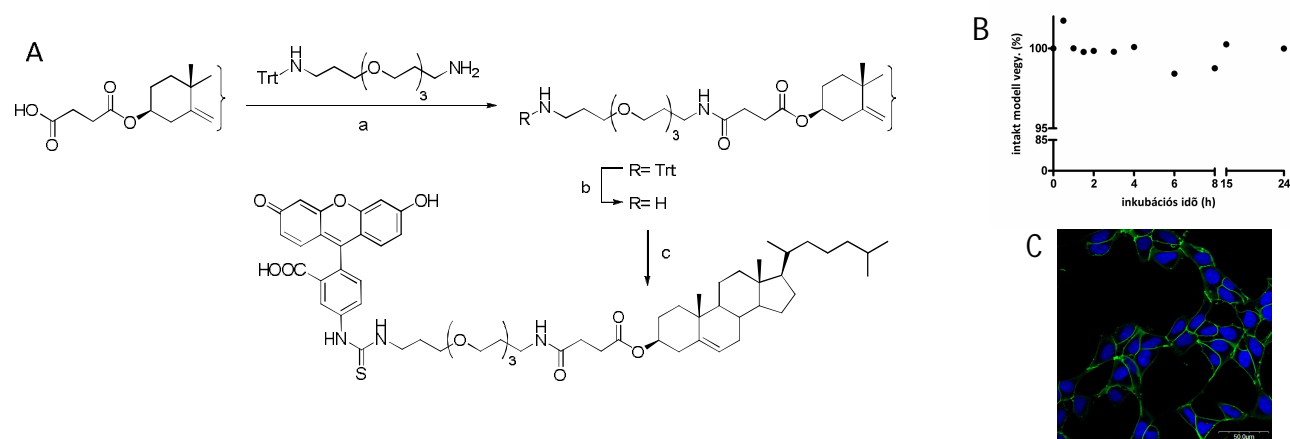


Záró szakmai beszámoló a K77783 sz. OTKA pályázathoz

A K77783 sz. pályázat keretében végzett támogatott alap kutatás elsődleges célja olyan prion fehérje (PrP) származék előállítás volt, amely élő sejtek membránjába juttatható, a sejtmembrán kettősrétegébe a glikozil-foszfatidilinozitol (GPI) glikolipidet tartalmazó fehérjékhez hasonló módon épül be, valamint lehetővé teszi a sejtmembránba mesterségesen beépített PrP közvetlen fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatát. Korábbi tanulmányok ugyanis kimutatták, hogy a GPI horgony molekula fontos szerepet játszik a PrP konformációs változásában, melynek eredményeként létrejön a patológiás PrP^{Sc} prion konformer.

