

AKTIVÁLHATÓ SEJTPENETRÁLÓ PEPTIDEK**Rovó Petra****Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémia Intézet,****Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium****Összefoglaló**

Az aktiválható sejtpenetráló peptidek (ACPP) egy újfajta hordozó molekulacsalád tagjai, amelyek egy polikationos sejtpenetráló peptidből (CPP) és a hozzá egy hasítható peptidlinkeren keresztül kapcsolódó polianionos peptidből állnak. A CPP peptid adszorpciója és a sejtpenetrációja mindaddig gátolt, amíg egy megfelelő proteáz a linkert el nem hasítja. A közönséges CPP-khez képest az ACPP rendkívül sok előnnyel bír, mely elsősorban az aktiválhatóságának köszönhető. Amennyiben a linker olyan peptidszekvenciát tartalmaz, melyet egy kóros folyamattal összefüggésbe hozható extracelluláris proteáz hasítani képes, akkor az ACPP polikationos részéhez kovalensen hozzákötött molekula célzottan abba a sejtbe jut, ahol a proteolitikus hasítás megtörtént. Az ACPP konstrukciókat elsősorban tumoros szövetek vizualizálására és kezelésére fejlesztették ki, de racionális peptid-tervezéssel más patológiás folyamatok (atherosclerosis, trombózis) is nyomon követhetőek, illetve befolyásolhatóak a segítségükkel.

