

FEHÉRJE MÉRETŰ MOLEKULÁK HUMÁN SEJTEKBE JUTTATÁSA LIPID-RAFT MEDIÁLT ENDOCITÓZISSAL

*Hetényi Anasztázia¹, Imre Norbert¹, Szabó Enikő², Bodnár Brigitta¹,
Szkalisity Abel³, Gróf Ilona⁴, Bocsik Alexandra⁴,
Deli A. Mária⁴, Horváth Péter³, Czibula Ágnes², Monostori Éva²,
Martinek A. Tamás¹*

*¹SZTE, SZAOK, Orvosi Vegytani Intézet, ²ELKH-SZBK, Genetika Intézet,
³ELKH-SZBK, Biokémiai Intézet, ⁴ELKH-SZBK, Biofizikai Intézet*

Összefoglaló

Fehérje-fehérje kölcsönhatások rendkívül fontos szerepet töltenek be, mind a fiziológiás, mind a patofiziológiás folyamatokban, ezért hatékony befolyásolásuk kulcsfontosságú a gyógyszeripar számára. Szükség van olyan módszerek kidolgozására, amelyek segítségével fehérjeméretű hatóanyagokat juttathatunk el az intracelluláris célpontjaikhoz. Egyes vírusos és bakteriális fehérjék funkcionális formában könnyen internalizálódnak a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózissal, de ennek a folyamatnak a terápiásan releváns koncentrációjú fehérje rakományokkal történő utánzása nagy kihívást jelent. Ebben a munkában a WYKYW pentapeptid szekvenciát vizsgáltuk, amely specifikusan kötődik a gangliozid GM1 glikán részéhez ($K_D = 24$ nM). A WYKYW úgy segíti elő a fehérjék GM1-függő endocitózisát, hogy a rakományt terhelő kaveoszómák nem fuzionálnak lizoszómákkal. A szerkezetileg sértetlen immunglobulin G komplex (580 kDa) sikeresen bejutott az élő HeLa sejtekbe 20-160 nm közötti extracelluláris koncentráció mellett, és megfigyelhető volt a rakományfehérjék kiszökése a citoszolba. A rövid WYKYW-tag egy előnyös endocitózis útválasztó szekvencia a terápiás makromolekulák lipid raft-mediált sejtbe juttatásához, különösen a GM1-et túlzottan expresszáló rákos sejtek esetében.

Bevezetés

Napjainkban a gyógyszerfejlesztés egyik legnagyobb kihívása az emlősök sejtmembránja, mivel olyan gátat jelent, amely többnyire áthatolhatatlan az olyan extracelluláris fehérjék számára, amelyeknek szerepük lehet, mint specifikus, hatásos és biztonságos gyógyszerek [1, 2]. A fehérjeméretű hatóanyagok internalizációja elérhető lipid-raft mediált endocitózissal [3, 4], mely útvonalon gyakran közlekednek endogén fehérjék [5], bakteriális toxinok (kolera és tetanusz) [6], illetve vírusok (egér és poliómavírus [7], valamint echovírus 1 [8]). Ennek a klatrin-független útvonalnak az előnye, hogy az endoszómák csak nagyon hosszú idő után egyesülnek a lizoszómákkal, sok esetben azonban ez el is marad. Ez az endocitotikus folyamat egy fontos célpont

a funkcionális, degradáció mentes fehérjebevitelre, hiszen a képződő „szivárgó” endoszómák lehetőséget biztosítanak a rakomány kiszabadulására. A lipid betüremkedések és kaveolák felszíne gazdagon borított glikoszfinbolipidekkel, főként mono-, di-, és triszialotetrahexozil-gangliozidokkal (GM1, GD1a, GT1b), amelyek a fő receptorai az így bejutó molekuláknak. A gangliozidokhoz való kötődés és a gangliozidok kötegelése olyan endocitotikus folyamatot indít el [9, 10], ahol a lizoszómális lebomlás csekély, ezáltal lehetővé teszik a fehérjének, hogy eljussanak a sejtplazmába [11], vagy transzcitózissal más sejtekbe [12, 13]. A jelenleg elérhető sejtbejuttató rendszereknek számos hátrányát ismerjük: a rakomány lizoszómába kerül és lebomlik, esetleg az alkalmazandó koncentráció túl nagy, terápiásan irreleváns. A hátrányokat kiküszöbölhetjük, ha megértjük annak módját, hogy miként váltanak ki a gangliozidok endocitózist [14]. Ennek ismeretében tudjuk empirikusan értelmezni a glikán-kódot, és azt tudatosan alkalmazhatjuk későbbi sejtbejuttató rendszerek tervezésénél [15, 16]. A különböző gangliozid-kötő molekulák azonosítását célzó kutatások már munkánk előtt elkezdődtek, azonban a nagyaffinitású molekuláris felismerés még várat magára. A GM1 gangliozidhoz kötő molekulák különösen érdekesek lehetnek, mert bár számos emlőssejt expresszálja a molekulát, különféle tumorokban feldúsulnak [17, 18]. A fehérje alapú terápiákban az extracelluláris koncentrációtartomány jellemzően 100-500 nM [19], tehát egy nagyaffinitású kötődés szükséges ahhoz, hogy megfelelő sejtmembránban való dúsulást érzünk el, lehetővé téve a hatóanyagok kellő mértékben való beáramlását.

Célul tűztük ki, hogy nanomoláris koncentrációban juttassunk be humán sejtekbe fehérje méretű molekulákat lipid-raft mediált endocitózissal. Kerestünk egy rövid peptidet - egy nem mérgező minimális motívumot -, amely képes specifikusan a makromolekuláris rakományát egy olyan belépési útvonalhoz irányítani, amely utánozza a vírusok és bakteriális toxinok gangliozidok által közvetített internalizációját a fő lipid útvonalon/kaveoláris GM1-en keresztül. Egy szerkezetileg jól definiált receptorra fókuszálva és az interakció alapos biofizikai jellemzésével azt tűztük ki célul, hogy utat nyitunk a szerkezet alapú tervezés felé, ami ritka megközelítés a fehérje célba juttatásnál [20, 21]. Kimutattuk, hogy egy pentapeptid szekvencia (WYKYW) kis nanomoláris affinitással specifikusan köti a GM1 szénhidrát részét. Ennek a rövid endocitózist irányító peptidnek a nagy fehérjéhez való közvetlen kapcsolása elősegítette a makromolekulák lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózist terápiásan releváns nanomoláris koncentrációkban, és így elkerülte az endoszómális csapdázódást és a lizoszómális lebomlást.

Módszerek

Izotermális titráló kalorimetria (ITC)

A szintetizált peptidekkel, peptid-konjugátumokkal és a megcélzott gangliozidokkal (GM1, aszialo-GM1, GM3) izotermális titráló kalorimetriát végeztünk egy MicroCal VP-ITC kaloriméter segítségével. A gangliozid-dodecilszfokolin 1:5 bicellákat titráltuk a peptidekhez és konjugátumaikhoz (pH 7,2, 35 °C) 15 µM gangliozid koncentrációt alkalmazva.

Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás és analízis (FACS)

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

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (CLSM)

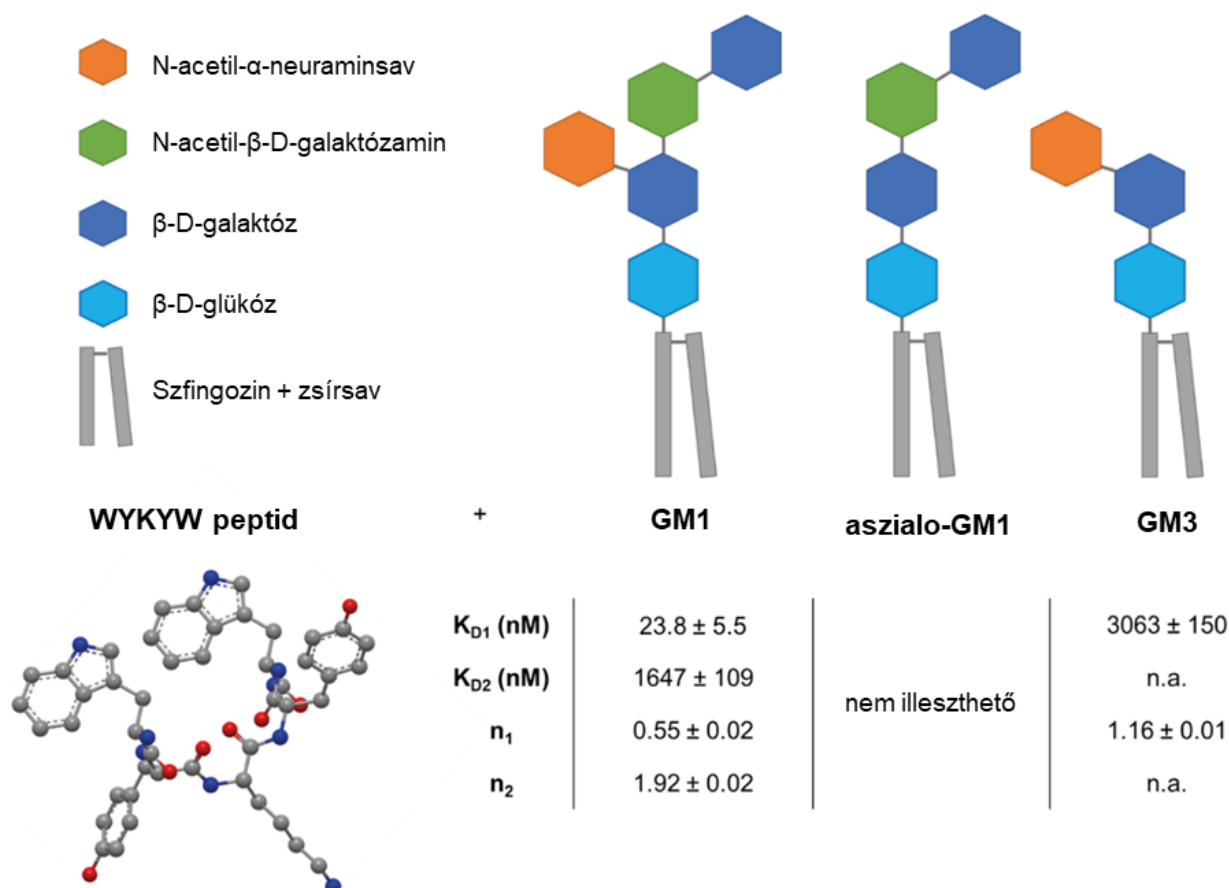
A vizsgált sejteket a tanulmányozott komplexekkel különböző koncentrációk alkalmazása mellett, különböző időhosszakig inkubáltuk 37 °C-on. Ezután a sejteket mostuk, majd Hoechst 33342 sejtmag-festékkel 30 percig jelöltük. A koleratoxin kolokalizációs kísérletekben a sejteket a komplexek mellett FITC-jelölt koleratoxin B alegységgel is inkubáltuk. Az antitestek szerkezetét célzó kísérletekben a szokásos inkubáció után a sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd szaponinnal permeabilizáltuk, végül pedig Atto488-konjugált galektin-1-gyel kezeltük őket 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. Az IgG komplexek méréséhez a sejtmembránokat FITC-jelölt WGA lektinnel jelenítettük meg. FITC-jelölt NeutrAvidin alkalmazásakor az extracelluláris fluoreszcencia kioltására tripánkéket használtunk. A rakomány lokalizációjának megfigyeléséhez a fluoreszcens festékekkel jelölt molekulákat egy Leica SP5 AOBS konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A Hoechst festéshez a 405 nm-es diódát, a FITC és Atto488 5 jelölésekhez a 488 nm-es argon lézert, az r-fikoeritrinhez és a LysoTrackerRed festékhez az 543 nm-es HeNe lézert, míg az Alexa Fluor 647-konjugátumokhoz a 633 nm-es HeNe lézert használtuk. Az emisszió detektálására

mindig a megfelelő spektrális szűrőt használtuk.

Eredmények

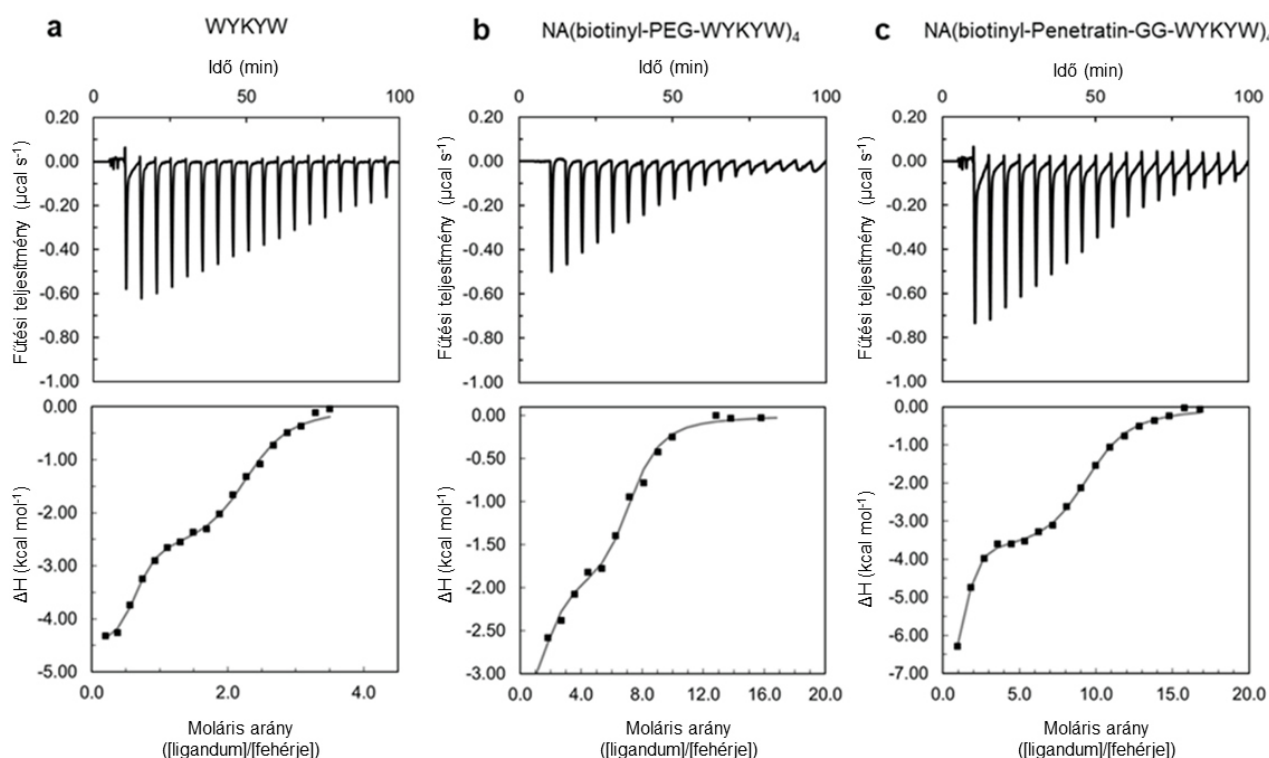
A WYKYW pentapeptid nagy affinitással és specifitással köti a gangliozid GM1-et