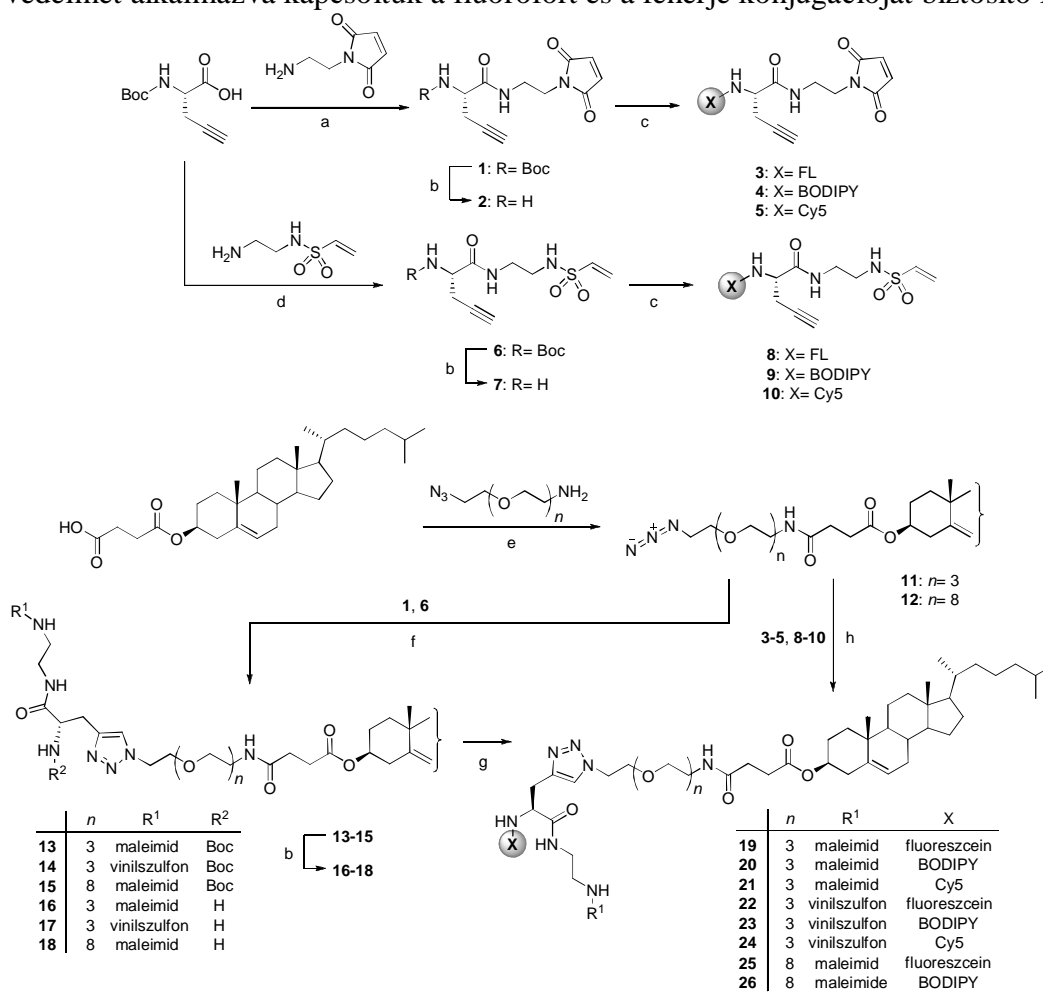
A GPI horgonyzott fehérjék, így a natív, GPI horgonyzott PrP is a sejtmembrán külső rétegének szfingolipidekben és koleszterinben dús lipid tutaj régióiban lokalizálódnak. Munkánk során abból indultunk ki, hogy a koleszterin az egyik fő alkotója ezen membrán inhomogenitásoknak, amely úgy merül a lipid kettősréteg egyik rétegébe, hogy a 3 β -hidroxil csoport a lipid fejcsoportok irányában helyezkedik el. Ezért feltételeztük, hogy a koleszterin 3 β -hidroxil csoportját módosítva a célul kitűzött fehérje horgonyzáshoz alkalmas származékokhoz jutunk. Ennek megfelelően olyan amfifil molekulákat terveztünk, amelyekben a koleszterin hidroxil csoportjához oligo-etilén glikol távtartó molekuláriszleten keresztül kapcsolódik a fluorofórt és a fehérje konjugációt biztosító funkciót tartalmazó fejcsoport. Ebből a koleszteril lipoproteint C-terminális végen Cys-nel meghosszabbított rekombináns fehérje tiol funkcióját kihasználva Michael addíció segítségével kapjuk meg. Mivel a horgony molekula fejcsoportja észter kötésen keresztül kapcsolódik a membránba merülő koleszterinhez, ezért a fluoreszcens mikroszkópiás alkalmazások előtt fontos megvizsgálni a horgonyok hidrolitikus stabilitását. Abban az esetben ugyanis, ha a koleszteril észter hidrolízist szenved, a fluoreszcens jelet és a konjugált fehérjét hordozó fejcsoport membránnal való kapcsolata megszűnik és ezáltal a fluoreszcens horgonymolekula alkalmatlanná válik membránfehérjék vizsgálatára. Ezért előállítottunk egy modell vegyületet, amelynek segítségével megvizsgáltuk az adott észter hidrolitikus stabilitását, valamint a fluoreszcens koleszterin származék sejtmembránnal történő asszociációját (1. ábra). Mono-tritil védett 1,13-diamino-4,7,10-trioxa-tridekánt acileztünk DIEA jelenlétében TBTU-val aktivált koleszteril hemiszukcináttal, majd a tritil védőcsoport eltávolítása után fluoreszcein izotiocianátot addicionáltunk a kapott aminra. Ezt a modell vegyületet PBS pufferben inkubáltuk és 24 órán keresztül HPLC analízis segítségével követtük a koncentrációjának változását. Azt tapasztaltuk, hogy a modell vegyület koncentrációja nem csökkent vagyis a koleszteril észter megfelelő stabilitást mutat a mikroszkópiás alkalmazásokhoz. Ezt követően élő SH-SY5Y sejteket



1. Ábra (A) Fluoreszcens modell vegyület szintézise: a) TBTU, DIEA, CHCl₃/CH₂Cl₂ (4:1), RT, 8h; b) TFA, TIS, CH₂Cl₂, RT, 5×10 min; c) FITC, DIEA, DMF, RT, 6h; (B) hidrolitikus stabilitása PBS pufferben és (C) élő SH-SY5Y sejtek membránjába épülése (fluoreszcein – zöld, sejtmagok – kék).

kezeltünk a modell vegyülettel 1 μM koncentrációban 30 percig. A sejtmembrán intenzív festődését tapasztaltuk, vagyis a koleszterinhez kapcsolt hidrophil fejcsoport nem gátolta a koleszterin sejtmembránba történő beépülését.

A GPI molekulák fehérje horgonyzó tulajdonságát utánzó koleszterin származékok előállítására olyan konvergens szintézis utat dolgoztunk, amelynek segítségével a fejcsoport minden funkcionális részlete egyszerűen módosítható. A konvergens szintézis egy azido-koleszterin származék és egy propargil-glicin (Pra) származék 1,3-dipoláros cikloaddíciós reakcióján alapul (2. ábra). Az azido-koleszterin származékban az oligo-etilén glikol távtartó molekularész hidrophil jellegénél fogva biztosítja a fejcsoport extracelluláris irányítottát a membránasszociációt követően, hosszának változtatásával az amfifil horgonymolekula hidrophil jellegét növelhetjük. Munkánk során di- és hepta-etilén glikol származékokat állítottunk elő és vizsgáltunk. Ehhez aktív észter formájában aktivált koleszteril hemiszukcináttal *N*-acileztük az 1-amino-11-azido-3,6,9-trioxaundekánt és a 26-azido-3,6,9,12,15,18,21,24-oktaoxahexakozán-1-amint. A propargil-glicin amino és karboxil csoportjához ortogonális védelmet alkalmazva kapcsoltuk a fluorofórt és a fehérje konjugációját biztosító Michael