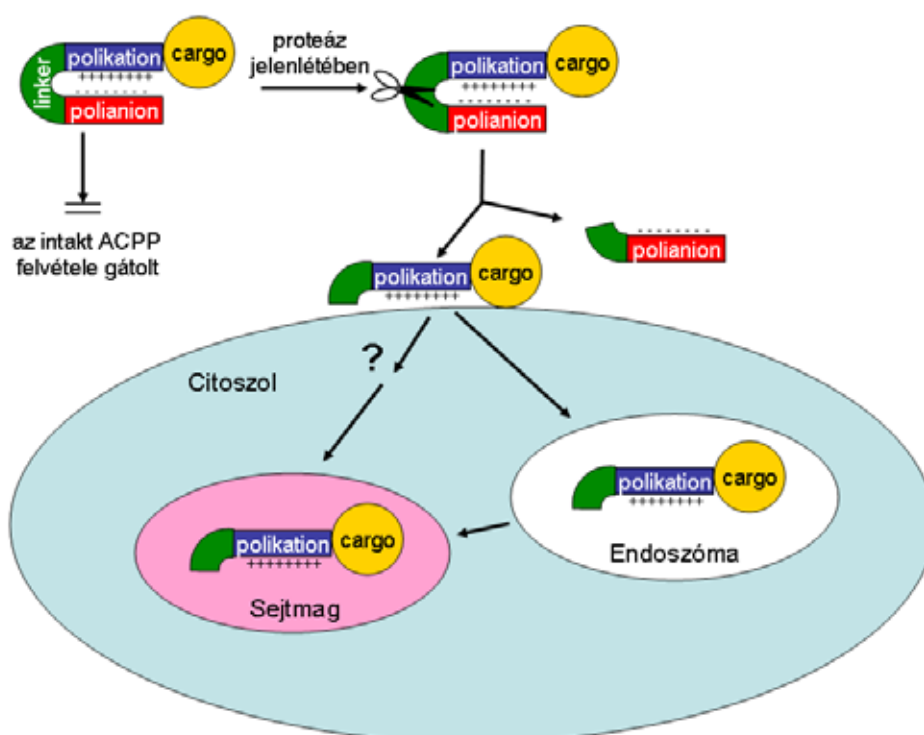
Bevezetés

Korunk orvostudományának egyik legnagyobb kihívása a különböző gyógyszer vagy kontrasztanyag molekulák célzottan a kóros sejtbe való bejuttatása [1]. Különösen igaz ez a tumoros sejtek kezelésére. A célzott sejtbejuttatás egyfelől segíthet lecsökkenteni a dózis adagokat, így csökkennek a nem-kívánt mellékhatások, másfelől segítségével a tumoros sejtek, szövetek könnyedén láthatóvá tehetőek. Jelenleg a legtöbb célzott sejtbejuttatást alkalmazó módszer antigén – antitest kölcsönhatáson alapul, melynek során a szervezetbe juttatott antitestek felismerik a tumoros szövetek bizonyos felszíni elemeit [2]. Bár egyes esetekben ez a módszer sikerrel alkalmazható [3], az eljárás hátránya az, hogy nagy mérete miatt sem az antitest, sem az általa hordozott molekula (cargo) nem képes szilárd tumorok belsejébe a sejtmembránon keresztül behatolni oda, ahol a káros sejtfolyamatokat valóban befolyásolni lehetne. Emellett problémát jelenthet az antitestek által kiváltott nem-kívánt immunreakció, illetve az amplifikáció hiánya is, ugyanis az antitest sztöchiometrikus arányban kötődik célzott sejt felszíni elemhez. Habár ezekre a problémákra már születettek biztató megoldási javaslatok [4-6], érdemes más elven működő célzott sejtbejuttatásra irányuló módszerekkel is foglalkozni [7-11].

Sejtpenetráló peptidek

Tsien és munkatársai egy teljesen új módszert dolgoztak ki tumoros sejtek szelektív molekuláris célzására [7]. A célbajuttatásra poliarginin alapú sejtpenetráló peptideket (CPP, cell-penetrating peptide) alkalmaznak. A CPP-k olyan polipeptidek, melyek specifikus receptor nélkül képesek az emlős sejtekbe

a hozzájuk kovalensen kapcsolt molekulával együtt bejutni. Ma már számos természetes [12-13] és mesterséges CPP ismert, többek között az olyan egyszerű szekvencia, mint a 6-12 egymást követő arginin [14-15]. A peptidgerinc konfigurációja nem befolyásolja a sejtpenetráció mértékét, és mivel a D-argininből felépülő CPP eleve proteolitikusan stabil, így ezt kiválóan lehet gyógyszerhordozó egységként felhasználni [16]. A CPP-hez kovalensen kapcsolt cargo mérete a kis gyógyszermolekuláktól a néhány száz Dalton tömegű fluoreszcens festékeken át [17] egészen a nanorészecskékig [9, 18] vagy liposzómáig [19] is terjedhet, habár a sejtpenetráció és a sejten belüli lokalizáció pontos mechanizmusa még nem ismert, és valószínű a molekula méretétől, a CPP szekvenciájától és a célzott sejt típusától függően különböző lehet [20-21]. A sejtpenetráció egy nem-specifikus elektrosztatikus kölcsönhatással kezdődik, amely a pozitívan töltött CPP és a negatívan töltött foszfolipid vagy glükózaminoglikán között lép fel. Ezt követően feltételezhetően mind a CPP, mind az általa hordozott molekula endocitózissal kerül be a sejt belsejébe, és végül bejut magába a citoszolba. Egy poliarginin CPP azonban ebben a formában még nem sejtszelektív, így minden sejtípusba bejuttatja az általa hordozott molekulát. Tsien és munkatársai úgy oldották meg ezt a problémát, hogy a poliarginin (általában arg_9) CPP-t egy hasítható linkeren keresztül egy poliglutaminsav (glu_9) peptidhez fuzionáltatták (1. ábra) [7]. A polianion neutralizálja a polikation láncot egy hajtű kanyart formálva, így amíg jelen van a linker, addig nem történik sejtadhézió vagy sejtpenetráció. Ezt a

