

**POLILIZIN GERINCŰ POLIPEPTIDEK BIOLÓGIAI
HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA *IN VITRO*, CSILLÓS
EGYSEJTŰ ÉS EGÉR MODELLSEJTEKEN**

Doktori értekezés

Szabó Rita

Biológia Doktori Iskola

Immunológia Program

Iskola- és programvezető: Erdei Anna

Témavezető: Hudecz Ferenc

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Budapest

2004

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Dr. Hollósi Miklós tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette munkámat az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén.

Nagyon hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Hudecz Ferenc egyetemi tanárnak, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport vezetőjének, hogy mindvégig gondos figyelemmel kísérte, és elméleti és gyakorlati tanácsaival támogatta munkámat és segítette a dolgozat elkészítését.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak a rendelkezésemre bocsátott vegyületekért, valamint a szintézis területén nyújtott hasznos tanácsaiért és gyakorlati közreműködéséért.

Szeretném megköszönni Dr. Falus András egyetemi tanárnak és Dr. Tóth Sára egyetemi docensnek, hogy lehetővé tették munkámat a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Kóhidai László egyetemi docensnek, aki bevezetett a kemotaxis vizsgálatának világába, és hasznos tanácsaival nagy segítségemre volt a biológiai kísérletek elvégzésében

Szeretném megköszönni Dr. Kovács Péter egyetemi docensnek a konfokális mikroszkóppal készített felvételeket, valamint Dr. Pállinger Éva tudományos főmunkatársnak a FACS mérések során nyújtott segítségét.

Köszönetet mondok Prof. Francesca Reignek hogy laboratóriumában (Department of Peptide and Protein Chemistry, CID, CSIC Barcelona, Spain) lehetővé tette munkámat, valamint Núria Almiñana doktorandának a liposzómákkal kapcsolatos kísérletek elsajátításában nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Prof. Siamon Gordonnak (Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, Nagy-Britannia), hogy hosszabb ideig intézetében dolgozhattam, Dr. Leanne Peisernek és Dr. Annette Plüddemannak akik gyakorlati segítségükkel és tanácsaikkal nagymértékben hozzájárultak a makrofágokkal végzett kísérletekhez.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Medzihradskyné Schweiger Hedvig ny. tudományos főmunkatársnak, Dr. Bösze Szilvia tudományos főmunkatársnak és Horváti Kata PhD hallgatónak, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársainak az analízisek elvégzéséért.

Nem mulaszthatom el megköszönni Kincses Andornénak a *Tetrahymena*-kísérletekhez nyújtott közreműködését; a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

sejttenyésztő laboratóriumában dolgozó asszisztenseknek, Farkasné Nagy Krisztinának, Ördögh Juditnak és Orbán Andreának (Semmelweis Egyetem), hogy bevezettek a sejttenyésztéssel kapcsolatos munkákba és mindvégig segítségemre voltak a gyakorlati munka során. Köszönöm Kozák Angélának (Semmelweis Egyetem) a FACS mérésekhez nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Kiskó Máriának (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) az analízisekkel kapcsolatos és Maria Osunának (Barcelona) a liposzómákkal kapcsolatos kísérletekben végzett technikai munkáért.

Szeretném megköszönni az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport valamennyi tagjának munkámmal kapcsolatos észrevételeit és tanácsait.

Hálával tartozom családomnak, hogy nyugodt és biztos hátteret biztosítottak munkám elvégzéséhez.

Köszönetet mondok az ELTE Biológia Doktori Iskolának, hogy lehetővé tették jelen kutatásaim elvégzését. Köszönettel tartozom OTKA (T-030838, T-032533, T-043576), az Oktatási Minisztérium Mecenatúra és Medichem 047/2001, az Alapítvány Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért, a Pázmány-Eötvös Alapítvány, a CSIC (Spanyolország) és MTA közötti együttműködés (9/2001) és a magyar-brit TÉT együttműködés (GB-31/2003) támogatásáért.

BEVEZETÉS

A daganatterápiában alkalmazott vegyületek, az antibiotikumok és a parazitaellenes hatóanyagok többsége kis molekulájú vegyület, amely általában diffúzióval kerül be a sejtekbe. Alkalmazásuk során számolni kell mellékhatásaikkal, pl. a szervezet egészét érintő nem specifikus toxicitással, valamint gyors kiválasztódásukkal [Takakura és Hashida, 1995]. A makromolekuláris hordozók alkalmazása csökkentheti a terápiás szerek mellékhatásait, javítja oldékonyságukat vizes közegben, valamint lehetőséget kínál a hatóanyagok sejt-, illetve szövetspecifikus célbajuttatására. Mivel számos bakteriális patogén, parazita (pl. *Mycobacterium sp*, *Leishmania sp.*) makrofágokban él és szaporodik, nagy jelentőséggel bírna parazitaellenes szerek, antibiotikumok szelektív bejuttatása makrofágokba. A makrofágok receptor-mediált endocitózisában nagy szerepet kapnak a scavenger receptorok, amelyek elsősorban a makrofág vonal sejtjein található, polianionos molekulákat (pl. acetilezett, maleil-csoporttal módosított fehérjéket, szulfáttartalmú poliszaharidokat) felismerő membrán-fehérjék. A scavenger receptoron keresztül a makrofágokba juttatott hatóanyagok szerepet kaphatnak mind a makrofágokhoz kapcsolódó tumoros megbetegedések, mind az intracelluláris patogének okozta fertőzések kemoterápiás kezelésében.

Napjainkban egyre terjed a szervezetben lebomlani képes hordozók, köztük a poliaminosavak, mint például poli[Tyr] és poli[Glu] alkalmazása kis molekulák célbajuttatására [Bourke et al, 2003, Li, 2002]. A polikationos poli[Lys] komplexet képez a nukleinsavakkal, ennél fogva vektorként is használható nukleinsavak, elsősorban DNS célbajuttatására [Ward et al, 2001].

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban régóta folyik polilizin gerincű, elágazó láncú polipeptidek szintézise és biológiai hatásuk vizsgálata. A polipeptidek oldalláncuk szerkezete szerint több csoportba sorolhatóak: **i.** a lizin egységekhez egy aminosav kapcsolódik (poli[Lys(X_i)], rövidítve X_iK) **ii.** a polipeptid oligo-DL-alanin oldalláncot hordoz (poli[Lys(DL-Ala $_m$)], AK), **iii.** az oldalláncban egy további aminosav található a Lys ϵ -aminocsoportjához (poli[Lys(DL-Ala $_m$ - X_i)], röviden AXK), **iv.** vagy az oligo-DL-ala N-terminális aminocsoportjához kapcsolódva (poli[Lys(X_i -DL-Ala $_m$)] vagy röviden XAK). A polipeptidek sokoldalú makromolekuláris hordozónak bizonyultak. Számos hatóanyag (GnRH antagonist [Mező et al, 1996], *Mycobacterium tuberculosis* [Wilkinson et al 1999] peptidek, Hepatitis-A peptidek [Nagy et al, 2000], valamint HSV epitóp peptidek [Mező et al, 2003],

metotrexát [Kóczán et al, 2002], daunomicin [Hudecz et al, 2003, Reményi et al, 2003]) hordozómolekulájaként alkalmazták őket.

A dolgozatban szereplő kísérletek arra próbálnak választ adni, hogy a polilizin gerincű elágazó láncú polipeptidek oldalláncának szerkezeti módosításai, elsősorban a polipeptid töltésviszonyainak változása hogyan befolyásolják a polipeptid csillós egysejtű, illetve egér makrofág sejtek túlélését, kemotaxisukra kifejtett hatását, valamint a polipeptid bejutását e modellsejtekbe. Dolgozatomban először áttekintést nyújtok a makromolekuláris hordozókkal való célbajuttatás lehetőségeiről, részletesen kitérve a polilizin gerincű elágazó láncú polipeptidek eddigi alkalmazására. Ezt követően vázolom a kemotaxis és az endocitózis folyamatát, majd összefoglalom a hivatásos fagocitasejtek, ezen belül is a makrofágok jellemzőit és funkcióit, valamint a makrofágok mintázatfelismerő receptorainak tulajdonságait. Végül ismertetem a hatóanyagok scavenger receptoron keresztül makrofágokba való specifikus célbajuttatásával foglalkozó irodalmat. Ezután ismertetem munkám célkitűzéseit, a kísérleti módszereket, és saját eredményeimet.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Kis molekulájú hatóanyagok célbajuttatása makromolekuláris hordozó segítségével

A biológiailag aktív vegyületek specifikus sejtbe juttatásával foglalkozó kutatások napjaink legdinamikusabban fejlődő tudományterületei közé tartoznak. Számos tumorellenes, parazitaellenes hatóanyag hidrofób, kis molekulájú vegyület (pl. metotrexát vagy antraciklinek), amely a diffúzióval átjut a sejtmembránon, azonban e szerek többsége toxikus a szervezet többi sejtjére nézve is [Takakura és Hashida, 1995]. Ezért nagy fontossággal bírna e hatóanyagok sejt-, illetve szövetspecifikus célbajuttatása. A kis molekulájú, hidrofil hatóanyagok (peptidek, fehérjék, oligonukleotidok, plazmidok) esetében éppen az csökkenti a vegyület hatékonyságát, hogy a vegyület alacsony membránpermeabilitása miatt nem jut el a hatás helyére [Tung és Weissleder, 2003]. Ebben az esetben a hatóanyag sejtbe juttatása jelenti a megoldandó feladatot. Ezekre a problémákra kínál megoldást a makromolekuláris hordozók alkalmazása. A makromolekuláris célbajuttató rendszerek csökkenthetik a terápiás szerek toxikus mellékhatásait, így magasabb dózisu hatóanyag alkalmazását teszik lehetővé. A sejt- vagy szövetspecifikus hordozók segítségével kiküszöbölhető a hatóanyagoknak a szervezet más részein kifejtett nem specifikus hatása, amely a daganatok gyógyításának komoly hátráltató tényezője. A hordozók alkalmazása kiküszöbölheti az antibiotikumok hatástalanságának legfőbb okát, a multidrog-rezisztenciát is. A kis molekulájú vegyületek (epitóp peptidek, toxinok) esetében a molekula immunogenitása nem elég nagy ahhoz, hogy a szervezetbe juttatva ellenanyag termelését idézzék elő, ellenben ha a kis molekulát makromolekuláris hordozóhoz kapcsolva juttatják a szervezetbe, megfelelő intenzitású immunválaszt idézhetnek elő [Hudecz et al, 1993].

A makromolekuláris hordozóval szemben támasztott főbb követelmények:

- ⇒ *Bomoljon le, és ne halmozódjon fel a szervezetben;*
- ⇒ *Ne legyen toxikus;*
- ⇒ *Ne legyen immunogén;*
- ⇒ *Hordozzon olyan funkciós csoportokat, amelyekhez a hatóanyag egyszerű kémiai reakcióval hozzákapcsolható;*
- ⇒ *Amennyiben rendelkezik felismerőegységgel, a hatóanyag hozzákapcsolása után is megőrizze célspecifikusságát;*

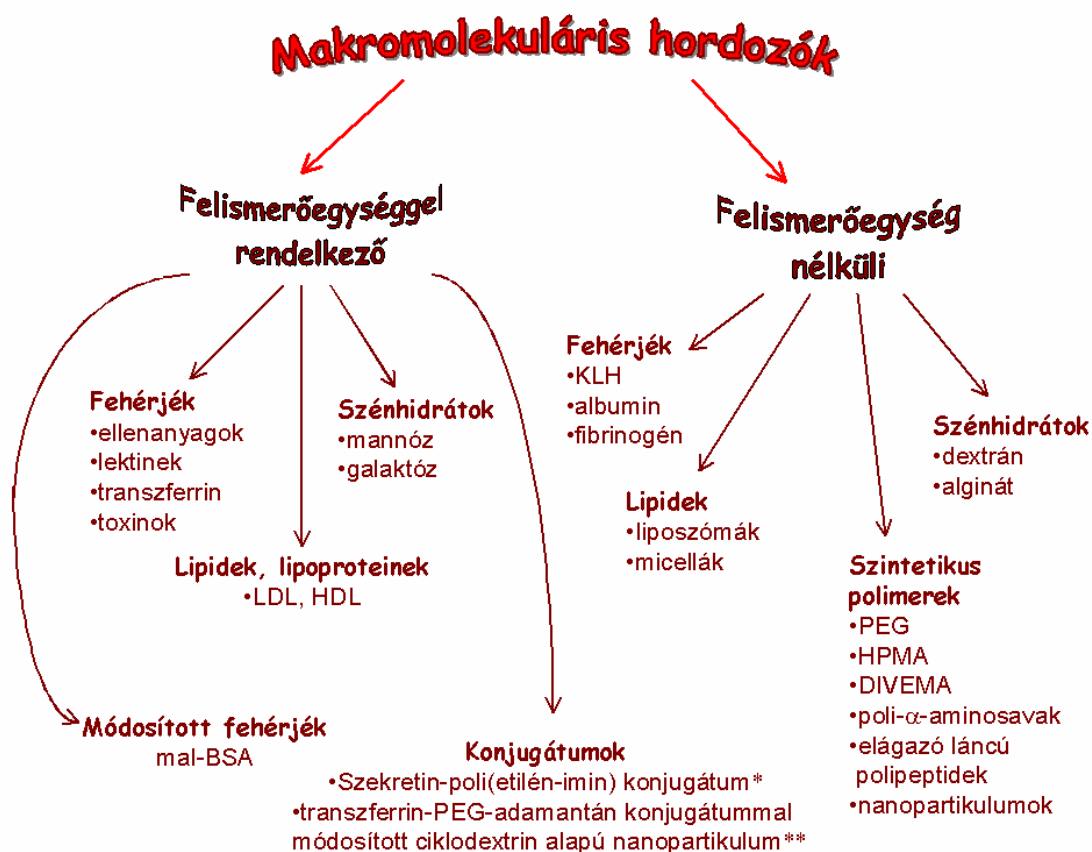
⇒ *Ne változtassa meg a hatóanyag biológiai aktivitását* [Takakura és Hashida, 1995].

Attól függően, hogy a szervezet mely pontjaira szeretnénk eljuttatni a hatóanyagot, kétféle stratégiát alkalmazhatunk. Amennyiben egy kis membránpermeabilitású molekulát – enzimet, nukleinsavat, fluoreszcens vagy radioaktív jelzőanyagot – szeretnénk a szervezet minden sejtjébe eljuttatni, olyan hordozót kell választanunk, amely a membránon keresztüljuttatja a hatóanyagot, de nem rendelkezik specifikus felismerőegységgel. Ha azonban a hatóanyagot – tumor vagy parazitaellenes szer, jelzőanyagot – egyféle sejtípusba vagy szövetbe szeretnénk eljuttatni, olyan hordozót kell választanunk, amely nem jut át a sejtmembránon, hanem az adott sejtre, szövetre specifikus felismerő struktúra segítségével vesznek fel a sejtek. A felismerőegység lehet valamely sejten található receptor ligandja, de maga a hordozó is rendelkezhet specifikus receptorral a sejteken, mint pl. a transferrin. A makromolekula ebben az esetben receptor-mediált endocitózissal juttatja be a sejtbe a hozzá kapcsolt kis molekulájú hatóanyagot. A felvétel hatékonyságát befolyásolja sejten található receptorok mennyisége, reciklizációs ideje, valamint az, hogy a hatóanyag milyen hatékonysággal szabadul fel az endo-lizoszóma kompartmentben [Tung és Weissleder, 2003]. Nem célspecifikus hordozók esetében a szöveti sajátságokat használják ki. Ismert, hogy a daganatok vérellátását biztosító újonnan képződött kapilláriserek endotéliumának szerkezete rendezetlen, a sejtek közötti távolság jóval nagyobb, mint az egészséges érfal endotéliumában. Így azok a makromolekulák, amelyek az egészséges endotéliumon képtelenek átjutni, a tumor érrendszerének endotél sejtjei között bejuthatnak a szövetbe. Ennek következtében a hozzájuk kapcsolt tumorelles szer a daganatban halmozódik fel, és fejt ki hatását. Ezt a jelenséget EPR (enhanced permeability and retention) effektusnak nevezik [Seymour, 1992].

1.1.1. A makromolekuláris hordozók csoportosítása

Természetes és szintetikus makromolekulákat egyaránt használnak biológiailag aktív vegyületek vagy jelzőmolekulák makromolekuláris hordozójaként. A hordozókat csoportosíthatjuk méretük szerint: a relatíve kis molekulatömegű hordozók közé sorolhatjuk a sejt-penetrációs peptideket, peptid- és szteroid hormonokat, míg a nagy molekulatömegű hordozók közé tartoznak különböző, fehérjék (marha szérumalbumin, ellenanyagok), a DNS, szénhidrátok, és szintetikus polipeptidek. Bizonyos makromolekulák, mint például az ellenanyagok, lektinok, transferrin, lipoproteinek, (LDL) rendelkeznek specifikus

felismerőegységgel, míg a hordozók másik csoportja nem hordoz specifikus felismerő struktúrát. Ilyen hordozók a sejt-penetrációs peptidek, mint a penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK), oligoarginin, transpotran (GWTLSAGYLLKINLKALAALAKKIL) és hidrofób peptidek: (VTVLALGALAGVGVG és AAVLLPVLLAAP) [Tung és Weissleder, 2003]. A felismerőegységet nem tartalmazó hordozók közé sorolhatjuk a különböző szintetikus polipeptideket, mint a nem lebomló HPMa (N-(2-hidroxi-propil)-metakrilamid kopolimer) [Duncan et al, 1987, Jensen et al, 2003] és DIVEMA (divinil-éter–maleinsav-anhidrid kopolimer) [Przybylski et al, 1978], a dextrán; a szervezetben lebomló poli- α -aminosav hordozókat (mint poli[Lys] és, poli[Glu] és poli[Tyr]) [Ward et al, 2001, Li, 2002, Bourke et al, 2003]. A makromolekuláris hordozók főbb típusait az 1. ábra foglalja össze.

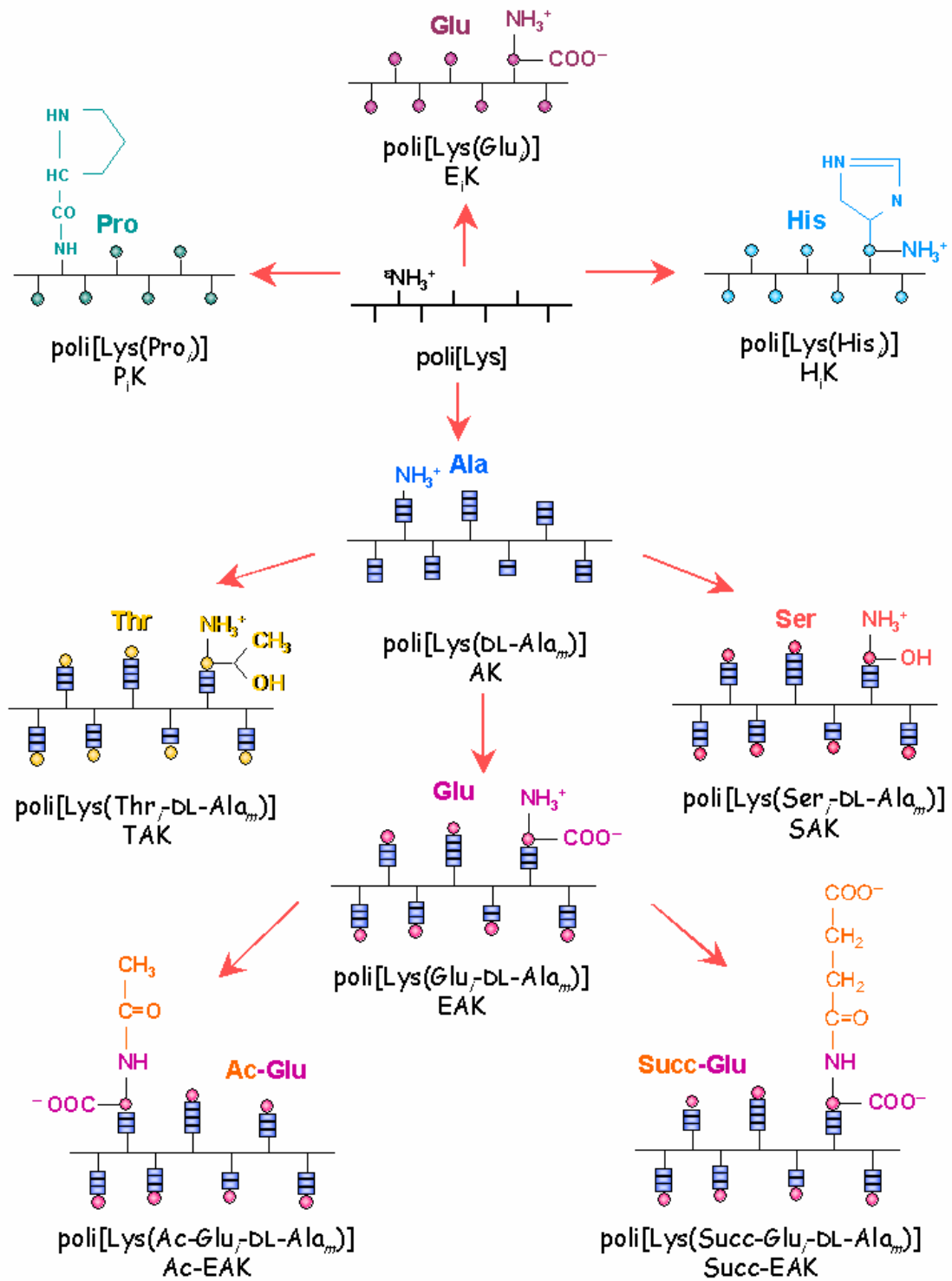


1. ábra A makromolekuláris hordozók főbb csoportjai. (*McKay et al, 2002, ** Bellocq et al, 2003)

1.1.2. Polilizin gerincű polipeptidok mint makromolekuláris hordozók

Különböző hatóanyagok, epitópek hordozómolekulájaként csoportunkban régóta alkalmaznak polilizin gerincű elágazó láncú polipeptideket (továbbiakban polipeptid). Munkám során a polipeptideknek ezt a csoportját tanulmányoztam, ezért részletes jellemzést adok kémiai és biológiai tulajdonságaikról. A makromolekula gerince 60-120 L-lizin egységből áll, melyek ϵ -aminocsoportjához különböző összetételű oldalláncok kapcsolódnak. A polipeptidek oldallánc-szerkezetük alapján három csoportba sorolhatóak. Ha a lizin egységekhez egy aminosav kapcsolódik, a polipeptid a poli[Lys(X_i)], rövidítve X_iK általános képlettel jellemezhető. Az X_iK polipeptidek egyben a polipeptidek második csoportját alkotó poli[Lys(DL-Ala $_m$ - X_i)], röviden AXK típusú polipeptidek szintézisének kiindulási vegyületei. A harmadik csoportba a poli[Lys(X_i -DL-Ala $_m$)] vagy röviden XAK¹ típusú polipeptidek tartoznak. Az X helyen különböző természetes aminosavak állhatnak. A polipeptidek szerkezete a 2. ábrán látható.

¹ A polipeptidek rövidítései az aminosavak egybetűs kódjain alapulnak, azaz K a lizin, A az alanin, X az oldalláncban szereplő bármely természetes aminosav rövidítése. Az m index az oligo-alanin láncok átlagos hosszát adja meg ($m=3-5$), i pedig az X aminosav átlagos szubsztitúciófokát a polipeptid összes oldalláncára nézve ($i \leq 1$) [IUPAC-IUB, 1984].



2. ábra A polilizin gerincű elágazó láncú polipeptidek szerkezete

1.1.2.1. A polipeptidek szintézise és kémiai jellemzése

A poli[Lys] szintézise N^{α} -carboxi- N^{ϵ} -benziloxikarbonil-lizin-anhidridből kiindulva polimerizációval történik. [Hudecz et al, 1980, 1985]. Az oligo-alanin oldalláncok kialakítása a lizin ϵ -aminocsoportján N^{α} -karboxi-DL-Ala-anhidridből, kiindulva, szintén polimerizációval megy végbe [Hudecz et al, 1985]. Mind a X_iK , mind a XAK típusú polipeptidek esetében a láncvégi aminosav felkapcsolása HOBt-katalizált aktív észteres eljárással történik [Mező et al, 1993].

A polipeptidek összetételének jellemzése az aminosav-összetétellel, illetve végcsoport-analízissel történik, méretüket szedimentációs analízissel, gél- permeációs kromatográfiával, oszlopkromatográfiával [Hudecz et al, 1984], újabban tömegspektrometriával határozzák meg [Schlosser et al, 2002].

1.1.2.2. A polipeptidek biológiai tulajdonságai

A polilizin gerincű polipeptidek biológiai tulajdonságát sok szempontból vizsgálták már. Jellemezték *in vitro* és *in vivo* citotoxicitásukat, immunogén sajátásaikat, az immunrendszerre gyakorolt hatásukat, szervezetbeli eloszlásukat, valamint lebomlásukat a vérben. Megállapították, hogy a polipeptidek oldalláncainak aminosav-összetétele (töltése, polaritása) befolyásolja a makromolekula és annak hatóanyag konjugátumainak biológiai tulajdonságait, eloszlását a szervezetben [Hudecz, 1995].

1.1.2.2.1. Citotoxicitás

A polipeptidek *in vitro* citotoxicitását patkány máj- és lépsejteken és C26 egér vastagbél karcinóma sejtvonalon, valamint tanulmányozták hatásukat HeLa sejtek szaporodására. A polipeptidek toxikus hatását nagymértékben befolyásolta az oldallánc N-terminális aminosav minősége. Az amfoter és polianionos polipeptidek nem bizonyultak toxikusnak, míg a polikationos karakterű polipeptidek az oldallánc végcsoportjától függően toxikus hatást mutattak 1,5-50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. A lizinből felépülő polipeptidek hatását összehasonlítva patkány máj- és egér lépsejteken azt az eredményt kapták, hogy a szabad ϵ -aminocsoportokat ($pK_a = 10,53$) hordozó poli[L-Lys] – és még nagyobb mértékben a poli[D-Lys] – toxikusnak bizonyult patkány lép- és májsejtekre, illetve HeLa sejtvonalra nézve. Ezzel szemben a szabad α -aminocsoportokat hordozó poli[ϵ -Lys]] lényegesen kisebb mértékben csökkentette a sejtek életképességét. Megfigyelték továbbá, hogy az oldallánc 3-4 alaninnal

történő meghosszabbítása (a láncvégi pozitív töltés eltávolítása a polilizin gerinctől) a poli[Lys(Lys_{0,5}-DL-Ala_{2,95})] (KAK) polipeptid esetében szintén a vegyület toxicitásának csökkenését okozta. További lánchosszabbítás (átlagosan 8,5 alanin) esetén a polipeptid még kevésbé volt hatással a sejtek életképességére [Hudecz, 1995, Gaál et al, 1984]. Az X aminosav helyzete a polilizin gerinchez képest csak kis mértékben befolyásolta a polipeptid hatását az X helyen leucint (LAK-ALK) vagy glutaminsavat (EAK-AEK) tartalmazó AXK–XAK polipeptid-párok esetében [Hudecz et al, 1992]. Azok a polipeptidok, amelyek oldalláncukban hidroxilcsoportot hordoztak (szerin vagy treonin N-terminális aminosavval rendelkeztek) sem patkány máj-, sem egér lépsejtekre, sem C26 egér vastagbél-karcinóma sejtekre nem voltak toxikusak [Hudecz et al, 1999]. A dolgozatomban szereplő kísérletek más modellsejtek felhasználásával részben kiegészítik az itt felsorolt eredményeket, részben új polipeptidok citotoxicitásának vizsgálatát végeztem el.

1.1.2.2.2. Immunogén sajátosságok és immunmodulációs hatás

Különböző szerkezetű XAK típusú polipeptidokkal (X= Leu, D-Leu, Phe, D-Phe, Glu, D-Glu) immunizáltak Balb/c, CBA és C57/B1/6 egereket. Meghatározták az IgM és IgG típusú ellenanyagok mennyiségét, izotípus-eloszlását és az elsődleges- valamint a memóriaválasz során keletkezett antitestek specificitását. Amennyiben a polipeptideket adjuváns jelenléte nélkül injektálták az állatokba, a vizsgált polipeptidok közül egyedül a D-LAK (poli[Lys(D-Leu_i-DL-Ala_m)]) idézte elő IgM és IgG antitestek termelődését. Az ellenanyag-termelés kinetikája T-sejt függő B-sejt válaszra utalt. A polipeptideket komplett Freund-adjuváns jelenlétében injektálva az állatokba, megfigyelhető volt a D-LAK jelentős immunogén hatása mindegyik egértörzsben. Az amfoter EAK (poli[Lys(Glu_i-DL-Ala_m)] és D-EAK (poli[Lys(D-Glu-Phe_i-DL-Ala_m)]) polipeptidok csak a BALB/c egértörzsben idézték elő kis mértékű IgG-termelődést [Hudecz et al, 1992].

Az ellenanyagok antigén-felismerésének vizsgálata arra utalt, hogy a D-LAK ellen termelődött antitestek specificitása az egértörzsek között eltérő [Rajnavölgyi et al, 1986, Hudecz, 1995]. A T-sejt felismerés specificitását különböző polipeptidok (AK, LAK, D-LAK, FAK, D-FAK) esetében késői típusú túlérzékenységi reakció (DTH) intenzitásának megfigyelésével vizsgálták BALB/c, C75B1/6 és CBA egereken. A polikationos AK, LAK, D-LAK, FAK és D-FAK polipeptidok jelentős DTH reakciót indukáltak mindhárom egértörzsben. [Rajnavölgyi et al, 1990].

A polipeptidek hatását birka vörösvérsejt (BVVS) specifikus T-sejt függő B-sejt válaszána kialakulására *in vivo* BDF1 egereken tanulmányozták. A HAK, LAK és D-LAK polipeptidek intraperitoneálisan BVVS-ekkel együtt adva koncentrációtól függően serkentették a BVVS-re adott immunválaszt. A SAK, ASK és EAK polipeptid nem befolyásolta az immunválasz intenzitását. A BVVS-sel való immunizálás előtti 4. és 6. napon történt polipeptid-kezelés szintén növelte, míg a polipeptidek hozzáadása a BVVS-sel történt immunizálás után nem volt hatással a az immunválasz kialakulására [Gaál et al, 1984, Hudecz, et al, 1999, Hudecz et al, 1992].

1.1.2.2.3. A polipeptidek életideje a vérben

A polipeptidek élettartamát a vérben és eloszlásukat a szervezetben nőstény BALB/c egerekbe injektált ^{125}I illetve ^{111}In izotóppal jelölt polipeptidek lebomlásának sebességével jellemezték [Hudecz et al, 1999]. A megfigyelések arra utalnak, hogy az oldallánc összetétele és az oldallánc N-terminális aminosavának minősége, ezen belül is leginkább a töltése nagymértékben befolyásolja a polipeptid életidejét a vérben. A hidroxil-csoportot hordozó polikationos polipeptidek (S_iK : poli[Lys-Ser_i] SAK: poli[Lys(Ser_i-DL-Ala_m)], ASK: poli[Lys(DL-Ala_m-Ser_i)], LSK: poli[Lys(Leu_i-DL-Ser_m)], ESK: poli[Lys(DL-Ser_m-Leu_i)] hosszú ideig nem ürültek ki a vérből [Clegg et al 1990], hasonlóan az amfoter EAK és D-EAK polipeptidekhez. Az oldalláncukban N-terminális aminosavként alanint vagy leucint hordozó polikationos polipeptidek (AK és LAK) hamar eltűntek a keringésből. A polianionos polipeptidek közül az Ac-EAK (poli[Lys(N-Ac-Glu_i-DL-Ala_m)] hosszú ideig jelen volt a keringésben, míg a szintén polianionos Succ-EAK (poli[Lys(N-Succ-Glu_i-DL-Ala_m)] mennyisége a vérben gyorsan lecsökkent [Pimm et al, 1995]. A leghosszabb életidejűnek a terminális pozícióban az amfoter glutaminsavat hordozó polipeptidek bizonyultak.

1.1.2.2.4. A polipeptidek eloszlása a szervezetben

A polipeptidek megoszlását a szövetek és a vér között szintén az oldallánc összetétele, töltése és N-terminális aminosavának minősége határozta meg. A polikationos polipeptidek (AK, LAK, PAK: poli[Lys(Pro_i-DL-Ala_m)] a keringésből a lépbe, vesébe és a májba jutnak. Az amfoter EAK polipeptid a vérből való lassú kiürülése miatt nem dúsult fel egyik szervben sem. A D-aminosavat tartalmazó polipeptidek (D-EAK és D-LAK) nagy mennyiségben halmozódtak fel a lépben és a májban [Hudecz, 1995, Clegg et al, 1990].

A tumoros Ddy egerekbe juttatott polipeptidek szöveti megoszlása hasonló volt az egészséges egerekben tapasztaltakhoz. A polikationos polipeptidek a lépbe és a májba jutottak; a tumorszövetben az injektált mennyiség 1%-a volt kimutatható. Az amfoter EAK esetében a szervezetbe jutott polipeptid 3,1%-a jutott a tumorba. Az Ac-EAK polipeptid esetében ez a mennyiség nagyobb volt (3,4%), ellenben az EAK polipeptid szukcinilezése a tumorban kimutatható polipeptid mennyiségének csökkenését vonta magával (1,2%) [Hudecz, 1995, Clegg et al, 1990].