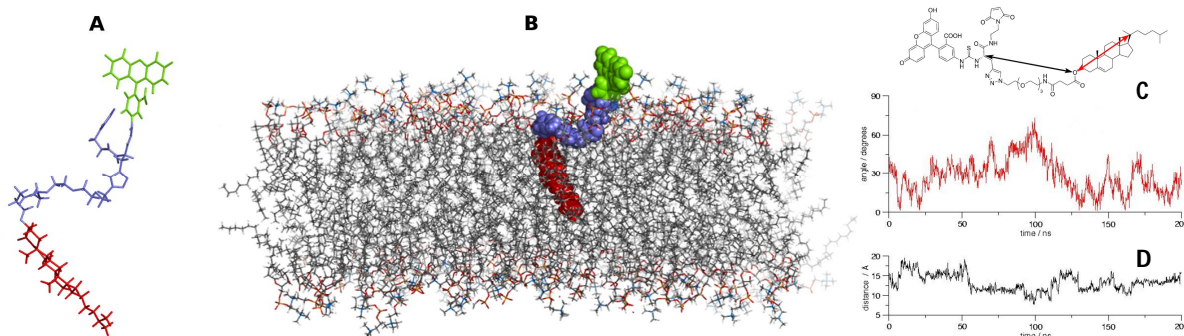


2. Ábra Fluoreszcens horgonymolekulák szintézise. a) HOBt, DIC, THF, RT, 8h; b) TFA/CH₂Cl₂ (1:1), RT, 0.5h; c) X= FL: FITC, DIEA, THF, RT, 13h, X= BODIPY: karboxipropil-bodipy, TBTU, DIEA, CH₂Cl₂, RT, 16h, X= Cy5: karboxipentil-Cy5, HATU, DIEA, DMF, RT, 16h; d) TBTU, DIEA, CHCl₃/CH₂Cl₂/DMF 8:2:1, RT, 8h; e) TBTU, DIEA, CHCl₃/CH₂Cl₂ (4:1), RT, 8h; f) NaAsc, CuSO₄·5H₂O, CH₂Cl₂/H₂O (1:1), RT, 8h; g) X= FL: FITC, DIEA, DMF, RT, 6h, X= BODIPY: karboxipropil-bodipy, TBTU, DIEA, CH₂Cl₂, RT, 13h, X= Cy5: karboxipentil-Cy5, HATU, DIEA, DMF, RT, 16h; h) X= FL: NaAsc, CuSO₄·5H₂O, *t*BuOH/H₂O (1:1), RT, 48h, X= BODIPY: NaAsc, CuSO₄·5H₂O, CH₂Cl₂/H₂O (1:1), RT, 18h, X= Cy5: NaAsc, CuSO₄·5H₂O, *t*BuOH/H₂O (1:1), RT, 48h.

akceptort. Fluorofórként fluoreszceint, dipirrometén-bór-difluoridot (BODIPY) és egy pentacianin (Cy5) származékot alkalmaztunk. A koleszteril horgonymolekulák szintézisét a fluoreszcein származékok előállításával kezdtük, majd a kedvezőbb fotokémiai és fluoreszcencia sajátságokkal rendelkező BODIPY származékokat állítottuk elő. A BODIPY szintén zöld fluorofór, azonban nem tartalmaz a karboxipropil csoporton kívül további funkció csoportokat, ezért mind szintetikus kémiai, mind pedig a későbbi fluoreszcencia mikroszkópiás alkalmazás szempontjából is előnyös. A festéket 2,4-dimetil-pirrol és glutáraldehid BF₃.OEt₂ jelenlétében végrehajtott reakciójával állítottuk elő. Ezen kívül előállítottunk egy karboxipentil funkcionizált Cy5 festéket is, amelynek igen magas moláris extinkciós koefficiense és vörös tartományba eső fluoreszcenciája következtében a sejtmembránba épült horgony, illetve koleszteril lipoprotein származékok még érzékenyebb fluoreszcencia mikroszkópiás detektálása válik lehetővé. A horgonymimetikumok előállításának fontos lépése a maleimid funkciót és a fluoreszcens festéket tartalmazó Pra, valamint az azido funkciót tartalmazó oligoetoxi-koleszterin származékok közötti cikloaddíció. A termelések optimalizálása érdekében több reakciót is megvizsgáltunk különböző körülmények között (1. táblázat). A fluoreszcens festékek gazdaságosabb felhasználása érdekében tovább vizsgáltuk a teljes reakcióutat. Megállapítottuk, hogy a Boc-Pra-(2-maleimido-etil)-amid cikloaddíciója hatékonyabb, mint a fluoreszcens festéket is tartalmazó Pra származékoké. Továbbá az így előállított Boc-védett koleszterin származék stabil a Boc-védőcsoport acidolízise alatt, és az így kapott aminhoz tetszőleges karboxil- vagy izotiocianát-funkciót tartalmazó fluoreszcens festék kapcsolható. Ezáltal kisebb a fluoreszcens festék vesztesége, illetve kis mennyiségű minták előállításához is praktikusabb ez a reakció sorrend. A GPI horgonymimetikumok és intermedierjeik analitikai vizsgálatához HPLC kromatográfiás módszereket dolgoztunk ki, valamint elvégeztük részletes NMR szerkezetvizsgálatukat, a teljes hozzárendeléseket ¹H, ¹³C, HSQC és HMBC mérések segítségével oldottuk meg.