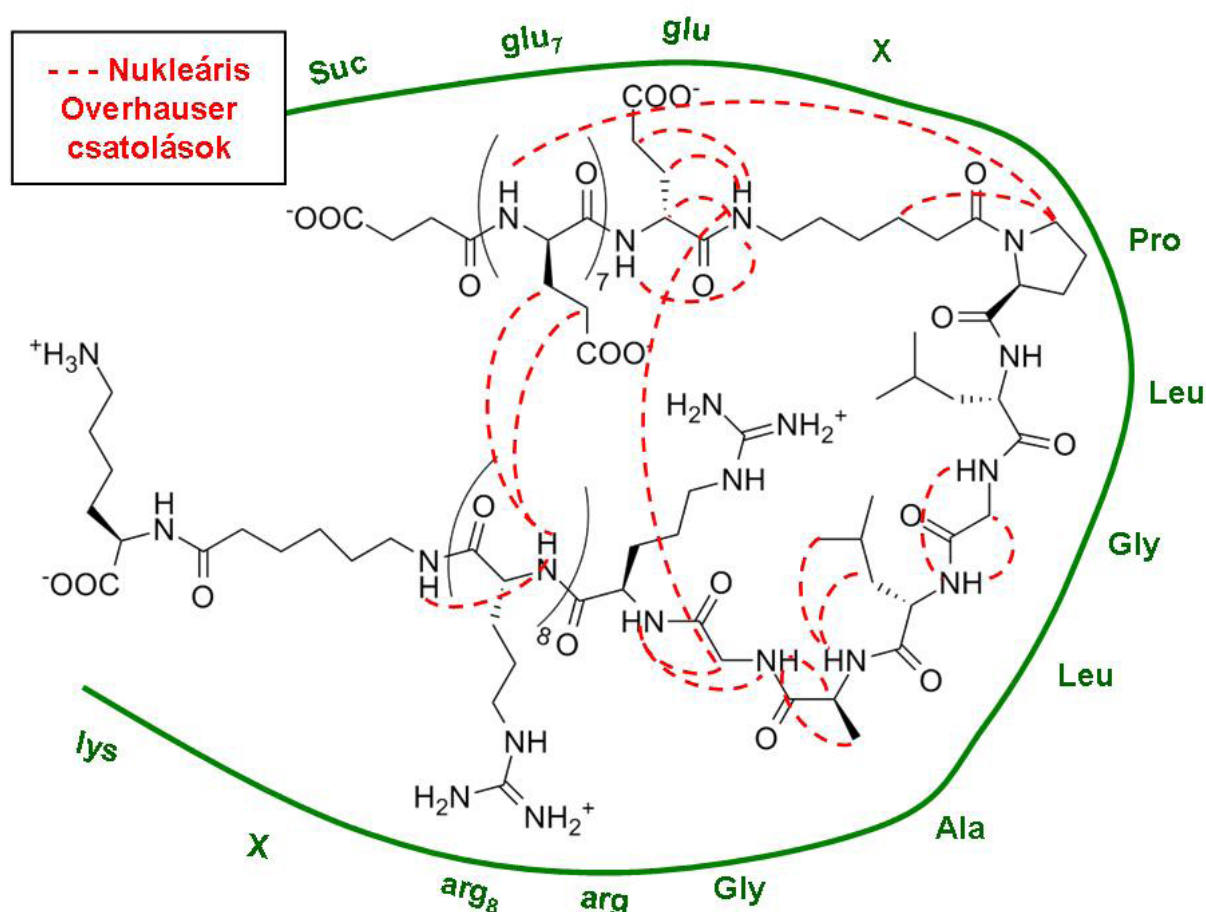


1. ábra. Az aktiválható sejtpenetráló peptid (ACPP) működésének sematikus diagramja. A polikationos peptid által indukált sejtpenetrációt a hasítható linkeren keresztül hozzákapcsolt polianionos szegmens gátolja. Amint elhasad a linker, a polianionos szekvencia eldisszociál, és a sejtpenetráló peptid be tudja juttatni a sejtbe a hordozott molekulát [7].

konstrukciót aktiválható CPP-nek nevezték el (ACPP, activatable cell penetrating peptide), ugyanis ha egy megfelelő proteáz elhasítja a linker régiót, akkor a poliglutaminsav eldisszociál, és a szabadon maradt poliarginin be tudja juttatni a környező sejtekbe a hordozott molekulát. A polianion és polikation szegmens közötti kölcsönhatást úgy kell optimalni, hogy elég erős legyen ahhoz, hogy az intramolekuláris sóhidak kialakuljanak, viszont elég gyenge ahhoz, hogy a linker hasítása után megszűnjön a két szakasz között a kölcsönhatás. Linkerrégióknak érdemes olyan szekvenciát választani, melyet olyan extracelluláris proteázok hasítanak, amelyek a tumoros sejtekben fokozottan termelődnek. Ilyen proteáz a mátrix metalloproteináz (MMP), amely a PLGLAG szekvenciát hasítja [22].