1.1.2.3. A polipeptidek kölcsönhatása foszfolipid modell-membránokkal

A polipeptidek a sejtekkel való érintkezés során kapcsolatba kerülnek a sejt membránjával. A polipeptiddel való kölcsönhatás befolyásolhatja a membrán fizikai tulajdonságait. A membrán fluiditásának változása befolyásolhatja a membránfehéjék, köztük ioncsatornák, receptorok oldalirányú elmozdulását. Ezáltal a membránnal elég erős kölcsönhatásba lépő molekulák a sejt jelátviteli folyamataira, adhéziójára is hatással lehetnek [Chan et al, 1991]. Prion-fertőzött idegsejtekben figyelték meg, hogy a membrán rigiditásának növekedése a Ca^{2+} válasz csökkenését idézi elő [Wong et al, 1996]. Ismeretes, hogy a kationos penetrációs peptidek: a penetratin és a HIV-1 vírus Tat fehérjéje, az oligoargininek, és egyéb Arg-gazdag peptidek elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek a membrán anionos lipidjeivel. A HIV-1 vírusból származó Tat proteinről feltételezik, hogy a membránhoz való aspecifikus kötődése előzi meg a fehérje sejtbe való bejutását. Mann és munkatársai [Mann et al, 1991] ezt a folyamatot adszorptív endocitózisnak nevezték. Hasonló sejtbe jutási mechanizmust feltételeznek az Arg-gazdag peptidek és a penetratin esetében is, bár a peptidek sejtbe jutásának mechanizmusa még nem tisztázott [Richard et al, 2003, Tung és Weissleder, 2003].

A foszfolipid kettősrétegeket, liposzómákat, a biológiai membránok leegyszerűsített modelljeiként gyakran alkalmazzák a polipeptid-membrán kölcsönhatás tanulmányozására. A hőmérséklet emelkedésével a biológiai membránok és liposzómák fluiditása megváltozik: gél fázisból fluid fázisúvá alakul. Ezt az átalakulást jellemezhetjük a fázisátalakulási hőmérséklettel (tranzíciós hőmérséklet, T_c). A membrán lipid-összetétele meghatározza a lipid kettősréteg fizikai tulajdonságait, így a gél fázis – fluid fázis átmenet hőmérsékletét is.

Kutatócsoportunkban vizsgálták a polilizin gerincű polipeptideknek mind membrán-penetrációját mind foszfolipid kettősréteggel való kölcsönhatását [Nagy et al, 1998]. Foszfolipid monorétegekkel a peptidek a láncvégi aminosav töltésétől függően léptek

kölcsönhatásba. A kölcsönhatás erőssége a SAK>AK>EAK~Ac-EAK>poli[Lys]>OAK (poli[Lys(Orn_i-DL-Ala_m)]) sorrenddel volt jellemezhető. A különböző összetételű liposzómákkal való kölcsönhatás vizsgálata során megállapították, hogy poli[Lys] és OAK kivételével a polipeptidek nem befolyásolták az 5% anionos foszfolipidet tartalmazó liposzómák külső-és belső rétegében mért fluiditást. Poli[Lys] esetében a membrán-penetráció a negatív foszfolipid-tartalom emelkedésével (5%→20%) nőtt. A liposzómák jelenléte befolyásolta a polipeptidek által felvett harmadlagos szerkezetet. Azon polipeptidek, amelyek vizes oldatban részlegesen rendezett konformációt vettek fel (EAK és OAK), a 20 % anionos lipidet tartalmazó foszfolipid kettősréteg jelenlétében képesek voltak rendezett α -helikális struktúra kialakítására. [Nagy et al, 2003]. Doktori munkám során ezeket a kísérleteket kiegészítve, nem vizsgált, különböző töltésviszonyokkal rendelkező polipeptidek foszfolipid kettősrétegekkel kialakított kölcsönhatását jellemeztem.

1.1.3. A polipeptid konjugátumok biológiai hatása

Az előzőekben bemutatott polilizin gerincű elágazó láncú polipeptideket a 90-es évektől alkalmazzák hordozóként különböző hatóanyagok célbajuttatására. Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársai az elmúlt években néhány tumorellenes vegyület, így daunomicin és metotrexát, GnRH agonista peptid, valamint HSV és *Mycobacterium tuberculosis* eredetű epitóp peptid polipeptid-konjugátumát készítették el és tanulmányozták. [Hudecz, 1995; Hudecz et al, 2003].

1.1.3.1. Tumorellenes hatóanyagot tartalmazó polipeptid konjugátumok.

1.1.3.1.1. Daunomicin konjugátumok

Az antraciklin szerkezetű antibiotikumok közé tartozó daunomicint széles körben használják a gyógyászatban különböző szilárd tumorok és leukémiák kezelésére [Lothstein et al, 2001]. A daunomicint savlabilis *cisz*-akonitsav kapcsolóstruktúráján keresztül kapcsolták EAK, valamint SAK polipeptidhez. Az *cisz*-akonitil-daunomicinből (cAD) savas környezetben szabadul fel a hatóanyag [Reményi et al, 2003]. A cAD-EAK (cAD-poli[Lys(Glu_{0,9}-DL-Ala_{3,5})]) konjugátummal kezelt L1210 leukémiát hordozó egerekben kiküszöbölhető volt a daunomicin immunszuppresszív hatása, az állatok 66-100%-a 60 nappal túlélte a kezelést. [Gaál et al,

1998]. Újabb adatok szerint a polipeptidhez kapcsolt hatóanyag multidrog-rezisztens (HL-60/MDR1 és HL-60/MRP1) sejtekben is kifejti hatását. [Reményi, 2003].

1.1.3.1.2. Metotrexát konjugátumok

A metotrexát (L-4-amino- N^{10} -metil-pteroil-glutaminsav), a folát-anyagcsere inhibitora, jelentős antitumor hatással rendelkező vegyület. A gyógyászatban akut leukémia, csontrák, valamint reumatológiai betegségek kezelésére használják. Ezen kívül ismert bizonyos intracelluláris paraziták, így a *Leishmania* fajok szaporodását gátló hatása is. A metotrexátot a molekula glutaminsav-részének karboxil-csoportján keresztül peptidkötéssel kapcsolták polikationos AK, SAK, ALK (poli[Lys(DL-Ala_m-Leu_i)] és amfoter EAK polipeptidekhez. A konjugátumok *Leishmania*-ellenes hatását vizsgálva azt tapasztalták, hogy a konjugátumok jelentős leishmanicid aktivitással rendelkeznek, jelentősen csökkentették a fertőzött makrofágokban jelen lévő paraziták számát *in vitro*. Az metotrexát ALK (poli[Lys(DL-Ala_{3,0}-Leu_{0,97})] polipeptiddel alkotott konjugátumának *in vitro* és *in vivo* *Leishmania*-ellenes aktivitása a szabad metotrexáténál is lényegesen nagyobb volt [Kóczán et al, 2002].

1.1.3.1.3. GnRH analóg peptid

A GnRH (gonadotropin releasing hormon) agonista peptidekkel történő ismételt kezelés hatására az agyalapi mirigy gonadotropin-termelése lecsökken, a szteroidok termelése visszaszorul. Bizonyos GnRH-analóg peptidek hatékonyan képesek gátolni hormonfüggő tumorok növekedését. Egy GnRH analóg peptid (Ac-D-Trp-D-Cpa-D-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂) Ac-EAK konjugátuma gátolta MCF-7 (70%) és MDA-MB 231 (50%) sejtek növekedését *in vitro*. [Mező et al 1996].

1.1.3.2. Epitóp peptidek kapcsolása polilizin gerincű polipeptidekhez

1.1.3.2.3. Mycobacterium tuberculosis peptidek

Wilkinson és munkatársai *Mycobacterium tuberculosis* 16kDa és 38 kDa fehérjéiből származó peptidek segítségével új, a korábbi módszereknél specifikusabb *in vitro* diagnosztikai eljárást szándékoztak kifejleszteni. A peptidek alacsony T-sejt választ indukáló hatásának fokozására az epitóp peptideket amfoter EAK és polianionos Ac-EAK (poli[Lys(N-Ac-Glu_i-DL-Ala_m)] és Succ-EAK (poli[Lys(N-Succ-Glu_i-DL-Ala_m)] polipeptidekhez kapcsolták. A konjugátum által

kiváltott T-sejt válasz a polipeptid hordozótól függő módon fokozódott a szabad peptid által kiváltott reakcióhoz képest [Wilkinson et al, 1999].

1.1.3.3. Nukleinsavak sejtbe juttatása polilizin gerincű polipeptid vektor segítségével

A pozitív töltésű polipeptidek képesek komplexet képezni a negatív töltéseket hordozó nukleinsavakkal, és azt a sejtekbe juttatni [Wu et al, 1986, Ward et al, 2001]. Bello Roufaï és munkatársai igazolták, hogy a hisztidin oldalláncot hordozó polilizin gerincű polipeptiddel (poli[Lys(His_i)]) komplexben lévő plazmid DNS bejut HepG2 humán hepatóma sejtekbe [Bello Roufaï et al, 2001]. A poli[Lys]-DNS komplex életideje a keringésben rövid, szervezetbe jutását követően rövid időn belül a májban halmozódik fel. A polipeptidek keringésből való gyors eltávozásának egyik oka feltehetően az, hogy a polikationos polipeptid aktiválja a komplementrendszer, és a komplement-komponensekkel opszonizált komplex a fagocitasejtek célpontjává válik [Ward et al, 2001].

1.2. A kemotaxis

1.2.1. A kemotaxis jelentősége

A kemotaxis egyike a legalapvetőbb sejtélettani funkcióknak mind a törzsfajlás alacsonyabb szintjén álló szervezetek, például egysejtűek esetében, mind a magasabb rendű élőlényekben.

Az egysejtűek kemotaktikus képessége nélkülözhetetlen a túléléshez. A sejtek a táplálékmolekulákat specifikus felismerő molekulák (táplálékreceptorok) segítségével különböztetik meg a káros, vagy semleges hatású anyagoktól. Lenhoff elmélete szerint [Lenhoff, 1974] a sejtek receptorai a filogenezis során kezdetben csak a táplálékmolekulákat ismerték fel. A táplálékmolekula és a sejten található felismerő egységeik ismételt találkozása során a receptor specificitása, mennyisége, ennél fogva a sejt válaszreakciója módosulhat. Ezt a jelenséget hormonális imprintingnek nevezik [Csaba, 1994, Csaba, 2000]. A sejtek a molekulák felismerésének képességét átörökítik az utódgenerációk számára. Ez a folyamat vezethetett azután olyan szignálmolekulák kiválasztódásához, amelyek a sejtmembránban specifikus receptorral rendelkeznek, és a sejt működését hosszabb távon befolyásolni képesek. A folyamat kezdeti lépései során egyes kis molekulák, pl. rövid peptidok kettős szerepet kaphattak: hasznosulhattak táplálékként, de szerepelhettek jelmolekulaként is. Ezt látszik alátámasztani az a megfigyelés, miszerint az egysejtű csillós *Tetrahymena* aminosav-specifikus táplálékreceptora egyes aminosavakat, és ezek hormon funkciójú származékát – például a tirozint és a tiroxint/trijódtironint vagy a hisztidint és a hisztamint – hasonló molekulaként ismeri fel [Csaba, 1994]. *Tetrahymena pyriformis* esetében figyelték meg, hogy az eredetileg a hematopoetikus citokinreceptorok részét képező SXWS szekvenciájú oligopeptidok (ahol X = a 19 természetes aminosav, kivéve a ciszteint) hasonló kemotaktikus választ váltanak ki, mint a peptidben X helyen szereplő aminosav önmagában. [Illyés et al 2002a]. Az egysejtűek különböző receptorkészlettel rendelkező populációi kemotaktikus vegyületekkel szelektálhatóak, és a szelektáló anyagra adott válaszképesség a szelektált populációk további generációi esetében is fennmarad. A kemotaxis a magasabb rendűek életműködéseiben is nagy jelentőséggel bír. Szerepet játszik az ivarsejtek migrációjában, az embrionális fejlődés során bekövetkező sejt vándorlások szabályozásában [Kőhidai, 2000]. A kórokozók elleni védekezés során az immunsejteknek a fertőzés helyére vándorlását különféle kemotaktikus anyagok – bakteriális peptidok, saját sejtek által termelt kemotaktikus citokinek

és egyéb molekulák, például véralvadási faktorok [Bar-Shavit et al, 1983] – idézik elő. A kemotaxis szerepet játszik több kóros folyamatban is, mint a bakteriális fertőzések kialakulása, vagy az áttétképző tumorsejtek vándorlása [Tsuji et al, 2002]. A sejtek kemotaktikus aktivitásának megnövekedése jellemző a rheumatoid arthritis késői szakaszában is [Kőhidai, 2000].

1.2.2. A kemotaxis alapfogalmai

A *migráció* a mozogni képes sejt elmozdulása a környezetből érkező jel hatására. Ez a fogalom általánosan használt, azonban nem ad információt sem a mozgás irányáról, sem sebességéről, sem az érzékelt jel minőségéről, például a környezetben található molekula koncentrációjáról vagy annak változásáról.

A *chemotaxis* a sejt mozgásának megváltozása a környezetükben oldott állapotban lévő molekulák hatására. A sejtek az adott vegyület koncentrációjának változását, koncentrációgradiensét érzékelik. Ezt követően a sejtek elmozdulhatnak az adott molekula irányába: az ilyen választ kiváltó anyagokat *attraktáns*nak nevezzük. Amennyiben az elmozdulás adott vegyület csökkenő koncentrációgradiensének irányában történik, azaz a vegyület taszítja a sejteket, az anyagot *repellens*nek nevezzük.

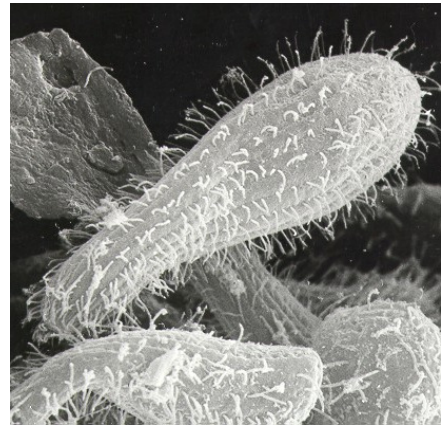
A kemotaxis egy speciális formája a *haptotaxis*, amely nem a környező folyadéktérben oldott, hanem szilárd felszínhez kötött anyagok hatására következik be. A haptotaxist kiválthatják sejt felszínhez kötött fehérjék, hormonok [Wiedermann et al, 1995], az extracelluláris mátrix egyes fehérjéi, valamint a rajtuk megkötött anyagok [Mansfield et al, 1994].

Amennyiben a sejtek oldott anyagok hatására bekövetkező mozgásának jellemzői nem irányítottak, *chemokinezis*ről beszélünk.

1.2.3. *Tetrahymena*: a sejtélettani vizsgálatok kedvelt modellje

A *Tetrahymena pyriformis* szabadon élő csillós egysejtű (3. ábra). Az általunk használt *Tetrahymena pyriformis* GL aszexuálisan, harántosztódással szaporodik, egyedei átlagosan 2½ óránként kettőződnek meg. Más *Tetrahymena* fajok (pl. *Tetrahymena thermophila*) ivaroson, konjugációval is képesek szaporodni. A *Tetrahymena* sejt fiziológiai vizsgálatok, valamint hormon-receptor kutatások kedvelt modellje, mivel felismerő és intracelluláris jel továbbító rendszere sok tekintetben hasonlóságot mutat a törzsfajlódás magasabb szintjén álló élőlényekével. *Tetrahymena pyriformis* esetében leírták, hogy ezek az egysejtűek képesek

felismerni számos gerincesek által termelt hormont. Az inzulin, hasonlóan a magasabb rendűekhez, *Tetrahymena* esetében is a cukoranyagcserére hat, ezenkívül befolyásolja a sejtek fagocitózis-intenzitását [Csaba, 1994, Kovács, 1996]. Az inzulin receptorát Christopher és munkatársai izolálták *Tetrahymena* membránjából [Christopher et al, 1995]. A *Tetrahymena* kemotaktikusan szelektálható is inzulinnal [Kőhidai et al, 2000]. A *Tetrahymena* sejtek felismerik ezen kívül az adenokortikotróp hormont (ACTH), β -endorfint, kalcitonint; az aminosav és peptid hormonok közül pedig a szerotonint, tiroxint, adrenalint [Csaba, 1994], a hisztamint [Kőhidai et al, 2000] és a melatonint [Kőhidai et al, 2002b]. Bár a *Tetrahymenának* nincsenek



3. ábra *Tetrahymena pyriformis*

klasszikus szteroid-receptorai, a sejtek reagálnak bizonyos szteroid hormonokra, a dihidroepiandroszteronra és az ösztradiolra is. A *Tetrahymena* több gerinces hormont így az inzulint, szerotonint, melatonint is képes termelni. A *Tetrahymena* által termelt inzulinról leírták, hogy képes befolyásolni a gerincesek cukoranyagcseréjét is [Csaba, 1994]. Számos, a magasabb rendűekben megtalálható második hírvivő rendszer is megtalálható *Tetrahymenában*: jelen van a sejtekben az adenilát-cikláz–cAMP és a guanilát-cikláz–cGMP rendszer, az inozitol foszfolipideken alapuló jelátviteli utak, valamint a kalmodulin és más kalcium-függő protein kinázok is [Csaba, 1994, Kovács et al, 1990, Hegyesi et al, 1994]. A sejtek kemotaxisának célja rendszerint a hasznosítható molekulák bekebelezése. A *Tetrahymena* három módon képes tápanyagokat felvenni: i. mikropinocitózissal, ii. a plazmamembránon keresztül történő transzportfolyamatok révén, iii. fagocitózissal, a szájmezőben képződő táplálékvakuólumokon keresztül. A táplálékvakuólumok kialakulásával járó tápanyagfelvétel feltehetőleg receptor-közvetített folyamat. A tápanyag, pl. aminosavak, peptidok, fehérjék, így a médium sterilizálásakor a tápfolyadékban található triptonból keletkező nagyobb részecskék, vagy akár latex gyöngyök is kiválthatják a fagocitózist [Kovács et al, 1996]

1.2.3.1. A *Tetrahymena pyriformis* GL: a kemotaxis-kísérletek modellje

A *Tetrahymena pyriformis* érzékenyen reagál a környezetben található kémiai anyagokra, amelyek – legtöbbször alacsony (10^{-12} – 10^{-6} M) koncentrációban – befolyásolni képesek a csillói segítségével gyors helyváltoztatásra képes sejt mozgásának irányát. Az egyszerű

vizsgálati módszerek [Kőhidai, 1995] a kemotaxis tanulmányozásának kedvelt modellsejtjévé teszik a *Tetrahymenát*, jól jellemzett jelátviteli és felismerő-rendszere megkönnyíti a kemotaktikus anyagok hatásának értelmezését. Számos vegyület, vegyületcsalád, köztük citokinek: TNF α , valamint a kemokinek közé sorolt IL-8 és RANTES [Kőhidai és Csaba, 1998], lektinek [Kőhidai et al, 2003a] szteroid [Kőhidai et al, 2003b] és peptid hormonok [Kőhidai et al, 2002a, b és 2001], bakteriális eredetű peptidok [Kőhidai et al, 2003c] *Tetrahymena pyriformis* kemotaxisára gyakorolt hatását vizsgálták az elmúlt években. A *Tetrahymena* kemotaxisát befolyásoló vegyületek közül kiemelt az aminosavak és peptidok molekulacsaládját, amelyek számos képviselője hatással van a *Tetrahymena* kemotaxisára. Az aminosavak táplálékként szolgálnak a *Tetrahymena* számára, mégsem minden aminosavra reagál a sejt pozitív kemotaxisal. A kis molekulájú glicin és alanin nem befolyásolja a *Tetrahymena* kemotaxisát, míg a lizin, leucin, fenilalanin és a valin taszítja a sejteket [Kőhidai et al, 1996, Kőhidai et al, 2003c]. Egyféle aminosavból felépülő oligopeptidekre a molekula hosszúságától függően válaszoltak a sejtek. Az aminosavtól és a 2, 3 és 4 lizint tartalmazó repellens peptidoktól eltérően az öt lizinből álló oligopeptid attraktánsként viselkedett. Hasonlóképpen a neutrális 1, 2 és 3 glicint tartalmazó neutrális peptidokkal szemben az öt glicinből felépülő peptid szintén attraktánsnak bizonyult [Kőhidai et al, 1996]. Prolint tartalmazó dipeptidek esetében azt tapasztalták, hogy a prolin N- vagy C-terminális elhelyezkedése, valamint a peptidben található másik aminosav fizikai-kémiai tulajdonságai nagymértékben befolyásolták a peptidre adott kemotaktikus választ [Kőhidai et al, 1997]. A kitüntetett helyen lévő X aminosav szerepét figyelték meg az SXWS (*Ser-X-Trp-Ser*) és WSXWS (*Trp-Ser-X-Trp-Ser*; X = a 19 természetes aminosav, a ciszteint kivéve) szekvenciájú szintetikus IL-6 receptor peptidok esetében. Az SXWS peptidok esetében repellensként viselkedett minden, az X helyen hasonló szerkezetű aromás aminosavat hordozó peptid [Illyés et al, 2002b]. Emellett jelentős szerepe van a peptid C-terminálisának is, hiszen ha az SEWS peptid C-terminálisán szabad karboxilcsoportot tartalmazó peptid kiemelkedően attraktáns hatású (kemotaxis idx. = 660 %), míg az amid terminálisú peptid esetében ez a hatás teljesen elvész [Kőhidai et al, 2003d]. A peptid hormonok közül a bradikinin és származékai szekvenciájuktól, ezen belül is elsősorban az N- és C-terminális aminosav minőségétől függően eltérő hatást gyakoroltak a sejtekre. A 9 aminosavból álló bradikinin attraktáns volt a *Tetrahymena* sejtekre. A peptid rövidítése egy argininnel az N-terminálison (Pro N-terminális) a kemoattraktáns hatás elvesztésével járt, míg a két aminosavval történt rövidítés

(az N-terminálison Phe található) ismét attraktáns származékot eredményezett. A C-terminálison egy aminosavval rövidített peptid szintén attraktáns peptidet, további rövidítés után azonban rövidített peptid repellens peptidet eredményezett [Kőhidai et al, 2002b]. A vazóaktív endotelinek estében rövid távú attraktáns (ET-1) vagy repellens (ET-2, 3) hatást tapasztaltak. Megfigyelték, hogy két aminosav eltérés a szekvenciában ellentétes hatású peptidet eredményez [Kőhidai et al, 2001]. A bakteriális eredetű formil-Met-Leu-Phe (fMLF) peptid az emlős szervezetek sejtjeire is ható kemoattraktáns molekula [Heit et al, 2002]. *Tetrahymenára* a fMLF peptid kemoattraktánsként hatott 10^{-8} M koncentrációban. Eltérő szekvenciájú formil-peptidek közül egyedül a fMV (formil-Met-Val) vonzotta a sejteket, az fMLFF (formil-Met-Leu-Phe-Phe) fMMM (formil-Met-Met-Met), fMV (formil-Met-Val), fMP (formil-Met-Pro) peptidek nem befolyásolták a *Tetrahymena* kemotaxisát, míg az fMS (formil-Met-Ser) peptid repellens hatású volt [Kőhidai et al, 2003c]. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a *Tetrahymena* kemotaxisát számos olyan vegyület (kemokinek, kemoattraktáns peptidek) kiváltja, amelyek a gerinces szervezetben is hasonló funkcióval rendelkeznek, ezért *Tetrahymena* modellen végzett kísérletekből levont következtetések kiindulási alapként szolgálhatnak a magasabb rendű szervezetek kemotaktikus válaszreakcióinak tanulmányozásához.

1.3. Az endocitózis

Az élő szervezet sejtjei az őket körülvevő vizes fázisból veszik fel a tápanyagokat és működésükhöz szükséges egyéb anyagokat. Bizonyos kis molekulák, pl. ionok, aminosavak, szénhidrátok bejuthatnak a sejt plazmamembránján keresztül diffúzióval, vagy specifikus transzportmechanizmussal, illetve ioncsatornákon keresztül. A nagyméretű vegyületek, makromolekulák bejutása specifikus felismerő struktúrák (receptorok) segítségével endocitózissal, vagy az extracelluláris folyadékban oldott állapotban lévő molekulák esetében makropinocitózissal történhet.

Az endocitózisnak három fő típusa a pinocitózis, a fagocitózis és a receptor-mediált endocitózis. A *pinocitózis* minden sejtél előfordul. A plazmamembránból átlagosan 0,1 μm átmérőjű vezikula fűződik le, amelybe a sejt környezetéből folyadék illetve az ebben oldott 150 nm-nél kisebb molekulák kerülhetnek [Alberts et al, 1994].

A *fagocitózis* az endocitózis speciális formája, melynek során a sejtek nagyméretű részecskéket ($>0,5 \mu\text{m}$), baktériumsejteket, és egyéb, pl. tusrészecskéket kebeleznek be, amelyek nagy méretű endocitotikus vezikulákba, fagoszómákba kerülnek. A fagoszómák mérete gyakran összemérhető a fagocitáló sejtével. Protozoonok esetében a fagocitózis a táplálékfelvétel általános módja, míg az emlős sejtek közül az erre specializálódott sejtípusokra (pl. makrofágok, neutrofil granulociták) jellemző. A fagocitózist többféle receptor közvetítheti. A hivatásos fagocitasejtek esetében nagy szerepet játszanak a fagocitózis folyamatában az immunglobulinok F_c régióját felismerő izotípus-specifikus F_c -receptorok, a koplementreceptorok, valamint az ún. mintázatfelismerő receptorok, pl. CD14 és scavenger receptorok, amelyek a mikroba számára esszenciális, de a gerinces sejtek felszínén jelen nem lévő molekulákat – szénhidrátokat, sejtfa-alkotóelemeket – ismernek fel [Alberts et al, 1994, Aderem és Underhill, 1999].

A *receptor-mediált endocitózis* specifikus folyamat, minden eukarióta sejtél előfordulhat. A membránban található, egy bizonyos ligandot megkötő transzmembrán receptorfehérjén keresztül megy végbe. A folyamat egyik formája „coated pit”, (burkos gödör), majd pedig burkos vezikula kialakulásával jár. A klatrin-közvetített endocitózis klasszikus példái az LDL részecskék, a vaskötő fehérje transferrin, az inzulin és a legtöbb peptid hormon bejutása a sejtekbe [Lodish et al, 2000]. Az endocitózist közvetítő receptorok számára az endoszómába kerülésük után két út kínálkozik. Recirkulálhatnak, azaz az endoszómából lefűződve

visszatérhetnek a plazmamembránba (pl. LDL receptor), vagy a receptort tartalmazó vezikulák a lizoszómákkal egyesülhetnek, és így a bennük levő fehérjék lebomlanak. Az endocitózis klatrin-független mechanizmussal is lejátszódhat: egyrészt koleszterin és szfingolipid gazdag palack alakú membránbemélyedéseken, kaveolákon keresztül, amelyeket a citoplazma felől a kaveolin fehérje burkol. Az újabb kutatások alapján a membrán koleszterinben és glikoszfingolipidekben gazdag rendezett szerkezetű mikrodoménjeinek, a lipid raftoknak [Pike, 2004] is nagy szerepet tulajdonítanak a klatrin-független receptor-mediált endocitózis folyamatában. Kaveola és/vagy raft közvetített endocitózissal jutnak a sejtekbe a szfingolipidek és a szfingolipidekhez kötött toxinok, így a koleratoxin, valamint egyes hormonok, mint az endotelin és vírusok, pl. az SV40 vírus [Nabi et al, 2004]. Klatrintól független folyamat a *makropinocitózis*, amely a membrán kitüremkedésével jár, és heterogén vezikulák, makropinoszómák képződéséhez vezet. A makropinocitózis fő funkciója nemcsak az oldott anyagok felvétele, hanem jelentős szerepe van a hivatásos antigénprezentáló sejtek – dendritikus sejtek, makrofágok – antigén-felvételében is. Egyes baktériumokról, mint a *Legionelláról* és a HIV vírusról kimutatták, hogy a makrofágokba való bejutásuk után a makropinoszómákban helyezkednek el [Johannes és Lamaze, 2002].

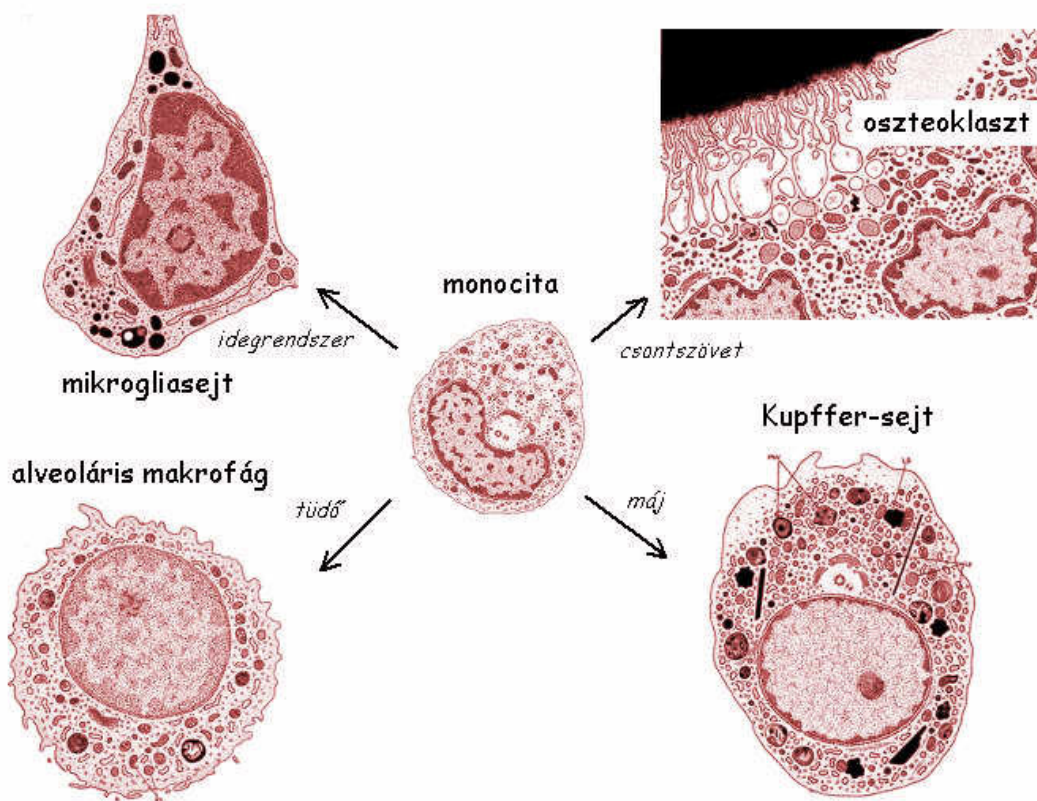
Az endocitózis specializált formája a *transzcitózis*, amely a polarizált sejteknél (epitél sejtek) fordul elő. Ebben az esetben a sejt egyik pólusán felvett anyagot a sejt másik pólusán leadja a sejt. Így szállítódnak az anyatejben lévő immunglobulinok a bélcsatornából a keringésbe, és az anyai immunglobulinok a placentán keresztül a magzatba [Alberts et al, 1994].

1.4. A hivatásos fagocita sejtek

Az emlős szervezet két professzionális fagocitasejtje, a neutrofil granulociták és a makrofágok a mieloid fejlődési vonal sejtjei közé tartoznak. Közös előalakból (granulocita-monocita előalak) fejlődnek. A *neutrofil granulociták* a keringésben cirkulálnak, amíg bizonyos ingerek hatására a kötőszövetekbe, vagy pl. a fertőzés, a gyulladás helyére vándorolnak, és ott megkezdik fagocitotikus aktivitásukat. A neutrofil granulociták rövid életű sejtek, a szövetekben is csak pár napig maradnak életképesek, azután elpusztulnak. A *makrofágok* életideje jóval hosszabb a neutrofil granulocitákénál; a szöveti makrofágok több hónapig is életképesek maradhatnak. A makrofágok „fagocita repertoárja” igen változatos: bekebelezik a szövetekben elpusztult, előregedett sejteket, köztük az elpusztult neutrofil granulocitákat, előregedett vörösvértesteket; baktériumokat, vírusokat, egysejtűeket [Gergely et al, 1998]. A bekebelezett részecske a fagoszómákba kerül, amely specializálódott lizoszómákkal egyesül. Ezekben a fagoszómákban történik a részecske lebontása, amelyben a lizoszomális hidrolázokon kívül részt vesznek a reaktív szuperoxid (O_2^-) és hipoklorit (ClO^-) gyökök is. [Alberts et al, 1994]

1.4.1. A makrofágok

A makrofágok a vérben keringő monocitákból differenciálódnak. A monociták a keringésből a szövetekbe vándorolnak, ott megtelepsznek és makrofágokká érnek. Ekkor a sejt mérete többszörösére növekszik, számos receptor expressziója megemelkedik (mintázatfelismerő receptorok, MHC I MHC II, Fc γ R-ok, komplementreceptorok, adhézions molekulák ld. *1. táblázat*), fagocitáló kapacitása fokozódik, és a sejt litikus enzimeket, (peroxidáz, nukleázok, savas hidrolázok) kezd termelni. A makrofág sejtek elnevezése szövettípusonként eltérő: peritoneális makrofágok, a tüdő alveoláris makrofágjai, a májban található Kupffer-sejtek, a vese mezangiális glomeruláris sejtjei, a csontszövet sokmagvú, fuzionált fagocitasejtjei, az oszteoklasztok, a kötőszöveti hisztiociták, a központi idegrendszer mikroglia sejtjei. Ezek közül a sejtek közül néhány látható a *4. ábrán*. A makrofágok megtalálhatóak a központi nyirokszervekben – timuszban, csontvelőben – valamint a perifériás nyirokszervekben: a lép, nyirokcsomók csíráközpontjaiban is. Itt főképpen hivatásos antigénprezentáló funkciójuk kerül előtérbe, de bekebelezik a nyirokszervekben elpusztult sejteket, pl. neutrofil granulocitákat is.