1. Táblázat Azid-alkin cikloaddíció optimalizálása a koleszteril horgonymolekulák előállításához

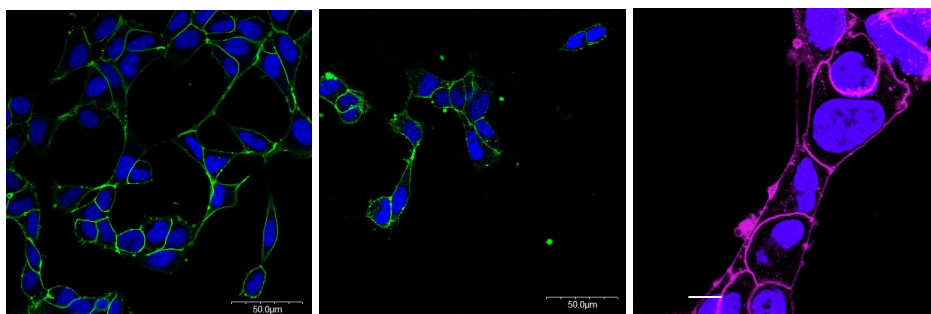
Azid	Alkin	Katalizátor	Bázis / Segédanyag	Oldószer	Konverzió (%)
1	11	CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMSO	34
		CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMF	13
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O (1:1)	76
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	<i>t</i> BuOH/H ₂ O (2:1)	44
1	12	CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMSO	51
		CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMF	29
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O (1:1)	97
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	<i>t</i> BuOH/H ₂ O (2:1)	39
3	11	CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMSO	43
		CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMF	44
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O (1:1)	33
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	<i>t</i> BuOH/H ₂ O (2:1)	49
3	12	CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMSO	25
		CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMF	42
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O (1:1)	36
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	<i>t</i> BuOH/H ₂ O (2:1)	46
4	11	CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMSO	46
		CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMF	70
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O (1:1)	93
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	<i>t</i> BuOH/H ₂ O (2:1)	16
4	12	CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMSO	41
		CuI (1 eq)	DIEA (2 eq)	DMF	43
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O (1:1)	70
		CuSO ₄ .5H ₂ O (0.5 eq)	Na Asc. (1 eq)	<i>t</i> BuOH/H ₂ O (2:1)	33



3. Ábra Egy DOPC modell membránba merülő fluoreszcens horgonymolekulák szerkezete; (A) víz és lipid molekulák, illetve (B) vízmolekulák feltüntetése nélkül. (C) A membrán sík normál valamint a 3β -O és C-20 atomokat összekötő vektorok által bezárt szög fluktuációja, illetve (D) a 3β -O és a Pra $C\alpha$ atomok közötti távolság változása a molekuladinamikai szimuláció során.

A fluoreszcens horgonymolekulák membrán kettősréteggel való kölcsönhatásának atomi szintű részleteit molekuladinamikai szimulációk segítségével vizsgáltuk. Modell membránként DOPC kettősréteget választottunk, melynek fizikai-kémiai paraméterei kísérleti mérésekből ismertek. Ezek segítségével validáltuk a szimulációs környezetünket: jó egyezést találtunk a lipid fejcsoport terület, kettősréteg vastagság, laterális diffúziós koefficiens és deutérium rendparaméter számított és kísérleti értékei között. A szimulációk során két kezdeti elrendezést vizsgáltunk meg. Az egyik esetben a **19** horgonymolekulát a DOPC membrán egyik rétegébe merítettük. Ekkor a 200 ns szimuláció során a koleszterin származék végig a lipidrétegben maradt, a fejcsoport gyors konformációs mozgásokat követően hajlított szerkezetet vett fel, amely 20 ns után már számottevő változást nem mutatott (3. ábra). Ebben az elrendeződésben a dietilén glikol távtartó a lipid fejcsoportok síkjában, a membránsíkkal párhuzamosan helyezkedett el, a koleszterin részlet a kettősréteg hidrofób régiójába merült, a maleimid és fluoreszcein molekularészek pedig a vizes fázisban helyezkedtek el. A második szimulációs elrendezés során **19**-t a vizes fázisban helyeztük el. 100 ns szimulációt követően a koleszterin származék spontán módon a DOPC rétegbe merült, majd az előzőhöz hasonló elrendeződést vett fel. A szimulációk eredményei alapján tehát feltételezhetjük, hogy a vizsgált fluoreszcens koleszterin származékok nem véletlenszerűen asszociálódnak a sejtmembránhoz, hanem olyan, a natív GPI horgonyokhoz hasonló térbeli elrendeződést vesznek fel, ahol a fehérje konjugációját biztosító funkció csoport az extracelluláris tér felé irányul.