Az ACPP atomi szerkezete

Az ACPP szerkezetét homonukleáris NMR spektroszkópiával határozták meg [7]. Az elvárásnak megfelelően a polianionos és polikationos szekvenciák egymással egy hajtókanyart formálnak, melyre bizonyítékot a NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) spektrumban jelentkező interreziduális oldalláncok között kialakuló jelek szolgáltatnak (2. ábra). Ennek alapján a PLGLAG szekvencia ka-

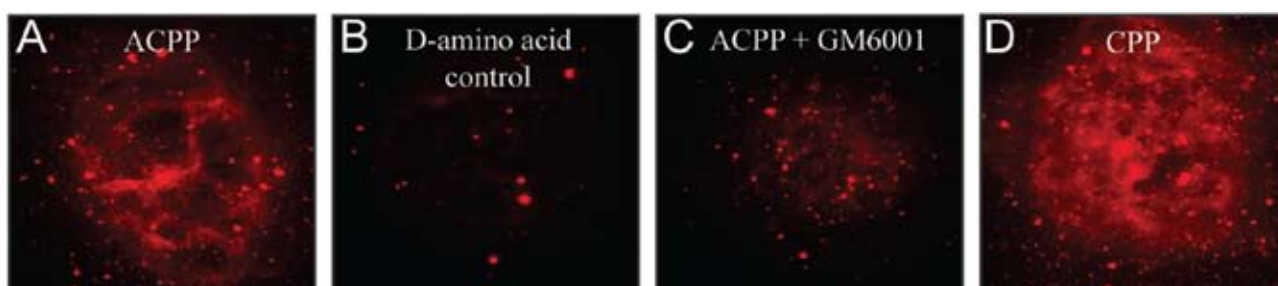


2. ábra. A szukcinil-e₈-XPLGLAG-r₉-Xk ACCP szekvenciának a 2D NOESY spektrumában megfigyelhető nukleáris Overhauser effektusból (nOe) eredő kölcsönhatásai. A szaggatott piros vonal a megfigyelt interreziduális nOe-kat, a zöld vonal a peptid körvonalát mutatja [7].

nyar szerkezetű, a D-arginin és D-glutaminsav oldalláncok között kialakuló keresztcsúcsok pedig azt mutatják, hogy az elektrosztatikus kölcsönhatás a két szekvencia között elég erős ahhoz, hogy a töltések kioltásuk egymást intramolekuláris sóhidakat képezve, habár a nagymértékű jelátfedések miatt ennél pontosabb szerkezetet nem tudtak az ACPP-ről származtatni.

FACS analízis és mikroszkópia

Tsien és munkatársai az ACPP-k működését többféle konstrukcióval és tumor sejtípussal is tesztelték [11]. Az egyik kísérletük során fluoreszcensen jelölt ACPP peptideket inkubáltak Jurkat limfocita és HT-1080 fibroszarkóma sejtekkel, és ezután áramlási citometriával, illetve fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálták a sejtbejutás mértékét és specificitását. Az áramlási citometria hisztogramja azt mutatta, hogy a fluoreszcens jelölés unimodális és homogén volt, míg a fluoreszcens mikroszkópia arról adott számot, hogy a fluoreszcens festék sejtbejutása szignifikánsan nagyobb volt a proteolitikus hasítást követően, és hogy a fluoreszcens festék nagy része eljutott egészen a sejtmagig (3. ábra). Negatív kontrollként egyrészt olyan konstrukciót használtak, ahol a linker régió is D-aminosavakból épült fel, így nem képes az MMP azt hasítani (3B. ábra), ennek előnye, hogy a konstrukció molekulatömege, hidrofobicitása teljesen megegyezik a hasítható ACPP molekulatömegével és hidrofobicitásával; másrészt megismételték a kísérletet 100 μ M MMP inhibitor (GM6001) jelenlétében (3C. ábra). Pozitív kontrollként pedig CCP konstrukciót használtak (3D. ábra).