A WYKYW vezérmolekulát (1. ábra) először Gabius és munkatársai [22-24] azonosították a Tyr-Xxx-Tyr-tartalmú pentapeptid család tagjaként, amelyről megfigyelték, hogy szétkapcsolja a galektin-1 - proteoglikán kölcsönhatásokat [24]. Korábbi munkánk során azt találtuk, hogy a proteoglikán-galektin-1 kölcsönhatás gátlásának oka a peptid kompetitív kötődése az aszialofetuin glikán részéhez [25]. Annak ismeretében, hogy a galektin-1 kötődik a GM1 gangliozidhoz [26], feltételeztük, hogy a WYKYW kölcsönhatásba lép a GM1 extracelluláris glikán részével is. A fentiek ismeretében szintetizáltuk a WYKYW peptidet, és izotermális titráló kalorimetriával (ITC) (1. ábra) megmértük az affinitását és vizsgáltuk a specifitását a különböző gangliozidokhoz.



1. ábra. A kötődés célpontjául választott gangliozid GM1 és származékai, valamint a WYKYW vezérmolekula szerkezete. A gangliozid-WYKYW kölcsönhatások ITC-vel mért kötési affinitásai (K_D) és sztöchiometriái (n). A paramétereket a GM1-nél két független kötőhely, a GM3-nál egy kötőhely modelljéhez illesztett nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével kaptuk. Asialo-GM1 esetében az ITC entalpogram nem mutatott illeszkedő jellemzőket. Forrás: [27].

Kétlépcsős kölcsönhatás figyelhető meg a GM1-gyel (2.a ábra), amelyben az első kötési lépcső alacsony nanomoláris affinitást mutatott 1:2-es GM1:WYKYW aránnyal. A második szakasz egy mikromoláris kölcsönhatás volt. A tiszta n-dodecil-foszfokolinnal (DPC) végzett kontroll kísérletben nem találtunk kölcsönhatást. A szialilcsoport eltávolításával (aszialo-GM1) nem kaptunk illeszthető eredményeket. A GM3 gangliozid esetén, (hiányzik a terminális β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 3)GalNAc), csak gyenge kölcsönhatás volt megfigyelhető. Az ITC mérések eredményeiből megállapítottuk, hogy a WYKYW csak a GM1-et köti meg alacsony nanomoláris affinitással.



2. ábra. ITC entalpogramok. a) WYKYW, **b)** NA(biotinil-PEG-WYKYW)₄ és **c)** NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)₄ esetén. A titrálásokat GM1:DPC 1:5 bicellákkal végeztük, és a nemlineáris legkisebb négyzetek illesztését a két független kötőhely modellhez hajtottuk végre. Forrás: [27].

A WYKYW-peptid lipid-raft mediált/kaveoláris edocitózissal juttatja be a fehérje rakományt nanomoláris koncentráció mellett

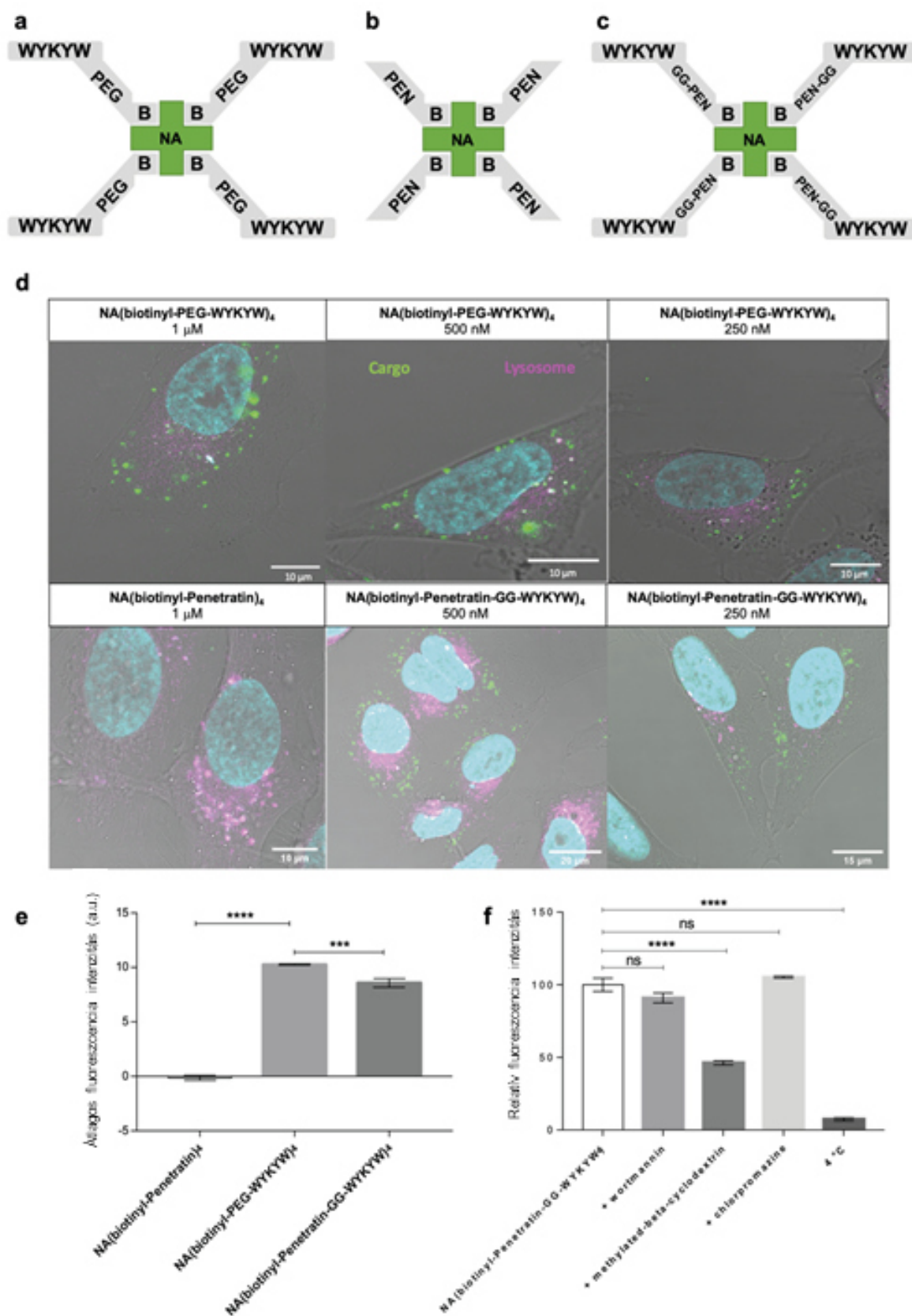
A következő lépésben teszteltük azt a hipotézist, hogy a nagy affinitású WYKYW–GM1 kölcsönhatás endocitózist indukál-e, amikor a hordozó címkét egy fehérjéhez kapcsoljuk. Modellrakományként a FITC-jelölt NeutrAvidint (NA) választottuk; biotinil-PEG-WYKYW konjugátummal jelöltük meg (3. ábra), ahol a PEG 8-amino-3,6-dioxa-oktil-borostyánkősav monomer kapcsolásával kapott trimer linkert jelöl. Az NA négy biotinilezett szekvenciához kötődik, így a NA(biotinil-PEG-WYKYW)₄ tetramer fehérjekonstrukciót eredményez (3.a ábra).