4. ábra A szöveti makrofágok. A monociták a keringésből a szövetekbe vándorolnak, és ott és makrofágokká érnek. A sejtek elnevezése szövettípusonként különböző: peritoneális makrofág, tüdő: alveoláris makrofág, máj: Kupffer-sejtek, vese: mezangiális glomeruláris sejt, csontszövet: oszteoklaszt, kötőszövet: hisztiocita, agy: mikroglia.

1.4.1.1. A makrofágok fagocitózisa

A makrofágok a szervezet azon sejtjei közé tartoznak, amelyek a szervezetbe jutó kórokozók, és egyéb részecskékkel (pl. koromszemcsék a tüdőben) először találkoznak. A szervezetbe jutó sejtek – baktériumok, gombák – felszínükön olyan molekulákat hordoznak, amelyek magasabb rendűekre nem jellemzőek, de a mikroorganizmusok számára létfontosságúak. Ilyen molekulák például a sejtfelszíni szénhidrátok, mint galaktóz, mannóz, a G⁻ baktériumok sejtfalában található LPS, a Gram⁺ és Gram⁻ baktériumok sejtfalalkotóeleme, a tejkolsav, az élesztő sejtfalában található mannán. Ezeket a – gyakran ismétlődő régiókból álló – „molekuláris mintázatokat” (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP) a makrofágok felszínén jelen lévő „mintázatfelismerő receptorok” (Pattern Recognition Receptors, PRR) ismerik fel. A makrofágok fagocitózisában legnagyobb szerepet játszó mintázatfelismerő receptorok a mannóz receptor, a Toll-szerű receptorok, az LPS

receptor (CD14) és a scavenger receptorok [Aderem és Underhill, 1999, Greenberg és Grinstein, 2002].

A fagocitózis specifikus és hatékony, ha az immunrendszer előre „megjelöli”, a szervezetbe került részecskéket. A képződő immunkomplexek lehetnek ellenanyaggal borítottak, de tartalmazhatnak komplementkomponenseket is [Falus, 1998]. A makrofág az opsonizált részecskét az immunglobulinok C-terminális régióját felismerő F_c -receptorokon, vagy a komplementmolekulákat kötő komplementreceptorokon keresztül veszi fel. Ezen receptorok, azonkívül, hogy kiváltják a fagocitózis folyamatát, képesek sejten belüli jelátviteli kaszkádot beindítani, amely végső soron a makrofágok aktivációjához vezet. [Aderem és Underhill, 1999, Greenberg és Grinstein, 2002]

Az 1. táblázatban a makrofágok fagocitózisában szerepet játszó receptorok láthatóak.

| | Receptor | Célsejt | Ligandja | Szerepe az immunválaszban | |
|--------------------------------|---------------------------------|--|--------------------------|--|------------|
| Immunkomplexe | Komplement receptorok | Komplement-komponensekkel opsonizált | C3b, C4b, MBL | Opszonizált fagocitózis | [3] |
| | CR1 (CD35) | baktériumok, gombák | C3bi, C3d | Effektorfunkciók beindítása | |
| felismerő receptorok | CR3 (CD11b/CD18) | | | | |
| | CR4 (CD11c/CD18) | | | | |
| erőreceptorok | F _c -receptorok | Immunglobulinokkal opsonizált | IgG F _c régió | Opszonizált fagocitózis | [3] |
| | FcγRII (CD32) | baktériumok, gombák | | Effektorfunkciók beindítása | |
| FcγRIII (CD16) | | | | | |
| | | | | | |
| „Mintázatfelismerő receptorok” | LPS receptor (CD14) | Gram– baktériumok | LPS | Fagocitózis | [3] |
| | Toll-szerű receptorok (TLR) | Baktériumok, vírusok | | PRR intracelluláris jelátvitel – effektorfunkciók beindítása | [8] [9] |
| felismerő receptorok | Szénhidrát receptorok | Baktériumok Gombák | Sejtfal-alkotóelemek | Fagocitózis (baktériumok, gombák) | [3] |
| | a. Mannóz receptor | | Mannóz, fukóz | | [4] |
| b. Galaktóz receptor | | | galaktóz | | [4] |
| Scavenger receptorok | Baktériumok, apoptotikus sejtek | Polianionos molekulák, pl. fucoidin, Ac-LDL, Ox-LDL, telomer szekvenciák | | Baktériumok, apoptotikus sejtek fagocitózisa | [10] |

1. táblázat A makrofágok fagocitózis-receptorai

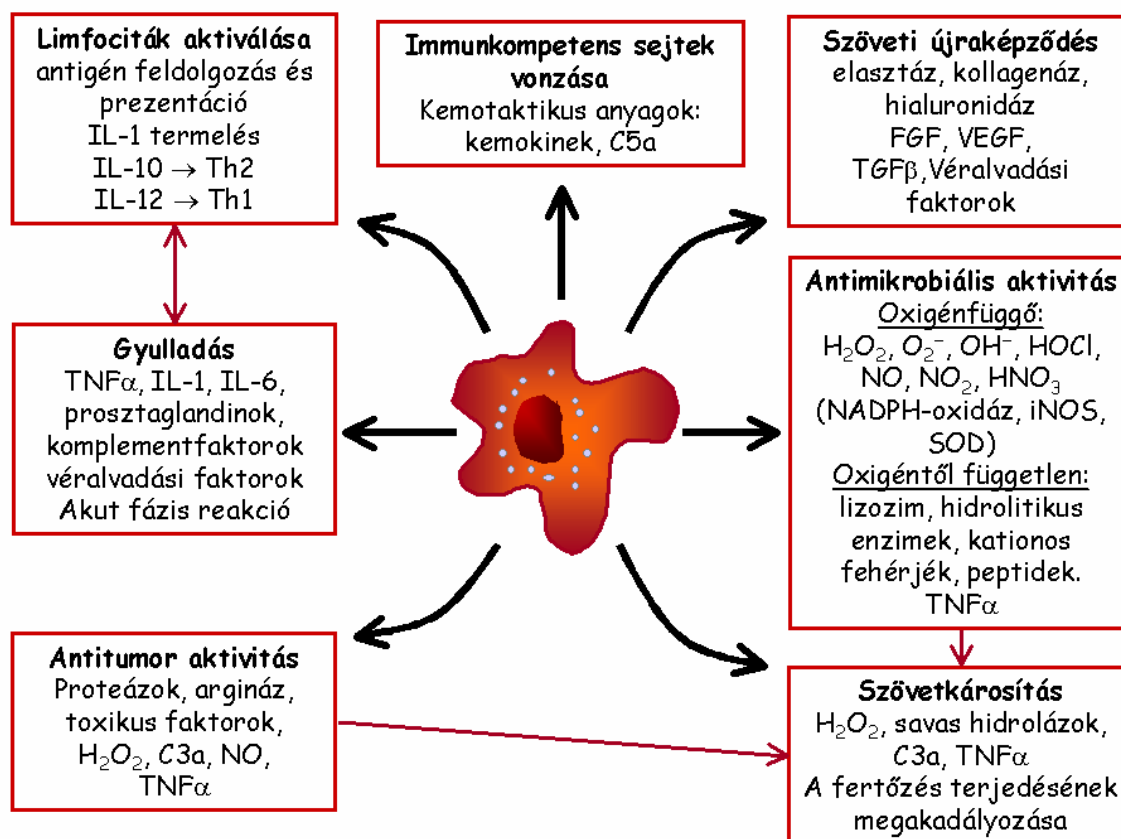
PRR: Pattern Recognition Receptors, minázatfelismerő receptorok

MBL: mannan binding lectin, mannánköötő lektin

[3]: Aderem és Underhill, 1999; [4]: Basu, 1990; [8]:Kopp et al, 2003 ; [9]:Vaidyay et al, 2003; [10]:Peiser et al, 2001

1.4.1.2. A makrofágok effektorfunkciói

Az aktivált makrofágokban számos folyamat indul be a mikroorganizmus bekebelezésének következményeképpen. A makrofágok effektorfunkcióit az 5. ábra foglalja össze.



5. ábra A makrofágok effektorfunkciói. Gergely és munkatársai nyomán [Gergely et al, 1998]

A makrofág a behatoló idegen organizmus elpusztítására törekszik. Ennek érdekében a sejt nagy mennyiségben kezd proteolitikus enzimeket (savas hidrolázok) termelni, amelyek a fagoszómába jutva a mikroorganizmus fehérjéinek lebontását végzik. Más enzimek (pl. peroxidáz, szuperoxid diszmutáz, NADPH-oxidáz, NO-szintáz) segítségével a sejt reaktív vegyületeket (H₂O₂, O₂⁻, HOCl, NO) állít elő, amelyek károsítják a kórokozót. A sejt toxikus peptideket, pl. defenzineket termel, amelyek erősen polikationos természetüknél fogva toxikusak a sejtekre, emellett immunstimuláló hatással is bírnak [Lehrer és Ganz, 2002]. A sejt által kibocsátott lipid mediátorok, pl. prosztaglandinok, leukotriének egyrészt kemoattraktáns hatásúak a többi immunsejtre nézve, valamint előidézik az erek tágulását, az

érfal átjárhatóságának növekedését. A makrofágok által termelt más mediátorok, pl. a hisztamin, és a bradikinin is hasonló élettani hatással rendelkeznek.

A patogének közvetlen elpusztítása mellett a makrofágok kis molekulájú mediátorokat, citokineket termelnek. A kemokinek családjába tartozó citokinek az immunkompetens sejtek a fertőzés helyszínére vonzásáért felelősek. A CXC vagy α -kemokinek családjába tartozó IL-8 különösen a neutrofil granulocitákat [Heit et al, 2002], míg a CC vagy β -kemokinek közé sorolt RANTES és MCP-1 (Macropage Chemoattractant Protein-1) fehérvérjék a monocitákat vonzzák a kórokozó behatolásának helyére [Fillion et al, 2001].

1.4.1.3. A makrofágok szerepe az adaptív immunválasz során

A makrofágok az ún. hivatásos antigénprezentáló sejtek közé tartoznak, sejt felszínükön folyamatosan megjelenítik az MHCII molekulákat. A környezetből felvett antigént a sejt citoplazmájában található multilamelláris vezikulákban feldolgozzák, peptidekre bontják, majd az antigénből származó peptideket az MHCII fehérjével komplexben jelenítik meg a sejt felszínén, és bemutatják a CD4+ T-sejteknek [Alberts et al, 1994]. Az antigén bemutatása mellett fontos szerepet játszanak adaptív immunválasz beindításában a makrofágok által termelt ún. riasztó citokinek. A makrofágok a gyulladásos folyamatot kiváltó három citokin, a TNF α , az IL-1 és IL-6 fő termelői. A TNF α a gyulladásban játszott szerepén kívül a tumorsejtek pusztulását idézi elő. Az IL-6 élettani hatása szinte a szervezet egészét érinti.

A makrofágok a gyulladásos citokinek mellett számos más citokinférfjét is termelnek. A makrofágok más citokinjei nagy szerepet játszanak a T- és B-sejtek aktiválásában, az adaptív immunválasz jellegének meghatározásában. Az IL-12 serkenti T_H1 limfociták IFN γ termelését és ezáltal a citotoxikus effektorsejtek (NK sejtek, T_C-sejtek, makrofágok) ölfektivitását. Ez a folyamat a sejten belüli kórokozókkal szemben hatékony sejtes immunválasz felé tolja el az egyensúlyt. Ezzel ellentétben, ha a makrofág IL-10-et szekretál, az gátolja a többi makrofág ölfektivitását, a T_H1 sejtek IL-2 és IFN γ termelését, valamint az antigén prezentációban nagy szerepet játszó B7 kostimulátor molekula megjelenését az antigénprezentáló sejtek felszínén, tehát összességében az extracelluláris patogének ellen hatékony humorális immunválasz kialakulásának kedvez.

Amint adaptív immunválasz menete két irányt vehet a kórokozó típusától függően, úgy a makrofágok aktiválódása is két úton mehet végbe. A T_H1 limfociták által termelt IFN γ serkenti az oxigén- és nitrogéntartalmú szabad gyökök szintézisét, a makrofágok patogénölő

aktivitása megnő. Növekszik a sejtfelszíni MHCI és MHCII molekulák megjelenítése is, a makrofág nagy hatékonysággal képes bemutatni a kórokozó feldolgozott peptidjeit a T-sejteknek. Az antigén tartós jelenléte késői típusú túlérzékenységi reakciót, vált ki, amelynek során a makrofágok által aktivált T_H1 -sejtek és a makrofágok kölcsönösen aktiválják egymást. Körfolyamat alakul ki, amely granulóma kialakulásához vezethet, amelyben az összeolvadt, sokmagvú aktivált makrofágokat aktivált T-sejtek veszik körül. A granulóma központjában létrejövő nekrozis a fertőzött sejtek pusztulását segíti elő. Az aktivált makrofágok felszínén számos receptor mennyisége megnövekszik, így fokozódik mind az MHCI és II molekulák, komplementreceptorok, F_c -receptorok, mind az adhéziós (LFA-1 integrin, az immunglobulin szupercsaládba tartozó ICAM1, ICAM2 és ICAM3,) és kostimulátor molekulák (CD40, B7) expressziója. A T_H2 sejtek, valamint a bazofil granulociták, hízósejtek, CD8+ T-sejtek, γ/δ T-sejtek, NK1.1+ T-sejtek által termelt IL-4 is aktiválhatja a makrofágokat egy ún. alternatív úton. Ebben az esetben elsősorban a mintázatfelismerő receptorok, így a mannóz receptor, scavenger receptorok és az MHCII molekula mennyisége nő meg a sejt felszínén, ami elősegíti a sejt hatékony fagocitózist, és az extracelluláris antigének prezentációját, de gátolja a makrofágok IFN γ általi aktiválódását és ölfunkcióit [Janeway et al, 2001].

1.4.2. A makrofágok mintázatfelismerő receptorai

1.4.2.1. Mannóz receptor

A makrofágok a mannóz receptorok közvetítésével kebeleznek be egyes nem-opszonizált mikroorganizmusokat, pl. baktériumokat, gombákat, valamint egysejtű parazitákat. A mannóz receptorhoz kötődnek a gombák sejtfalának poliszaharid komponensei, pl. az élesztő sejtfalában. A mannóz receptorok I. típusú transzmembrán fehérjék (C-terminálisuk található a citoplazmában), amely megtalálható a makrofágok és a máj endotél sejteinek felszínén, ezenkívül leírták megjelenését sejt kultúrában monocitából differenciáltatott dendritikus sejtek membránjában is [Linehan et al, 1999]. A mannóz receptor N-terminálisán cisztein-gazdag domént, egy fibronektin III típusú domént, változó számú, a szénhidrát-felismerésért felelős C-típusú lektin domént, valamint egy transzmembrán domént és egy a ligandkötésben szintén szerepet játszó C-terminális intracelluláris domént tartalmaz. A mannóz receptor expresszióját befolyásolja makrofágok érése, LPS jelenléte, citokinek, mint az IFN γ , és az IL-4 [Martínez-Pomares et al, 1998].

1.4.2.2. Toll-szerű receptorok

A Toll-szerű receptorok az emlős szervezetben a makrofágokon kívül megjelennek a monocitákon, dendritikus sejteken, limfocitákon, valamint epitél és zsírsejtek felszínén is. A receptor szerepet játszik a baktériumok és a gombák ellen kialakuló immunválaszban [Kopp és Medzhitov, 2003]. Az eddig leírt TLR-ok I. típusú transzmembrán fehérjék, amelyek extracelluláris doménje leucinban gazdag ismétlődő szekvenciákat tartalmaz. Ezek feltehetőleg szerepet kapnak a ligand megkötésében, azáltal, hogy stabilizálják a ligandkötő hely szerkezetét. Az intracelluláris domén az IL-1-receptor intracelluláris doménjével homológ részleteket tartalmaz. A TLR-ok hasonló jelátviteli utakat indítanak be, amelynek célmolekulája többnyire az NF κ B transzkripciós faktor. Így ezek a receptorok elindíthatják pl. gyulladási citokinek (IL-1, IL-6, TNF α), valamint a kemotaktikus hatású IL-8 termelését. A TLR receptorok két képviselőjéről, a TLR1-ről és 2-ről megállapították, hogy a membránban és a citoplazmában egymással képeznek komplexet. Ezen receptorok keresztkötése megindítja a sejten belüli jelátviteli folyamatokat [Sandor et al, 2003]. Az emlős TLR funkciója egyes esetekben eltér a mintázatfelismerő receptorok többségétől. A TLR-4 LPS jelenlétében a makrofágok LPS receptorához, a CD14 molekulához kapcsolódik. A ligand feltehetőleg nem

közvetlenül a TLR4-hez kötődik, hanem a CD14 fehérjéhez (LPS receptor) míg a TLR4 a receptorkomplex „jelátvivő láncaként” működik. [Aderem és Underhill, 1999].

1.4.2.3. Scavenger receptorok

A makrofágok fagocitózisában nagy szerepet kapnak a scavenger receptorok (SR). Ezek elsősorban a makrofág fejlődési vonal sejtjein, valamint egyes endotél sejteken (SREC, scavenger receptor expressed by endothelial cells, endotél sejt SR) [Naito et al, 1991, Adachi et al, 1997,] megjelenő transzmembrán fehérjék [Hughes et al, 1995]. Különböző szerkezetű polianionos molekulákat (acetilezett, maleilezett fehérjéket, szulfáttartalmú poliszaharidokat, négyszálú nukleinsavakat) ismernek fel [Krieger és Herz, 1994], de nem minden polianionos molekula a scavenger receptorok ligandja (2. táblázat).

| <i>SR-A I, II ligandok*</i> | <i>Nem SR-A I, II ligandok</i> |
|--|--|
| <u>MÓDOSÍTOTT FEHÉRJÉK, LIOPROTEINEK:</u> Ac-LDL, ox-LDL, mal-LDL, mal-HDL, mal-albumin (MSA, BSA) | <u>POLIANIONOS FEHÉRJÉK, LIOPROTEINEK:</u> Poli[D-Glu], acetilezett fehérjék |
| <u>NÉGYSZÁLÚ NUKLEINSAVAK:</u> poliinozilsav (poliI), poliguanilsav (poliG), polixantinilsav, szintetikus telomer szekvenciák [d(G ₄ T ₄) ₅] | <u>NEM NÉGYSZÁLÚ NUKLEINSAVAK:</u> poliA, poliC, poliU, egy és kétszálú DNS |
| <u>POLISZAHARIDOK:</u> dextrán-szulfát, fucoidin | <u>POLISZAHARIDOK:</u> heparin, kondroitin-szulfát, poliszialinsav, mannán |
| <u>FOSZFOLIPIDEK:</u> foszfatidil-szerin | <u>FOSZFOLIPIDEK:</u> foszfatidil-kolin |
| <u>EGYÉB:</u> polivinil-szulfát, lipoteichoésav, azbeszt | <u>EGYÉB:</u> polifoszfát (n=65) |

2. táblázat A polianionos molekulák csoportosítása a scavenger receptorokhoz való kötődésük szerint. Az adatok sejt kultúrában tenyésztett makrofágokra, és SR-A I-gyel és II-vel transzfektált sejtekre vonatkoznak; Mal: maleil, Ac: acetil

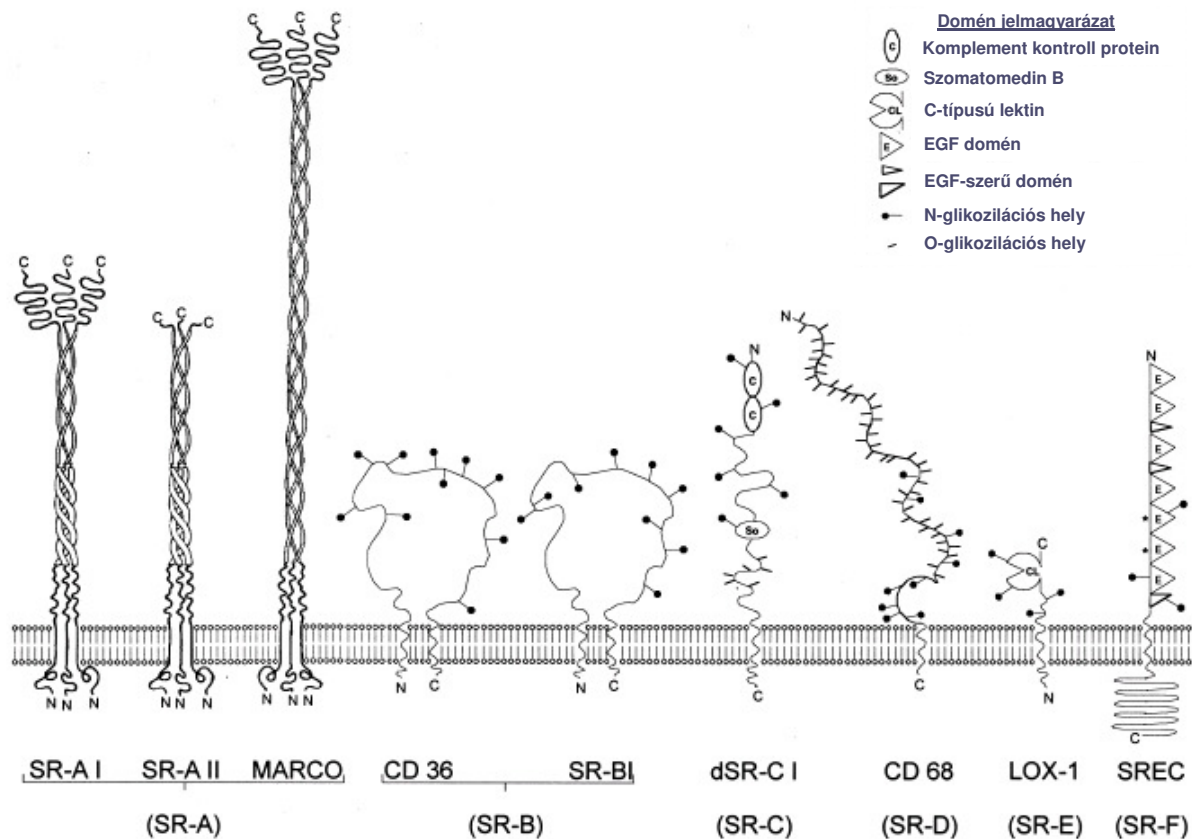
A scavenger receptorok sejtfelszíni mennyiségét növeli a monociták érése, például a homing során történő differenciálódás, a makrofágok IL-4 hatására végbemenő aktiválódása; sejt kultúrában a szérumban komponensek jelenléte; a sejtek monocita- vagy fibroblaszt-kondicionált médiumban (GM-CSF forrás) való tenyésztése. Expressziójukat csökkenti az LPS, szerotonin, fibronectin, IFN γ , TNF α jelenléte, valamint a sejtek limfocita-kondicionált médiumot tartalmazó tápoldatban való tenyésztése [de Villiers et al, 1994]. A scavenger receptorok funkciója igen sokrétű. Szerepet játszanak a veleszületett immunválasz kialakulásában, valamint kóros folyamatokban, mint az érlemezés és az Alzheimer-kór.

A scavenger receptorok részt vesznek a nem opsonizált mikroorganizmusok fagocitózisában. A makrofágok SR-okon keresztül kebeleznek be Gram+ és Gram- baktériumokat egyaránt [Peiser et al, 2002 és 2000].

A scavenger receptorok jelenléte egérben bizonyos védelmet nyújthat az LPS által kiváltott endotoxikus sokk ellen. A scavenger receptorok képesek megkötni az LPS-t, de szemben a CD14-TLR4 receptor-komplexszel, a SR által közvetített jelátvitel nem serkenti a TNF α felszabadulását. Ezt támasztja alá, hogy Haworth és munkatársai kimutatták, hogy az SR-A -/- egerek érzékenyebbek az LPS-re, és magasabb a TNF α és IL-6 szintjük, mint a vad típusú kontroll egereké [Haworth et al, 1997].

A makrofágok érlemezésben játszott szerepe régóta ismert [Brown és Goldstein, 1983]. A makrofágok scavenger receptoraik közvetítésével felveszik az oxidált LDL részecskéket, és sejten belül felhalmozzák a belőlük felszabaduló koleszterint. A makrofágok ún. habsejteké (foam cells) fejlődnek, amelyek az érfalhoz tapadva az érlemezéses plakkok részeit képezik. Szinte valamennyi scavenger receptor így az SR-A I, II; SR-B1, CD-36, makroszialin (SR-D), LOX-1 (SR-E), és a SREC (SR-F) képes az ox-LDL megkötésére.

A scavenger receptorok szerkezetük szerint csoportosítva öt családba sorolhatóak (6. ábra).



6. ábra A scavenger receptorok szerkezet szerinti csoportosítása [Gough et al, 2000].

Az **A-típusú scavenger receptorok** családjába tartoznak az SR-AI, SR-AII, SR-AIII és a MARCO (kollagén domént hordozó makrofág receptor) molekulák. Az SR-A fehérjék 6 doménből állnak, és C-terminálisuktól eltekintve konzervatív szerkezet jellemzi őket. N-terminális doménjük a citoplazmában található, ezt egy 25 aminosavból álló transzmembrán domén követi. A transzmembrán régió egy rövid összekötő doménon keresztül kapcsolódik az α -helikális coiled-coil doménhez, amelyet egy hármas hélix szerkezetet felvevő kollagénszerű domén követ. A C-terminális régió hosszúsága eltérő az egyes receptorok esetében [Kodama, 1990, Gough et al, 2000]. A coiled-coil doménnek a receptor trimerizációjában, valamint a ligand endoszómában történő disszociációjában van szerepe, a citoplazmában található domén protein kináz C kötőhelyeket tartalmaz [Peiser et al, 2002b]. A receptor ligandkötő helyeként a kollagénszerű domént azonosították. A kollagénszerű domén szekvenciájában gyakori a *Gly-X-X* motívum ismétlődése, ahol *X* gyakran *Pro* vagy *Lys*. Az SR-AI molekula kollagénszerű doménjének C-terminális régiójában hat *Gly-X-X* esetében az *X* aminosav helyén *Lys* vagy *Arg* áll. Az ismétlődő szekvenciák ugyanott helyezkednek el mind a

szarvasmarha, mind az emberi SR-AI esetében [Matsumoto et al, 1990]. A fehérje kollagénszerű doménje tehát fiziológiás pH-n pozitív töltéseket hordoz, így polianionos molekulák megkötésére képes. A főbb SR-A ligandokat a 2. táblázat foglalja össze, összehasonlítóképpen feltüntetve azokat a polianionos molekulákat, amelyek nem kötődnek az SR-A receptorokhoz.

Elsődleges funkciójuk a patogének, baktériumok fagocitózisa. A makrofágok SR-okon keresztül számos baktériumfaj, így a *Neisseria meningitidis* és az *Escherichia coli* bekebelezésére képesek *in vitro* [Peiser et al, 2002a és 2000]. *In vivo*, az SR-A -/- egerek érzékenyebbnek bizonyultak *Listeria monocytogenes*, valamint a Herpes simplex vírus által kiváltott fertőzésre, mint a receptorra nézve vad típusú társaik [Suzuki et al, 1997]. A makrofágok többféle felszínhez tapadhatnak az SR-A molekulák közvetítésével. Fraser és munkatársai leírták, hogy a RAW264 tumoros makrofág sejtek szövettenyésztő edényekhez való letapadása gátolható az SR-A specifikus monoklonális 2F8 ellenanyaggal. Ezzel szemben a tapadást elősegítő anyagokkal nem kezelt bakteriológiai tenyésztőedények felszínéhez a makrofágok nem a scavenger receptoraik segítségével tapadnak ki [Fraser et al, 1993]. Az SR-A közvetíti a makrofágok adhézióját a β -amiloid fibrillumokhoz, amely a makrofágok letapadását követően reaktív oxigén gyökök szintézisét idézi elő [Gough et al 2000]. Az SR-A család negyedik tagja, a MARCO nem tartalmaz coiled-coil régiót, kollagénszerű doménje azonban hosszabb, mint az SR-A I, II, III receptoroké. Feltételezések szerint a MARCO esetében a ligand felismerése a C-terminális cisztein-gazdag doménon történik. A MARCO az SR-A család többi tagjához hasonlóan szerepet játszik a Gram+ és Gram- baktériumok fagocitózisában, de segítségével történik számos más részecske, pl. por-kvarc szemcsék bekebelezése is. A MARCO jelenléte a sejtek felszínén az SR-A család többi tagjával ellentétben csak a lép marginális zónájában, a nyirokcsomóban, és a peritoneumban található makrofágokra jellemző, de egyes bakteriális fertőzések által kiváltott gyulladás indukálhatja megjelenését *in vitro* más makrofág-populációkon is [Gough et al, 2000, Peiser et al, 2002a].

A **B-típusú scavenger receptorok** családjába tartozik az SR-BI, II és a CD36 molekula. A CD36 molekulák elsősorban az apoptotikus sejtek felismerésében, vesznek részt. Mindhárom B-típusú scavenger receptor szerepét leírták a módosított LDL és HDL felvételében és akkumulációjában [Krieger, 1999]. Az SR-BI receptorok a máj, mellékvese mirigy- és

zsírsejtjein fejeződnek ki és a sejtek lipid anyagcseréjében van fontos szerepük. Nagy affinitással kötik a HDL részecskéket [Freeman et al, 1997]. A CD36 molekula 78-88 kDa tömegű transzmembrán glikoprotein. Monociták, vérlemezkék, zsírsejtek, bizonyos endotél sejtek, mint az emlő és a retina endotéljének felszínén fejeződik ki [Pearce et al, 1998]. A makrofágok a CD36 molekula közvetítésével veszik fel az apoptotikus neutrofil granulocitákat, egyéb apoptotikus sejteket, a hemoglobint nem tartalmazó, és *Plasmodium falciparum*mal fertőzött vörösvértesteket. Ezenkívül az extracelluláris mátrix fehérjék, pl. a trombospondin-1 receptoraként is működnek, ennél fogva szerepet játszanak a sejtek mátrixhoz való adhéziójában és migrációjában [Febbraio et al, 2001].

Az **SR-CI** molekulát először *Drosophila* embrionális makrofágjain fedezték fel (dSR-CI). A *Drosophilából* izolált cDNS-sel COS-M6 sejteket transzfektáltak, és megállapították, hogy a transzfektált sejtek olyan sejtfelszíni receptort fejeznek ki, amely az acetilezett LDL-t köti és előidézi annak felvételét és feltehetőleg lizoszomális lebomlását [Perason et al, 1995]. Az SR-CI ezen kívül felismer β -glükánokat, laminarint és más bakteriális felszíni molekulákat is. A scavenger receptorok jelenléte *Drosophilában* arra enged következtetni, hogy ezek a struktúrák az evolúció során megőrizték konzervatív szerkezetüket [Gough et al, 2000].

1.5. Hatóanyagok specifikus célbajuttatása makrofágokba

A sejt-specifikus célbajuttatás gondolata nem újkeletű, először Paul Ehrlich vetette fel 1906-ban. A sejt-specifikus hatóanyagok, hordozók fejlesztése azonban napjainkban is a tudomány nagy érdeklődésre számot tartó területei közé tartozik.

Az ideális célspecifikus hatóanyag a következő elemekből épül fel:

- *Rendelkezik egy specifikus felismerőegységgel a célsejt felszínén;*
- *célbajuttató elemmel, amely a hatóanyagot keresztülviszi a sejtmembránon;*
- *olyan struktúrával, amely biztosítja, hogy a hatás a megfelelő helyen nyilvánuljon meg.*

Mivel a legtöbb sejt az adott sejttípusra jellemző sejt-felszíni molekulakészletet hordoz, a specifikus molekulákat felismerő hordozó segítségével a különböző hatóanyagok elvileg a megfelelő típusú sejtbe juttathatók. Hordozómolekulaként gyakran alkalmaznak valamely sejt-felszíni struktúrát felismerő ellenanyagot, vagy az adott sejten található valamely receptor ligandját. A monoklonális ellenanyagok alkalmazása nagy szelektivitást biztosít, és bár az ellenanyag-konjugátumok sejtbe való felvétele gyakran kevésbé hatékony, a hatóanyag akkumulálódhat a sejten belül, és így elérheti a hatáshoz elegendő koncentrációt. A másik széles körben alkalmazott lehetőség a hatóanyagok receptor–ligand kölcsönhatáson alapuló sejtbe juttatása. A sejt-felszíni receptor ligandjához kapcsolt hatóanyagok rendszerint klatrin-közvetített receptor-mediált endocitózissal jutnak a sejtbe. A felvételt követő intracelluláris folyamatok befolyásolhatják a sejtbe jutás mértékét (pl. receptor down-reguláció csökkentheti a további felvételt). Amennyiben reciklizáló receptort célzunk meg, a hatóanyag folyamatosan a sejtbe juttatható [Basu, 1990].