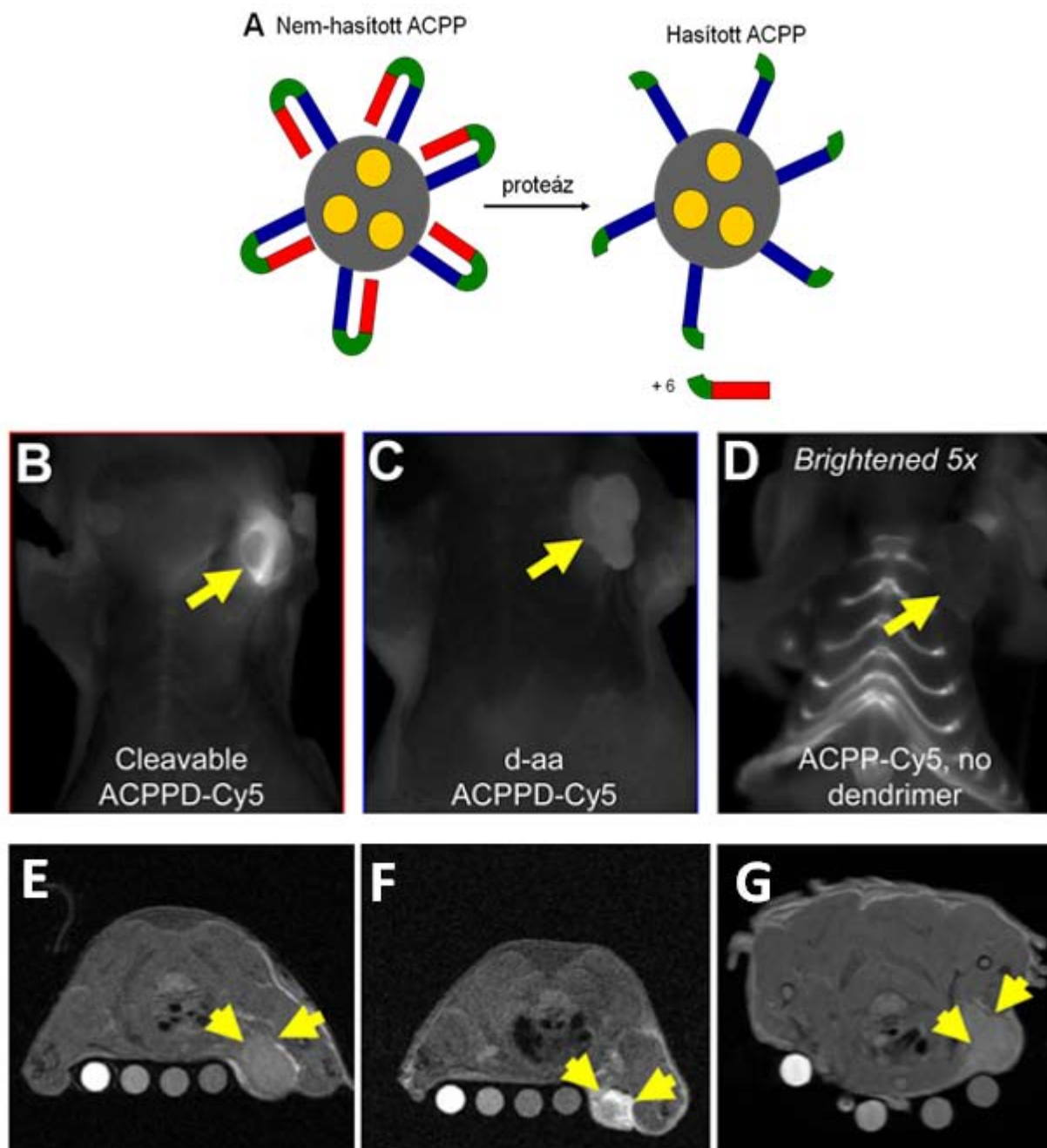


3. ábra. Az endogén MMP proteáz által hasított ACPP bejut a 3D szövetkultúra sejtjeibe. (A) Cy5 fluoreszcens festékkel (vörös) jelölt hasítható ACPP konstrukcióval kezelt MDA-MB-231 sejtekről készült fluoreszcens projekció. (B) Nem hasítható (plgla) linkert tartalmazó kontrollal kezelt sejtek fluoreszcens képe. (C) GM6001 széles-spektrumú MMP inhibitorral és ACPP-vel együttesen kezelt sejtek fluoreszcens képe. (D) Pozitív kontrol, r_g -(Cy5) konstrukcióval kezelt sejt kultúra fluoreszcens képe. Az ACPP és a CPP sejtpenetrációja összemérhető nagyságrendű [11].