A kutatás következő fázisában a fluoreszcens horgonymolekulák membrán kettősréteggel való kölcsönhatásának kísérleti tanulmányozásához élő SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejteket kezeltünk a **19-25** koleszterin származékokkal. Ezt követően konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a membránba épülésüket, valamint MTT teszt alkalmazásával mértük a citotoxicitásukat. A konfokális mikroszkópiás mérések bizonyították, hogy a molekulák stabilan beépültek a sejtmembránba, 1h inkubációt követően nem mértünk számottevő intracelluláris fluoreszcencia intenzitást (4. ábra). Előállítottunk rodaminnal jelzett koleszteril horgony analógot is, ekkor azonban azt tapasztaltuk, hogy ez a származék nagyon gyorsan áthatolt a sejtmembránon és a citoszolba került. Ez minden bizonnyal a kationos természetű fluorofór révén kialakult pozitív fejcsoport töltés következtében történt. Ennek kiküszöbölésére, valamint a sejtmembránhoz horgonyzott prion fehérje detektálási érzékenységének növelése érdekében egy pentacianin festék szulfonsav származékát állítottuk elő. Az így kapott **21** és **24** Cy5 származékok negatívan töltött fejcsoporttal rendelkeznek, így a sejtmembránon nem hatolnak át, csak endocitózis révén kerülhetnek a intracelluláris térbe. Az előállított fluoreszcens horgonymolekulák MTT teszten alapuló citotoxicitás vizsgálatai során 0.26 nM - 10 μ M közötti koncentráció tartományban 1h alatt nem tapasztaltunk citotoxikus hatást.

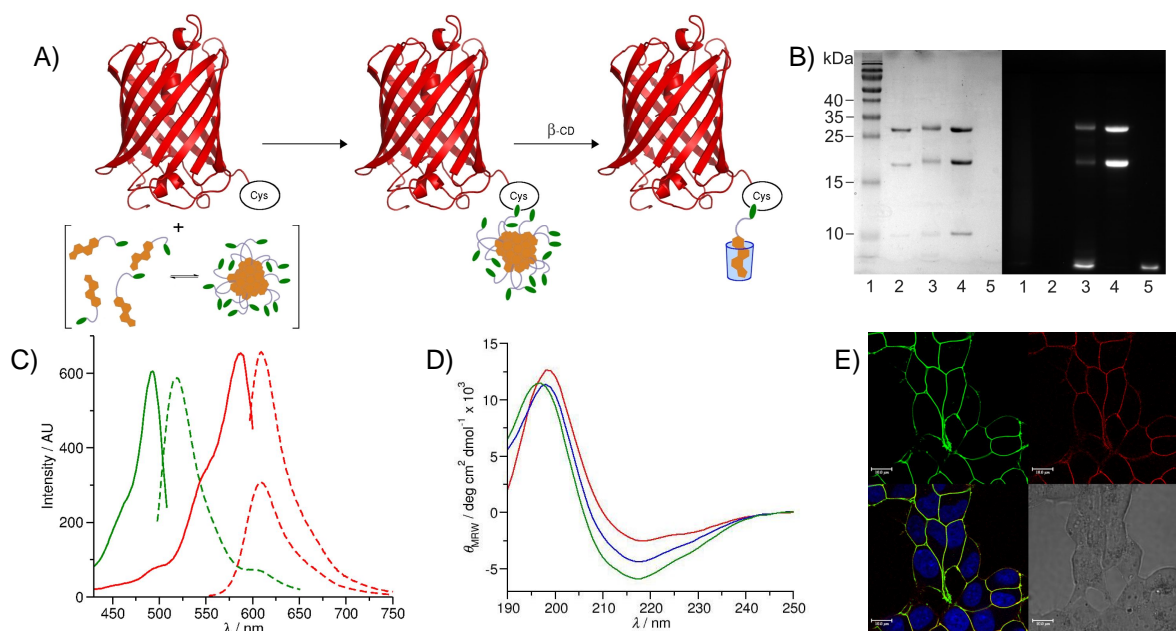


4. Ábra SH-SY5Y sejtek kezelése A) 1 μM **19**, 30 min, B) 1 μM **20**, 30 min, C) 0.1 μM **21**, 10 min.