1.5.1. A makrofágokban élősködő kórokozók

A makrofágokat számos intracelluláris parazita használja köztes gazdaként. Találhatók köztük baktériumok (*Mycobacterium sp.*, *Legionella sp.*, *Salmonella sp.*); gombák; vírusok (HSV-2; hepatitis vírusok), de egysejtű paraziták (*Leishmania sp.*, *Schistosoma sp.*) is. Ezek a kórokozók a makrofágok fagoszómáiban elrejtőzve képesek kikerülni a szervezet védekező mechanizmusait, nemegyszer bonyolult védekező mechanizmusokat kifejlesztve, amellyel elkerülhetik a sejten belüli lizoszomális lebomlást. A *Mycobacteriumok*, miután a makrofágok fagocitózissal bekebelezték őket, a fagoszómákban élnek és szaporodnak. A baktérium a burkában található glikolipid (lipoarabinomannán) és szekretált lipidek segítségével megakadályozza az endoszómák érését, a lizoszómával való fúzióhoz szükséges fehérjék

megjelenését az endoszóma membránjában. A fertőzött makrofágok felszínén mindazonáltal megjelennek az MHCII molekulán mycobacteriális peptidek, és ezek a makrofágok aktiválják, a T_H1 sejteket, a T-sejtek által termelt citokinek pedig elősegítik az intracelluláris baktérium elpusztítását. A hosszabb ideig fennálló fertőzés granulóma kialakulásához vezet.[Janeway et al, 2001, Amer et al, 2002]. A *Leishmania* fajok endoparazita egysejtűek, amelyek több köztes gazdában élőködnek. A *Leishmania* fajok nőtény pillestúnyog (*Phlebotomus sp.*) csípésével kerülnek az emlős szervezetbe. A szervezetbe került parazitákat a makrofágok bekebelezik, és ezután a parazita a fagoszómába kerül. A parazita sejtfelszíni lipofoszoglikánja megvédi a parazitát a makrofágon belüli lebomlástól, valamint gátolja a fagoszóma lizoszómával való fúzióját is [Alexander et al, 1999, Amer et al, 2002]. A makrofágokban élőködő kórokozók elpusztítására kínál megoldást, ha antibiotikumokat, illetve parazita, vírusellenes hatású vegyületeket szelektíven be tudnánk juttatni a sejtekbe. Némi nehézséget jelent, hogy a makrofágok nem rendelkeznek csak az adott sejttípuson megtalálható sejtfelszíni receptorral, mint a B-sejtek sejtfelszíni immunglobulinja, vagy a T-sejt receptor. Mindazonáltal több konzervatív szerkezetű molekulákat tömörítő receptorcsalád is alkalmas lehet a különböző hatóanyagok célbajuttatására így a szénhidrát-felismerő mannóz-fukóz receptorcsalád [Aderem és Underhill, 1999] és a galaktóz receptor [Basu, 1990], az LDL- receptor [Mankerz et al, 1997], valamint a scavenger receptorok családja [Basu, 1990].

1.5.2. Hatóanyagok specifikus célbajuttatása makrofágokba scavenger receptoron keresztül

Az elmúlt években számos sikeres kísérlet történt antibiotikumok, daganatterápiás szerek szelektív bejuttatására makrofágokba scavenger receptoron keresztül. Ezekben a kísérletekben többnyire módosított fehérjét, legtöbbször maleilezett marha-szérumalbumint (mal-BSA) alkalmaztak hordozóként.

Abraham és munkatársai maleil-csoporttal módosított fehérjék (marha szérumalbumin, egér szérumalbumin, diftéria-toxin) egér peritoneális makrofágokba való felvételét vizsgálták. Megállapították, hogy a maleilezett proteinek sejtbe jutása gátolható a scavenger receptor ligand poliguanilsavval. Balb/c egereket immunizálva a módosított fehérjékkel kitűnt, hogy míg a natív fehérjék nem idéztek elő számottevő ellenanyagválaszt, addig maleilezett fehérjék jelentős ellenanyag-termelést indukáltak [Abraham et al, 1995]. A maleilezett fehérjét bekebelezett sejtek a T_H1 sejtek stimulálása által a celluláris immunválasz irányába tolták el

az egyensúlyt. A maleilezett fehérjék ellen ennek következtében IFN γ hatására képződő IgG2a típusú ellenanyag került túlsúlyba, ezzel szemben a natív fehérje inkább IL-4 függő IgG1 ellenanyag termelését idézte elő [Singh et al, 1998]. A módosított fehérjék jelenlétében megnövekedett T-sejt proliferációt is tapasztaltak [Abraham et al, 1995, 1997].

A scavenger receptoron keresztül a makrofágokba juttatott hatóanyagok szerepet játszhatnak mind a daganatterápiában, mind az intracelluláris paraziták okozta betegségek kemoterápiás kezelésében. Maleilezett BSA-hoz (mal-BSA) kapcsolt daunomicin különböző sejtípusokba (J774A.1 makrofág sejt vonal, CHO sejtek, Bowes melanóma sejtek és nem makrofág sejt vonalak) való felvételét tanulmányozva megállapították, hogy a Dau-mal-BSA konjugátumot csak a scavenger receptort expresszáló J774.A1 sejtek vették fel. A felvétel telítési kinetikával volt jellemezhető. A Dau-mal-BSA-val történt kezelés nem volt hatással a Bowes melanóma sejtekre, viszont jelentős mértékben gátolta a J774A.1 makrofág sejt vonal szaporodását [Mukhopadhyay et al, 1992].

A fotodinamikus daganatterápiában használt alumínium-tetraszulfó-ftalocianin mal-BSA-val alkotott konjugátuma szintén szelektíven jutott be J774 sejtekbe, míg a receptort nem expresszáló EMT-6 egér emlőtumor sejtek nem vették fel a vegyületet. Fotoaktiválás után a ftalocianin a J774 sejtek pusztulását idézte elő [Brasseur et al, 1999]. A fotodinamikus terápia utat tör az érlelmeszesedés gyógyításában is, ám a módszer hatékony alkalmazásának feltétele a fotoreaktív vegyületek eljuttatása az érlelmeszesedéses plakkok belsejében található aktivált makrofágokba. De Vries és munkatársai oxidált LDL-hez kapcsolt alumínium-ftalocianil-kloridot juttattak be scavenger receptort expresszáló RAW 264.7 egér makrofág vonal sejtjeibe. A sejtekbe felvett ox-LDL-hez konjugált ftalocianin származékot vörös fényel megvilágítva a sejtek pusztulását figyelték meg [De Vries et al, 1999].

Majumdar és munkatársai [Majumdar és Basu, 1991] mal-BSA-hoz konjugált *p*-aminoszialinsav *Mycobacterium tuberculosis* túlélésére gyakorolt hatását vizsgálták Balb/c egerből származó peritoneális makrofágokban. A konjugátum jóval hatékonyabban pusztította el a baktériumokat a sejtekben, mint a nem konjugált vegyület (80% vs. 12,5%, $c=5 \mu\text{g/ml}$, 4h és 55% vs. 10%, $c=2 \mu\text{g/ml}$, 3h). A konjugátum hatását csökkentette mind a chloroquin a lizoszomális funkciók gátlása révén, mind a feleslegben jelen lévő mal-BSA.

A mal-BSA-hoz kapcsolt metotrexát hatékonyan gátolta *Leishmania mexicana amazonensis* szaporodását a makrofágokban. $0,9 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban a paraziták mintegy 70%-a elpusztult a sejtekben, míg a szabad metotrexát csak a sejtekben élősködő egysejtűek 10%-át

pusztította el. A konjugátum alkalmazásával a fertőzés tünetei, mint a talpon található léziók is nagymértékben visszaszorultak [Mukhopadhyay et al, 1989].

Prasad és munkatársai [Prasad et al, 1999] antiszensz oligonukleotidok specifikus makrofágba juttatásának lehetőségét vizsgálták. A vezikuláris sztomatitisz vírus(VSV) szaporodását gátló VSV-pecifikus oligonukleotid 3' végére poliguanilsavat (poli(G)) kapcsoltak. A poliG szakasz révén a scavenger receptor felismerte az antiszensz oligonukleotidot, és az bejutott a VSV-vel fertőzött J774E tumoros makrofág sejtekbe, valamint scavenger receptort expresszáló transzfektált CHO sejtekbe, és megakadályozta a vírus szaporodását.

Mindezen eredmények illusztrálják, hogy a scavenger receptorok a makrofágokba szelektíven bejuttatni kívánt vegyületek ígéretes célpontjai lehetnek. A scavenger receptoron keresztül sejtbe jutó hordozómolekulákhoz számos, a gyógyászat területén alkalmazható vegyületet (kemoterápiás szert, oligonukleotidot vagy akár epitóp peptidet) kapcsolhatunk, amelyek specifikus célbajuttatása anélkül, hogy hatásuk a szervezet egészét érintené, előrelépést jelentene a makrofágokhoz kötődő betegségek gyógyításában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban már a nyolcvanas évektől kezdve vizsgálják a polilizin gerincű elágazó láncú polipeptid hordozók kémiai és biológiai sajátosságait. A kutatócsoportban végzett eddigi kutatások jelzik

- a) hogy a makromolekula oldallánc-szerkezete és töltésviszonyai meghatározóak a polipeptid és konjugátumainak biológiai hatása szempontjából. [Hudecz, 1995];
- b) valamint, hogy az elágazó láncú polipeptidek alkalmasak tumor- illetve parazitaellenes szerek, epitóp peptidek hordozómolekulájának.

Ugyanakkor e vegyületeknek sem kemotaktikus tulajdonságait, sem sejtbe történő bejutását nem vizsgálták eddig. Doktori munkám célja ezért elsősorban a kémiai szerkezet és a fenti sajátosságok közötti összefüggések feltárása volt.

Tanulmányoztam a különböző szerkezetű oldalláncot hordozó polipeptidek hatását *Tetrahymena pyriformis* GL csillós egysejtűn, valamint J774 egér makrofág sejtvonalon és csontvelőből izolált egér makrofágokon, valamint vizsgáltam a polipeptidek és különböző összetételű foszfolipid modellmembránok között kialakuló kölcsönhatást.

A következő kérdésekre kerestem választ:

- ⇒ A vizsgált polipeptidek mutatnak-e toxikus hatást a sejtekre nézve. Ennek tisztázására meghatároztam a polipeptidek toxicitását mindhárom modellsejt esetében.
- ⇒ A kemotaxis a sejtek alapvető jelentőségű élettani funkciója. Célul tűztem ki *Tetrahymena pyriformis* és a J774 sejtek polipeptidekre adott kemotaktikus válaszána jellemzését. Vizsgálni kívántam a polipeptidek hosszú távú hatását *Tetrahymena pyriformis* kemotaxisára.
- ⇒ Milyen szerepe van a polipeptidek szerkezetének a sejtbe jutás mértékében és mechanizmusában. Ezért meghatároztam a polipeptidek felvételének jellemzőit *Tetrahymena pyriformis*, J774 és egér csontvelői eredetű makrofág sejtekbe.
- ⇒ Két, egymástól eltérő (acetyl, illetve szukcinil) végcsoportot tartalmazó polianionos polipeptid alkalmazásával tisztázni kívántam, hogy a scavenger receptoroknak szerepe

van-e a polipeptidek bejutásában J774 sejtekbe, illetve egér csontvelőből izolált makrofágokba. Csontvelői makrofág sejteken vizsgáltam, a scavenger receptor szerepét polikationos polipeptidek felvételében is.

⇒ A polipeptidek sejtbe jutása során – különös tekintettel a polikationos molekulákra – szerepet kaphat a sejtmembrán foszfolipidjeivel kialakuló kölcsönhatás. Célul tűztem ki az elágazó láncú polipeptidek és neutrális, valamint anionos foszfolipidet tartalmazó modellmembránok között kialakuló kölcsönhatás jellemzését. Vizsgáltam a polipeptidek töltésének, polaritásának szerepét a foszfolipid modellmembránokkal létrejövő kölcsönhatás kialakulásában.

3. KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1. Sejtek

3.1.1. *Tetrahymena pyriformis*

A *Tetrahymena pyriformis* GL egysejtűeket 28°C-on tartottam fenn 1% triptont (Difco, Michigan, USA) és 0,1% élesztőkivonatot (Difco, Michigan, USA) tartalmazó táptalajban (pH=7,2). A kísérleteket a logaritmikus fázisban lévő sejteken (48 óra) végeztem, ebben az esetben a *Tetrahymena* kultúra sejtsűrűsége $\sim 10^4$ sejt/ml.

3.1.2. *J774* sejt vonal

A *J774* monocita-makrofág sejt vonal fenntartása 10% borjúmagzat-szérumot (Fetal Calf Serum, FCS)(Sigma) 2mM/l L-glutamint és 0,16 g/l sztreptomocint tartalmazó RPMI 1640 médiumban (Sigma) 37°C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában történt. A kísérletekhez a logaritmikus növekedési fázisban lévő sejteket használtam fel.

3.1.3. A csontvelői eredetű egér makrofágok

Kísérleteinkhez két egértörzset használtunk: a scavenger receptort expresszázó *129/ICR* és az A-típusú scavenger receptorra nézve génkiütött *SRA* -/- egereket. Az egerek leölése után az állatok lábából a femurt és tibiát kivettük, majd sterilizálás után, amely 1 perc etanolos áztatással történt, a csontvelői sejteket PBS pufferrel kimostuk csont üregéből. Az így kimosott sejteket hagytuk letapadni bakteriológiai Petri-csésze felszínéhez. A le nem tapadó sejteket újabb mosással távolítottuk el, majd a letapadó sejteket 1 héten keresztül továbbtenyésztettük 15% (V/V) LCM (L-sejt kondicionált médium, amely a sejtek növekedéséhez nélkülözhetetlen GM-CSF-et tartalmazza) tartalmú R10² médiumban [Peiser et al, 2000].

² Az R10 médium összetétele: RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK), 10% FCS, 10 mM HEPES puffer, antibiotikumok: 50 IU/ml penicillin és 50 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamin

3.2. Anyagok

3.2.1. Polipeptidok

A polilizin gerincű polipeptideket az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport állította elő és bocsátotta rendelkezésemre. A polipeptidok kémiai jellemzőit a 3. táblázatban foglaltam össze.

| Polipeptid | Jele ^a | Aminosav-összetétel ^b | | | \overline{DP}_n^c | $\overline{M}_w^d \pm 5\%$ |
|---|-------------------|----------------------------------|---------|-------|---------------------|----------------------------|
| | | Lys | Ala (m) | X (i) | | |
| poli[Lys] | - | 1,00 | - | - | 130 | 17000 |
| poli[Lys(Pro _i)] | P _i K | 1,00 | - | 0,95 | 84 | 24800 |
| poli[Lys(His _i)] | H _i K | 1,00 | - | 0,56 | 93 | 15400 |
| poli[Lys(Glu _i)] | E _i K | 1,00 | - | 1,00 | 94 | 25700 |
| poli[Lys(DL-Ala _m)] | AK | 1,00 | 3,88 | - | 60 | 24200 |
| poli[Lys(DL-Ala _m)] | AK | 1,00 | 4,50 | - | 80 | 32900 |
| poli[Lys(Ser _i - DL-Ala _m)] | SAK | 1,00 | 3,80 | 1,00 | 60 | 29400 |
| poli[Lys(Thr _i - DL-Ala _m)] | TAK | 1,00 | 3,80 | 0,90 | 60 | 29300 |
| poli[Lys(Glu _i - DL-Ala _m)] | EAK | 1,00 | 3,80 | 1,00 | 60 | 31300 |
| poli[Lys(Glu _i - DL-Ala _m)] | EAK | 1,00 | 4,00 | 1,00 | 80 | 42900 |
| poli[Lys(Ac-Glu _i - DL-Ala _m)] | Ac-EAK | 1,00 | 3,00 | 0,96 | 60 | 36500 |
| poli[Lys(Ac-Glu _i - DL-Ala _m)] | Ac-EAK | 1,00 | 4,00 | 1,00 | 80 | 46600 |
| poli[Lys(Succ-Glu _i - DL-Ala _m)] | Succ-EAK | 1,00 | 3,80 | 1,00 | 60 | 37900 |
| poli[Lys(Succ-Glu _i - DL-Ala _m)] | Succ-EAK | 1,00 | 4,00 | 1,00 | 80 | 51400 |

3. táblázat A polilizin gerincű polipeptidok kémiai jellemzői. ^a A polipeptidok rövidítése az aminosavak egybetűs kódjának felhasználásával, ^b aminosavösszetétel, ^c átlagos polimerizációfok, ^d átlagos molekulatömeg

3.2.2. Reagensek, oldószerek

N,N-dimetil formamid, (DMF), kloroform, imidazol, paraformaldehid, TFA (Fluka, Buchs, Svájc); dimetil-szulfoxid (DMSO); etanol, ecetsav, formaldehid, trietil-amin (TEA) (Reanal, Budapest), 5(6)-karboxifluorescein-szukcinimidészter (Molecular Probes, Eugene, OR USA), 1,19-dioctadecil-1-3,3,3',3'-tetrametilindokarbocianin perkloráttal jelölt acetil-LDL (DiI-AcLDL), 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid (MTT), 1,6-difenil-

1,3,5-hexatrién (DPH), 1-(4-trimetil-ammónium-fenil)-6-fenil-1,3,5,-hexatrién (TMA-DPH), fucoidin, tripánkék (Sigma), lidokain , MAb 2F8 (prof. Siamon Gordon ajándéka, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, UK), poliinozilsav (poli(I)) (Pharmacia Biotech, St. Albans, UK)

3.2.3. Fosfolipidek

Dipalmitoil-foszfátidilkolin, DPPC (Sigma), foszfátidil-glicerin, PG (Sigma).

3.3. Módszerek

3.3.1. Anionos és jelzett polipeptidek előállítása

3.3.1.1. Ac-EAK előállítása

85 mg EAK-t (poli[Lys(Glu_{1,0}-DL-Ala_{4,0})]), (159 μ mol) feloldottam 2 ml desztillált vízben majd DMF-fel 10 ml-re hígítottam 0°C-on. 27 μ l (198 μ mol) trietilamint adtam az oldathoz a polipeptidben található sóhidak felbontása érdekében. Az acetilezés 5 ekvivalens frissen készített imidazolil-acetáttal DMF-ben történt. A terméket 12000-14000 Da pórúsátmérőjű dializáló membránba töltöttem, és 2 napig dializáltam desztillált vízzel szemben. Ezután liofilizáltam az anyagot [Mező et al, 1996].

3.3.1.2. Succ-EAK előállítása

10 mg (18,5 μ mol) EAK-t (poli[Lys(Glu_{1,0}-DL-Ala_{4,0})]) feloldottam 2 ml karbonát pufferben (0,1M, pH=9,2)³. Ehhez az oldathoz állandó kevertetés mellett 220 ml (220 mmol) DMSO-ban oldott (c=10 mg/ml) borostyánkősav-anhidridet csepegtettem. A reakciót 4 órán keresztül végeztem, mialatt a pH-t állandóan 9-9,2 között tartottam. A terméket 12000-14000 Da pórúsátmérőjű dializáló membránban 2 napig dializáltam desztillált vízzel szemben, majd liofilizáltam.

³ A 0,1M, pH=9,2 karbonátpuffer összetétele: 0,1 M Na₂CO₃ + 0,1 M NaHCO₃ 1 liter desztillált vízben

3.3.1.3. Polipeptidek jelölése 5(6)-karboxifluoreszceinnel

10 mg EAK-t feloldottam 2 ml karbonát-pufferben (0,1M pH=9,4). Az 5(6)-karboxifluoreszcein szukcinimid észtert DMF-ben oldottam (c=10 mg/ml), majd folytonos kevertetés mellett hozzáadtam a polipeptid-oldathoz. A reakcióelegyet 1 óráig kevertettem, majd tisztítottam az oldatot Sephadex G25 géllal töltött PD 10 oszlopon desztillált víz eluenssel. A tisztított oldatot liofilizáltam. A biológiai vizsgálatokhoz a polipeptideket PBS-ben oldottam (0,1M, pH=7,4).

3.3.1.4. A jelölt polipeptidek karboxifluoreszcein-tartalmának meghatározása

Az analízis előtt a mintákat 24 órán át hidrolizáltuk 6M HCl jelenlétében, vákuumban, 110°C fokon. A hidrolízis után a HCl-t eltávolítottuk, majd a hidrolizátumot feloldottuk DMSO-ban. A karboxifluoreszcein-polipeptid konjugátumok jellemzése fordított fázisú HPLC-vel történt (Knauer HPLC készülék, Bad Homburg, Németország). Az analitikai HPLC vizsgálatokhoz fordított fázisú Eurospher C₁₈ (3,9×250 mm 5 µm átmérőjű szilikagél töltetet tartalmazó, 100 Å pórusátmérő) oszlopot használtunk (Knauer, Bad Homburg, Németország). Az eluensek a következők voltak: 0.1% TFA/víz (A eluens) és 0.1% TFA/ acetonitril/víz = 80/20 (V/V) (B-eluens). A gradiens elúció során a B-eluens mennyisége 25%-ról 45%-ra emelkedett 20 perc alatt, majd 45%-ról 99%-ra 10 perc alatt. A folyássebesség 1 ml/perc volt. A vizsgált minták átlagos koncentrációja 0,65 µg/ml volt, az oszlopra 20 µl minta felvitele történt. A csúcsokat $\lambda_{ex}=419$ nm és $\lambda_{em}=519$ nm hullámhosszon detektáltuk fluoreszcens detektor segítségével (Shimadzu, Japán). Az polipeptidekkel azonos körülmények között hidrolizált karboxifluoreszcein koncentrációját egy $4,8 \times 10^{-5}$ M – $1,2 \times 10^{-5}$ M koncentrációtartományban felvett standard görbe alapján határoztuk meg.

3.3.2. A polipeptidekkel kezelt sejtek túlélésének meghatározása

3.3.2.1. A polipeptidek toxicitása *Tetrahymena* és *J774* sejtekre

A 10^4 sejt/ml sűrűségű *Tetrahymena pyriformis* kultúrát, csakúgy, mint a *J774* sejteket ($2,5 \cdot 10^4$ sejt/ml) 96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottam *Tetrahymena* esetében 100 µl táptalajban, *J774* sejtek esetében – miután a sejtszámot beállítottam $2,5 \cdot 10^5$ sejt/ml-re – 180 µl 10% FCS-t tartalmazó médiumban. A polipeptidekkel 0,2; 2; 20 és 200 µg/ml

koncentrációban kezeltem a sejteket. A *Tetrahymena* sejteket 6 és 24 óráig 28°C-on, a J774 sejteket 1, 24 illetve 48 óráig 37°C-on inkubáltam a polipeptid-oldatokkal. Kontrollként mindkét kísérletben a kezeletlen sejtek szolgáltak. Az élő sejtek kontrollhoz viszonyított mennyiségét MTT-tesztel határoztam meg [Monner, 1988, Dias et al, 1999]. 20 µl 5 mg/ml koncentrációjú MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid) oldatot adtam a lemezek minden vájatóhoz. Az MTT oldattal 3 órán át inkubáltam a lemezeket 28°C (*Tetrahymena*) illetve 37°C-on (J774). Ezután a lemezeket centrifugáltam 2000 rpm fordulatszámon 5 percig. A felülúszó leszívása után a keletkezett formazán kristályokat DMSO-val oldottam fel (150 ml/lyuk). Az abszorbancia mérése ELISA-readerrel (Labsystems MS Reader) történt $\lambda=540$ nm mérő és $\lambda=620$ nm-es hullámhosszon. A két hullámhosszon kapott abszorbanciaértékek különbségét ($A_{540}-A_{620}$) átlagoltam a kezeletlen kontroll abszorbanciaértékének százalékában ábrázoltam a polipeptid koncentráció függvényében. A statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztem.

3.3.2.2. A polipeptidek toxicitása egér csontvelői makrofágokra

A sejteket 24 órával kezelés előtt 6 lyukú bakteriológiai lemezbe osztottam (10^6 sejt/lyuk). A szérumtartalmú médiumot eltávolítottam, majd mostam a sejteket PBS-sel (0,1M; pH=7,4). Ezután a karboxifluoreszceinnel jelölt polipeptideket OPTIMEM (Gibco, Paisley, UK) médiumban feloldva adtam a sejtekhez 1 és 20 µg/ml koncentrációban. A polipeptid-oldattal 1 órán keresztül inkubáltam a makrofágokat 37°C-on. Újabb mosást követően a sejteket a felületről 4 mg/ml lidokain/PBS (0,1M; pH=7,4) oldattal távolítottam el. A toxicitás meghatározásához a sejteket 0,04%-os tripánkék/PBS (0,1M; pH=7,4) oldattal festettem, és ezt követően Neubauer-kamrában megszámoltam. Az élő sejtek számát öt látóérből átlagoltam, majd a kontroll átlagának százalékában ábrázoltam. Az adatok statisztikai analízisét kétmintás t-próbával végeztem.

3.3.3. Kemotaxis meghatározása

3.3.3.1. *Tetrahymena pyriformis* kemotaxisa

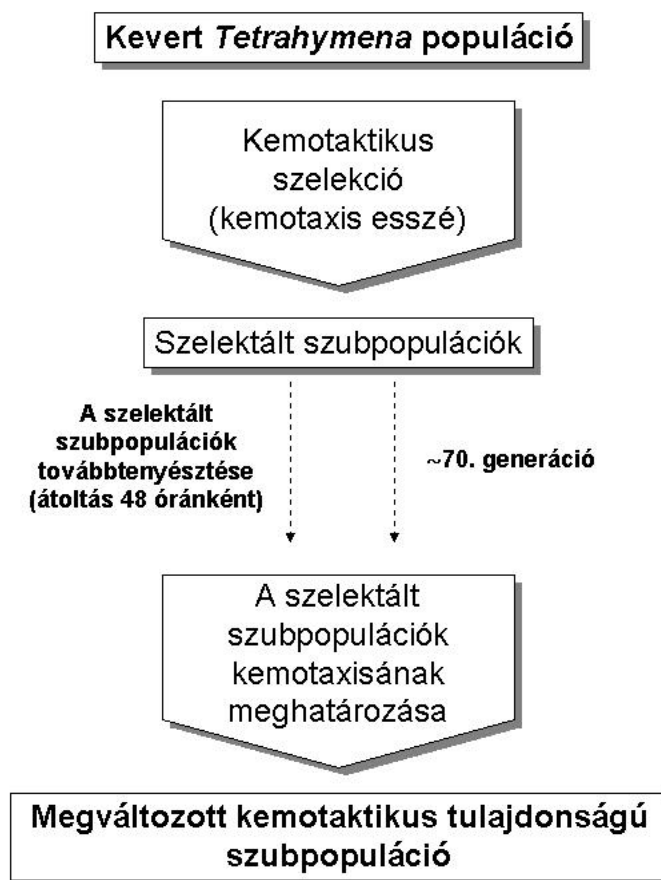
A kísérletekben a kétkamrás kapilláris technika módosított változatát alkalmaztam [Kőhidai et al, 1995]. Belső kamraként nyolccsatornás pipettára húzott 200 µl-es hegyek szolgáltak. Ezekbe szívtam fel a polipeptidek 0,02; 0,2; 2 és 20 µg/ml koncentrációjú oldatából 100 µl-t

illetve kontrollként 100 µl táptalajt. A külső kamraként szolgáló 96 lyukú szövettenyésztő lemez vájataiba a *Tetrahymena pyriformis* 10^4 sejt/ml denzitású tenyészetéből 400-400 µl-t mértem. A pipettahegyeket belemerítettem a lemez vájataiba, majd 20 perc elteltével a pipettahegyekbe vándorolt sejteket 4%-os formalin/PBS (0,1M, pH=7,4) oldattal fixáltam, és Neubauer-kamrában megszámoltam. A 10 párhuzamos mérés során kapott sejtszám adatokat átlagoltam, és a kontroll médiummal szemben futtatott sejtek százalékában ábrázoltam. Az adatok statisztikai analízise az Origin4 program ANOVA tesztjével történt.

3.3.3.2. Kemotaktikus szelekció

A kemotaktikus szelekció során azt vizsgáljuk, hogy egy kevert sejtpopulációból különböző szignálmolekulákkal szelektálható-e olyan szubpopuláció, amelyben a kemotaktikus válaszképesség az utódgenerációkban is megjelenik. A kemotaktikus szelekció menetét a 7. ábra szemlélteti. Először a fent leírt kétkamrás kapilláris technikát alkalmaztam. A polipeptideket feloldottam táptalajban a kemotaxis- kísérletekben hatásosnak bizonyult koncentrációban. A *Tetrahymena* kultúrát a polipeptid-oldatával (P) és kontroll táptalajjal (C) szemben futtattam. A pozitív választ adó sejteket friss táptalajba oltottam, és kétszeri átoltással továbbtenyésztettem 168 órán keresztül (ekkor hozzávetőlegesen a 70. generációt kaptam). A szelektált kultúrák kemotaxisát szintén kétkamrás kapilláris módszerrel vizsgáltam a következő kísérleti elrendezésben: A kontroll médiummal szelektált sejteket futtattam kontroll médiummal szemben (C/C) és az azzal a polipeptiddel szemben, amellyel ezt a populációt szelektáltam (C/P). A polipeptiddel szelektált sejteket futtattam szintén kontroll médiummal (P/C) és a szelektáló polipeptiddel szemben (P/P). A választ adó sejteket Neubauer-kamrában számoltam [Kőhidai et al, 2000]. A kapott sejtszám-adatokat a kontroll (C/C) százalékában ábrázoltam. az adatok statisztikai analízisét az Origin4 program ANOVA tesztjével végeztem. A szelekciós hányadost (Ch_{sel}) az alábbi összefüggéssel számoltam:

$$Ch_{SEL} = (P/P \times C/C) / (P/C \times C/P).$$



7. ábra A kemotaktikus szelekció menete

3.3.3.3. J774 sejtek kemotaxisa

A J774 sejtek kemotaxisának mértékét 96-lyukú módosított Boyden-kamrában (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) vizsgáltam. Egy lyukba a lemez vájatainak megfelelő térfogatú polipeptid-oldatot töltöttem 10% borjúmagzat-szérumot tartalmazó RPMI 1640 médiumban oldva 0,02 $\mu\text{g/ml}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ és 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban, majd a lemezt behelyeztem a kemotaxis-kamrába. A kamrát lezártam, vájataiba egyenként 10^5 sejtet pipettáztam (lyukanként 200 μl 10 borjúmagzat-szérumot tartalmazó médiumban). majd 3 órán át inkubáltam 37°C -on, 5% CO_2 atmoszférában. A filteren keresztül a szövettenyésztő lemezbe vándorolt sejtek mennyiségét MTT-tesztel határoztam meg. 20 μl 5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot adtam a lemez vájataihoz. A sejteket 1 éjszakán át inkubáltam az MTT-vel 37°C -on, majd másnap a lemezeket centrifugáltam 2000 rpm fordulatszámon 5 percig. A felülúszó leszívása után a keletkezett formazán kristályokat DMSO-val oldottam fel

(150 μ l/lyuk). Az abszorbancia mérése ELISA-readerrel (Labsystems MS Reader) történt $\lambda=540$ nm mérő és $\lambda=620$ nm-es referencia hullámhosszon. A két hullámhosszon mért abszorbancia különbségét ($A_{540}-A_{620}$) ábrázoltam a negatív kontroll (10% FCS-t tartalmazó médiummal szemben futtatott sejtek) százalékában a polipeptid koncentráció függvényében. Pozitív kontrollként a sejtek komplement C5a-val szemben végzett kemotaxisát határoztam meg [McCloskey et al, 1999]. A statisztikai analízist az Origin4 program ANOVA tesztjével végeztem.

3.3.4. A polipeptidek sejtbe jutásának meghatározása áramlási citometriával

3.3.4.1. *Tetrahymena pyriformis* polipeptid-felvétele

A *Tetrahymena pyriformis* log fázisban lévő kultúráját Eppendorf-csővekbe osztottam (400 μ l/cső, 4×10^3 sejt), majd a sejteket 1 órán át éheztettem Losina-Losinskij oldatban⁴. A karboxifluoreszcinnel jelölt polipeptideket (polipeptidre nézve) 0,02; 0,2; 2; 20 μ g/ml koncentrációjában adtam a *Tetrahymena* sejtekhez. 0,5; 2; 5 és 15 perc elteltével 5 percig 4°C fokon fixáltam a sejteket 4% (m/V) formaldehid/PBS (0,1M; pH=7,4) oldattal. A sejteket kétszer mostam PBS-sel (0,1M, pH=7,4), majd az extracelluláris fluoreszcencia kioltására 400 μ l 0,5%-os (m/V) tripánkék/PBS (0,1M, pH=7,4) oldatot adtam minden csőhöz. Áramlási citométerrel (FACSCalibur, Becton Dickinson) 5000 sejtet lemérve ($\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=519$ nm, FL1 tartomány) meghatároztam a sejtekre jellemző fluoreszcenciaintenzitáshoz tartozó sejtsszámot, majd meghatároztam a diagramok geometriai középértékét. Az adatokat a kezeletlen kontroll százalékában adtam meg az idő és a polipeptid koncentráció függvényében.