A kísérletet számos ACPP konstrukcióval megismételték, amelyek különböztek a töltött szekvenciák hosszában, a linker régió orientációjában, a linker régió szekvenciájában, stb. A legjobb esetben több mint százszoros intenzitáskülönbséget tudtak mérni a hasítás előtti és hasítás utáni fluoreszcensjelek között. Ennek a konstrukciónak a szekvenciája: UeeeeeeeeXPLGLAGrrrrrrrXf(FI) volt, ahol U a szukcionil, X a 6-aminohexanoil és FI a fluoreszcein egységet rövidíti.

Kettős próba *in vivo* fluoreszcens és mágneses rezonancia képalkotás- ra

Egy másik munkájuk során Tsien és munkatársai egy olyan konstrukciót terveztek, amelyet egyszerre lehet tumor szövetek *in vivo* fluoreszcens és mág-



4. ábra. (A) A dendrimer ACPPD konstrukció sematikus diagramja: az ACPPD egy dendrimerből (szürke kör) és ehhez kovalensen kapcsolt ACPP-ből áll (a színezés meg-
egyezik az 1. ábrán használatnál). (B-D) HT-1080 fibroszarkóma tumor fluoreszcens
képei 48 órával az ACPPD-Cy5 (B), a nem-hasítható D-aminosav linkert tartalmazó
ACPPD-Cy5 (C) és a dendrimer nélküli ACPP-Cy5 injekció után. (E-G) Az ACPPD-Gd
használat lehetővé teszi a tumorok megjelenítését az R_1 -súlyozott MR mérések során.
(E) injekció előtt a tumor képe, (F) 48 órával az ACPPD-Gd-vel és (G) a D-aminosav
linkert tartalmazó ACPPD-Gd-vel történt kezelés után. A sárga nyilak minden esetben
a tumorok helyzetét mutatják. Az MR képeken 250, 50, 10 és 0 μM Gd-DOTA kont-
raszanyagot tartalmazó fantomok láthatóak [9].

neses rezonancia képalkotására használni [9]. Ebben az esetben a cargo egy dendrimer típusú nanorészecske (ötödik generációs PAMAM dendrimer, 5,4 nm átmérővel), amely több (általában hat) ACPP egységhez van hozzákötve, és Cy5 fluoreszcens és/vagy Gd-DOTA¹ MR kontraszt anyagot szállít (4. ábra). A makromolekuláris méretű cargo előnye, hogy egyszerre több, és akár többféle molekulát is képes hordozni, így megvalósítható a segítségével a szimultán fluoreszcens és MR kontraszt anyaggal való jelölés. A szabad ACPP-hez (ACPP-Cy5) képest a dendrimer-ACPP (ACPPD-Cy5) konstrukcióval megjelölt szövetekben lecsökken a bőr és az ízületek háttér fluoreszcenciája (4B. és 4D. ábra), a konstrukció féléletideje pedig jelentősen megnő (9 óra, szemben a 10 perccel), amire bizonyíték, hogy 48 óra elteltével is képesek voltak még az ACPPD-Cy5-tel kezelt tumoros sejtek fluoreszcenciáját detektálni, míg a szabad ACPP-Cy5 addigra már kiürült a szervezetből. Az MR vizsgálatok is alátámasztották a fluoreszcens mérések eredményeit, ugyanis a kontraszt anyag az inkubálást követő második-harmadik napon is látható volt a tumoros szövetekben, és csak hét nap elteltével tért vissza a kontraszt anyag mennyisége az alapvonalhoz (4E. ábra). Az ACPPD-Gd jelölés fontos sajátossága volt, hogy a tumoros szövetek felületén vékony fényes sávval mutatkozott a tumor és egészséges szövet határa.