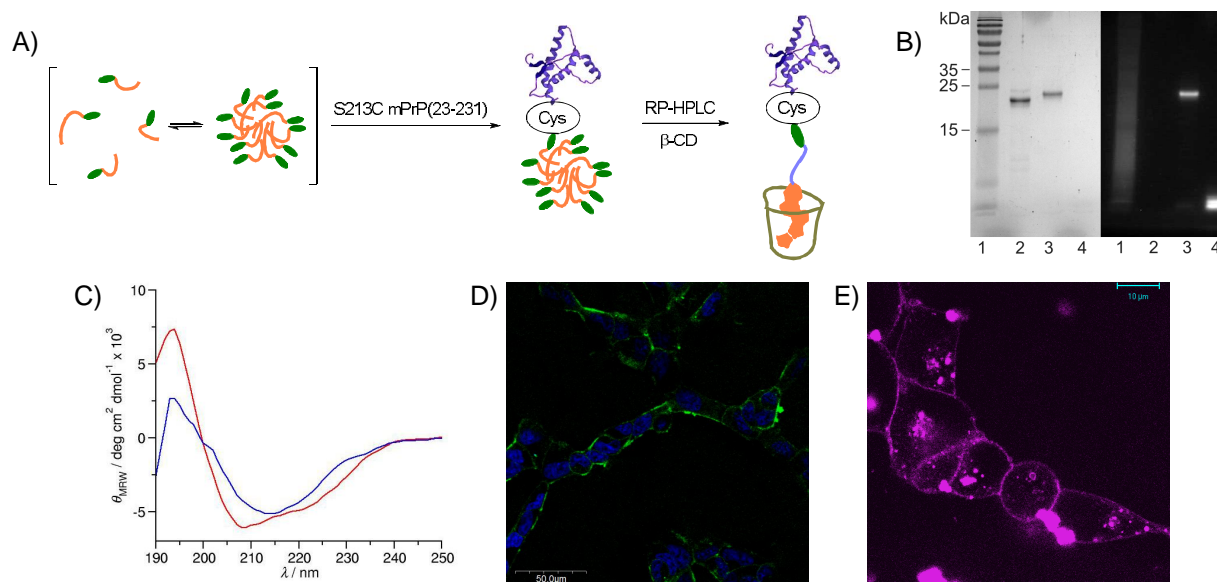
A fluoreszcens horgonymolekulák fehérjékkel való konjugációjának vizsgálatához az mCherry fluoreszcens fehérje C-terminális végén His₆-Cys szekvenciával meghosszabbított származékát (mCherry-Cys) állítottuk elő. A szükséges plazmid DNS-t Welker Ervin bocsátotta rendelkezésünkre. A His₆ toldalék révén nikkell affinitáskromatográfiával tisztítottuk az *E. coli*-ban túltermelt rekombináns fehérjét. Az mCherry fehérje piros fluoreszcenciát mutat, ezért a zöld fluoreszcens festéket tartalmazó horgonymolekulákkal való Michael addícióját vizsgáltuk. Az így kapott kettős fluoreszcenciát mutató konjugátum sejtmembránba épülése egyértelműen követhető és kontrollálható fluoreszcens mikroszkópiával, ahol mind a horgonymolekula fejcsoportján található fluorofór, mind pedig a fehérje fluorofórja szimultán detektálható fluoreszcens antitestek alkalmazása nélkül. A fluoreszcenciánál előnyösebb fluoreszcencia tulajdonságokkal rendelkező BODIPY fluorofórt tartalmazó **20** származék vizsgálata során kiderült, hogy a BODIPY hidrofób természetéből adódóan vizes közegben nem oldódik, ami a fehérjékkel való konjugációt megnehezíti. Ennek eredményeként a fehérje C-terminális Cys tiol oldallánca és a horgonymimetikum maleimid funkciója közötti Michael-addíció csak alacsony konverzióval ment végbe, valamint a kialakult konjugátum kicsapódott. Ugyanakkor az ilyen hidrofób horgonymimetikumok sejtmembránba juttatására eredetileg tervezett liposzómákról kiderült, hogy a sejtekkel történő fúziójuk nehezen reprodukálható és a sejteket károsítják/károsíthatják. Ezért olyan koleszteril horgonymolekula előállítására törekedtünk, amely vizes közegben is alkalmazható, ugyanakkor a sejtmembránba stabilan beépül. Elsőként a koleszteril-hemiszukcináthoz kapcsolt oligoetilén-glikol hosszának növelésével próbáltuk a horgonymimetikumok hidrofóbicitását csökkenteni. A **26** származékot az mCherry-Cys fehérjével kapcsolva azonban ismét sok elreagálatlan fehérjét tartalmazó csapadékot kaptunk. Ezért a koleszterin származék vízoldhatóvá tételét megkíséreltük a fluoreszcenciát tartalmazó horgonymolekulák sóinak alkalmazásával. A koleszteril-észter hidrolízisének elkerülésére tercier amin alkalmaztunk. Kiderült, hogy már a rövidebb trietoxi láncot tartalmazó **19** koleszteril horgony is oldódik vízben, amennyiben a fluoreszcenciát előzetesen etil-diizopropil-ammónium sóvá alakítjuk. Az így kapott GPI horgonymimetikum és az mCherry-Cys fehérje között kvantitatív reakciót értünk el, amit kromatográfiás, gél-elektroforézis és MALDI tömegspektrometriás módszerekkel igazoltunk. Szintén kvantitatív kapcsolást értünk el egy másik rekombináns fehérje, az *E. coli* maltóz-kötő fehérje (MBP) esetén is. Ebben az esetben a fehérje egyetlen, kemoszelektív Michael addíciót biztosító Cys-je az N-terminális végén található. Az MBP fehérjének ezt a származékát MxeGyrA intein és *Bac. circulans* kitin-kötő doménnel közös fúzióban expresszáltuk, majd kitin affinitástisztítást követően ditiotretolos tiolízissel kaptuk a fehérje tioészterét, ami azonnal a megfelelő karbonsavvá hidrolizált. Mivel a maleimid funkciót tartalmazó fluoreszcens koleszterin származékok vizes közegben micellákat képezve oldódnak, ezért a koleszteril horgony – fehérje konjugátumok konfokális mikroszkópiás vizsgálata előtt az ebből adódó problémát oldottuk meg. A C-terminális Cys-t tartalmazó fehérjékkel történt Michael addíciót követően ugyanis olyan vegyes micellák képződnek, amelyek egy fehérje konjugátumot és ca. 25 horgony molekulát tartalmaznak. Ezt gélkromatográfiás és elektroforézis vizsgálatokkal támasztottuk alá. Amennyiben a vegyes micellákat tartalmazó oldattal kezeltünk SH-SY5Y sejteket, intenzív membránfestődést