3.3.4.2. Úszó J774 sejtek polipeptid-felvétele

A J774 sejteket a polipeptidek hozzáadását megelőzően 1 órán keresztül inkubáltam FCS-mentes RPMI médiumban. Ezt követően 450-450 μ l sejtet szétosztottam mikrocentrifugacsővekbe (10^5 sejt/cső). A karboxifluoreszcinnel jelölt polipeptideket (a polipeptidre nézve) 0,02; 0,2; 2 és 20 μ g/ml koncentrációban adtam a sejtsszuspenzióhoz. A

⁴ A Losina-Losinskij oldat összetétele: 9 mM CaCl₂, 10,5 mM MgCl₂, 13,4 mM KCl, 47,6 mM NaHCO₃, 171 mM NaCl

kezelést követően azonnal, illetve 15, 30 és 60 perc után fixáltam a sejteket 4%-os (m/V) formaldehid/PBS (0,1M; pH=7,4) oldattal. Centrifugálást követően (3000 rpm, 30 sec) a felülúszót leöntöttem, majd az extracelluláris fluoreszcencia kioltására 400 µl 0,5%-os (m/V) tripánkék oldatot adtam minden csőhöz. A sejteket azonnal centrifugáltam 3000 rpm fordulatszámon 30 másodpercig, ezt követően kétszer mostam PBS-sel. Áramlási citométerrel (FACSCalibur, Becton Dickinson) 5-10000 sejtet lemérve meghatároztam az adott fluoreszcencia intenzitáshoz tartozó sejtszámot, majd kiszámoltam a kapott diagramok geometriai középértékét. A geometriai középérték adatokat ábrázoltam a kezeletlen kontroll százalékában az idő és a polipeptid koncentráció függvényében.

3.3.4.3. Letapadt J774 sejtek polipeptid-felvétele

A sejteket 24 órával a kezelés előtt 24 lyukú szövettenyésztő lemezbe osztottam 10^5 sejt/lyuk kiindulási sejtszámban, 500 µl 10% FCS tartalmú médiumban. A kezelés előtt közvetlenül a sejteket kétszer mostam PBS-sel (0,1M, pH=7,4). A karboxifluoreszcinnel jelölt polipeptidekkel 0,02; 0,2; 2 és 20 µg/ml koncentrációban (polipeptidre nézve) 60 percig inkubáltam a sejteket szérumentes RPMI médiumban. Az inhibíciós kísérletekben a scavenger receptor ligand fucoidint, $c=0,02, 0,2; 2, 20$ µg/ml, koncentrációban fél órával a kezelés előtt adtam a sejtekhez szérumentes RPMI médiumban. A fucoidin a kezelés teljes időtartama alatt a rendszerben maradt. Pozitív kontrollként DiI-AcLDL ($c=10$ µg/ml, 4h) felvételét vizsgáltam, amely a scavenger receptorokon keresztül jut a sejtekbe [Voyta et al, 1984]. Ezek után a sejteket kétszer mostam PBS-sel (0,1M, pH=7,4), majd az extracelluláris fluoreszcencia kioltása végett 200 µl 0,5%-os (m/V) tripánkék oldatot adtam minden lyukhoz. A sejteket 4%-os (m/V) formaldehid/PBS (0,1M; pH=7,4) oldattal 5 percig 4°C fokon fixáltam. Áramlási citométerrel (FACSCalibur, Becton Dickinson) 5-10000 sejtet lemérve ($\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=519$ nm, FL1 tartomány) meghatároztam az adott fluoreszcenciaintenzitáshoz tartozó sejtszámot, majd kiszámoltam a kapott diagramok geometriai középértékét. A geometriai középérték adatokat ábrázoltam a kezeletlen kontroll százalékában a polipeptid vagy a fucoidin koncentráció függvényében. A statisztikai analízist az Origin5 program kétmintás t-próbájával végeztem.

3.3.4.4. A J774 polipeptid-felvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal

Az úszó sejtekről készült felvételekhez a sejteket 4% formaldehid/PBS (0,1M, pH=7,4) oldattal fixáltam. A polipeptidekkel 20 µg/ml koncentrációban inkubáltam a sejteket 1 órán keresztül. Az AK polipeptid esetében vizsgáltam a polipeptid felvételének időfüggését, valamint a különböző fixálási módszerek hatékonyságát. A sejteket két módszerrel fixáltam: I. 4%-os (m/V) formaldehid/PBS (0,1M; pH=7,4) oldattal, II. 35 %-os (V/V) etanollal 5 percig 4°C fokon, emellett élő sejtekről is készültek felvételek. A Succ-EAK polipeptid esetében mikroszkópos felvételeken vizsgáltam a letapadt és úszó sejtek polipeptid-felvételét. A J774 sejteket a felvételek készítése előtt 24 órával fedőlemezhez tapasztottam. A mikroszkópos vizsgálatok BIO RAD MRC 1024 készüléken történtek, a gerjesztéshez kripton-argon lézert használtam (a karboxifluoreszcein gerjesztési maximuma $\lambda=419$ nm, az emissziós maximuma $\lambda=519$ nm-en található).

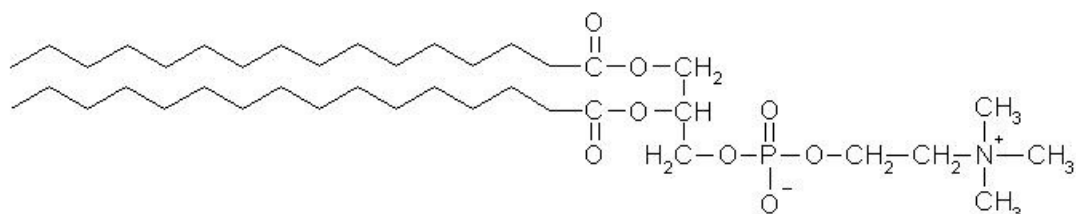
3.3.4.5. Egér csontvelői makrofágok polipeptid-felvétele

A sejteket 24 órával kezelés előtt 6 lyukú bakteriológiai lemezbe osztottam (10^6 sejt/lyuk). A szérumtartalmú médiumot eltávolítottam, majd PBS-sel (0,1M; H=7,4) mostam a sejteket. Inhibíciós kísérletekben a gátlószert: a több scavenger receptorhoz kötődő (SR-A, SR-C, SR-E, SR-F) poliinozilsavat (poli(I), $c=50$ µg/ml) [Peiser et al, 2000] és a SR-A specifikus monoklonális ellenanyagot (MAb 2F8, $c=15$ µg/ml) [Fraser et al, 1993], vagy a jelöletlen polipeptidet (10-szeres koncentrációban a jelölt polipeptidhez képest) fél órával a kezelés előtt pipettáztam a sejtek médiumába. Ezek az anyagok a kezelés teljes időtartama alatt jelen voltak a rendszerben. A karboxifluoreszceinnel jelölt polipeptideket OPTIMEM médiumban oldva adtam a sejtekhez. A polipeptid-oldattal 1 órán keresztül inkubáltam a makrofágokat 37°C-on. Az ezt követő mosás (PBS, 0,1M; H=7,4) után a sejteket a felületről 4 mg/ml lidokain/PBS (0,1M; H=7,4) oldattal távolítottam el. A sejteket 2% formaldehid/PBS (0,1M; pH=7,4) oldattal fixáltam. A sejtbe jutás mértékét FACS-analízissel határoztam meg $\lambda_{ex}=488$ nm, és $\lambda_{em}=519$ nm hullámhosszon (FL1 tartomány). A fluoreszcencia-intenzitás adatokhoz tartozó sejtszám meghatározását követően kiszámoltam a kapott diagramok középértékét. A középérték adatokat ábrázoltam a kezeletlen kontroll százalékában a polipeptid koncentráció illetve az idő függvényében. A statisztikai analízist az Origin5 program kétmintás t-próbájával végeztem.

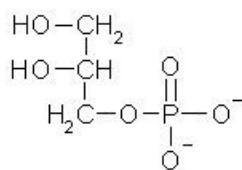
3.3.5. Polimer polipeptidek kölcsönhatása foszfolipid kettősrétegekkel

3.3.5.1. A liposzómák készítése

Gömbömbikba mértem 20 mg DPPC-t (a DPPC liposzómák készítéséhez) illetve 16 mg DPPC + 4 mg PG-t a DPPC:PG liposzómák esetében. A foszfolipideket feloldottam minimális térfogatú kloroformban (~2 ml). A kloroformot 55°C-os vízfürdőben 15 perc alatt vákuumbepárlással eltávolítottam, majd a keletkezett lipidfilmet 1 órán keresztül liofilizáltam. A szárított lipidfilmet felvettem 4 ml Na-acetát pufferben (0,1M, pH=7,4). Az így kapott multilamelláris vezikulákat kétszer 2 percig szonikáltam, két szonikálás között 1 percig nitrogént áramoltattam a lombikba. A szonikáló berendezésből visszamaradó titánt 3000 rpm fordulatszámon 20 perces centrifugálással távolítottam el. Ezután a liposzóma-oldatot 1 órára 55°C-os vízfürdőbe helyeztem. Így foszfolipid kettősrétegből álló liposzómákhoz jutottam. A liposzómák méretét automata készülékkel (Malvern Autosizer) határoztam meg. A DPPC-liposzómák átlagos átmérője 78 nm-nek, a DPPC:PG=80:20 (w/w) liposzómáké pedig 105 nm-nek adódott. A liposzómákat +4°C-on tároltam felhasználásig.



dipalmitoil-foszfatidilkolin (DPPC)



foszfatidil-glicerin (PG)

8. ábra A dipalmitoil-foszfatidilkolin (DPPC) és a foszfatidil-glicerin (PG) szerkezete

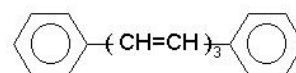
3.3.5.2. Fluoreszcencia-polarizáció mérése

A liposzómákat 1 óráig inkubáltam 55°C-on, sötétben a fluoreszcens jelzőanyag oldatával (DPH: $c=5 \cdot 10^{-5}$ M, TMA-DPH: $c=2,16 \cdot 10^{-5}$ M). A két fluoreszcens jelzőmolekula szerkezete a 3. ábrán látható. A polipeptideket feloldottam Na-acetát pufferben⁵ (0,1M, pH=7.2) 0,2 mg/ml koncentrációban. A fluoreszcens jelzőanyagot tartalmazó liposzómákat a polipeptid-oldattal a küvettában mértem össze polipeptid:liposzóma=22:1 arányban. [Nagy et al, 2003]. A kontroll küvettában a liposzómákhoz Na-acetát puffert adtam.

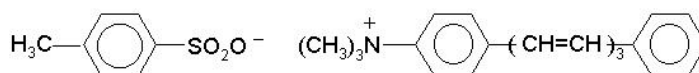
A méréseket négyküvettás PE-LS50 spektrofluoriméteren végeztem 28°C-55°C között 11 hőmérsékleten. A hőmérsékletet folyamatosan emeltem lépésenként 3°C fokkal, a T_c közelében pedig 1°C fokozatonként. A gerjesztési maximum DPH esetében $\lambda=365$, TMA-DPH esetében $\lambda=355$ nm-en, míg a DPH emissziós maximuma $\lambda=430$ nm-en, a TMA-DPH emissziós maximuma $\lambda=425$ nm-nél található. A polarizációt adott hőmérsékleten 3 mérés átlagából Shinitzky és Barenholz módszerével [Shinitzky és Barenholz, 1978] az alábbi összefüggés alapján számoltam:

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp} \cdot G) / (I_{\parallel} + I_{\perp} \cdot G)$$

ahol I_{\parallel} a gerjesztéssel párhuzamos síkban mért fluoreszcencia intenzitása, I_{\perp} a gerjesztés síkjára merőleges fluoreszcencia intenzitása, G pedig egy a készülékre vonatkoztatott korrekciós faktor. A 11 hőmérsékleten mért polarizációértékek által alkotott ponthalmazra szigmoid görbét illesztettem. Ezen görbék elsőrendű deriváltjainak minimumértékéhez tartozó hőmérsékletet tekintetem az adott liposzóma fázisátalakulási hőmérsékletének (T_c).



1,6-difenil-1,3,5-hexatrién (DPH)



1-(4-trimetil-ammóniumfenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrién
p-toluol-szulfonsav
(TMA-DPH)

9. ábra A fluoreszcens jelzőmolekulák szerkezete

⁵ A Na-acetát puffer (0,25 M, pH=7,4) összetétele: 0,25 M Na-acetát, a pH beállítása 7,4-re 0,1 M ecetsavval történt

4. EREDMÉNYEK

4.1. A karboxifluoreszceinnel jelölt polipeptidek jellemzése

A polipeptid-CF konjugátumok karboxifluoreszcein-tartalmát fluoreszcens detektorral egybeépített fordított fázisú HPLC rendszerrel határoztuk meg 24 óra sósavas hidrolízist követően. A karboxifluoreszcein koncentrációját egy $4,8 \times 10^{-5}$ M – $1,2 \times 10^{-5}$ M koncentrációtartományban felvett kalibrációs görbe alapján számoltuk ki. A karboxifluoreszcein-szukcinimid észter enyhe reakciókörülmények között kapcsolódott a polipeptidekhez. A CF a sósavas hidrolízis során sem disszociált a jelölt aminosavról. A jelölt polipeptidek kémiai jellemzőit a 4. és 5. táblázat foglalja össze.

| Polipeptid | Jele ^a | DP _n ^b | CF [%] ^c |
|--|-------------------|------------------------------|---------------------|
| poli[Lys] | - | 130 | 19,9 |
| poli[Lys(Pro _{0,95})] | P _i K | 84 | 18,6 |
| poli[Lys(His _{0,56})] | H _i K | 93 | 10,6 |
| poli[Lys(Glu _{1,0})] | E _i K | 94 | 14,7 |
| poli[Lys(DL-Ala _{4,5})] | AK | 80 | 10,5 |
| poli[Lys(Ser _{1,0} -DL-Ala _{3,8})] | SAK | 60 | 2,4 |
| poli[Lys(Thr _{0,9} -DL-Ala _{3,8})] | TAK | 60 | 1,9 |
| poli[Lys(Glu _{1,0} -DL-Ala _{4,3})] | EAK | 80 | 1,4 |
| poli[Lys(Ac-Glu _{1,0} -DL-Ala _{4,0})] | Ac-EAK | 80 | 2,6 |
| poli[Lys(Succ-Glu _{1,0} -DL-Ala _{4,0})] | Succ-EAK | 80 | 1,6 |

4. táblázat A *Tetrahymena* és *J774* sejtek polipeptid-felvételének vizsgálatához használt jelzett polipeptidek kémiai jellemzői. ^a A polipeptidek rövidítése az aminosavak egybetűs kódjának felhasználásával, ^b átlagos polimerizációfok, ^c a karboxifluoreszcein szubsztitúciófoka az oldalláncok arányában

| Polipeptid | Jele ^a | DP _n ^b | CF [%] ^c |
|--|-------------------|------------------------------|---------------------|
| poli[Lys] | - | 130 | 0,42 |
| poli[Lys(Pro _{0,95})] | P _i K | 84 | 0,36 |
| poli[Lys(His _{0,56})] | H _i K | 93 | 1,15 |
| poli[Lys(Glu _{1,0})] | E _i K | 94 | 1,14 |
| poli[Lys(DL-Ala _{3,8})] | AK | 60 | 1,55 |
| poli[Lys(Ser _{1,0} -DL-Ala _{3,8})] | SAK | 60 | 11,6 |
| poli[Lys(Thr _{0,9} -DL-Ala _{3,8})] | TAK | 60 | 1,12 |
| poli[Lys(Glu _{1,0} -DL-Ala _{3,8})] | EAK | 60 | 2,54 |
| poli[Lys(Ac-Glu _{1,0} -DL-Ala _{3,8})] | Ac-EAK | 60 | 0,46 |
| poli[Lys(Succ-Glu _{1,0} -DL-Ala _{3,8})] | Succ-EAK | 60 | 0,58 |

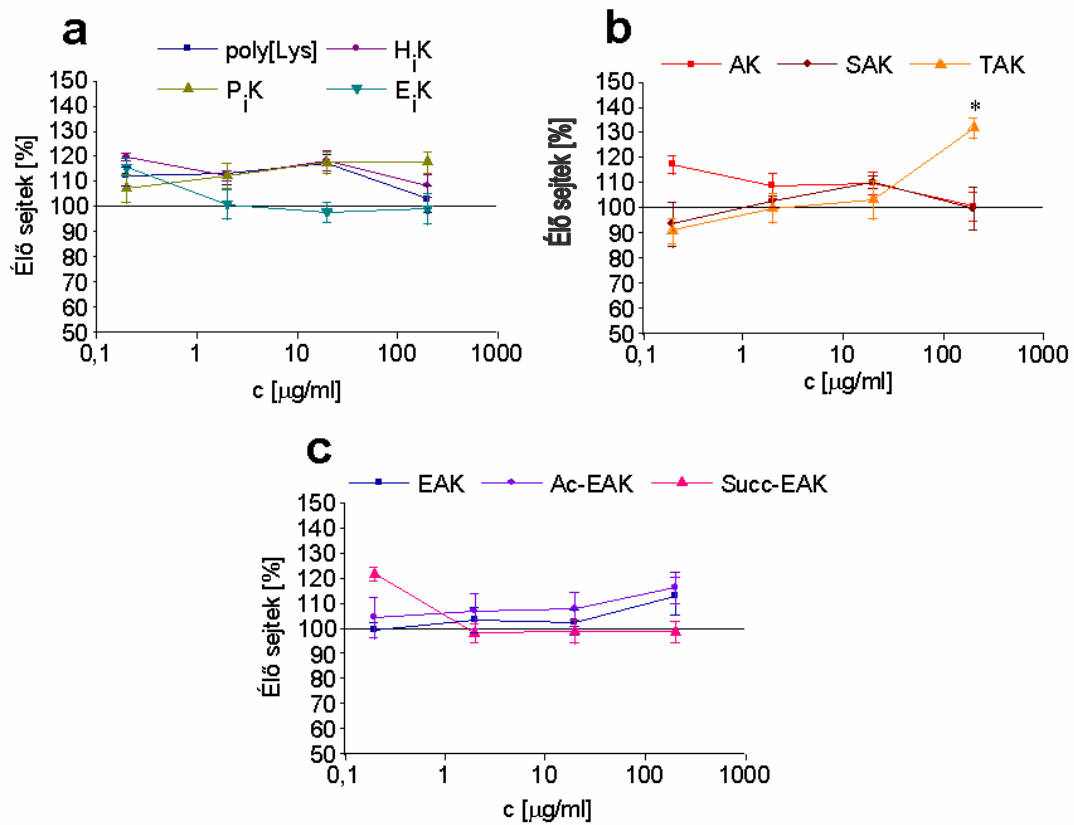
5. táblázat Az egér csontvelői makrofágok polipeptid-felvételének vizsgálatához használtjelzett polipeptidek kémiai jellemzői. ^a A polipeptidek rövidítése az aminosavak egybetűs kódjának felhasználásával, ^b átlagos polimerizációfok, ^c a karboxifluoreszcein szubsztitúciófoka az oldalláncok arányában (%)

4.2. A polipeptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* GL csillós egysejtűre

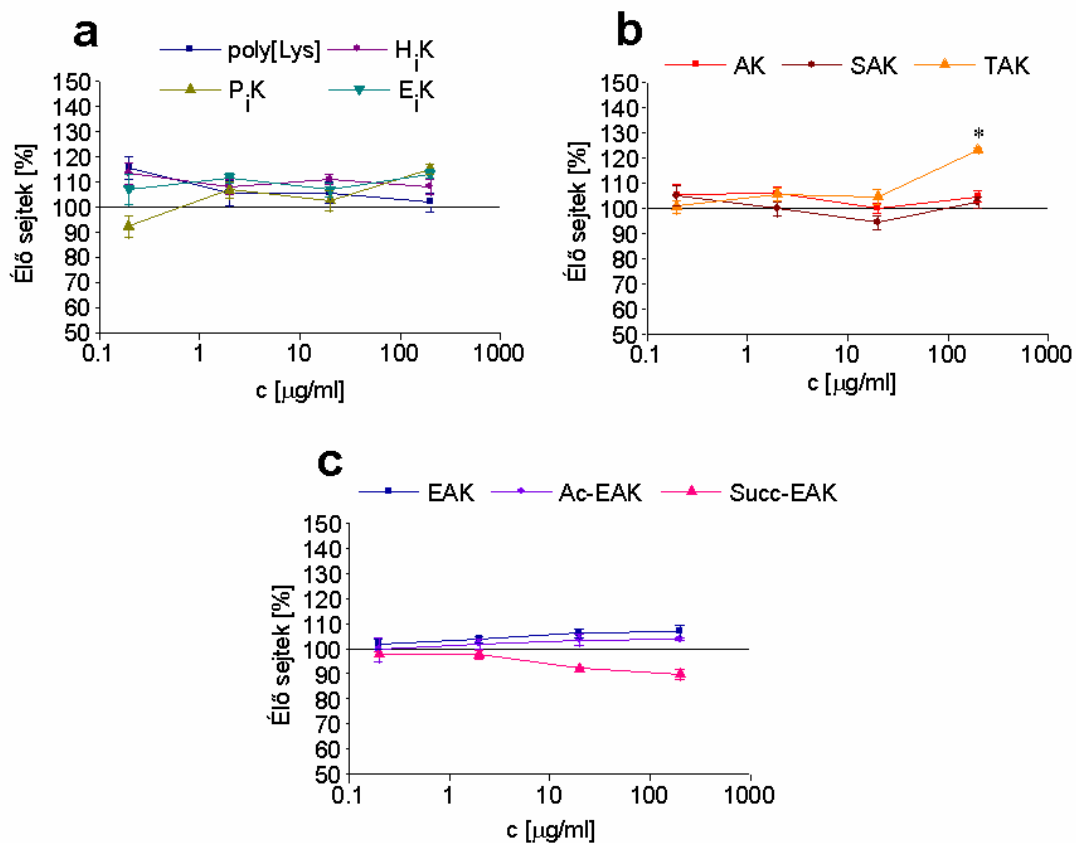
A *Tetrahymena pyriformis* csillós egysejtű sejtélettani vizsgálatok, mint hormon-receptor kutatások, és a kemotaxis vizsgálatának gyakran alkalmazott modellje. A *Tetrahymena* receptorai és jelátviteli mechanizmusai hasonlóságot mutatnak a magasabb rendű élőlényekével, ezért a *Tetrahymenán* végzett kísérletek eredményei tájékoztatásul szolgálhatnak a magasabb rendű szervezetek reakcióinak vizsgálatához.

4.2.1. Polipeptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* túlélésére és szaporodására

A *Tetrahymena pyriformis* kultúrákat a polipeptidek különböző koncentrációjú oldataiban (c= 0,2; 2; 20 és 200 µg/ml) inkubáltam; kontrollként ugyanolyan térfogatú táptalajt adtam a sejtekhez. A polipeptid-oldatokkal 6 és 24 óráig inkubáltam a sejteket. A *Tetrahymena* egy szaporodási ciklusa kb. 155 perc, így a 6 órás kezelés alatt 2-3 generációt vizsgáltam, amely főként a polipeptidek rövid távú hatására nézve szolgáltat információt. 24 óra alatt a sejtek kb. 10-edik generációját vizsgáltam, így ezekben a kísérletekben a polipeptidek *Tetrahymena* szaporodására gyakorolt hosszabb távú hatását figyeltem meg. Az életképes sejtek mennyiségét MTT módszerrel határoztam meg [Dias et al, 1999]. A kapott értékeket a kezeletlen kontrollhoz százalékában adtam meg. A statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztem. Az egy aminosav oldalláncot hordozó polipeptidek (H_iK, P_iK és E_iK) közül egy sem idézte elő a sejtek pusztulását a vizsgált koncentrációtartományban. Mind 6, mind 24 óra inkubáció után a polikationos polipeptidek közül a H_iK és P_iK váltott ki kis mértékű, de statisztikailag nem szignifikáns proliferációt (10a és 11a ábra). 24 óra inkubáció után 2 µg/ml koncentrációban (11b ábra). Az amfoter polipeptid (EAK) és polianionos származékai (Ac-EAK és Succ-EAK) statisztikailag szignifikáns módon nem befolyásolták a *Tetrahymena* sejtek szaporodását (10c és 11c ábra).



10. ábra Polilizin gerincű polipeptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* szaporodására 6 óra után. a) poli[Lys] és X_iK polipeptidek, b) hosszú oldalláncú polikationos polipeptidek, c) az amfoter EAK és polianionos származékai. ×: $p < 0,05$, *: $p < 0,01$, #: $p < 0,001$



11. ábra Polilizin gerincű polipeptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* szaporodására 24 óra után. a) poli[Lys] és X_iK polipeptidek, b) hosszú oldalláncú polikationos polipeptidek, c) az amfoter EAK és polianionos származékai. ×: $p < 0,05$, *: $p < 0,01$, #: $p < 0,001$

Megállapíthatjuk, hogy a polipeptidek nem befolyásolták jelentős mértékben a *Tetrahymena pyriformis* egysejtűek szaporodását. Nem csökkent a sejtek életképessége az emlős sejtekre többnyire toxikus polikationos polipeptidek jelenlétében (pl. poli[Lys]) sem [Hudecz, 1995].

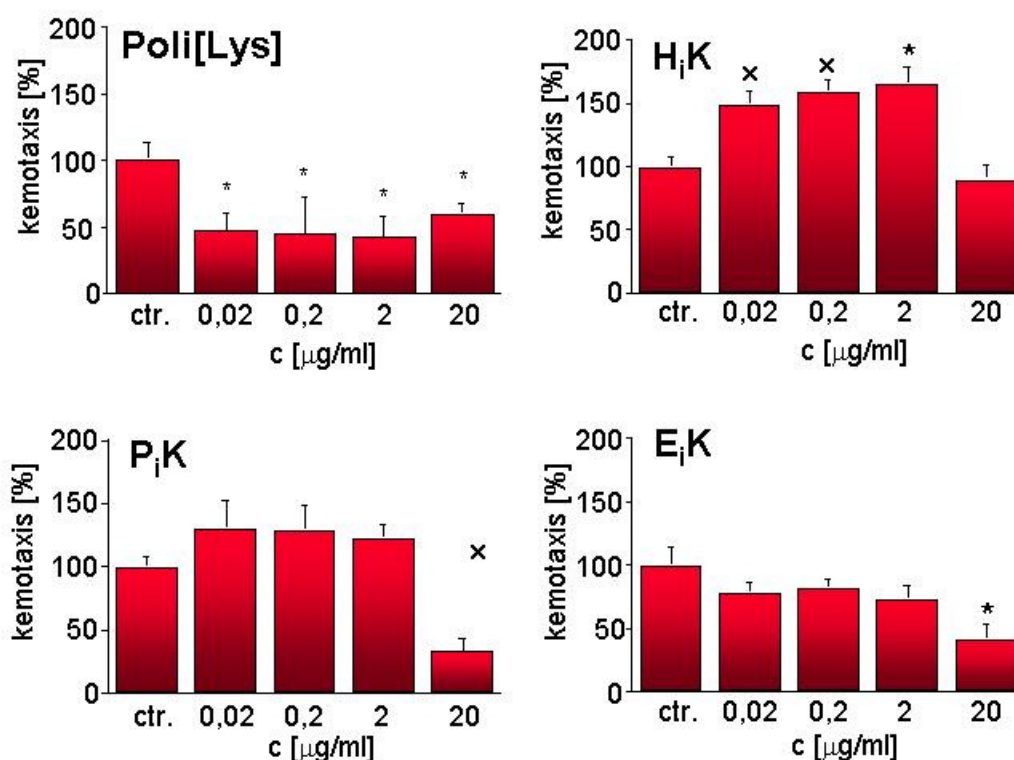
4.2.2. *Tetrahymena pyriformis* kemotaxisa polilizin gerincű polipeptidek hatására

A *Tetrahymena* sejtek kemotaktikus aktivitásának vizsgálata módosított kétkamrás kapilláris-módszerrel történt. 10 párhuzamos mérés sejt szám adatait átlagoltam, és a kontroll médiummal szemben futtatott sejtek százalékában ábrázoltam. Az adatok statisztikai analízise az Origin4 program ANOVA tesztjével történt.

Vizsgáltam polipeptidek hatásának koncentrációfüggését, illetve mértem a különböző polipeptidek hatását polipeptidekkel kemotaktikusan szelektált egysejtű-populáción.

4.2.2.1. Kevert *Tetrahymena* populáció kemotaxisa

A *Tetrahymena pyriformis* sejtek polilizin gerincű polipeptidekre adott kemotaktikus válaszát a 12-14. ábra mutatja be. A rövid oldalláncú polipeptidek közül a polikationos H_iK indukált jelentős pozitív kemotaxist széles koncentrációtartományban (0,02-2 µg/ml), szemben a

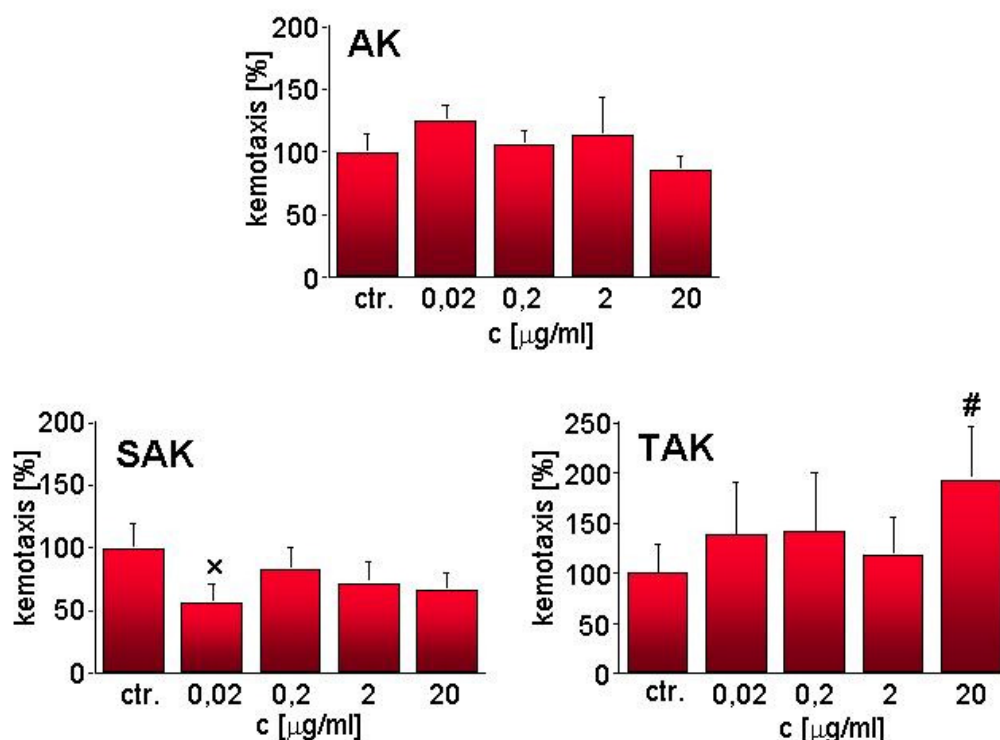


12. ábra Poli[Lys] és X_iK polipeptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* kemotaxisára. ^x:*p*<0,05; ^{*}:*p*<0,01; [#]: *p*<0,001

polilizinnel, amely minden vizsgált koncentrációban repellensnek bizonyult (12. ábra). Az ugyancsak polikationos P_iK gyengén attraktáns volt a 0,02-2 µg/ml koncentrációtartományban, c=20 µg/ml koncentrációban azonban már taszította a sejteket

(kemotaxis index= $34\pm 9\%$). Az amfoter karakterű E_iK 0,02-2 µg/ml koncentrációtartományban gyengén repellensnek bizonyult, a vizsgált legnagyobb koncentrációban már jelentős negatív kemotaxist idézett elő (12. ábra) (c=20 µg/ml: kemotaxis index= $41\pm 12\%$). Az eredmények azt mutatják, hogy a Pro vagy His beépítése az oldallánc N-terminálisára jelentősen megváltoztatta a poli[Lys]-re jellemző repellens hatást. A változás oka lehet, hogy a poli[Lys] esetében az oldallánc végén található szabad ε-NH₂ csoportot a másik két polipeptid (H_iK és P_iK) esetében α-NH₂ csoport váltja fel. A H_iK polipeptid kemoattraktáns jellegét feltehetőleg elsősorban a His imidazol oldalláncának aromás jellege határozza meg.