Diszkusszió

A célzott sejtbefuttatás során egy ACPP konstrukció használatának számtalan előnye lehet. (i) Az ACPP szállítmánya bármilyen molekula lehet, akár terápiás szer, akár képalkotáshoz való festék, melynek mérete a kismolekulától egészen a nanorészecskéig változhat. (ii) Mivel egy mátrix metallo proteináz (MMP) számos ACPP molekulát képes elhasítani, ezért a katalitikus amplifikáció megoldott. (iii) ACPP molekula nemcsak a tumoros sejthez, hanem magába a sejtbe és sejtmagba is befuttatja a szállított molekulát. (iv) Attól függően, hogy a szállítmány a polikationos vagy a polianionos részhez van kötve, befolyásolható, hogy a proteolitikus hasítás után a szállítmány bejusson a sejtbe vagy sem. (v) A D-aminosavak használata lecsökkenti a konstrukció biodegradációját és immunogenitását. (vi) Az ACPP konstrukciók elkészíthetők az ismert szilárdfázisú peptidszintézisek és biokonjugációs módszerek segítségével. (vii) Dendrimer ACPP segítségével egyszerre több szállítmány is befuttatható a célzott sejtekbe. (viii) Az ACPPD drasztikusan lecsökkenti a vesében és az ízületekben az ACPP felvételt, ezáltal csökken a szisztémás toxicitás, mindamellett ötszörös az akkumulációja a tumoros sejtekben az ACPP-hez képest. (ix) MMP-k számos tumortípusban túltermelődnek, így egyféle ACPP konstrukció többféle kezelésben is alkalmazható. (x) ACPP-vel nemcsak tumor, hanem más kóros sejt is célozható, amennyiben a kóros sejt extracelluláris részén nagy aktivitású proteáz van jelen, pl. ACPP használható trombózis, szívszélhúdás, gyulladás vagy neurodegeneratív betegség esetén. (xi) Specifikusan tervezett linker régió más mechanizmussal is elhasadhat, pl. diszulfidhidak redukálásával.

Az ismert előnyök ellenére az ACPP konstrukciókkal kapcsolatban is fennáll még néhány megoldandó probléma. (i) Az MMP-k fokozatosan beszívárognak a kerin-

1 DOTA: tetra-azaciklo-dodeka tetraecetsav

molekula esetén a mellékhatásokhoz, habár ezt a problémát az ACPPD konstrukció részben áthidalja [9]. Mivel a vizeletben és a plazmában található MMP mennyisége pozitívan korrelál a metasztázis súlyosságával, ezért célszerű olyan konstrukciókat alkalmazni, amelyeket csak a membránkötött MMP-k hasítanak. (ii) Fluoreszcens jelölésre csak a bőrfelületen, a retinán, vagy az endoszkóppal elérhető testüregek felszínén található tumorok az alkalmasak, ugyanis a fluoreszcens jel csak néhány milliméter mélyre tud a testszövetben behatolni. Ezt a problémát részben megoldja a fluoreszcens és MR kontraszt anyagot egyszerre hordozó ACPP dendrimer. Ekkor egy az egész testet érintő MR vizsgálattal az operáció előtt kaphatunk információt a tumor helyzetére, méretére vonatkozólag, míg ugyanezen tumoros sejtek fluoreszcens vizsgálatával a tumor eltávolítása közben nyerhetünk információt arról, hogy hol és milyen kiterjedésben található a kivágandó tumoros szövet. (iii) A fiziológiailag releváns dózistartományban az ACPP legtöbbször az endoszómákban marad, így szükséges lenne egy olyan sejtméchanizmus feltárása, amely elősegítené az ACPP és szállítmányának az endoszómából a citoszolba való kiszabadulását.

Irodalomjegyzék

- 1 Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., Radich, J., Anderson, G. and Hartwell, L. (2003) The case for early detection. *Nat Rev Cancer*. **3**, 243-252
- 2 Weissleder, R. and Mahmood, U. (2001) Molecular imaging. *Radiology*. **219**, 316-333
- 3 Harris, M. (2004) Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol*. **5**, 292-302
- 4 Olafsen, T., Tan, G. J., Cheung, C. W., Yazaki, P. J., Park, J. M., Shively, J. E., Williams, L. E., Raubitschek, A. A., Press, M. F. and Wu, A. M. (2004) Characterization of engineered anti-p185HER-2 (scFv-CH3)₂ antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. *Protein Eng Des Sel*. **17**, 315-323
- 5 Winnard, P. and Raman, V. (2003) Real time non-invasive imaging of receptor-ligand interactions in vivo. *J Cell Biochem*. **90**, 454-463
- 6 Sundaresan, G., Yazaki, P. J., Shively, J. E., Finn, R. D., Larson, S. M., Raubitschek, A. A., Williams, L. E., Chatziioannou, A. F., Gambhir, S. S. and Wu, A. M. (2003) ¹²⁴I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med*. **44**, 1962-1969
- 7 Jiang, T., Olson, E. S., Nguyen, Q. T., Roy, M., Jennings, P. A. and Tsien, R. Y. (2004) Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 17867-17872
- 8 Olson, E. S., Aguilera, T. A., Jiang, T., Ellies, L. G., Nguyen, Q. T., Wong, E. H., Gross, L. A. and Tsien, R. Y. (2009) In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer. *Integr Biol (Camb)*. **1**, 382-393
- 9 Olson, E. S., Jiang, T., Aguilera, T. A., Nguyen, Q. T., Ellies, L. G., Scadeng, M. and Tsien, R. Y. (2010) Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for in vivo fluorescence and MR imaging of proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 4311-4316
- 10 Nguyen, Q. T., Olson, E. S., Aguilera, T. A., Jiang, T., Scadeng, M., Ellies, L. G. and Tsien, R. Y. (2010) Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 4317-4322