tapasztaltunk, azonban a lipoprotein mellett kb. 20 ekvivalens fluoreszcens koleszterin származék is a sejtmembránba épül. Ez egyrészt lehetetlenné teszi a konjugált fehérje horgony fejcsoport fluoreszcencia mérésén alapuló vizsgálatát, másrészt így a sejtmembránba nagy mennyiségű koleszterint juttatunk be, ami az érzékeny membrán finomszerkezetek torzulását eredményezheti. A fehérjékkel való konjugáció után fordított fázisú folyadékkromatográfia alkalmazásával meg tudtuk szüntetni a vegyes micellákat, ekkor viszont a fehérje denaturálódott és nem sikerült a natív térszerkezetét újra kialakítani (mCherry fluoreszcens fehérje esetén). Ennek oka az lehet, hogy a lipoprotein koleszterin része nem hidratálódhat és mindenképp hidrofób kölcsönható partnereket keres, amelyek a fehérje apoláros oldalláncai lehetnek. A micelláris szerkezet megszüntetését a fehérje térszerkezetének megőrzése mellett végül β -ciklodextrin alkalmazásával sikerült elérni. Ennek hatására a vegyes micellákból mind a horgony molekulák, mind a koleszteril-lipoprotein molekulák zárványkomplexei képződnek, amelyek gélkromatográfiával elválaszthatók (5. ábra). A tisztított koleszteril mCherry konjugátum szerkezetét ECD spektroszkópia segítségével vizsgáltuk és azt találtuk, hogy a másodlagos szerkezeti elemek megoszlása megegyezik a kiindulási az mCherry fehérje röntgendiffrakciós szerkezetéből számított értékekkel. Az így kapott homogén koleszteril mCherry konjugátum élő SH-SY5Y sejtek membránjába épülését konfokális mikroszkópiával megvizsgáltuk és gyors kettős fluoreszcens membránfestődést tapasztaltunk. Abban az esetben, ha a sejteket mCherry-Cys fehérjével kezeltük nem tapasztaltunk piros membrán fluoreszcenciát. Ebből arra következtethetünk, hogy a konjugált fehérje a natív térszerkezetét megőrizve a koleszterin molekulárisan keresztül asszociálódott a sejtmembránhoz. A membránhoz kapcsolódást követően a zárványkomplexből felszabadul a β -ciklodextrin, azonban a sejttenyésztő médiumban így kialakuló 10-20 μ M β -ciklodextrin koncentráció jóval alacsonyabb annál, ami a sejtmembránban meglévő koleszterin kioldásához szükséges, így az a normál membrán koleszterin tartalmát nem befolyásolja. A molekuladinamikai szimulációk eredményei és a horgonymolekula fejcsoportjának hidrofíl jellege alapján feltételezhetjük, hogy a koleszteril mCherry konjugátumnak csak a koleszterin molekuláris részlete lép kölcsönhatásba a sejtmembránt alkotó lipid láncokkal, és ebben az elrendezésben a koleszterinre jellemző lipid-lipid kölcsönhatások alakulnak ki, illetve a koleszteril konjugátum koleszterinhez hasonló laterális diffúziós viselkedésére számíthatunk. Az mCherry és a fluoreszcens fluorofórok kolokalizációját a számított Manders koefficiensek segítségével ítéltük meg. Ezek szerint nagyfokú kolokalizáció alakult ki, vagyis a koleszteril horgonymolekula fejcsoportjának fluorofórja egyértelműen a konjugált fehérjéhez rendelhető. Az így optimalizált kísérleti körülmények birtokában az egér prion fehérje koleszteril származékainak előállításával folytattuk a kutatást.

A konjugációhoz a natív szekvenciánál a C-terminális végén egy Cys-nel hosszabb S231C mPrP(23-231) teljes hosszúságú egér prion fehérje mutáns (PrP-Cys) állítottuk elő. A rekombináns fehérje előállításához szükséges plazmid DNS-t Welker Ervin bocsátotta rendelkezésünkre. A mPrP eleve tartalmaz két Cys-t, amelyek intramolekuláris diszulfid hidat képeznek, azonban a horgony konjugáció során a C-terminális Michael addíció szelektivitását nem zavarják, mert a diszulfid híd két hélix között eltemetve található, nehezen redukálható és tiol cserereakcióban is nehézkesen vesz részt. A natív térszerkezettel rendelkező PrP-Cys fehérjét az *E. coli*-ban expresszált fehérje oxidatív renaturálását követően kaptuk meg. Mivel a fehérje pH7 körüli és efeletti értékeknél könnyen kicsapódott, ezért savasabb közegben is alkalmazható vinil-szulfon Michael akceptort tartalmazó koleszteril horgony molekulákat is előállítottunk. Az optimális fehérje konverziót azonban pH6-on 10 mM TCEP redukálószer jelenlétében a **19** és **21** horgonyokkal kaptuk. A nyers konjugátumot RP-HPLC segítségével tisztítottuk, ahol a savas eluens miatt a koleszteril-PrP oldatban maradt, majd a PrP konjugátumok β -ciklodextrin zárványkomplexeit a liofilizálást követő újraoldás során alakítottuk ki. A kapott oldatokban ECD spektroszkópia segítségével vizsgáltuk a PrP másodlagos szerkezetét. A koleszteril-PrP és a PrP-Cys másodlagos szerkezeti elemeinek arányában kis eltérést tapasztaltunk, ami az eltérő tisztítási körülmények (affinitáskromatográfia vs. RP-HPLC) következménye is lehet nem csak kizárólag a kovalens lipidálás eredménye. A koleszteril-PrP β -ciklodextrin zárványkomplexeivel