A WYKYW endocitózist-indukáló hatékonyságát egy referencia sejtbehatoló szekvenciához viszonyítva értékeltük, amit a FITC-NA biotinil-Penetratinnal történő jelölésével kaptunk: NA(biotinil-Penetratin)₄ (3.b ábra). A WYKYW és a Penetratin additív és szinergikus hatásának mérésére egy biotinil-Penetratin-GG-WYKYW kimérát (NA(biotinyl-Penetratin-GG-WYKYW)₄) is használtunk (3.c ábra). Az ITC mérések megerősítették, hogy a NA(biotinil-PEG-WYKYW)₄ és NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)₄ 14,5 ± 1,7 és 20,8 ± 2,7 nM-os K_D-vel kötötte meg a GM1-et (2.b, c ábra). A kölcsönhatás sztöchiometriája 1:1 volt a jelölt fehérje feleslegében. A NA(biotinil-Penetratin)₄ nem mutatott affinitást a GM1-hez.

A WYKYW-tartalmú konjugátumok sejtekbe való bejutásának tesztelésére konfokális lézer pásztázó mikroszkópos (CLSM) kísérleteket végeztünk (3.d ábra). A 250–1000 nM közötti extracelluláris rakománykoncentráció-tartományban megfigyelhettük mind a NA(biotinyl-PEG-WYKYW)₄, mind a NA(biotinyl-Penetratin-GG-WYKYW)₄ hatékony bejutását. Meglepő módon a NA(biotinyl-Penetratin)₄ ilyen körülmények között nem jutott be a sejtekbe (ez a CLSM-felvételeken is látható).

A hordozó-rakomány konstrukciók sejten belüli megjelenését fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (FACS) mérésekkel határoztuk meg 1 μM-es rakománykoncentrációnál (3.e ábra), tripánkéket használva extracelluláris fluoreszcencia kioltóként. A NA(biotinyl-PEG-WYKYW)₄ és NA(biotinyl-Penetratin-GG-WYKYW)₄ bejutási mértéke hasonló volt, míg a Penetratin-címkézett kontroll NA(biotinyl-Penetratin)₄ nem jutott be a sejtekbe. A CLSM és FACS eredmények alátámasztják, hogy a WYKYW GM1 felismerő szekvencia képes volt endocitózist kiváltani, ezzel szemben a Penetratin szekvencia nem indukálta a rakomány endocitózist azonos körülmények között (3.d,e ábra). A Penetratin jelenléte a WYKYW-tartalmú hordozó szekvenciában szignifikánsan nem változtatta a bejutás hatékonyságát a PEG linker származékhoz képest (additív vagy szinergikus hatások hiánya), ami azt jelzi, hogy a WYKYW megbízható endocitózist indukáló hatással rendelkezik, amely független a linker kémiától.

A lizoszómák festése 6 óra inkubáció után sem mutatott kolokalizációt a hordozó-rakomány komplexszel (3.d ábra). Ez azt jelzi, hogy a WYKYW képes sikeresen megcélozni a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis útvonalat.



3. ábra. Az **a)** NA(biotinyl-PEG-WYKYW)₄, **b)** NA(biotinyl-Penetratin)₄ és **c)** NA(biotinyl-Penetratin-GG-WYKYW)₄ sematikus ábrázolása. **d)** A konstrukciók internalizálása különböző koncentrációkban HeLa sejtekkel 6 óra inkubáció után konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal meghatározva. A FITC-jelölt NA zöld színnel, a Hoechst 33342-jelölt sejtmagok ciánnal, a

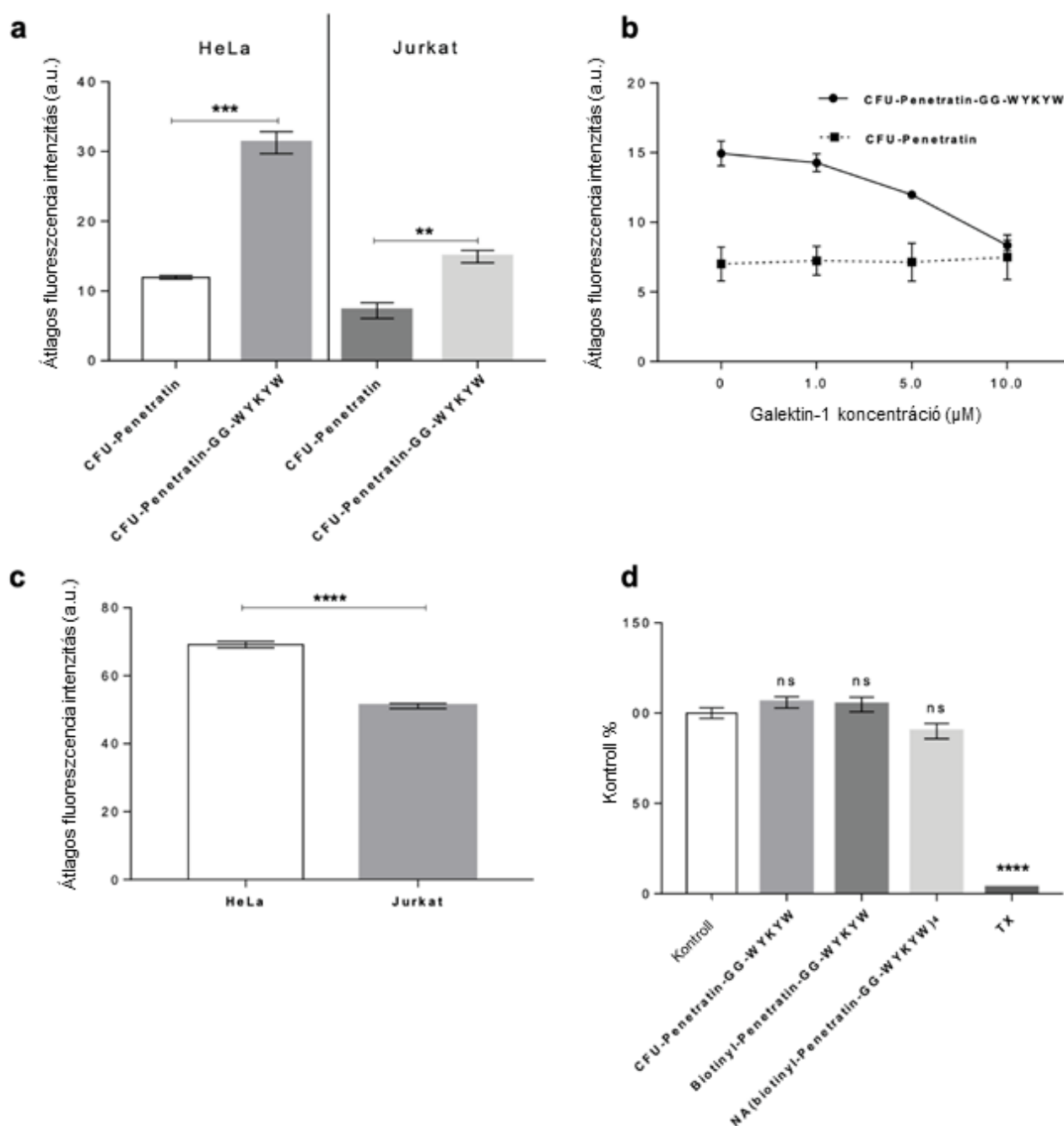
*LysoTracker Reddel festett lizoszómák magenta színnel láthatók. e) A konstruktok bejutása 1 μM koncentrációban HeLa sejtekkel 1 óra inkubáció után áramlási citometriával meghatározva. f) Az endocitózis inhibitor molekulák hatása a bejutásra áramlási citometriával meghatározva. A HeLa sejteket wortmannin (W), klórpromazin (CP) vagy β -metil-ciklodextrin (BMCD) inhibitorokkal 37 °C-on 30 vagy 60 percig előinkubáltuk, majd NA (biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)₄-gyel inkubáltuk. 37 °C-on 60 percig. Kontroll kísérletet is végeztünk 4 °C-on. Minden adatpont három mérés átlagát ábrázolja; a hibasávok az átlag standard hibáját mutatják. A statisztikai elemzést egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük, post hoc Tukey szignifikáns különbség teszttel. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Forrás: [27].*