- 11 Aguilera, T. A., Olson, E. S., Timmers, M. M., Jiang, T. and Tsien, R. Y. (2009) Systemic in vivo distribution of activatable cell penetrating peptides is superior to that of cell penetrating peptides. *Integr Biol (Camb)*. **1**, 371-381
- 12 Vivès, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. **272**, 16010-16017
- 13 Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. and Lebleu, B. (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*. **278**, 585-590
- 14 Rothbard, J. B., Kreider, E., VanDeusen, C. L., Wright, L., Wylie, B. L. and Wender, P. A. (2002) Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake. *J Med Chem*. **45**, 3612-3618
- 15 Wright, L. R., Rothbard, J. B. and Wender, P. A. (2003) Guanidinium rich peptide transporters and drug delivery. *Curr Protein Pept Sci*. **4**, 105-124
- 16 Gammon, S. T., Villalobos, V. M., Prior, J. L., Sharma, V. and Piwnica-Worms, D. (2003) Quantitative analysis of permeation peptide complexes labeled with Technetium-99m: chiral and sequence-specific effects on net cell uptake. *Bioconjug Chem*. **14**, 368-376
- 17 Bullok, K. E., Dyszlewski, M., Prior, J. L., Pica, C. M., Sharma, V. and Piwnica-Worms, D. (2002) Characterization of novel histidine-tagged Tat-peptide complexes dual-labeled with (99m)Tc-tricarbonyl and fluorescein for scintigraphy and fluorescence microscopy. *Bioconjug Chem*. **13**, 1226-1237
- 18 Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C. H., Tang, X. W., Cory, D., Scadden, D. T. and Weissleder, R. (2000) Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*. **18**, 410-414
- 19 Torchilin, V. P. and Levchenko, T. S. (2003) TAT-liposomes: a novel intracellular drug carrier. *Curr Protein Pept Sci*. **4**, 133-140
- 20 Potocky, T. B., Menon, A. K. and Gellman, S. H. (2003) Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem*. **278**, 50188-50194
- 21 Thorén, P. E., Persson, D., Isakson, P., Goksör, M., Onfelt, A. and Nordén, B. (2003) Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **307**, 100-107
- 22 Talvensaari-Mattila, A., Pääkkö, P. and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2003) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer*. **89**, 1270-1275



1986-ban születtem Cegléden. Egyetemi tanulmányaimat Az ELTE TTK vegyész szakán végeztem. Jelenleg az ELTE Kémia Doktori iskolájának harmadéves PhD hallgatója vagyok. 2007-ben csatlakoztam Perczel András Szerkezeti Kémia és Biológia Kutatócsoportjához, ahol minifehérjék NMR vizsgálatával foglalkozom. Diplomamunkámat is ebből a témából írtam. Doktori munkám elsősorban a Trp-kalitka és az Exendin-4 minifehérje köré csoportosul. Az egyetemi évek alatt számos kitüntetésben volt részem, háromszor részesültem Köztársasági Ösztöndíjban, illetve egyszer a Kar Kiváló Hallgatójának választottak. Angliában, Leedsben töltöttem a szakmai gyakorlatomat, illetve Erasmus hallgatóként egy további szemesztert is eltöltöttem ott. Idén elnyertem egy Fulbright ösztöndíjat, így 2012 szeptemberétől kezdve a Wyoming-i egyetem (USA) Szerves kémiai tanszékén fogok szilárd bioNMR-rel foglalkozni.