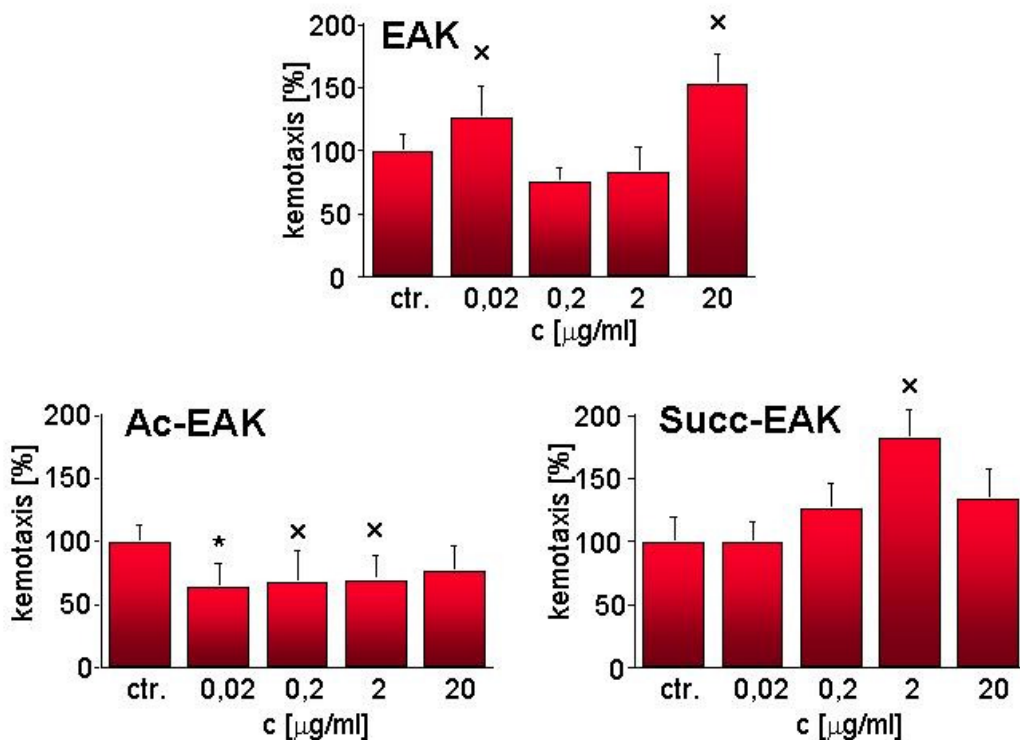
Az XAK típusú hordozó polikationos polipeptidek egymástól eltérő hatást gyakoroltak a *Tetrahymena* sejtekre. Az AK polipeptid gyakorlatilag nem volt hatással a sejtek kemotaxisára. Az oldallánc N-terminálisán Ser aminosavat hordozó polipeptid (SAK)



13. ábra Polikationos XAK polipeptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* kemotaxisára. x: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$; #: $p < 0,001$

alacsony koncentrációban (c=0,02 µg/ml) jelentős negatív kemotaxist váltott ki (kemotaxis index= $57\pm 14\%$), míg az ugyancsak hidroxilcsoportot tartalmazó de oldallánc-szerkezetében

eltérő treonint hordozó TAK polipeptid kemoattraktánsnak bizonyult a legnagyobb, $c=20$ $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban (kemotaxis index= $161\pm 27\%$) (13. ábra).



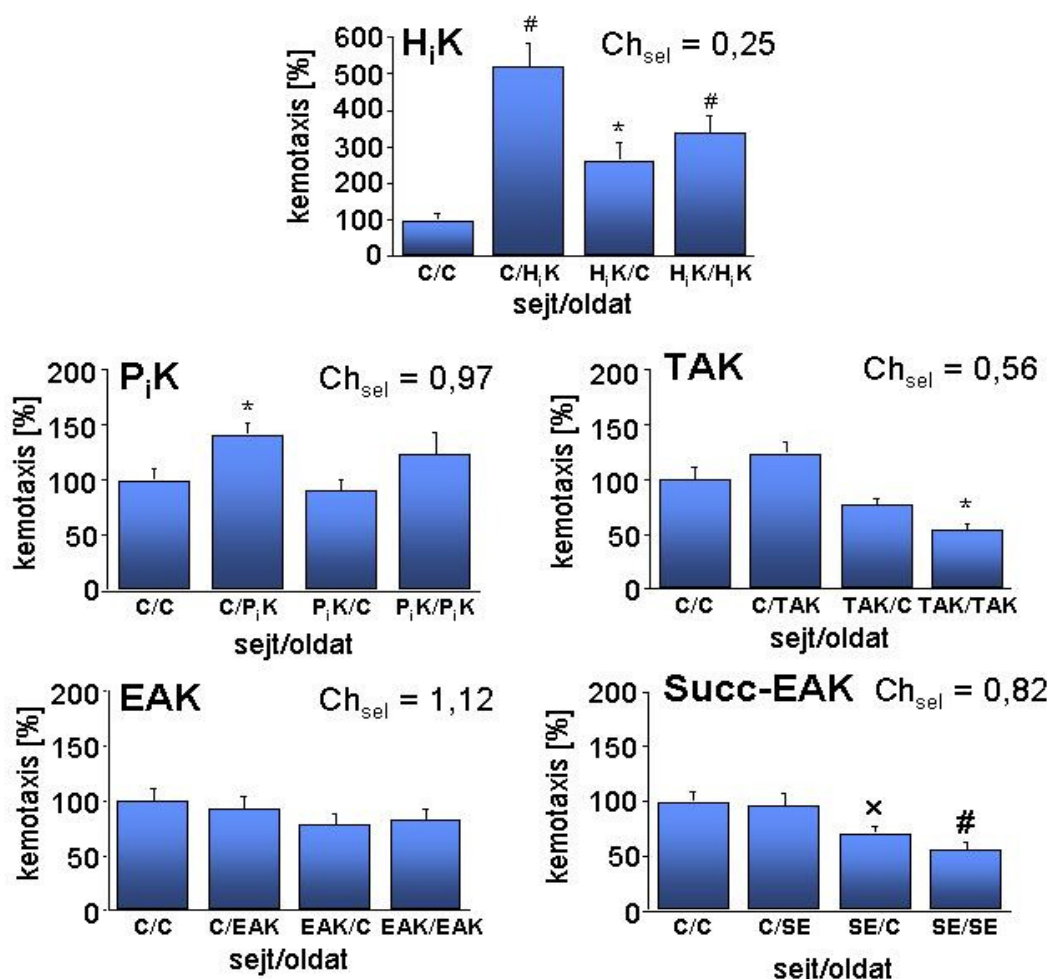
14. ábra Az amfoter EAK és polianionos származékainak hatása *Tetrahymena pyriformis* kemotaxisára. \times : $p < 0,05$; $*$: $p < 0,01$; $\#$: $p < 0,001$

Az amfoter EAK polipeptid hatására két koncentrációban ($c=0,02$ $\mu\text{g/ml}$ és 20 $\mu\text{g/ml}$) figyeltem meg pozitív kemotaxist. Kőhidai és munkatársai hasonló, kétcsúcsú görbét figyeltek meg több peptid pl. a leukocita-attraktáns formil-Nle-Leu-Phe peptid [Kőhidai et al, 2003c] és a bradikinin esetében is [Kőhidai et al, 2002b]. Ez a jelenség feltehetően azzal magyarázható, hogy az adott vegyület két, különböző affinitású receptorhoz kötődik a *Tetrahymena* sejteken. A lizin egységként egy negatív töltést hordozó polianionos Ac-EAK repellensnek bizonyult a teljes vizsgált koncentrációtartományban (kemotaxis index $< 80\%$), ezzel szemben a lizin egységként két negatív töltést hordozó Succ-EAK esetében harang alakú görbét kaptam, azaz a polipeptid egy optimális koncentrációban $c = 2$ $\mu\text{g/ml}$ váltott ki pozitív kemotaxist (kemotaxis index = $182\pm 22\%$ (2 $\mu\text{g/ml}$)) (14. ábra). Összegezve, a polipeptidek hatását *Tetrahymena* kemotaxisára elsősorban az oldallánc N-terminális aminosavának minősége határozta meg. Különböző hatást figyeltem meg az oldallánc N-terminálisán azonos

aminosavat tartalmazó, de eltérő oldallánc-hosszúságú polipeptid-pár esetében (E_iK:repellens, EAK: attraktáns).

4.2.2.2. Kemotaktikusan szelektált *Tetrahymena* szubpopulációk kemotaxisa

A kemotaktikus szelekció módszerével azt vizsgáltam, hogy a szelektáló molekulák hatása a kb. 70-edik *Tetrahymena* generációban is megfigyelhető-e. A polipeptidek közül azokkal szelektáltam a sejtfelszíni receptoraikra nézve kevert *Tetrahymena* populációt, amelyek az előző kísérletekben attraktánsnak bizonyultak. Kontrollként egy neutrális polipeptidet (P_iK) alkalmaztam. A kemotaktikus szelekció eredményeit a 15. ábra mutatja be. A *Tetrahymena* populációt a fenntartásukhoz használt médiummal („C” sejtpopuláció), valamint a kemoattraktáns és kontroll polipeptidekkel szelektáltam (a H_iK, EAK, Succ-EAK: SE, TAK



15. ábra Szelektált *Tetrahymena* szubpopulációk kemotaxisa. $Ch_{sel} = (P/P \times C/C) / (P/C \times C/P)$, ahol C=kontroll és P=polipeptid. x: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$; #: $p < 0,001$.

és P_iK polipeptid rövidítésével jelzett sejtpopuláció), a leghatásosabb koncentrációjú oldatot alkalmazva.

A H_iK polipeptiddel szelektált sejtek jelentős kemotaktikus aktivitást mutattak a kontroll médium felé (H_iK/C) (264±47 %), csakúgy, mint a H_iK polipeptid felé (H_iK/H_iK) (338±47 %). Azon a sejtek esetében, amelyeket TAK, EAK vagy Succ-EAK polipeptiddel szelektáltam, csökkent intenzitású kemotaxist figyeltem meg mind a kontroll médium (C/polipeptid), mind az adott polipeptid felé (polipeptid/polipeptid).

A szelektált sejtpopulációk kemotaktikus tulajdonságának összehasonlítására kiszámoltam az ún. szelekciós hányadost ($Ch_{sel}=(P/P \times C/C)/(P/C \times C/P)$) [Kőhidai et al, 2000], amelynek értékéből következtethetünk a polipeptidekkel való kölcsönhatás jellegére. Amennyiben $Ch_{sel} > 1,2$, hosszú távú kemotaktikus aktivitásról beszélhetünk, amely feltehetőleg egy, a sejtek utódgenerációinak is átörökített receptoron keresztül megy végbe; ha $Ch_{sel} < 1,2$, akkor rövid távú kölcsönhatást feltételezhetünk.

A polipeptidek közül egyedül az EAK esetében kaptam viszonylag nagy értékű szelekciós hányadost ($Ch_{sel}=1,12$). A polikationos polipeptidekkel (H_iK, P_iK és TAK) valamint a polianionos Succ-EAK polipeptiddel nem tudtam pozitív kemotaktikus választ adó populációkat szelektálni.

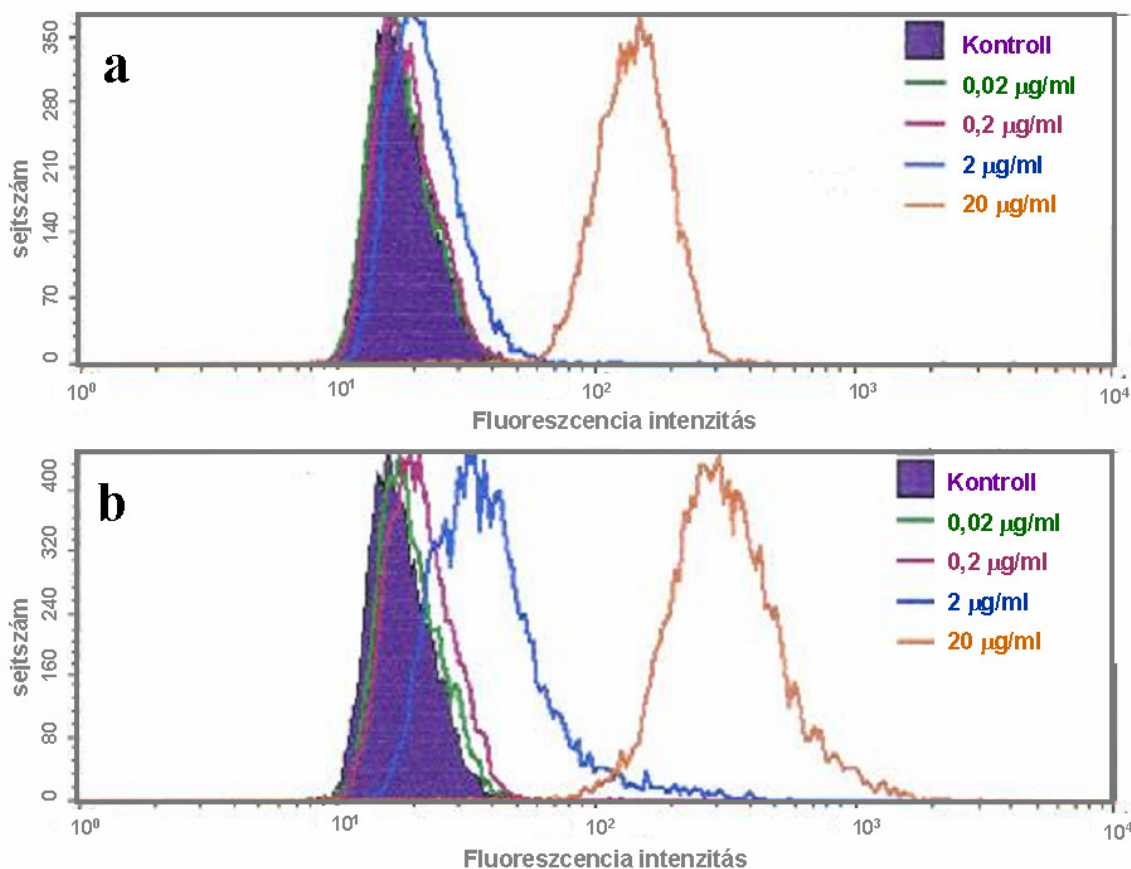
Megállapítható, hogy bár a szelekciós hányadosban jelentős különbségeket észleltem, egyik polipeptid esetében sem tapasztaltam $Ch_{sel} > 1,2$ értékkel jellemezhető pozitív kemotaktikus szelekciót. A polipeptidek *Tetrahymena* sejtekre gyakorolt kemotaktikus hatása rövidtávon érvényesült, nem jelent meg az utódgenerációkban, ezért feltételezhetjük, hogy a *Tetrahymena* kemotaktikus válaszképessége a polipeptidekre nem átörökített receptor köthető sajátosság.

4.2.3. *Tetrahymena* polipeptid-felvétele

A *Tetrahymena* számára az aminosavak, peptidek és fehérjék táplálékul szolgálhatnak. Felvételük feltehetőleg receptor-mediált endocitózissal történik a szájmezőben kialakuló táplálékvakuumokon keresztül.

A karboxifluoreszcinellel jelölt polipeptidek (polipeptidre nézve) 0,02; 0,2; 2; 20 µg/ml koncentrációjú oldatát adtam 1 órán keresztül éheztetett *Tetrahymena* sejtekhez. 0,5, 2, 5 és 15 perc múltán fixáltam a sejteket, majd áramlási citometriával meghatároztam a sejtekre jellemző fluoreszcencia-intenzitást, amely a polipeptidet bekebelező sejtek mennyiségéről ad információt. A kapott fluoreszcencia-intenzitás értékek geometriai középértékét vettem

(XGeoMean⁶). Az adatokat a kezeletlen kontroll százalékában adtam meg. Akkor tekintettem úgy, hogy a sejt felvette a polipeptidet, ha a kezeletlen kontroll és a polipeptiddel kezelt sejtek fluoreszcencia-intenzitásának különbsége meghaladta a 20%-ot. CF-H_iK kivételével a polikationos rövid oldalláncú polipeptidek bejutottak a *Tetrahymena* sejtekbe.



16. ábra *Tetrahymena pyriformis* polipeptid-felvétele. A P_iK polipeptid felvételének koncentrációfüggése a) 2 perc, b) 15 perc elteltével

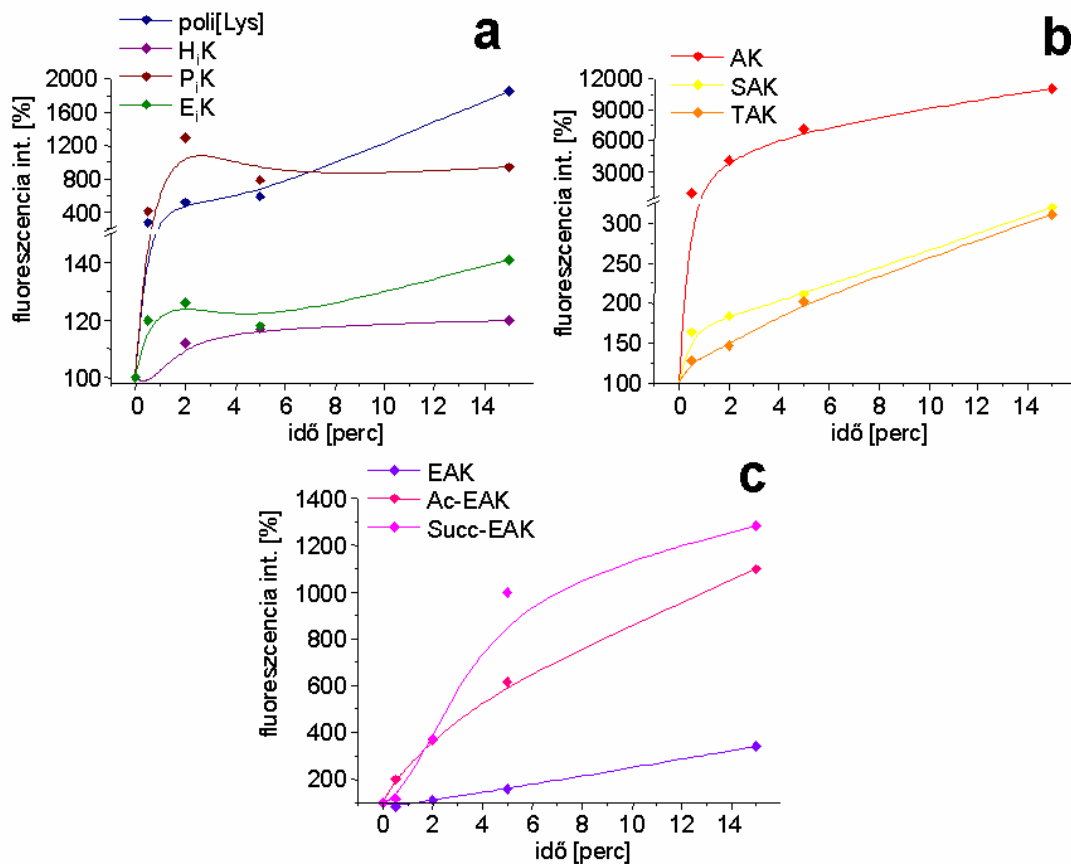
A CF-poli[Lys] (c=2 µg/ml) és CF-P_iK (c=20 µg/ml) polipeptideket két perc után felvették a sejtek 15 perc után mindkét esetben nagy mennyiségű polipeptidet fagocitáltak a sejtek (XGeoMean=1858% a CF-poli[Lys] esetében, és 940% a CF-P_iK esetében, c=20 µg/ml) (16. ábra). A rövid oldalláncú amfoter CF-E_iK-t a *Tetrahymena* sejtek csak 20 µg/ml koncentrációban vették fel (XGeoMean=141%) (17a ábra).

A hosszú oldalláncú polikationos polipeptideket (CF-AK, CF-SAK, CF-TAK) felvették a sejtek (XGeoMean=7127%, 211%, 202%, a sorrendnek megfelelően, c=20 µg/ml, 5 perc). A CF-SAK és CF-TAK polipeptid 5 perc elteltével, a CF-AK polipeptid pedig 2 perc után már jelen volt a sejtekben. Kiemelkedően magas volt a CF-AK polipeptid felvétele 15 perc

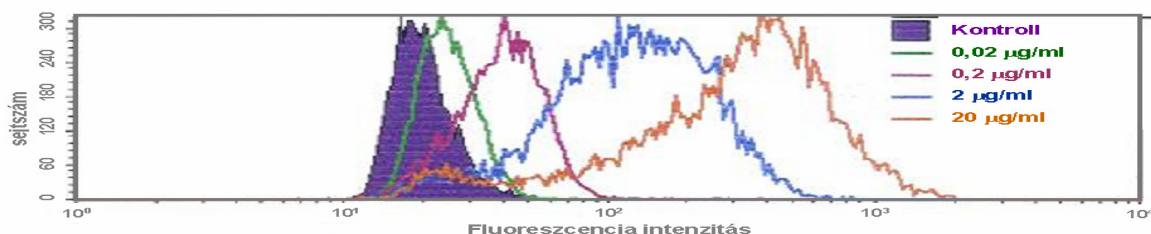
⁶

A FACS diagram geometriai középértéke (fluoreszcencia-intenzitás)

elteltével ($X_{GeoMean}=12529\pm 2018\%$)(17b ábra). Az amfoter CF-EAK polipeptidet 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban vették fel a sejtek 5 perc eltelté után. A polianionos CF-Ac-EAK és CF-Succ-EAK polipeptideket pedig már 2 perc elteltével bekebeleztek a *Tetrahymena* sejtek 2 és 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban (17c ábra). A 18. ábrán a CF-Succ-EAK polipeptid-felvételének koncentrációfüggését láthatjuk 15 perc inkubáció után.



17. ábra *Tetrahymena pyriformis* polipeptid-felvételének időfüggése a) poli[Lys] és X_{iK} polipeptidek, b) polikationos XAK polipeptidek, c. az amfoter EAK és polianionos származékai.



18. ábra *Tetrahymena pyriformis* polipeptid-felvétele. A CF-Succ-EAK (Poli[Lys(Succ-Glu_{1,0}-DL-Ala_{4,0})] polipeptid felvételének koncentrációfüggése 15 perc elteltével

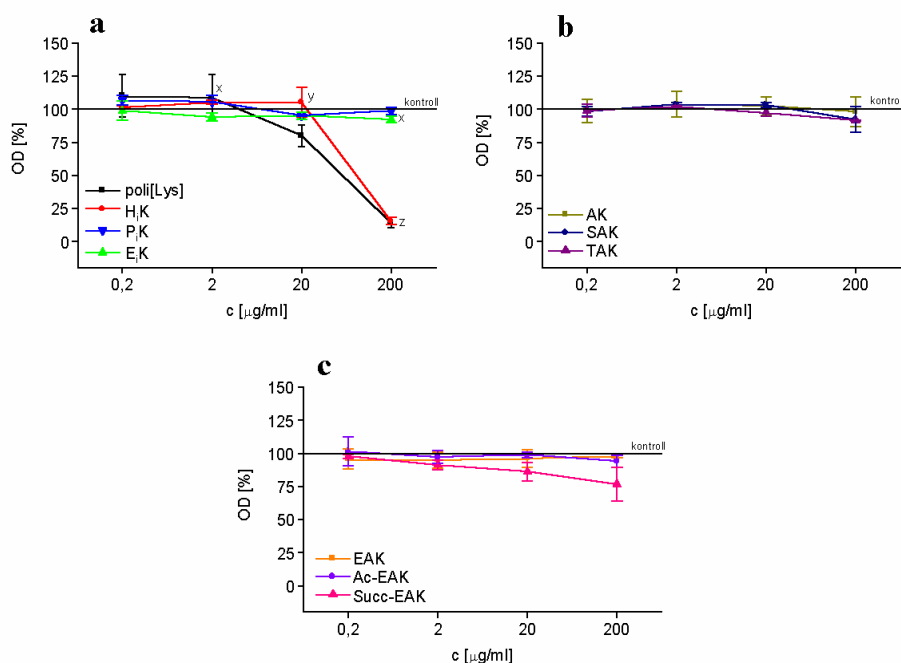
Megállapíthatjuk, hogy a *Tetrahymena pyriformis* polipeptid-felvétele függött az inkubációs időtől és a polipeptid koncentrációjától. A polipeptidek oldalláncának szerkezete nagymértékben befolyásolta a felvétel mértékét. A polikationos és a polianionos polipeptidek megközelítően azonos mértékben jutottak be a *Tetrahymena* sejtekbe, szemben az amfoter polipeptidekkel, amelyek felvétele csekély volt.

4.3. Polilizin gerincű polipeptidek hatása J774 sejtekre

A J774 sejteken számos makrofágokkal kapcsolatos élettani folyamatot tanulmányoztak. Vizsgálták szerepüket a gyulladási folyamatok során [Sautebin et al, 1999], tanulmányozták jelátviteli folyamataikat [Kügler et al, 1997], ölü- és fagocitotikus [Ralph és Nakoinz, 1975], valamint kemotaktikus [McCloskey et al, 1999] aktivitásukat, fagocitózisukat [Liang-Takasaki et al, 1982, Kügler et al, 1997]. Jellemezték a J774 sejtek endoszómában található enzimek aktivitását [Claus et al, 1998], és alkalmazták a J774 sejteket a fagoszóma érésének tanulmányozására *Mycobacterium* fertőzés során [Hostetter et al, 2003]. Számos scavenger receptorral és hatóanyagok scavenger receptoron keresztül történő specifikus célbajuttatásával foglalkozó kutatás során használták modellsejtként a J774 sejtvonalat [Mukhopadhyay et al, 1992, Bresseur et al, 1999, Prasad et al, 1999].

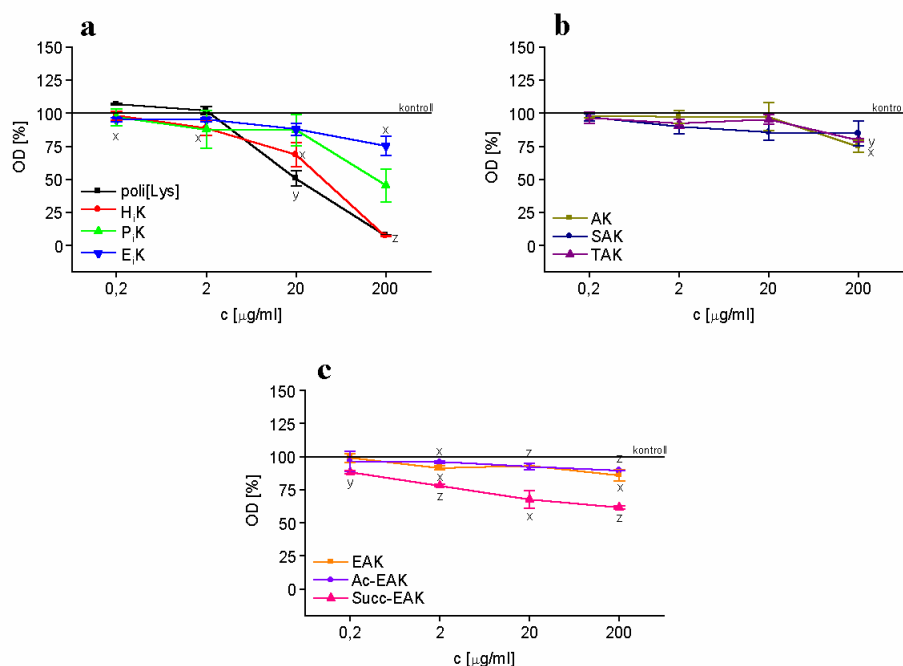
4.3.1. Polipeptidek hatása J774 sejtek túlélésére

A kísérletek során a J774 sejteket 1, 24, illetve 48 órán keresztül inkubáltam a polipeptidekkel 0,2-200 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációtartományban, míg a kontrollhoz azonos térfogatú 10% FCS tartalmú médiumot adtam. Az életképes sejtek mennyiségét MTT-teszttel határoztam meg [Monner, 1988], és a kontroll százalékában ábrázoltam. (19-20. ábra)



19. ábra Polipeptidek hatása J774 sejtek túlélésére 1 óra után. a.) X_iK polipeptidek; b.) polikationos XAK polipeptidek; c.) amfoter EAK és polianionos származékai. x: $p < 0,05$; y: $p < 0,01$; z: $p < 0,001$

A két nagymértékben polikationos oldalláncú polipeptid, a szabad α -NH₂ csoportot és imidazolgyűrűt tartalmazó H_iK és a szabad ϵ -aminocsoportot (pK_a=10,5) tartalmazó poli[Lys] (19a ábra) polipeptidek c=20 μ g/ml-nél töményebb oldatban toxikusak voltak (citotoxicitás > 85%, c=200 μ g/ml). A többi polipeptid esetében nem tapasztaltam számottevő toxicitást még 200 μ g/ml koncentrációnál sem (19b, c ábra.). 24 órás kezelés után, hasonlóan az 1 óra után kapott eredményekhez, jelentős mértékű toxikus hatást mutattak az X_iK típusú polipeptidek 20 mg/ml koncentrációban (20a ábra) poli[Lys] \cong H_iK > P_iK > E_iK sorrendben. Ezen kívül kis mértékű, de szignifikáns toxicitást mutatott a hosszú oldalláncú polikationos SAK és TAK (20b ábra). 200 μ g/ml koncentrációban rendkívül kis mértékben toxikus volt a polianionos Ac-EAK és az amfoter EAK valamint szintén toxikusnak bizonyult a polianionos Succ-EAK (20c ábra).



20. ábra Polipeptidek hatása J774 sejtek túlélésére 24 óra után. a.) X_iK polipeptidek; b.) polikationos XAK polipeptidek; c.) amfoter EAK és polianionos származékai. x: p<0,05; y: p<0,01; z: p<0,001

Összegezve megállapítható, hogy a polipeptidek töltése nagymértékben befolyásolta azok toxicitásának mértékét J774 sejtekre nézve. A rövid oldalláncú polikationos polipeptidek jelentős mértékben toxikusak voltak, míg legkevésbé toxikusnak a hosszú oldalláncú amfoter EAK bizonyult. A polianionos polipeptidek esetében megfigyelhető volt, hogy a negatív töltés növekedésével (Ac-EAK: 1 → Succ-EAK: 2/monomer egység) kis mértékben növekedett a peptid toxicitása 24 óra után. Az oldallánc hosszabbítása, valamint a kevésbé

kationos aminosavak jelenléte csökkentette a polipeptidek hatását a J774 sejtek életképességére. A 24 órás kezelések során a polipeptidek hatására bekövetkező sejtproliferációt nem tapasztaltam.

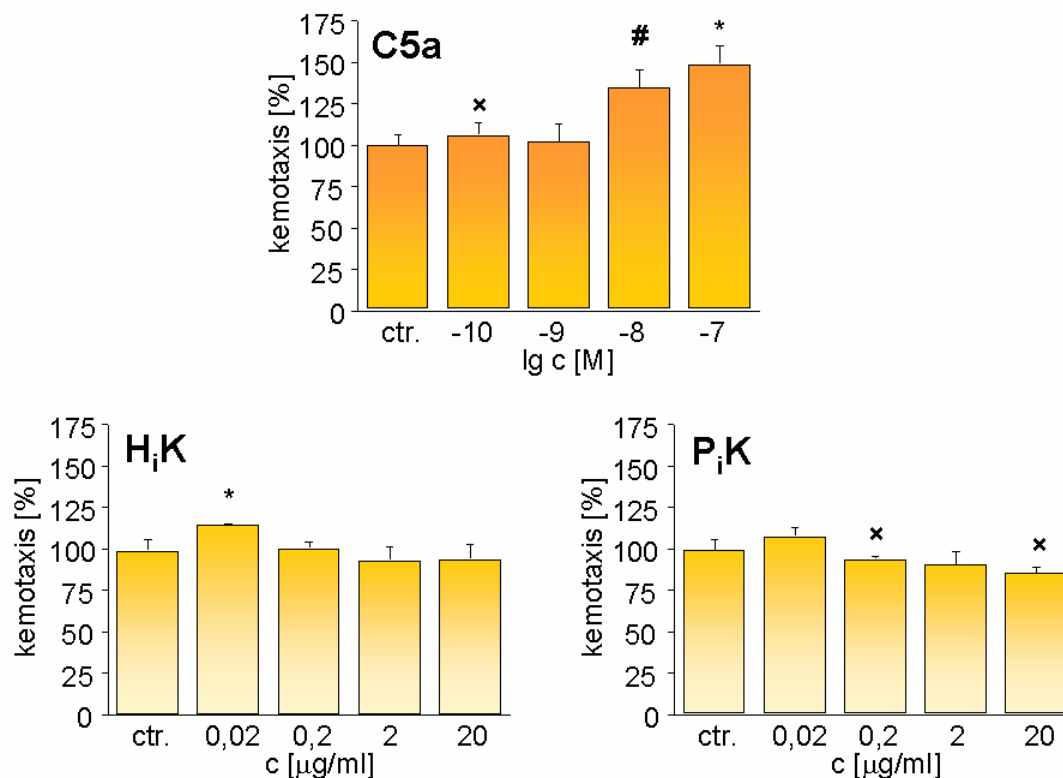
4.3.2. J774 sejtek kemotaxisa polilizin gerincű polipeptidek hatására

A monociták kemotaxisát előidézhetik különböző bakteriális peptidok (fMLF) [Heit et al, 2002], kemokinek, különböző nukleotidok (ADP, UDP) és a komplementrendszer egyes molekulái (pl. C5a) [McCloskey et al, 1999]. Amennyiben egy adott sejtpopulációra – jelen esetben a makrofágokra – specifikus hordozómolekulát szeretnénk előállítani, alkalmazhatunk kemoattraktáns hatású vegyületeket; amely a célsejt-populációt a beadás helyére vonzza, ám ebben az esetben azonban nagyobb annak a veszélye is, hogy a polipeptid immunválaszt vált ki. Ez a probléma nem léphet fel olyan molekulák esetén, amelyek nem idéznek elő kemotaxist, hanem más „célbajuttató egységet” tartalmaznak.