A sejtbejutási mechanizmus szelektivitásának további alátámasztására endocitózis gátlási kísérleteket végeztünk NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)₄-nal HeLa sejtekben. A komplex internalizációja 4 °C-on blokkolható volt, vagyis a transzlokáció energiatartó (3.f ábra). A sejtek különböző endocitózis gátlókkal történő előkezelése után azt tapasztaltuk, hogy a metil- β -ciklodextrin (MBCD), amely egy ismert lipid-raft inhibitor, szignifikánsan csökkentette a komplex bejutását, míg a wortmannin és a klórpromazin nem mutatott szignifikáns hatást. Ez az eredmény megerősítette a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis útvonalat (3.f ábra), összhangban azzal a ténnyel, hogy a GM1 lipid-raftokban és kaveolákban lokalizálódik [28]. A lipid-raft mediált mechanizmus alátámasztására további kolokalizációs kísérletet végeztünk a másodlagos antitestten Alexa Fluor 647-tel jelölt hordozó-cargo komplexszel és FITC-jelölt koleratoxin B alegységével. A koleratoxinról ismert, hogy GM1 kötéssel és lipid-raft mediált útvonalon jut be a sejtekbe [6]. Korrelációt találtunk a koleratoxin és a hordozó-rakomány komplex jelei között, ami arra utal, hogy a hordozó-rakomány komplex lipid-raft mediált mechanizmuson keresztül jutott be a sejtekbe.

Egyetlen WYKYW-peptid elegendő a ganglioizid GM1 kötődésen keresztül az endocitózis kiváltásához

Helenius és Pelkmans rámutatott, hogy a GM1 ganglioizid multivalens kötődése/klaszterezése szükséges a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis kiváltásához [9]. Modellünk hordozó-rakomány komplexének tetramer természete összhangban van ezzel a megfigyeléssel. Másrészt az endocitózishoz szükséges hordozó szekvenciák száma döntő lehet, különösen, ha a hordozó-cargo komplexet rekombináns szintézissel állítják elő. Ennek vizsgálatára teszteltük a monovalens CFU-Penetratin-GG-WYKYW konjugátum felvételét, amely 141 ± 45 nM-os K_D -t mutatott a GM1-hez. Kontrollként CFU-Penetratint használtunk, amely nem rendelkezik GM1-kötési affinitással. A szekvenciák humán HeLa és Jurkat sejt vonalak sejt felvételét FACS-al (4.a ábra) mértük, tripánkéket használva extracelluláris fluoreszcencia kioltóként. A vivőanyagokat 1 μM koncentrációban alkalmaztuk, ami legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb a

penetratinhoz használt optimális koncentrációnál [29], de megfigyeltük az önálló CFU-Penetratin sejtpenetrációját a fehérje rakomány nélkül.



4. ábra. a) Fluoreszcensen jelölt szekvenciák felvétele 1 μM koncentrációban HeLa és Jurkat sejteken 1 órás inkubáció után. **b)** CFU-Penetratin és CFU-Penetratin-GG-WYKYW 1 μM-os kompetíciója a galectin-1 0-10 μM-val. **c)** A GM1 sejtfelszíni expressziója HeLa és Jurkat sejtekben FITC-koleratoxin festéssel mérve. **d)** A CFU-Penetratin-GG-WYKYW, biotinil-Penetratin-GG-WYKYW és NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)₄ citotoxicitása 10 μM-en a HeLa sejtekre 24 óra elteltével bioimpedancia mérésekkel meghatározva. Triton X-100-at használtunk toxicitási kontrollként. Minden adatpont három mérés átlagát jelenti, a hibasávok pedig az átlag standard hibáját mutatják. A páratlan Student t-próbát használtuk az a) és c) panelen látható adatok statisztikai elemzéséhez: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Egyutas varianciaanalízis (ANOVA) post hoc Tukey szignifikáns különbség teszttel a d) panelben bemutatott adatok statisztikai elemzéséhez: * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Forrás: [27].

A CFU-Penetratin-GG-WYKYW komplex háromszoros, illetve kétszeres növekedést mutatott a sejtpenetráció hatékonyságában a HeLa és Jurkat sejtvonalakon, a makromolekuláris rakomány nélküli CFU-Penetratinnal kapott értékkel összehasonlítva.

Az intracelluláris rakomány mennyisége kétszer akkora volt a HeLa sejtekben, mint a Jurkat sejtekben. Feltételeztük, hogy a WYKYW sejtfüggő teljesítménye összefügg a GM1 sejtfelszíni expressziós szintjével. A GM1 kötő koleratoxinnal 4 °C-on végzett kötődési kísérletek (ami megakadályozza az endocitózist) azt mutatták, hogy a HeLa sejtek magasabb szintű GM1-et expresszáltak, mint a Jurkat sejtek (4.c ábra). Ezt követően az endocitózis közvetlen GM1-függését teszteltük egy kompetíciós kísérletben, amelyben a terminális digalaktozidokhoz mikromoláris affinitással [30] kötő galectin-1-et alkalmaztunk inhibitorként.

