513-1521 (2004)
- [14] Nemova, N. N., Lysenko, L. A., Kantserova N. P., *Russian Journal of Developmental Biology*, 41, 318-325 (2010)
- [15] Marshall, C., Hitman, G. A., Partridge, C. J., Clark, A, Ma, H., Shearer, T. R, Turner, M. D., *Molecular Endocrinology*, 19(1), 213-224 (2005)
- [16] Arthur, J. S. C., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K. and Greer, P. A. *Molecular Cell Biology*, 20, 4474-4481 (2000)
- [17] Huang, Y., Wang, K. K. W., *Trends in Molecular Medicine*, 7(8), 355-362 (2001)
- [18] Storr, S. J., Carragher, N. O., Frame M. C., Parr, T., Martin, S. G., *Nature Reviews Cancer*, 11, 364-374 (2011)

- [19] Maki, M., Bagaci, H., Hamaguchi, K., Ueda, M., Murachi, T., Hatanaka, M., *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 18866-18869 (1989)
- [20] Ma, H., Yang, H. Q., Maki, M., Hatanaka, M., *The Journal of Biochemistry*, 113, 591-599 (1993)
- [21] Hanna, R., Campbell, R.L., Davies, P.L., *Nature*, 456, 409-412 (2008)
- [22] Tompa, P., Mucsi, Z., Orosz, Gy., Friedrich, P., *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 9022-9028 (2002)
- [23] Gil-Parado, S., Assfalg-Machleidt, I., Fiorino, F., Deluca, D., Pfeiler, D., Schaschke, N., Moroder, L., Machleidt, W., *The Journal of Biological Chemistry*, 384, 395-402 (2003)
- [24] Sengoku, T., Bondada, V., Hassane, D., Dubal, S., Geddes, J. W., *Experimental Neurology*, 188, 161-170 (2004)
- [25] Bánóczy, Z., Tantos, Á., Farkas, A., Tompa, P., Friedrich, P., Hudecz, F., *Bioconjugate Chemistry*, 18, 130-137 (2007)
- [26] Hällbrink, M., Florén, A., Elmquist, A., Pooga, M., Bartfai, M., Langel, Ü., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1515, 101-109 (2001)
- [27] Világi, I., Kiss, D. S., Farkas, A., Borbély, S., Tárnok, K., Halasy, K., Bánóczy, Z., Hudecz, F., Friedrich, P., *Molecular and Cellular Neuroscience*, 38, 629-636 (2008)
- [28] Hudecz, F., Bánóczy, Z., Csík, G. *Medicinal Research Reviews*, 5(6), 679-736 (2005)
- [29] Frankel, A.D., Pabo, C. O., *Cell*, 55, 1189-1193 (1988)
- [30] Joliot, A., Pernelle C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 1864-1868 (1991)
- [31] Torchillin, V. P., *Peptid Science*, 90, 604-610 (2008)
- [32] Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S., Gräslund, A., *Journal of Biophysics*, 2011, Article ID 414729 (2011)
- [33] Dupont, D., Prochiantz, A., Joliot, A., *Methods in Molecular Biology*, 683, 21-29 (2011)
- [34] Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., Prochiantz, A., *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 10444-10450 (1994)
- [35] Langel, Ü., *Handbook of cell penetrating peptides*, CRC/Taylor & Francis, 2007
- [36] Alves, I. D., Jiao, C.Y.J., Aubry, S., Aussedat, B., Burlina, F., Chassaing, G., Sagan, S., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798, 2231-2239 (2010)
- [37] Jiao, C. Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I. D., Chassaing, G., Sagan, S., *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 33957-33965 (2009)

- [38] Kato, D., Miyazawa, K., Ruas, M., Starborg, M., Wada, I., Oka, T., Sakai, T., Peters, G. , Hara, E. *FEBS Letters*, 427, 203–208. (1998)
- [39] Han, K., Jeon, M. J., Kim, K. A., Park, J., Choi, S.Y., *Molecules and Cells*, 10, 728-732 (2000)
- [40] Llères, D., Swift, S., Lamond, A.I., *Current Protocols in Cytometry*, 42, 238 (2007)
- [41] Sapsford, K.E., Berti, L., Medintz, I. L., *Angewandte Chemie International Edition*, 45, 4562-4588 (2006)
- [42] Johnson, I., Spence, M.T.Z., *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Invitrogen, 2010
- [43] Hohlbein, J., Gryte, K., Heilemann, M., Kapanidis, A., N., *Physical Biology.*, 7, 031001 (2010)
- [44] Piston, D.W., Kremers, G.J., *Trends in Biochemical Sciences*, 32(9), 407-414 (2007)
- [45] Breuzard, G., Tertilt, M., Goncalves, C., Cheradame, H., Géguan, P., Pichon, C., Midoux, P. *Nucleic Acid Research*, 36(12), e71 (2008)
- [46] Subach, F., Kirsanova, O., Liquier, J., Gromova, E. S., *Biophysical Chemistry*, 138, 107-114 (2008)
- [47] Wang, L., Gaigalas, A. K., Blasic, J., Holden, M.J., *Spectrochimica Acta*, 60, 2741-2750 (2004)
- [48] Lichtmann, J.W., Conchello, J.A., *Nature Methods*, 2, 910-919 (2005)
- [49] Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 244, 2006
- [50] Merrifield, R.B., *The Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149-2154 (1963)
- [51] Bodanszky, M., *Peptide Chemistry - A Practical Textbook*, Springer-Verlag, 123-126, 1993
- [52] Carpino, L.A., Han, G.Y., *Journal of Organic Chemistry*, 37, 3404-3409 (1972)
- [53] Kaiser, E., Colescott, E.L., Bossinger, C.D., Cook. P.I., *Analytical Biochemistry*, 34, 595-598 (1970)
- [54] Kaiser, E., Colescott, E.L., Bossinger, C.D., *Analytica Chimica Acta*, 118, 149-151 (1980)
- [55] Grant, A.G., *Synthetic peptides. A User's Guide*, Oxford, University Press, 88-96, 1992
- [56] Subach, F., Kirsanova, O., Liquier, J., Gromova, E. S., *Biophysical Chemistry*, 138, 107-114 (2008)