A J774 sejtek kemotaxisát 96-lyukú módosított Boyden-kamrában mértem. A polipeptidekkel 0,02 µg/ml, 0,2 µg/ml, 2 µg/ml és 20 µg/ml koncentrációban inkubáltam a sejteket. Az 5 µm pórusátmérőjű polikarbonát filteren átvándorolt sejtek mennyiségét MTT-tesztel határoztam meg [Monner et al, 1988]. A $\lambda=540$ nm és $\lambda=620$ nm hullámhosszon mért abszorbancia különbségét ábrázoltam a negatív kontroll (10% FCS-t tartalmazó médiummal szemben futtatott sejtek) százalékában a polipeptid koncentráció függvényében. Pozitív kontrollként a sejtek komplement C5a-val [McCloskey et al, 1999] szemben végzett kemotaxisát határoztam meg (kemotaxis index= $134\pm 10\%$, $c=10^{-8}$ M és $149\pm 11\%$, $c=10^{-7}$ M) (21. ábra). A statisztikai analízist az Origin4 program ANOVA tesztjével végeztem.

A vizsgált 10 vegyület közül egyik esetben sem tapasztaltam szignifikáns kemoattraktáns hatást, noha a H_iK polipeptid kis mértékben vonzotta a sejteket (kemotaxis index= $116\pm 0,5\%$, $c=0,02$ µg/ml)(6. és 7. táblázat, 21. ábra). Repellensként egy polipeptid, P_iK viselkedett a vizsgált legtöményebb koncentrációban ($c=20$ µg/ml, kemotaxis index= $86\pm 4\%$)(6. táblázat, 21. ábra.)

A *Tetrahymena pyriformis* egysejtűvel összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a J774 sejtek kisebb kemotaktikus aktivitást mutattak a polipeptidek hatására. A H_iK polipeptid kemoattraktánsként viselkedett mindkét modellsejt esetében. H_iK és P_iK kivételével a polipeptidek nem gyakoroltak kemotaktikus hatást a J774 sejtekre. Összességében a polipeptidek nem befolyásolták számottevően a J774 sejtvonal migrációját, így ebből a szempontból alkalmasak a neutrális makromolekuláris hordozó szerepére.



21. ábra H₁K és P₁K polipeptid, valamint kopplement C5a (pozitív kontroll) hatása J774 sejtek kemotaxisára. x: $p < 0,05$; y: $p < 0,01$; z: $p < 0,001$

| c [µg/ml] | Kemotaxis index [%] ± SD [%] | | | |
|-------------|------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Poli[Lys] | H ₁ K | P ₁ K | E ₁ K |
| 0,02 | 120±8 | 116±0,5* | 108±5 | 105±11 |
| 0,2 | 114±5 | 101±4 | 95±1** | 103±4 |
| 2 | 110±5 | 94±8 | 91±8 | 108±9 |
| 20 | 109±4 | 95±9 | 86±4*** | 103±11 |

6. táblázat X₁K polipeptidek és poli[Lys] hatása J774 sejtek kemotaxisára. * $p < 0,001$, ** $p < 0,04$, *** $p < 0,04$

| c [µg/ml] | Kemotaxis index [%] ± SD [%] | | | | | |
|-------------|------------------------------|-----------------|--------|-------|--------|----------|
| | AK | SAK | TAK | EAK | Ac-EAK | Succ-EAK |
| 0,02 | 106±1* | 131±27 | 117±5 | 104±4 | 101±8 | 116±7 |
| 0,2 | 98±1** | 113±6*** | 120±19 | 110±4 | 101±1 | 105±6 |
| 2 | 101±6 | 115±2 | 117±10 | 114±9 | 109±11 | 105±9 |
| 20 | 104±15 | 118±9 | 109±8 | 102±4 | 99±5 | 97±15 |

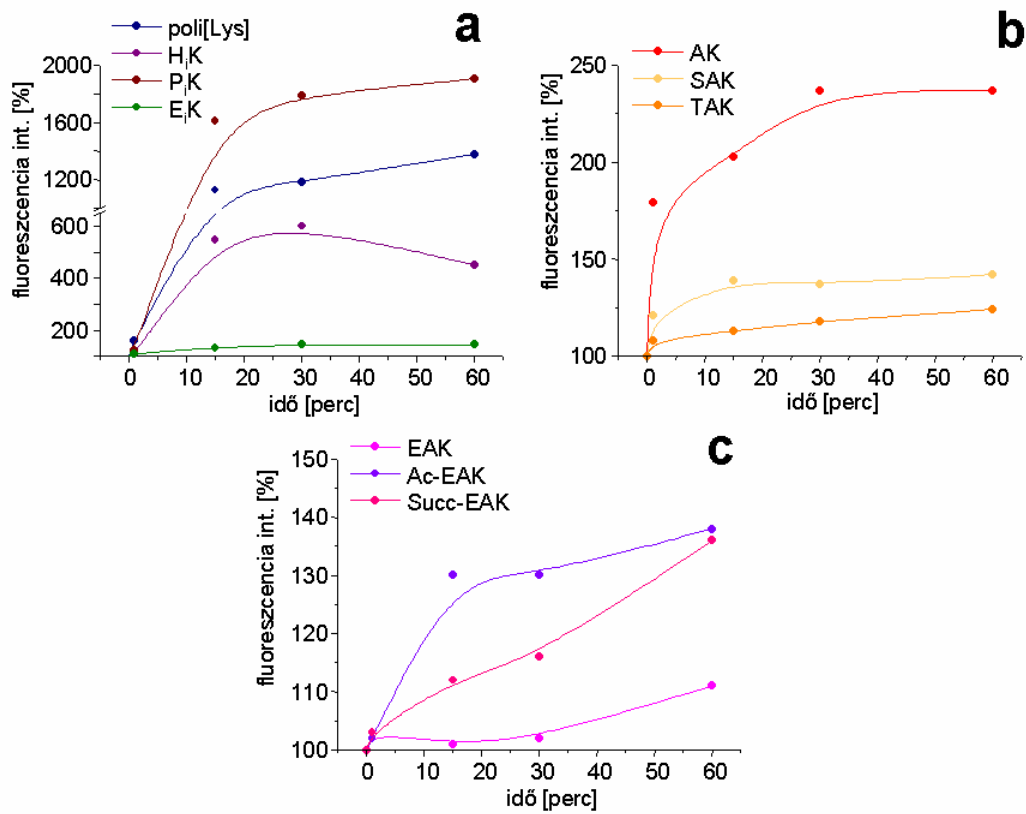
7. táblázat XAK polipeptidek hatása J774 sejtek kemotaxisára. * $p < 0,001$, ** $p < 0,03$, *** $p < 0,009$

4.3.3. J774 sejtek polipeptid-felvétele

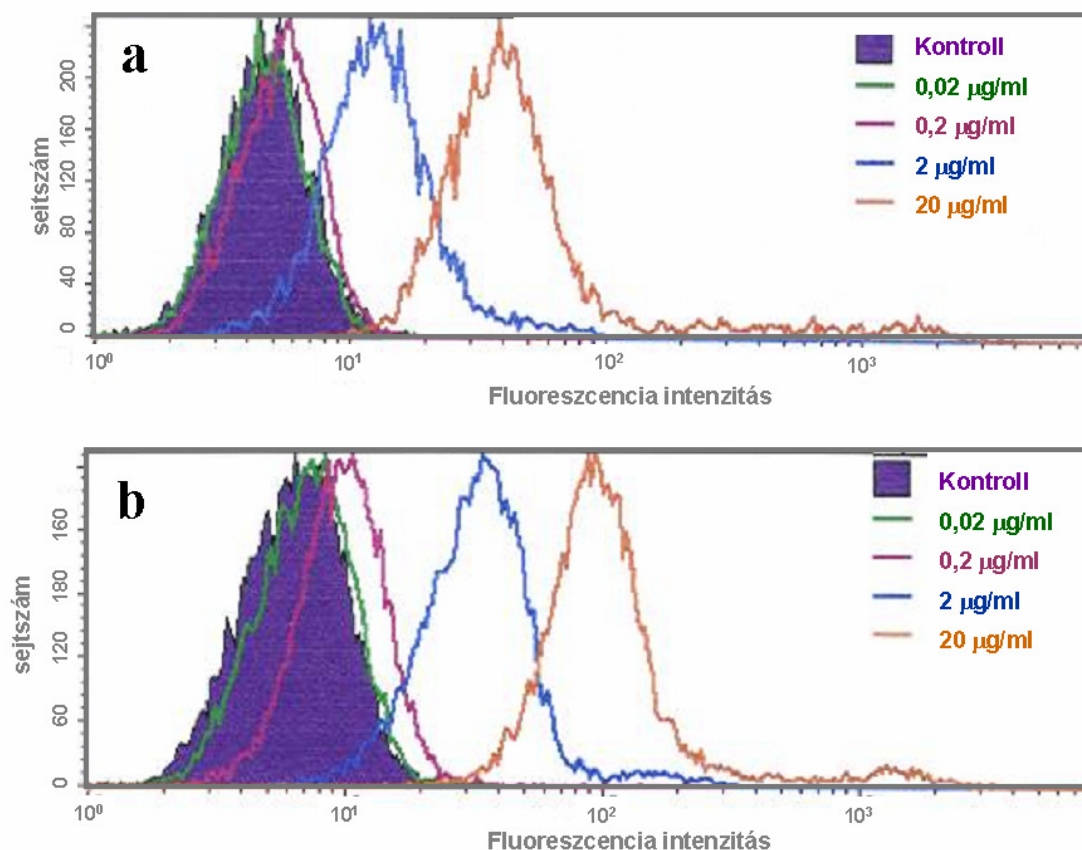
A jelenleg alkalmazott patogén-ellenes vegyületek többsége kis molekulájú vegyület, amely diffúzióval jut be a sejtekbe. Csoportunkban régóta alkalmaznak polilizin gerincű polipeptid polipeptideket különböző hatóanyagok (pl. daunomicin vagy metotrexát [Hudecz et al, 2003]) hordozómolekulájaként. A kis molekulák specifikus sejtbe jutását nagymértékben elősegítheti, ha makromolekuláris hordozóhoz kapcsoljuk őket, ebben az esetben a sejtbe jutás mechanizmusa is megváltozik, mivel a makromolekulák nem jutnak át a membránon.

4.3.3.1. Úszó J774 sejtek polipeptid-felvétele

A J774 sejteket 1 órán keresztül éheztettem FCS-mentes RPMI médiumban. Ezt követően a karboxifluoreszcinnel jelölt polipeptideket (a polipeptidre nézve) 0,02; 0,2; 2 és 20 µg/ml koncentrációban adtam a sejtekhez. 1, 15, 30 és 60 perc elteltével fixáltam a sejteket. Áramlási citométerrel meghatároztam az adott fluoreszcenciaintenzitáshoz tartozó sejtszámot, majd a kapott diagramok geometriai középértékét. A geometriai középérték adatokat ábrázoltam idő és a polipeptid koncentráció függvényében a kezeletlen kontroll százalékában. Akkor tekintettem úgy, hogy a sejt felvette az adott polipeptidet, ha a kezeletlen kontroll és a polipeptiddel kezelt sejtek fluoreszcencia-intenzitásának különbsége meghaladta a 20%-ot. A rövid oldalláncú polipeptidek közül a polikationos CF-poli[Lys], CF-H_iK és CF-P_iK jutott be a sejtekbe, míg az amfoter CF-E_iK esetében nem mutatható ki felvétel. A CF-poli[Lys], CF-H_iK és CF-P_iK polipeptid már 15 perc inkubáció után kimutatható a sejtekben. (22a és 23. ábra).



22. ábra Úszó J774 sejtek polipeptid-felvétele. a.) X,K polipeptidek; b.) polikationos XAK polipeptidek; c.) amfoter EAK és polianionos származékai. $x: p < 0,05$; $y: p < 0,01$; $z: p < 0,001$



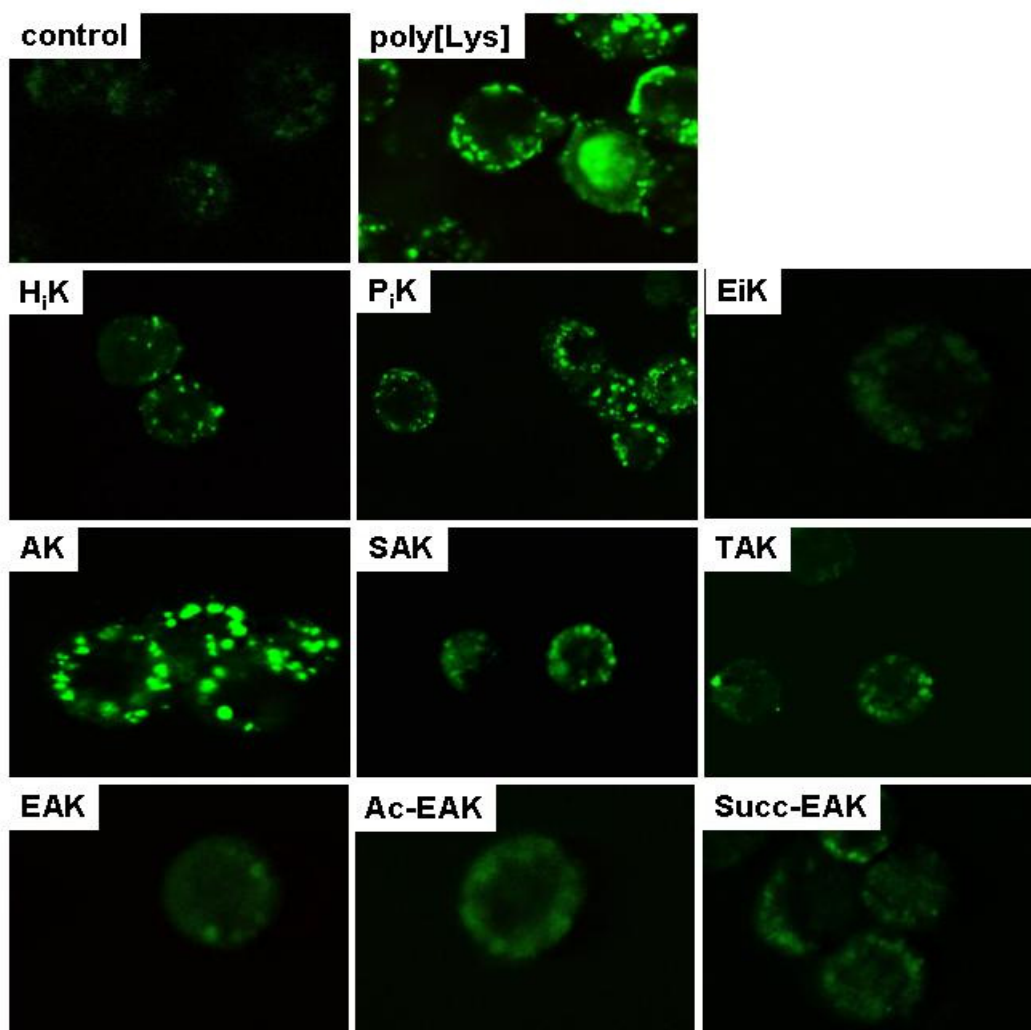
23. ábra J774 sejtek polipeptid-felvétele 15 perc elteltével, a) CF-poli[Lys], b) CF-P_iK (poli[Lys(Pro_{0,95})])

A hosszú oldalláncú polikationos polipeptideket (CF-AK, CF-SAK, CF-TAK) (XGeoMean=237%, 142%, 124%, a sorrendnek megfelelően) (22b ábra) csak a legnagyobb (c=20 µg/ml) koncentrációban vették fel a sejtek. A CF-AK polipeptid már 15 perc után bejutott a sejtekbe, a CF-SAK polipeptid felvételének mértéke az inkubációs idő növelésével egyenesen arányosan emelkedett, míg a CF-TAK polipeptidet csak 60 perc elteltével vették fel a sejtek.

Az amfoter CF-EAK a szintén amfoter karakterű CF-E_iK-hoz hasonlóan nem jutott be számottevő mértékben a J774 sejtekbe (XGeoMean=111%, c=20 µg/ml). A polianionos polipeptidek közül a CF-Ac-EAK polipeptid esetében c=20 µg/ml koncentrációban figyeltem meg a polipeptid kis mértékű felvételét (XGeoMean=130%), a CF-Succ-EAK polipeptid szintén c=20 µg/ml koncentrációban jelent meg a sejtekben (XGeoMean=136%) (22c ábra).

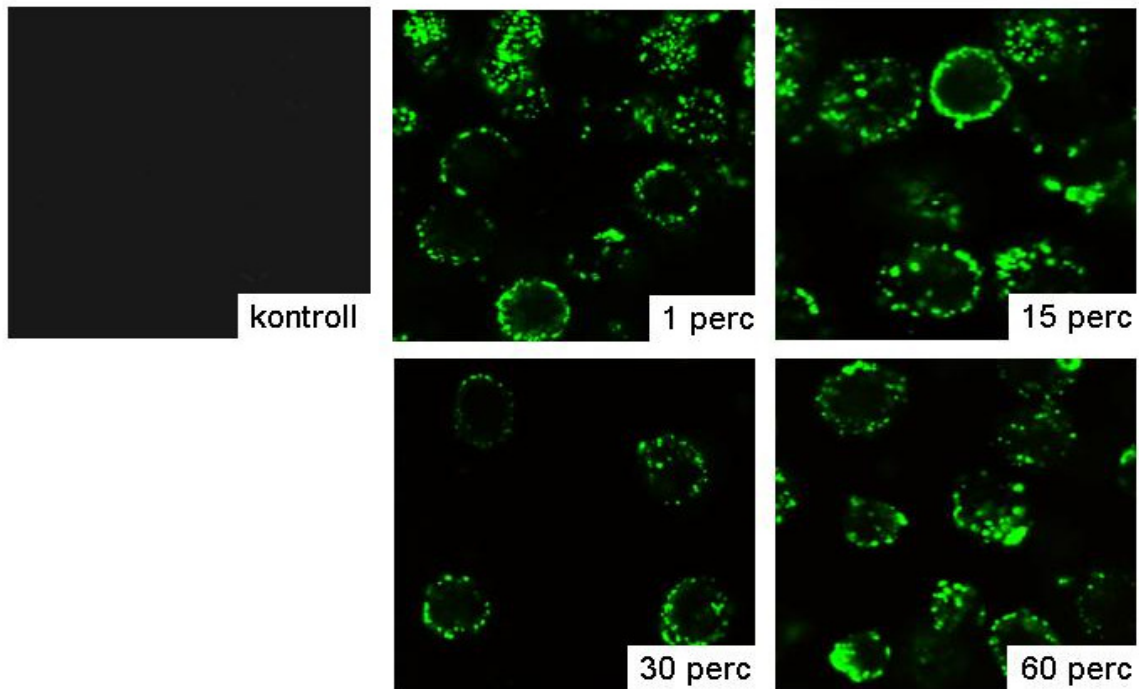
4.3.3.1.1. Úszó sejtek polipeptid-felvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatokhoz a FACS-analízishez használt módszerrel készítettem elő a sejteket. A vizsgálatok 4%-os formaldehiddel fixált sejteken történtek. Az úszó sejtekről készült felvételeken a polipeptideket tartalmazó vezikulák a sejtek citoplazmájában helyezkednek el. Kivételt képez a poli[Lys], amely egyes sejtekben bejutott a magba is. (24. ábra).



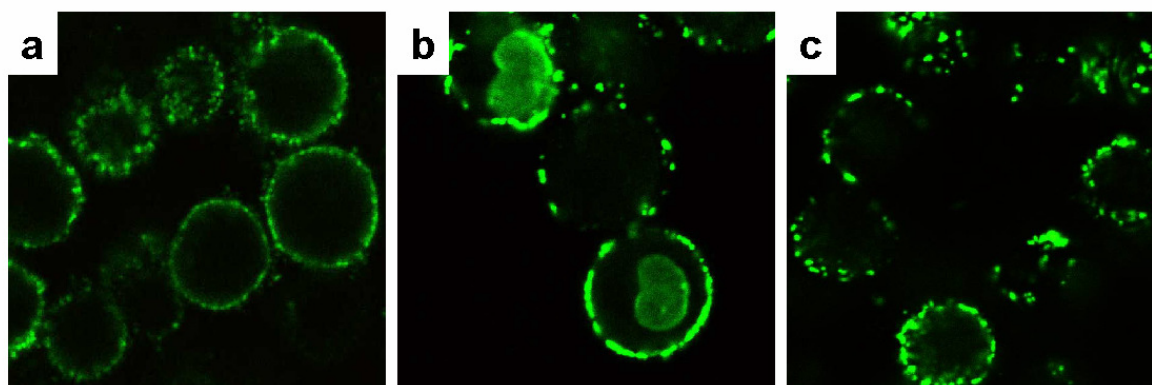
24. ábra Úszó J774 sejtek polipeptid-felvétele 1 óra elteltével ($c=20 \mu\text{g/ml}$). A felvételek 4% formaldehiddel fixált sejtekről készültek

Az CF-AK polipeptid esetében vizsgáltam a felvétel időfüggését, valamint a különböző fixálás (4% formaldehid/PBS (0,1M, pH=7,4) vs. 35% etanol/PBS (0,1M, pH=7,4) hatását a jelölt polipeptid sejten belüli elhelyezkedésére. A CF-AK felvételéről készült képek azt mutatják, hogy a sejtek a polipeptidet rövid idő (15 perc) elteltével felveszik. 30 perc után látható, hogy a vezikulák megjelennek a sejt citoplazmájának egész területén. A vezikulák száma ezután nem nőtt számottevően 60 perc inkubációt követően sem (25. ábra).



25. ábra A CF-AK polipeptid felvételének időfüggése ($c=20 \mu\text{g/ml}$). A felvételek élő sejtekről készültek

A 4% formaldehiddel történt fixálás után több esetben tapasztaltam magas autofluoreszcenciát a kezeletlen kontroll sejtek esetében. Ennek elkerülése végett több módszert próbáltam ki a sejtek fixálására, és készültek felvételek élő sejtekről is. Az élő sejtek hasonló képet mutattak a 4% formaldehiddel fixált sejtekéhez. Amennyiben az autofluoreszcencia nem volt magas, a 4% formaldehid oldattal fixált sejtekről jól kiértékelhető felvételeket kaptam. A 35% etanollal történt fixálás után nem tapasztaltam autofluoreszcenciát, azonban a polikationos CF-AK polipeptid esetében az etanosos fixálást követően a polipeptid a sejtmagban jelenik meg (26. ábra). Richard és munkatársai korábban már leírtak hasonló jelenséget 3,7% formaldehiddel fixált CHO sejtek esetében, az élő sejteken történt vizsgálatok azonban azt bizonyították, hogy a peptidek a fixálás eredményeképpen kerültek be a sejtmagba [Richard et al, 2002]. Hasonlóképpen, az élő J774 sejtekről általunk készített felvételek sem igazolták, hogy a polipeptidek a magba jutnak. Ebből arra következtettem, hogy etanosos fixálás esetén a magfestés műtermék.

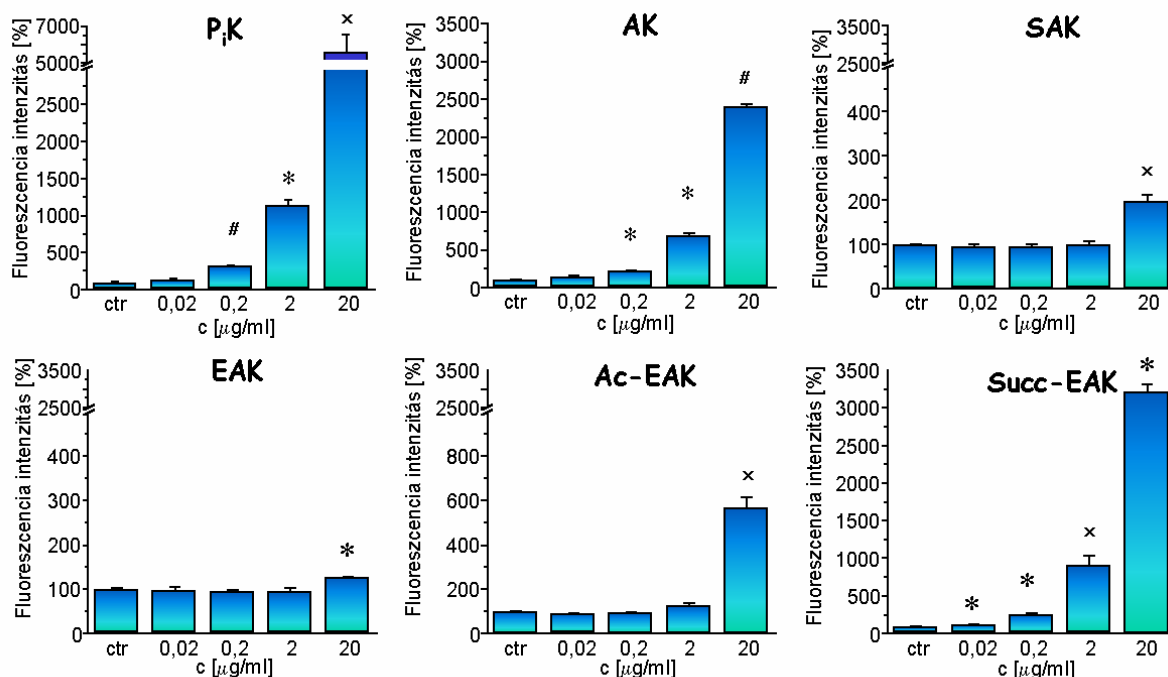


26. ábra A fixálás hatása az AK a polipeptid felvételén (1 perc, $c=20 \mu\text{g/ml}$) sejtmagba jutására; a) 4% formaldehid, b) 35% etanol, c) élő sejtek

4.3.3.2. Letapadt J774 sejtek polipeptid-felvétele

A sejteket 24 órával a kísérlet előtt 24 lyukú szövettenyésztő lemezbe osztottam (10^5 sejt/lyuk). Ebben a kísérletben hat polipeptidet vizsgáltam. A kiválasztott polipeptidek között található polikationos X_iK típusú (CF- P_iK) polipeptid CF-AK, valamint XAK típusú polikationos vegyület (CF-SAK). Vizsgáltam ezenfelül amfoter (EAK) és polianionos (Ac-EAK és Succ-EAK) polipeptidek felvételét. A polipeptid-oldatokkal 1 órán keresztül inkubáltam a letapadt sejteket 0,02; 0,2; 2, 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. Az áramlási citométerrel kapott diagramok geometriai középértékét vettem, majd ezeket az adatokat ábrázoltam idő és a polipeptid koncentráció függvényében a kezeletlen kontroll százalékában. A statisztikai analízist az Origin4 program 2 mintás t-próbájával végeztem.

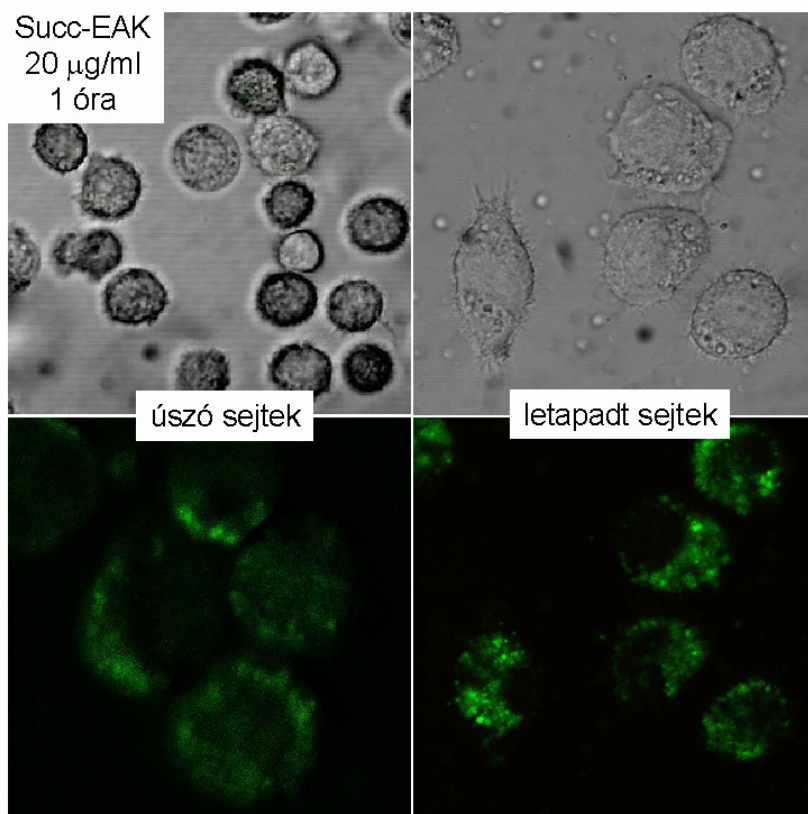
A polikationos CF- P_iK , CF-AK és CF-SAK polipeptidek bejutottak a sejtekbe, csakúgy, mint a polianionos CF-Ac-EAK és CF-Succ-EAK. Két polikationos polipeptid (CF- P_iK , CF-AK), valamint a polianionos CF-Succ-EAK esetében a sejtbe felvett polipeptid mennyisége a koncentráció növekedésével arányosan nőtt, míg a polikationos CF-SAK és polianionos CF-Ac-EAK polipeptidet csak a legnagyobb ($c=20 \mu\text{g/ml}$) koncentrációban internalizálták a sejtek (27. ábra). Megfigyeltem, hogy a letapadt sejtek nagyobb mennyiségben vették fel mind a hat polipeptidet, mint az úszó sejtek, de a különbség nagyobb volt a polikationos P_iK és AK, valamint a két polianionos polipeptid esetében, mint a polikationos SAK és az amfoter EAK esetében.



27. ábra Letapadt J774 sejtek polipeptid-felvétele 1 óra után. A fluoreszcencia-intenzitáshoz tartozó sejtszám-értékek geometriai középértékét ábrázoltam a kezeletlen kontroll százalékában. x: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$; #: $p < 0,001$

4.3.3.1.3. Letapadt J774 sejtek polipeptid-felvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A konfokális mikroszkóppal készített felvételek készítése előtt 24 órával tárgylemezre tapasztottam a J774 sejteket. A polianionos Succ-EAK polipeptiddel 1 órán keresztül inkubáltam a sejteket. A felvételek élő sejtekről készültek. A képen látható a sejtek morfológiájának megváltozása, a letapadt sejtek némelyike a makrofágokra jellemző állabakat növesztett. A CF-Succ-EAK polipeptid felvételéről készített képek is arra utalnak, hogy a letapadt sejtek nagyobb mértékben vették fel a polipeptidet, mint az úszó sejtek (28. ábra). Ez a jelenség magyarázható azzal, hogy a letapadás elősegíti a sejtek érését, ami azzal jár, hogy egyes receptorok, amelyek szerepet játszanak a polipeptidek felvételében, nagyobb számban jelennek meg a sejt felszínén (de Villiers et al, 1994).



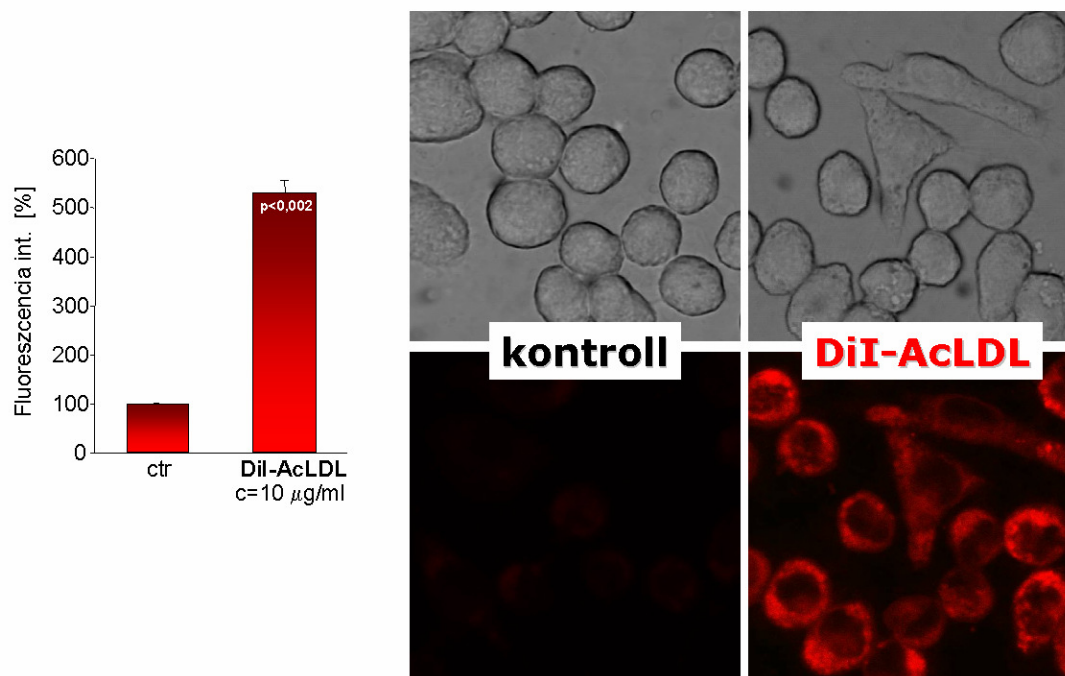
28. ábra Úszó és letapadt J774 sejtek polimer-felvétele (Succ-EAK, $c=20 \mu\text{g/ml}$) 1 óra elteltével. A felvételek élő sejtekről készültek

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a polipeptidek J774 sejtekbe való felvétele függött az inkubációs időtől, valamint a polipeptid-koncentrációtól. A polipeptid töltése nagymértékben befolyásolta a polipeptidek sejtbe jutását. Az úszó sejtek nagyobb mértékben vették fel a polikationos polipeptideket, mint az amfoter és polianionos vegyületeket. A letapadt sejtek esetében a sejtbe jutó polipeptid mennyisége a polikationos és polianionos vegyületek esetében jóval nagyobb volt, mint az úszó sejtek esetében. Ez a jelenség magyarázható azzal, hogy a letapadás elősegíti a sejtek érését, melynek következtében egyes receptorok, amelyek szerepet játszanak a polipeptidek felvételében, nagyobb számban jelennek meg a sejt felszínén (de Villiers et al, 1994).