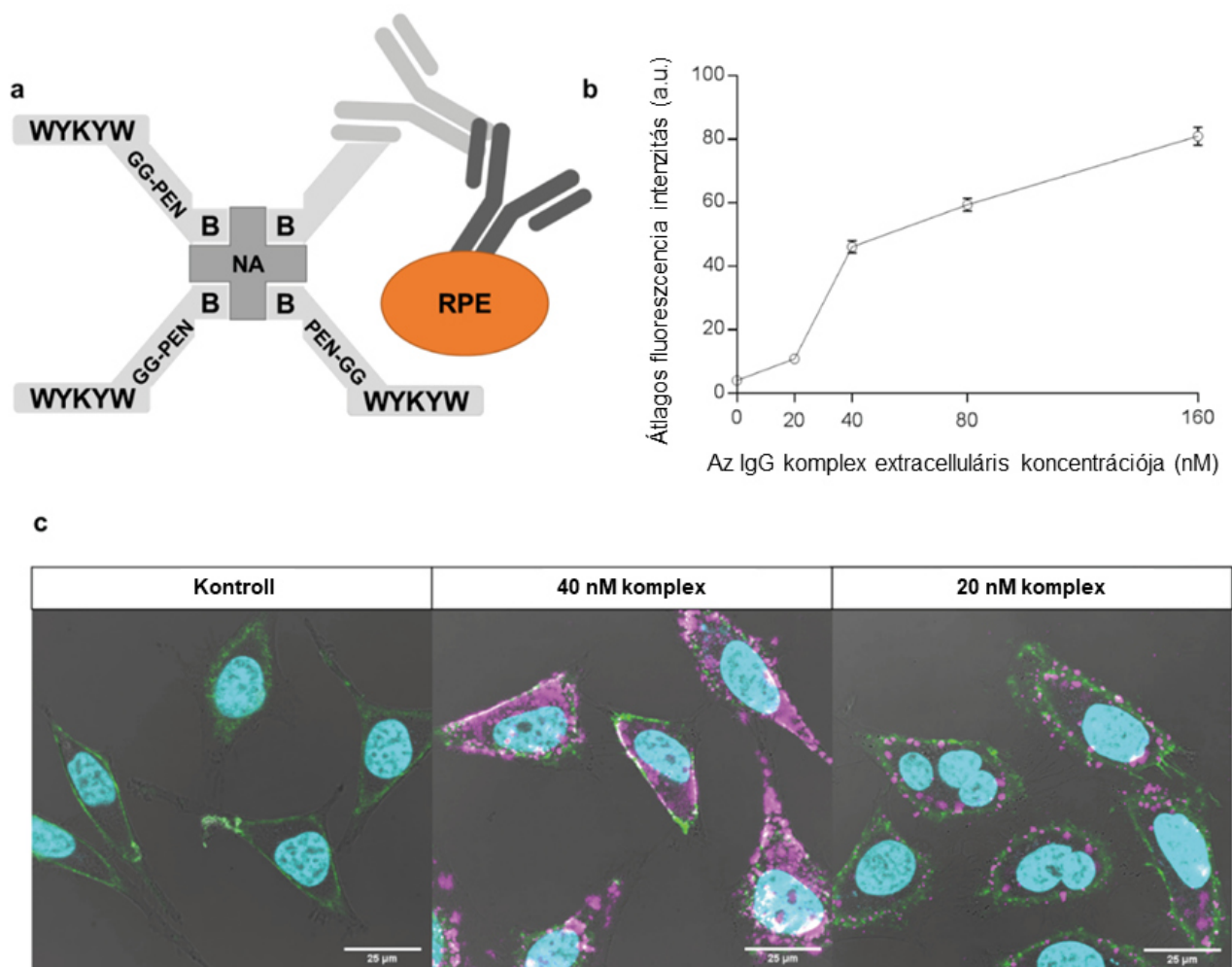
A galectin-1 10 μ M-os koncentrációban csökkentette a CFU-Penetratin-GG-WYKYW felvételét a CFU-Penetratin által elért alapszintre (4.b ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy egyetlen WYKYW szegmens elegendő a GM1 kötődésen keresztül az endocitózis kiváltásához. Az internalizált rakomány mennyisége korrelált a GM1 sejtfelszíni expressziós szintjével (4.c ábra). A WYKYW-tag számos előnyös tulajdonságot mutatott, és a sejtes kísérletek során nem észleltünk citotoxicitásra utaló jeleket. A CFU-Penetratin-GG-WYKYW lehetséges citotoxicitását magasabb koncentrációkban is teszteltük, és 10 μ M-ig nem volt toxikus a HeLa-sejtekre (4.d ábra), így a molekula biztonságos a további kísérletekhez.

A WYKYW-jelölt szekvenciák képesek antitest méretű komplexeket intracellulárisan bejuttatni terápiás szempontból releváns nanomoláris koncentrációkban

Következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a WYKYW-jelölés képes-e az immunglobulinok terápiásan releváns családjába tartozó nagy fehérje rakománynál endocitózist indukálni. Terveztünk egy 580 kDa-os konstrukciót, amely linkerként NA-t, a WYKYW-tartalmú biotinil-PEG-WYKYW-et vagy biotinil-Penetratin-GG-WYKYW-et, egy biotinilált primer immunglobulin G-t és egy r-fikoeritrin-konjugált másodlagos antitestet tartalmazott (5.a ábra).

A HeLa sejteket a nagy hordozó-cargo komplexszel 3 órán át inkubáltuk különböző extracelluláris koncentrációkban. Célunk az volt, hogy teszteljük az affinitásvezérelt endocitikus anyagáramlás lehetséges alsó határát; ezért a

kísérleteket a hordozó-hub komplex affinitásához ($K_D = 21 \text{ nM}$) közeli koncentrációban végeztük el. A felülethez kötött frakció eltávolítása érdekében a mintákat alapos mosásnak vetettük alá jelöletlen NA(biotinil-Penetratin-GG-WYKYW)₄-gyel. A hordozó-IgG komplex a biotinil-Penetratin-GG-WYKYW konjugátummal 20-160 nM-es koncentrációtartományban internalizálódott (5. ábra).



5. ábra. a) Sematikus reprezentációja az általunk tervezett moduláris konstruktnak. **b)** Mesterséges intelligenciával segített kvantitatív elemzése a felvett CLSM képeknek. A HeLa sejtek 6 órán át voltak inkubálva különböző koncentrációkban a tervezett IgG komplex molekulával. **c)** Az IgG komplex sejtbejutása különböző koncentrációkban 3 órás inkubációt követően. Az r-fikoeritrin-konjugált másodlagos antitest magenta színnel, a WGA-FITC jelölt membrán zöld színnel, a sejtmagok cián színnel vannak megjelenítve. A kontroll sejteket r-fikoeritrin-konjugált másodlagos antitestet adtunk 160 nM koncentrációban 3 órás inkubációban. Forrás: [27].