5. Ábra (A) A mCherry–19 konjugátum előállítása és tisztítása. B) Coomassie blue-festett (bal) és fluoreszcencia detektált (jobb) SDS-PAGE (15%): 1, M_w marker; 2, mCherry–Cys; 3, mCherry–19 vegyes micellák; 4, mCherry–19 β -ciklodextrin zárványkomplexe; 5, **19**. C) A mCherry–19 konjugátum gerjesztési (— λ_{em} = 518 nm; — λ_{em} = 610 nm) és emissziós (--- λ_{ex} = 488 nm; --- λ_{ex} = 543 nm; --- λ_{ex} = 587 nm) spektruma vizes oldatban. D) ECD spektrumok, mCherry–Cys (piros), mCherry–19 vegyes micellák (kék) és mCherry–19 β -ciklodextrin zárványkomplex (zöld). E) 10 μ M mCherry–19 β -ciklodextrin zárványkompleksszel kezelt SH-SY5Y sejtek konfokális mikroszkópos, illetve kontraszt (jobb alsó) képe, zöld - fluorescein, piros - mCherry, kék - magfestés.



6. Ábra (A) Koleszteril PrP előállítása és tisztítása. B) Coomassie blue-festett (bal) és fluoreszcencia detektált (jobb) SDS-PAGE (15%): 1, M_w marker; 2, S231C mPrP(23-231); 3, PrP–19 konjugátum β -ciklodextrin zárványkomplexe; 4, **19**. C) ECD spektrumok, S231C mPrP(23-231) (piros), PrP–19 β -ciklodextrin zárványkomplex (kék). Konfokális mikroszkópiás felvételek D) 30 percig 3 μ M PrP–19 konjugátummal kezelt SH-SY5Y sejtek, E) 30 percig 0.5 μ M PrP–21 konjugátummal kezelt SH-SY5Y sejtek.

élő SH-SY5Y sejteket kezeltünk és egyértelmű membránfestődést tapasztaltunk, azonban fluoreszcens aggregátumok kialakulását is megfigyeltük.

A C-terminális Cys-t tartalmazó fehérjék membrán asszociációjához kidolgozott módszerünk lehetővé teszi GPI horgonyzott fehérjék sejtben belüli körforgásának fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatát, mivel a fejcsoport fluoreszcenciája a konjugált fehérjéhez rendelhető, illetve homogén koleszteril lipoproteinek építhetők az élő sejtek membránjába exogén módon anélkül, hogy a sejtmembrán perturbációját kiváltó lipideket vagy detergenset juttatnánk a membránba.

A kutatás másik fontos célkitűzése a prion fehérje élő sejtek membránjához horgonyzása mellett a polipeptid szekvenciájának módosítása volt. Ennek első lépéseként előállítottuk a PrP[35-40] fragmenst Fmoc szintézissel, és így a Ser³⁶ oldalláncát trans-2-merkaptacetamido-ciklohexánkarbonsavval észterestítettük. A kapott származékot a Boc stratégiával előállított PrP[23-34] fragmens tioészter származékával ligáltuk. A HPLC tisztítást követően a peptid diasztereomerek hidrolízisével kaptuk a PrP[23-40] fragmenst. Mivel Majer Mariann megszakította PhD tanulmányait ezért a PrP kémiai ligációkon alapuló totálszintézisét nem tudtuk befejezni.

Publikációs stratégiánk egy átfogó kézirat létrehozására irányult. Mivel az *Angew. Chem. Int. Ed.* folyóiratban végül nem sikerült publikálnunk 2012 októberében, a kísérleti eredmények bizonyos részein tovább dolgoztunk és azokat (1., 3. és 5. ábrákon bemutatott eredmények) a Schäfer et al (2013) *Bioconj. Chem.* 24, 1684–1697 helyen közöltük. Ezt követően Schäfer Balázs elindította a PhD fokozatszerzési eljárást, valamint Németh Dorottya sikeresen megvédte “Fluoreszcens koleszterin származékkal módosított prion fehérje előállítás és vizsgálata” című BSc szakdolgozatát a Szegedi Tudományegyetemen. A fennmaradó kísérleti eredmények (2., 4., 6. ábrák és 1. táblázat eredményei) publikációja 2014. I. félévében fejeződik be.

Szeged, 2014. január 7.

Tömböly Csaba
vezető kutató