A biotinil-PEG-WYKYW minta előkészítése során fehérje kicsapódás volt megfigyelhető. Ez arra utalt, hogy a linker régió testre szabható szegmensként funkcionálhat a szállító-teher komplex oldatban történő stabilizálására. Fontos, hogy a kaveoszómák között a citoplazmában diffúz fluoreszcenciát figyeltünk meg, amikor a komplexet 40 nM feletti koncentrációban alkalmaztuk, vagyis a

rendszer képes kiszabadulni az internalizált rekeszekből [31]. Az alaposabb elemzés azt támasztotta alá, hogy az internalizált rakomány mennyisége 20 nM-ban csökkent. Elvégeztük a CLSM-képek mesterséges intelligenciával segített kvantitatív elemzését (5.b ábra). Az eredmények megerősítették, hogy a WYKYW GM1 felismerő szegmenst tartalmazó komplex robusztus hordozóanyag, amely endocitózist és az 580 kDa-os rakomány transzlokációját váltotta ki a terápiás protokollok alsó tartományának megfelelő extracelluláris koncentrációkban (kb. 100 nM). A bejutott rakomány relatív mennyiségének 20 nM körüli csökkenését az elemzés megerősítette, és ez a megfigyelés a WYKYW-GM1 kölcsönhatás K_D értékéhez közel helyezi az alkalmazhatóságot. Ez a jelenség, ami a tömeghatás törvényével magyarázható, alátámasztja azt az elképzelést, hogy a rakomány endocitózist a GM1 affinitás-tag irányította. Az r-fikoeritrin intenzív intracelluláris fluoreszcens emissziója a funkcionális fehérje árulkodó jele volt. A hordozó és az r-fikoeritrin közötti IgG komponensek lehetséges lebomlásának tesztelésére kolokalizációs kísérletet végeztünk FITS-NA-val a hordozóban és egy Alexa Fluor 647-tel jelölt másodlagos antitesttel a rakományban. Nagyon jó térbeli korrelációt találtunk a két fluoreszcens jel között, ami alátámasztotta, hogy az elsődleges és a másodlagos antitest közötti molekuláris felismerés működőképes. Az elsődleges antitest szerkezeti integritásának további vizsgálataként a HeLa sejteket hordozó-cargo komplexszel kezeltük, amely csak egy primer anti-galektin-1 antitestet tartalmazott a hordozóhoz, és az internalizált IgG komponenst Atto 488-segítségével tettük láthatóvá. A hordozó-cargo komplexszel kezeletlen kontrollsejtek nem mutattak fluoreszcenciát, míg az internalizált antitest megkötötte a fluoreszcens galektin-1-et a kezelt sejtekben, és fluoreszcenciát figyeltünk meg. Ez a jelenség alátámasztja, hogy az elsődleges antitest Fv-régiója szerkezetileg sértetlen.

Eredmények megbeszélése

Az emlősök sejtmembránja szigorú kontrollt gyakorol a sejtmembránon keresztüli makromolekuláris transzporttal szemben. A lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis a legígéretesebb módszer a rakományfehérjék funkcionális formájukban való szállítására. Koncepciónk az volt, hogy a makromolekuláris rakományt a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózis felé tereljük, és elkerüljük a klatrin által közvetített és a makropinocitózis útvonalakat. Az endocitotikus membrángödrökben előforduló kezdeti molekuláris felismerési eseményekre összpontosítottunk, mert ez elősegítette a mechanizmus kiválasztását és az alacsony koncentrációjú rakomány hatékony dúsítását a

belépési ponton. Azt találtuk, hogy a WYKYW-címke nagy affinitással köti a GM1 lipid raft receptor glikán részét. A GM3-mal és az aszialo-GM1-gyel való erős kölcsönhatások hiánya szelektív viselkedést jelez. Arra a következtetésre jutottunk, hogy mind a szialilcsoport, mind a terminális N-Ac-digalaktozid a GM1-ben lényeges szerkezeti jellemzők az alacsony nanomoláris kötődéshez.

A WYKYW-tag fontos tulajdonsága, hogy hatékonyan tudja irányítani a makromolekuláris rakományt a kívánt lipid raft-mediált/kaveoláris endocitózis belépési pontjához, és még nagy rakományt tartalmazó IgG fehérjékhez kapcsolódva is képes indukálni a folyamatot. A WYKYW specifikus affinitáson alapuló irányító hatása alapján definiáljuk az „endocitózis útválasztó szekvencia” kifejezést. Bár a kaveoláris GM1 multivalens kötődése szükséges az endocitózis kiváltásához, azt találtuk, hogy egyetlen WYKYW szegmens beépítése a láncba elegendő ahhoz, hogy a GM1 kötődésen keresztül beindítsa az internalizációt. Megjegyezzük, hogy a galectin-1 a GM1–WYKYW kölcsönhatás kompetitív inhibitoraként működött, de ez csak az endogén *in vivo* szérum galectin-1 100 ng x ml⁻¹ (6,7 nM) koncentrációjánál nagyságrendekkel magasabb koncentrációban fordult elő [32]. A megfigyelés alapján az endocitózis útválasztó hatás potenciális *in vivo* gátlásának kockázata alacsony.

Ahogy az várható volt a lipid-raft mediált/kaveoláris útvonal esetében, az internalizált kaveolák korai endoszómákká, majd később lizoszómákká való előrehaladása hiányzott vagy nagyon lassú volt [11, 15], ezért nem figyeltünk meg lizoszómákkal való kolokalizációt, ami megkímélte a rakományt a korai lebomlástól [33]. Ez elősegíthette a rakomány részleges kiszabadulását a kaveoszómákból, amit kísérleteink során diffúz intracelluláris fluoreszcenciaként lehetett megfigyelni. Ez a tulajdonság utat nyit az itt bemutatott endocitózisra irányító szekvencia továbbfejlesztéséhez. A fehérje rakomány jelölése a nagy fluoreszcens fehérjével, az r-fikoeritrinnel lehetővé tette számunkra, hogy teszteljük az intracelluláris fehérje funkcionalitását. A kiválasztott mechanizmus érintetlenül hagyta a fehérje rakományt, amint azt a fluoreszcencia mutatja az órákon át tartó inkubáció után is. Ezenkívül az elsődleges és másodlagos antitestek, valamint az elsődleges antitest és a külsőleg hozzáadott antigén közötti molekuláris felismerés működőképes volt, ami azt jelzi, hogy a hordozó-rakomány komplex nem bomlik le.

GM1 receptor alapú moduláris megközelítésünk hasznos alternatívája a jelenleg elérhető hordozóknak, mivel a nagyon rövid, könnyen felhelyezhető és nem

toxikus WYKYW-tag elősegíti a lipid-raft mediált/kaveoláris endocitózist hordozó által kiváltott módon, és terápiásan releváns koncentrációban működik a GM1-et expresszáló sejtek számára. Egyre fontosabb a rakományok sejt- és szövetspecifikus célzására szolgáló módszerek kidolgozása. A WYKYW-jelölt rakomány GM1-függő endocitózisa szelektivitást kínál az olyan sejtípusok számára, amelyek túlzottan expresszálják a GM1-et, amely számos tumorsejt jellemzője. Ezt a sejtípus-függő hatást alátámasztják HeLa és Jurkat sejtekkel végzett kísérleteink eredményei, amelyek különböző mennyiségű GM1-et jelenítenek meg a sejtfelszínen.

Köszönetnyilvánítás

A projekt a GINOP-2.2.1-15-2016-00007 és a TUDFO/47138-1/2019-ITM pályázatok támogatásából valósult meg.

Irodalomjegyzék

- [1] Fosgerau, K., Hoffmann, T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, **20(1)**: 122-128.
- [2] Sanchez-Navarro, M., Teixido, M., Giralt, E. (2017) Just passing through. *Nature Chemistry*, **9(8)**: 727-728.
- [3] Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M., Helenius, A. (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*, **118(6)**: 767-780.
- [4] Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, **3(5)**: 473-483.
- [5] Fajka-Boja, R., Blasko, A., Kovacs-Solyom, F., Szebeni, G.J., Toth, G.K., Monostori, E. (2008) Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65(16)**: 2586-2593.
- [6] Montesano, R., Roth, J., Robert, A., Orci, L. (1982) Non-Coated Membrane Invaginations Are Involved in Binding and Internalization of Cholera and Tetanus Toxins. *Nature*, **296(5858)**: 651-653.
- [7] Smith, A.E., Helenius, A. (2004) How viruses enter animal cells. *Science*, **304(5668)**: 237-242.
- [8] Pietiainen, V., Marjomaki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A., Hyypia, T. (2004) Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Molecular Biology of the Cell*, **15 (11)**: 4911-4925.

- [9] Pelkmans, L., Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic*, **3 (5)**: 311-320.
- [10] Mayor, S., Rothberg, K.G., Maxfield, F.R. (1994) Sequestration of Gpi-Anchored Proteins in Caveolae Triggered by Cross-Linking. *Science*, **264 (5167)**: 1948-1951.
- [11] Kiss, A.L., Botos, E. (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation ? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **13(7)**: 1228-1237.
- [12] Sprenger, R.R., Fontijn, R.D., van Marle, J., Pannekoek, H., Horrevoets, A.J.G. (2006) Spatial segregation of transport and signalling functions between human endothelial caveolae and lipid raft proteomes. *Biochemical Journal*, **400**: 401-410.
- [13] Moscariello, P., Ng, D.Y.W., Jansen, M., Weil, T., Luhmann, H.J., Hedrich, J. (2018) Brain Delivery of Multifunctional Dendrimer Protein Bioconjugates. *Adv Sci (Weinh)*, **5(5)**: 1700897.
- [14] Zorko, M., Langel, U. (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57(4)**: 529-545.
- [15] Matsubara, T., Otani, R., Yamashita, M., Maeno, H., Nodono, H., Sato, T. (2017) Selective Intracellular Delivery of Ganglioside GM3-Binding Peptide through Caveolae/Raft-Mediated Endocytosis. *Biomacromolecules*, **18(2)**: 355-362.
- [16] O'Sullivan, D. (2002) Framework for managing business development in the networked organisation. *Computers in Industry*, **47(1)**: 77-88.
- [17] Fuster, M.M., Esko, J.D. (2005) The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, **5(7)**: 526-542.
- [18] Krengel, U., Bousquet, P.A. (2014) Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Frontiers in Immunology*, **5**: 1-11.
- [19] Fischer, S.K., Yang, J.H., Anand, B., Cowan, K., Hendricks, R., Li, J., Nakamura, G., Song, A. (2012) The assay design used for measurement of therapeutic antibody concentrations can affect pharmacokinetic parameters Case studies. *Mabs*, **4(5)**: 623-631.
- [20] Kauffman, W.B., Guha, S., Wimley, W.C. (2018) Synthetic molecular evolution of hybrid cell penetrating peptides. *Nature Communications*, **9**: 2568.
- [21] Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells.

- Nature Biotechnology*, **19(12)**: 1173-1176.
- [22] Andre, S., Maljaars, C.E.P., Halkes, K.M., Gabius, H.J., Kamerling, J.P. (2007) Discovery of galectin ligands in fully randomized combinatorial one-bead-one-compound (glyco)peptide libraries. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17(3)**: 793-798.
- [23] Maljaars, C.E.P., Andre, S., Halkes, K.M., Gabius, H.J., Kamerling, J.P. (2008) Assessing the inhibitory potency of galectin ligands identified from combinatorial (glyco)peptide libraries using surface plasmon resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, **378(2)**: 190-196.
- [24] Andre, S., Arnusch, C.J., Kuwabara, I., Russwurm, R., Kaltner, H., Gabius, H.J., Pieters, R.J. (2005) Identification of peptide ligands for malignancy- and growth-regulating galectins using random phage-display and designed combinatorial peptide libraries. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13(2)**: 563-573.
- [25] Weber, E., Hetenyi, A., Vaczi, B., Szolnoki, E., Fajka-Boja, R., Tubak, V., Monostori, E., Martinek, T.A. (2010) Galectin-1-Asialofetuin Interaction Is Inhibited by Peptides Containing the Tyr-Xxx-Tyr Motif Acting on the Glycoprotein. *Chembiochem*, **11(2)**: 228-234.
- [26] Kopitz, J., vonReitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M., Gabius, H.J. (1997) Galectin-1 is the major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *European Journal of Cell Biology*, **74**: 54-54.
- [27] Imre, N., Hetenyi, A., Szabo, E., Bodnar, B., Szkalitsy, A., Grof, I., Bocsik, A., Deli, M.A., Horvath, P., Czibula, A., Monostori, E., Martinek, T.A. (2020) Routing Nanomolar Protein Cargoes to Lipid Raft-Mediated/Caveolar Endocytosis through a Ganglioside GM1-Specific Recognition Tag. *Adv Sci (Weinh)*, **7(4)**: 1902621.
- [28] Parton, R.G. (1994) Ultrastructural-Localization of Gangliosides - Gm(1) Is Concentrated in Caveolae. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **42(2)** 155-166.
- [29] El-Andaloussi, S., Jarver, P., Johansson, H.J., Langel, U. (2007) Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochemical Journal*, **407**: 285-292.
- [30] Brewer, C.F. (2002) Thermodynamic binding studies of galectin-1,-3 and-7. *Glycoconjugate Journal*, **19(7-9)**: 459-465.

- [31] Qian, Z.Q., Liu, T., Liu, Y.Y., Briesewitz, R., Barrios, A.M., Jhiang, S.M., Pei, D.H. (2013) Efficient Delivery of Cyclic Peptides into Mammalian Cells with Short Sequence Motifs. *Acs Chemical Biology*, **8(2)**: 423-431.
- [32] He, J.L., Baum, L.G. (2004) Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *Journal of Biological Chemistry*, **279(6)**: 4705-4712.
- [33] Torchilin, V.P. (2006) Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **8**: 343-375.



Hetényi Anasztázia 1978-ben született Mohácson. 2008 óta dolgozik a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézetében, jelenleg egyetemi docens. Vegyész diplomával rendelkezik, PhD fokozatát 2006-ben szerezte, 2015-ben habilitált. Fő kutatási területe molekuláris felismerés és önrendeződés biomimetikus rendszerekben, mely témában több Q1-es cikke jelent meg, a cikk témájából nemzetközi szabadalom született.



Martinek A. Tamás 1973-ben született Szegeden. 2018 óta dolgozik a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézetében, jelenleg tanszékvezető egyetemi tanár. Vegyész diplomával és közgazdasági szakoklevéllel rendelkezik, PhD fokozatát 2001-ben szerezte, 2008-ban habilitált, 2014-ben MTA doktora címet szerzett. Fő kutatási területe gyógyszerkutatás-hatóanyagtervezési módszerek fejlesztése, bioaktív molekulák molekulaszervezeti és kémiai tulajdonságainak vizsgálata, antimikrobiális foldamerek, fehérje-fehérje kölcsönhatások, mely témában számos rangos közleménye jelent meg, a cikk témájából nemzetközi szabadalom született.