4.3.3.4. A scavenger receptor szerepe J774 sejtek polipeptid-felvételében

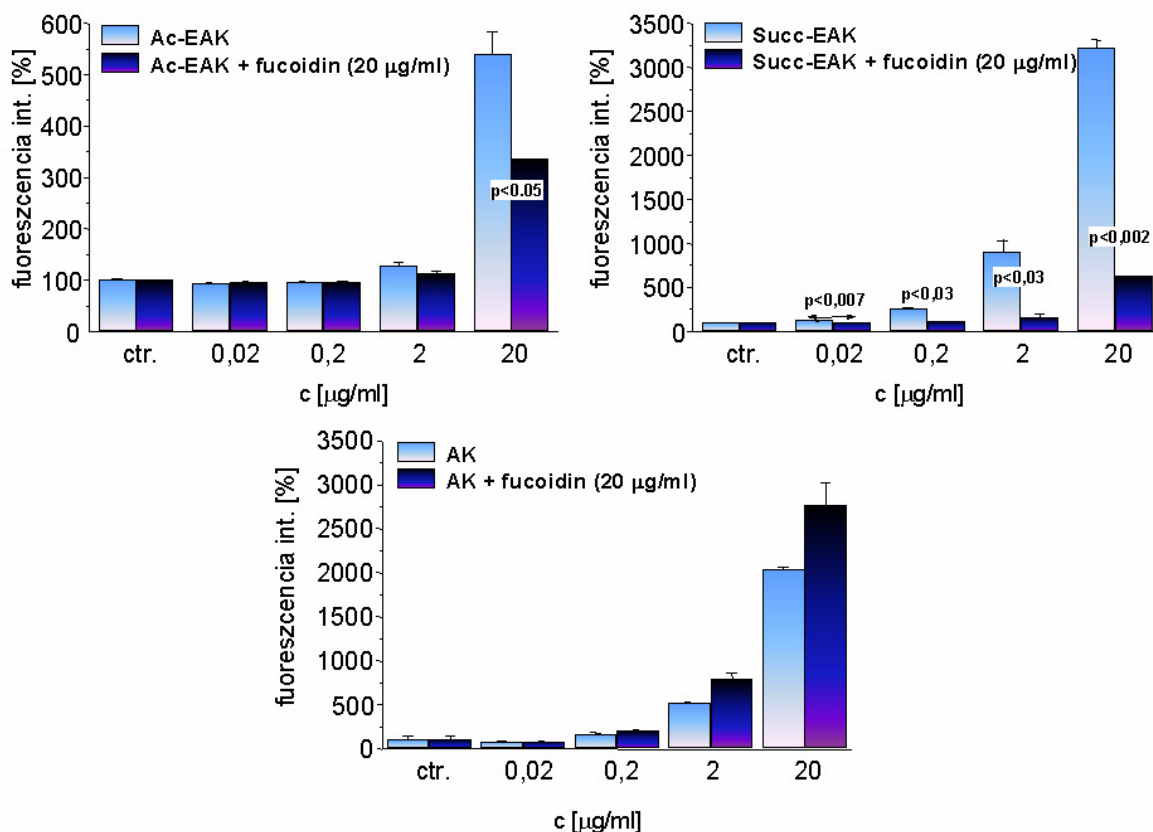
A makrofágok fagocitózisában szerepet játszanak a scavenger receptorok (SR), amelyek ligandjaiként különböző szerkezetű polianionos vegyületeket írtak le [Krieger és Herz, 1994]. Három polipeptid a két polianionos polipeptid, CF-Ac-EAK és CF-Succ-EAK, valamint negatív kontrollként a polikationos AK felvételét vizsgáltam önmagukban és az ismert scavenger receptor ligand fucoidin jelenlétében. A J774 sejteket a kezelés előtt 24 órával 24 lyukú szövettenyésztő lemezbe osztottam 10^5 sejt/lyuk sűrűségben. Pozitív kontrollként a scavenger receptoron keresztül a sejtbe jutó DiI-AcLDL szolgálta [Voyta et al, 1984]. A polipeptidek hozzáadása előtt a sejteket 15 percig inkubáltam fucoidinnal [Bermudez et al, 1997], amely a kezelés teljes időtartama alatt a rendszerben maradt. A karboxifluoreszcenciával jelölt polipeptidekkel 60 percig inkubáltam a sejteket. Áramlási citométerrel meghatároztam az adott fluoreszcencia-intenzitáshoz tartozó sejtszámot, majd kiszámoltam a kapott diagramok geometriai középértékét. A geometriai középérték adatokat ábrázoltam a kezeletlen kontroll százalékában a polipeptid vagy a fucoidin koncentráció függvényében. A statisztikai analízist az Origin5 program 2 mintás t-próbájával végeztem.

A DiI-AcLDL felvétele $10 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban mind áramlási citométerrel, mind konfokális mikroszkóppal jól kimutatható volt (29. ábra).



29. ábra A scavenger receptor kimutatása J774 sejteken DiI-AcLDL felvételének meghatározásával

Előkísérletekben megállapítottam, hogy a fucoidin 20 µg/ml koncentrációban képes gátolni az polipeptid felvételét. A polianionos polipeptidok esetében fucoidin jelenlétében a polipeptid-felvétel jelentős csökkenését tapasztaltam. A CF-Ac-EAK polipeptid esetében a sejtbe jutott polipeptid mennyisége 19%-kal, míg a CF-Succ-EAK esetében közel ötödére (3214%-ról 62%-ra) csökkent. A fucoidinnal történt előkezelés ezzel szemben nem befolyásolta a polikationos AK polipeptid bejutását a J774 sejtekbe (30. ábra).



30. ábra Fucoidin előkezelés hatása polianionos Ac-EAK és Succ-EAK, valamint polikationos AK sejtbe jutására

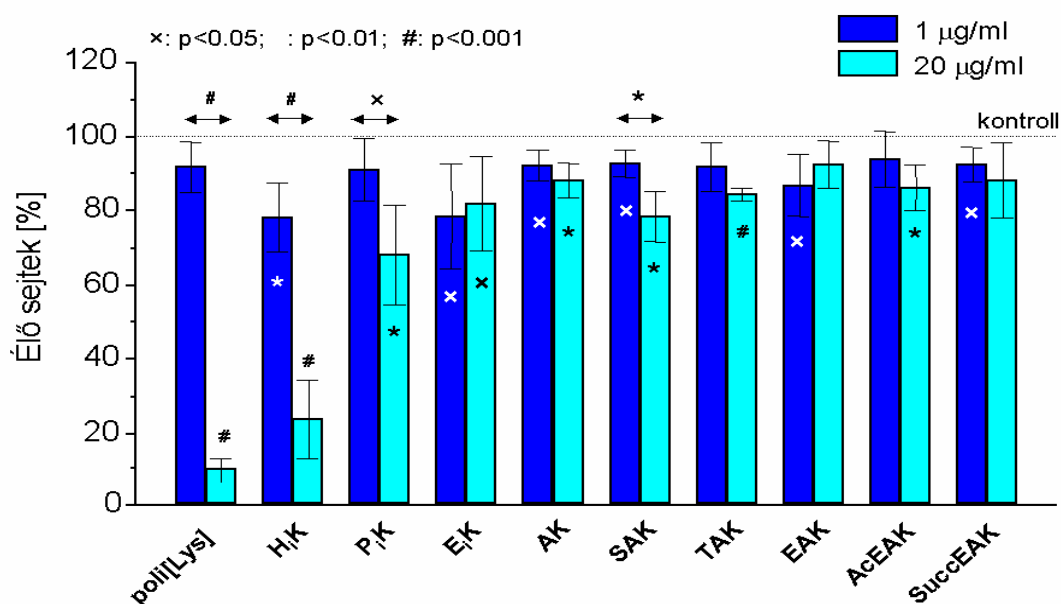
Összegezve megállapíthatjuk, hogy a fucoidin gátolta a polianionos polipeptidok (Ac-EAK és Succ-EAK) felvételét. A két polipeptid felvételét különböző mértékben szorította vissza: az oldallánconként egy negatív töltést hordozó Ac-EAK esetében kisebb mértékű gátlás volt megfigyelhető, mint az oldallánconként két negatív töltést hordozó Succ-EAK esetében. A polikationos AK felvételét nem gátolta a fucoidin, ellenkezőleg, az AK felvétele fucoidin jelenlétében, kis mértékben növekedett. Az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a scavenger receptor szerepet játszik a polianionos polipeptidok feltételében, míg a polikationos AK-t más úton veszik fel a J774 sejtek.

4.4. A polipeptidek felvétele egér csontvelő makrofág sejtekbe

Intracelluláris paraziták, mint például a *Mycobacterium* és *Leishmania* fajok a makrofágokban élnek és szaporodnak [Basu, 1990], ezért nagy jelentőséggel bírna parazitaellenes szerek, antibiotikumok szelektív bejuttatása ezekbe a sejtekbe. A J774 makrofág sejt vonal mellett két primer makrofág sejt kultúra (129/ICR és SR-A -/-) polipeptid-felvételét vizsgáltam. A egerek csontvelőjéből izolált makrofágokon tanulmányoztam a scavenger receptorok, ezen belül is a SR-A szerepét a polipeptidek sejtbe jutásában.

4.4.1. A polipeptidek hatása a makrofágok túlélésére

A sejteket 24 órával kezelés előtt 6 lyukú bakteriológiai lemezbe osztottam (10^6 sejt/lyuk). A polimer oldattal 1 és 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban 1 órán keresztül inkubáltam a makrofágokat. A sejteket 0,04%-os tripánkék oldattal festettem, és ezt követően Neubauer kamrában számoltam. Az élő sejtek számát átlagoltam, majd a kontroll átlagának százalékában ábrázoltam. Az adatok statisztikai analízisét kétmintás t-próbával végeztem. A 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban a vizsgált 10 polipeptid egyike sem bizonyult toxikusnak. 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban adva a két polikationos, rövid oldalláncú polipeptid, P_iK, H_iK valamint a poli[Lys] esetében tapasztaltam toxikus hatást, a többi polipeptid nem csökkentette a sejtek életképességét (31. ábra).



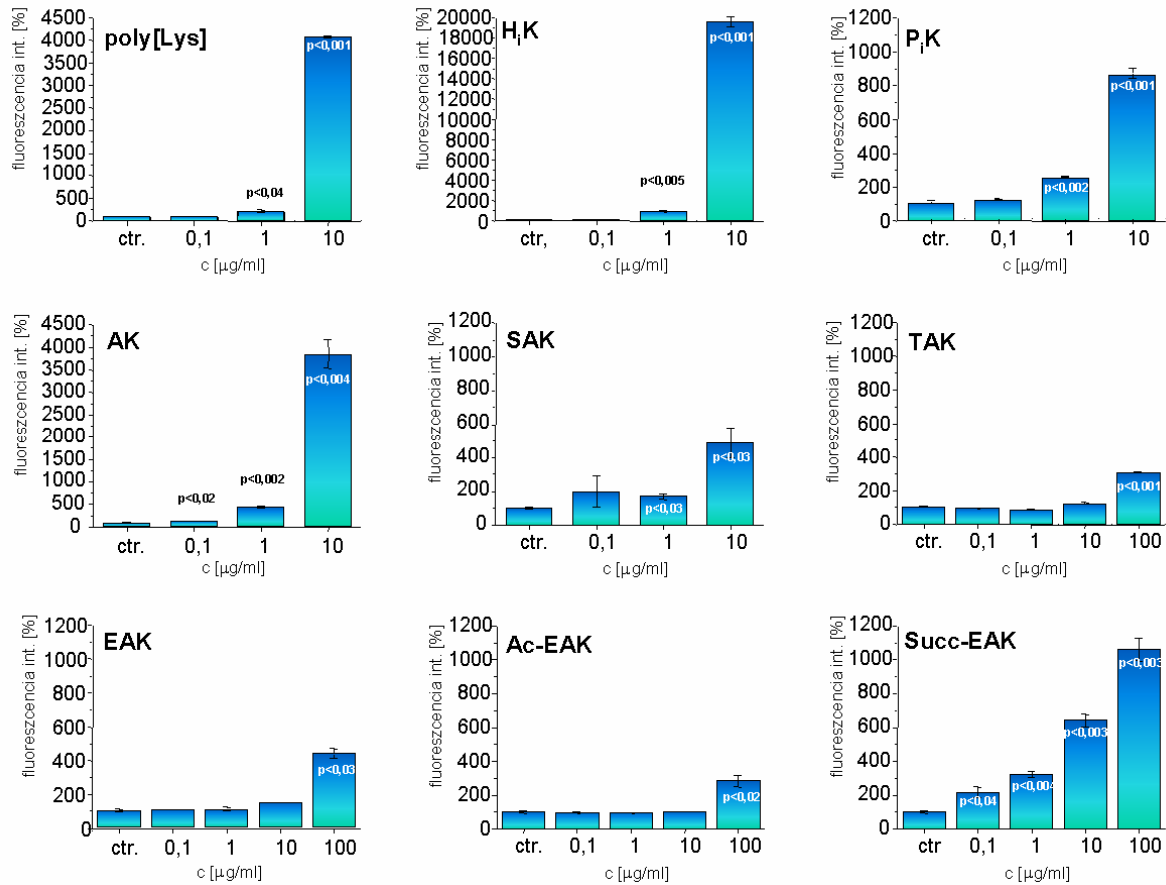
31. ábra Polilizin gerincű polipeptidek hatása 129/ICR egér csontvelői makrofágok túlélésére x: $p < 0,05$, *: $p < 0,01$, #: $p < 0,001$

4.4.2. A polipeptidek felvétele a makrofágokba

129/ICR egerek csontvelőjéből izolált makrofágokon vizsgáltam polipeptidek sejtbe jutásának koncentráció- és időfüggését, valamint összehasonlítottam különböző karakterű polipeptidek felvételének mértékét 4°C-on és 37°C-on. Tanulmányoztam ezen kívül a jelöletlen polipeptidekkel történt előkezelés hatását a karboxifluoreszcenccel jelölt polipeptidek felvételére. A sejtbe jutott polipeptidek mennyiségét áramlási citometriával határoztam meg. Az adott sejtszámhoz tartozó fluoreszcencia értékek középértékét vettem, és az adatokat a kontroll százalékában ábrázoltam. A statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztem.

4.4.2.1. A koncentráció hatása a polipeptid-felvételre

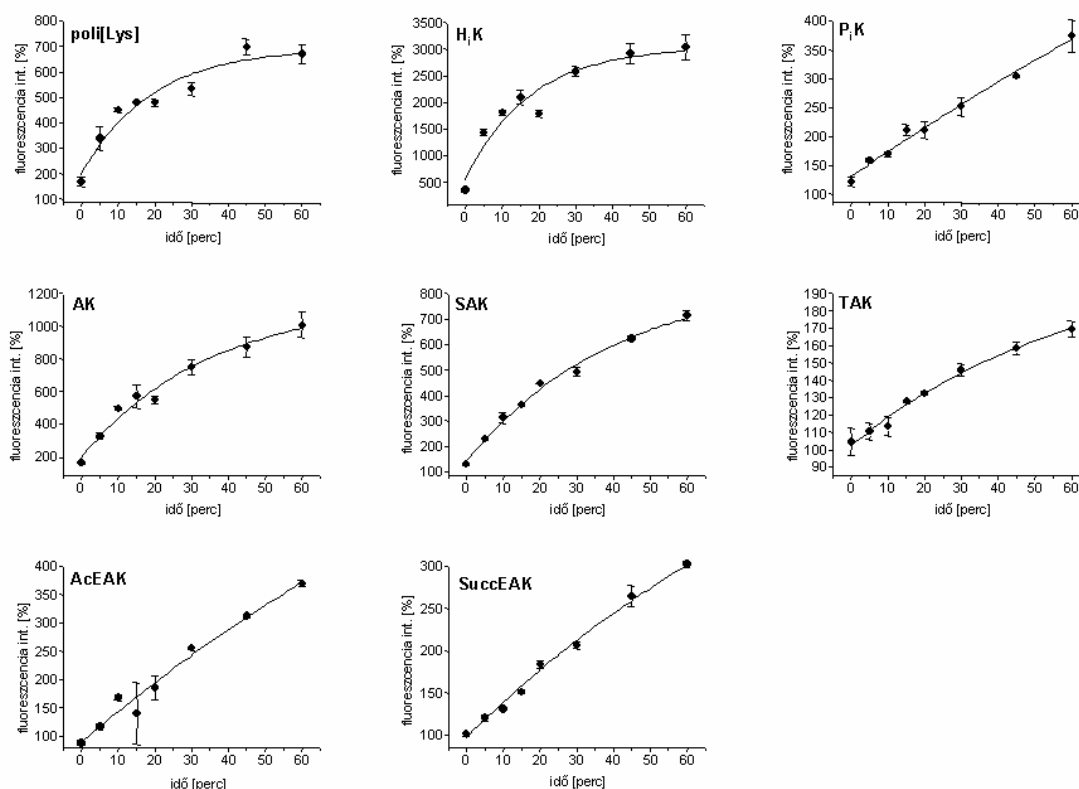
A 129/ICR egerek csontvelőjéből izolált makrofágokat 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml és 100 µg/ml koncentrációban inkubáltam a karboxifluoreszcenccel jelölt polipeptidekkel. A rövid oldalláncú polikationos polipeptidek közül a H₁K, P₁K, valamint a poli[Lys], polipeptideket nagy mennyiségben felvették a sejtek már 1 µg/ml koncentrációban. A hosszú oldalláncú polikationos polipeptidek közül az AK és SAK polipeptid 1 µg/ml koncentrációban bejutott a sejtekbe, míg a TAK polipeptid esetében csak 10 µg/ml koncentrációban figyeltem meg felvételt. Az amfoter EAK felvétele kis mértékű volt, és csak 100 µg/ml koncentrációban volt megfigyelhető. A polianionos Ac-EAK csak 100 µg/ml koncentrációban jutott be a makrofágokba, míg a szintén polianionos Succ-EAK felvétele ennél jóval hatékonyabbnak bizonyult: a sejtek már 1 µg/ml koncentrációban jelentős mennyiségű polipeptidet vettek fel (32. ábra).



32. ábra A CF- polipeptidok felvételének függése a polipeptid koncentrációtól

4.4.2.2. Az inkubáció időtartamának hatása a polipeptid-felvételre

A polipeptidekkel 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 és 60 percig inkubáltam a sejteket 37°C-on a legkisebb hatékony felvételt biztosító polipeptid-koncentrációban. Négy polikationos polipeptid: poli[Lys] és a rövid, kationos oldalláncú H₁K, valamint a hosszú oldalláncú polikationos AK és SAK és TAK esetében a felvétel kinetikája telítési görbével jellemezhető. A sejtek polipeptid-felvétele a poli[Lys] és H₁K polipeptidek esetében 60 perc után érte el a telítési állapotot. A polikationos P₁K polipeptid esetében az inkubációs idővel közel egyenesen arányos felvételt tapasztaltam. A polianionos Ac-EAK és Succ-EAK polipeptideket a P₁K-hez hasonlóan, az idővel egyenesen arányosan internalizálták a sejtek. (33. ábra).



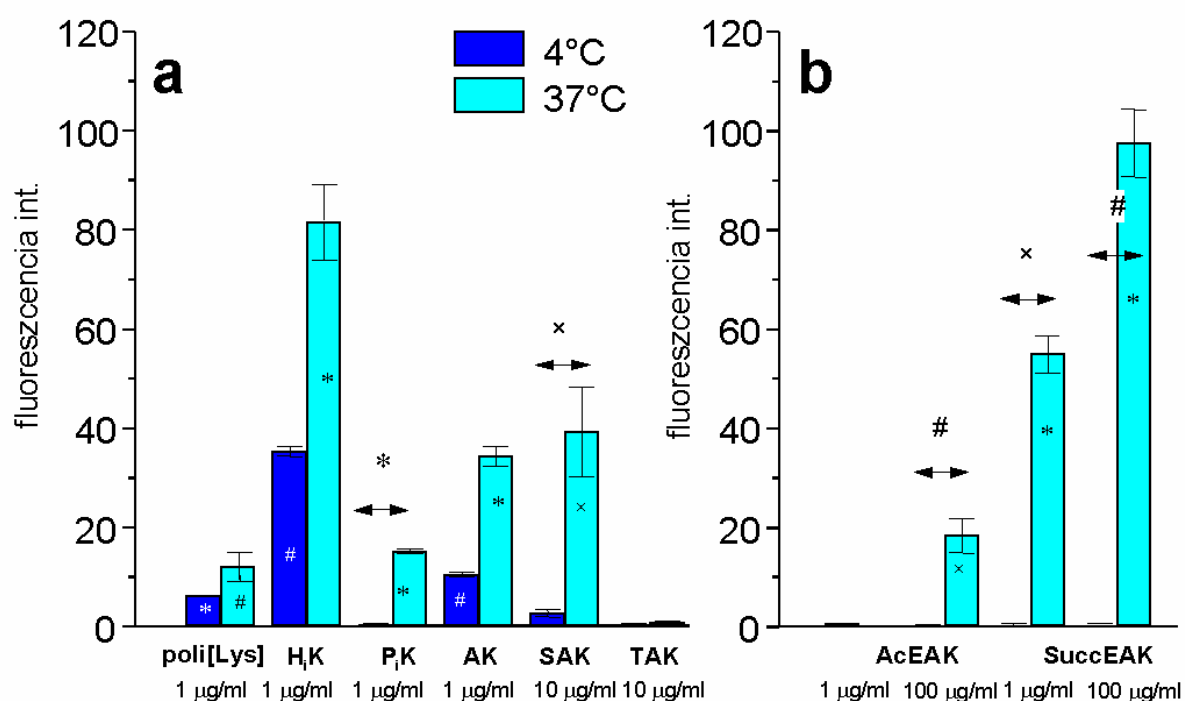
33. ábra A CF-polipeptidek felvételének függése az időtől. A polipeptideket legkisebb, még hatékony felvételt biztosító koncentrációban adtam a sejtekhez. Poli[Lys], P₁K, H₁K, AK, Succ-EAK: $c=1 \mu\text{g/ml}$, SAK, TAK: $c=10 \mu\text{g/ml}$, Ac-EAK: $c=100 \mu\text{g/ml}$

Feltételezhetjük, hogy amennyiben ezek a polipeptidek receptor közvetítésével jutnak a sejtbe, ez a receptor recirkulál az intracelluláris kompartmentek és a plazmamembrán között. Másik magyarázat lehet, hogy a sejt intracelluláris receptorkészlettel rendelkezik. Ennek a

feltételnek megfelel az A-típusú scavenger receptor (SR-A), amely a sejten belül is megtalálható [Naito et al, 1991].

4.4.2.3. A hőmérséklet hatása a polipeptidek felvételére

Ebben a kísérletben a polipeptidek sejtbé jutását hasonlítottam össze 4°C-on és 37°C-on. A polipeptideket a legkisebb jól detektálható koncentrációban adtam a sejtekhez. Mindkét polianionos polipeptid (Ac-EAK és Succ-EAK) csak 37°C-on jutott be a makrofágokba. A polikationos polipeptidek közül három esetben, az P_iK, AK és SAK polipeptideknél tapasztaltam szignifikáns különbséget a 4°C-on és 37°C-on a felvett polipeptid mennyisége között (34. ábra).

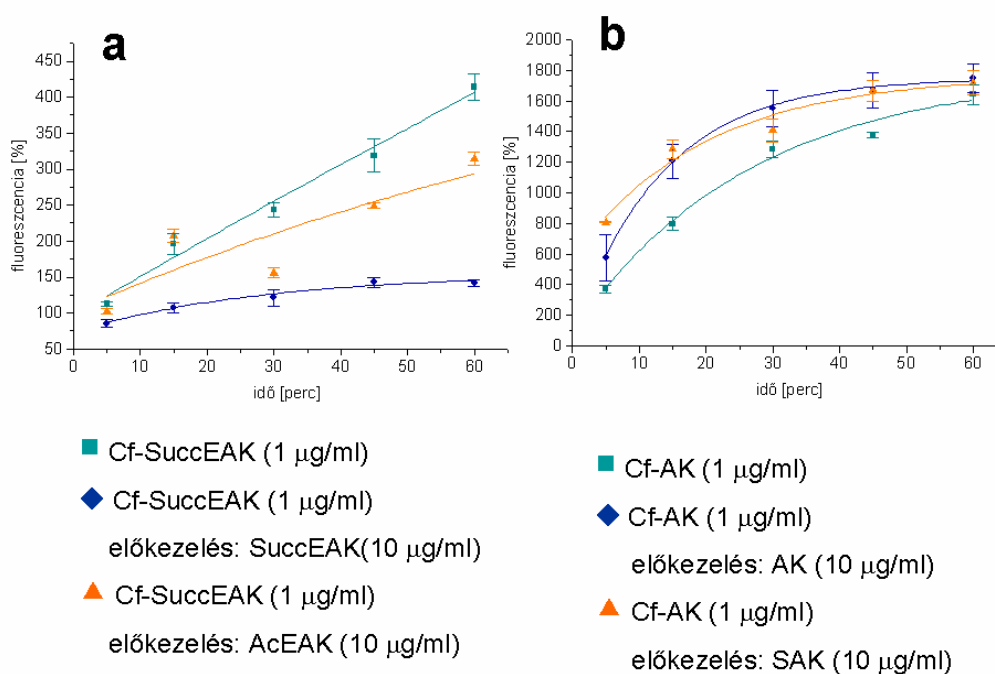


34. ábra CF-polipeptidek felvétele 129/ICR makrofágokba 4°C-on és 37°C-on. a) polikationos polipeptidek, b) polianionos polipeptidek. x: $p < 0,05$, *: $p < 0,01$, #: $p < 0,001$

A polipeptidek sejtbé jutása 4°C-on szoros összefüggést mutatott felvételük kinetikájával: azok a polipeptidek, amelyek felvétele nem mutatott telítődést, nem, vagy csak nagyon kis mértékben jutottak be a sejtekbe 4°C-on. Ezek a polipeptidek feltehetőleg, nem diffúzióval, hanem aktív transzport segítségével jutnak a sejtekbe [Vives et al, 1997].

4.4.2.4. Jelöletlen polipeptidekkel való előkezelés hatása

A jelölt polipeptidek hozzáadását megelőzően fél órával jelöletlen polipeptid oldatát adtam a sejtek médiumához a CF-polipeptidekhez képest 10-szeres koncentrációban. A jelöletlen polipeptid a kezelés teljes időtartama alatt jelen volt. A polianionos polipeptidek esetében a CF-Succ-EAK ($c=1 \mu\text{g/ml}$) felvételének mértékét határoztam meg Ac-EAK-val ($c=10 \mu\text{g/ml}$) és Succ-EAK-val ($c=10 \mu\text{g/ml}$) történt előkezelés után. A polikationos polipeptidek esetében a CF-AK polipeptid sejtbe jutását vizsgáltam AK és SAK polipeptidekkel előkezelt sejteken. A jelölt polipeptiddel 60 percig inkubáltam a sejteket. A polianionos polipeptidek gátolták a CF-Succ-EAK sejtekbe jutását. A jelöletlen Succ-EAK-val történt előkezelés szinte teljesen visszaszorította a CF-Succ-EAK felvételét a csontvelői eredetű makrofág sejtekbe (Fluoreszcencia középérték= $413,99 \pm 19\%$ jelöletlen polipeptid nélkül és $141,8 \pm 4,6\%$ a polipeptid jelenlétében). Az Ac-EAK polipeptid jelenlétében kisebb mértékben ugyan, de szintén csökkent (35a ábra) a CF-Succ-EAK sejtbe jutása. A polikationos AK és SAK polipeptidek ezzel szemben nem gátolták a CF-AK felvételét a makrofágokba, sőt, a sejtek nagyobb mértékben internalizálták a jelölt AK polipeptidet a jelöletlen polipeptidek jelenlétében (35b ábra).

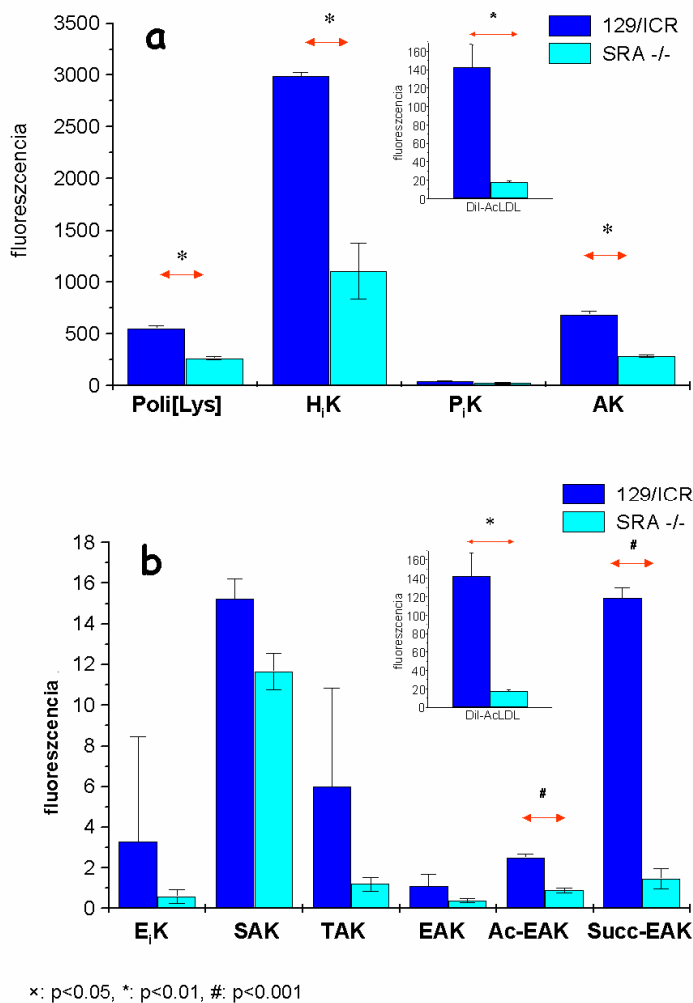


35. ábra A CF- polipeptidek felvétele I29/ICR makrofágokba jelöletlen polipeptidekkel való előkezelés után. A) polianionos polipeptidek

Összegezve elmondhatjuk, hogy a 129/ICR makrofágok polipeptid-felvétele függ a polipeptid koncentrációjától, valamint az inkubációs időtől és a hőmérséklettől. A polipeptid töltése és az oldallánc N-terminális aminosavának szerkezete befolyásolta mind a felvétel mértékét, mind annak kinetikáját. Az eredmények azt mutatják, hogy egyes polikationos polipeptidek, mint P_iK, SAK, valamint a polianionos Ac-EAK és Succ-EAK receptor közvetített mechanizmussal jutnak be a makrofágokba.

4.4.2.5. Scavenger receptorra nézve vad típusú 129/ICR, és SR-A -/- makrofágok polipeptid-felvétele.

A scavenger receptor szerepét a polipeptidek sejtbe jutásában az A-típusú scavenger receptorra nézve vad típusú 129/ICR, valamint a receptorra nézve génkiütött SR-A -/- egerekből nyert csontvelői makrofágokon vizsgáltam. Pozitív kontrollként a scavenger receptoron keresztül a sejtekbe jutó DiI-AcLDL-t alkalmaztam $c=10 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban [Voyta et al, 1984]. A jelölt polipeptidekkel $20 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban 60 percig inkubáltam a sejteket. Az SR-A -/- sejtek DiI-AcLDL felvételében mintegy négyszeres különbséget tapasztaltam a vad típusú makrofágokhoz képest (Fluoreszcencia középérték = 146 ± 25 a 129/ICR és $37,6 \pm 4$ az SRA -/- sejtek esetében, $p < 0,01$) (36.a, b ábra, kis diagram). Több polikationos polipeptid, így CF-poli[Lys], CF-H_iK és CF-AK kisebb mértékben jutott be az SR-A -/- sejtekbe, mint a vad típusú makrofágokba. A különbség a két sejtípus között különösen szembetűnő a H_iK polipeptid esetében (36a. ábra). A polianionos polipeptidek, közül a CF-Succ-EAK esetében hasonló különbséget tapasztaltam. Az SR-A -/- sejtek mintegy háromszor kisebb mennyiségű CF-Succ-EAK polipeptidet kebeleztek be, mint a vad típusú sejtek (Fluoreszcencia középérték= $20,57 \pm 0,51$ a vad típusú, és $7,22 \pm 0,52$ az SRA -/- makrofágok, $p < 0,001$) (36b ábra). Az Ac-EAK polipeptidet jóval kisebb mennyiségben vették fel a sejtek, de itt is statisztikailag szignifikáns csökkenést figyeltem meg.

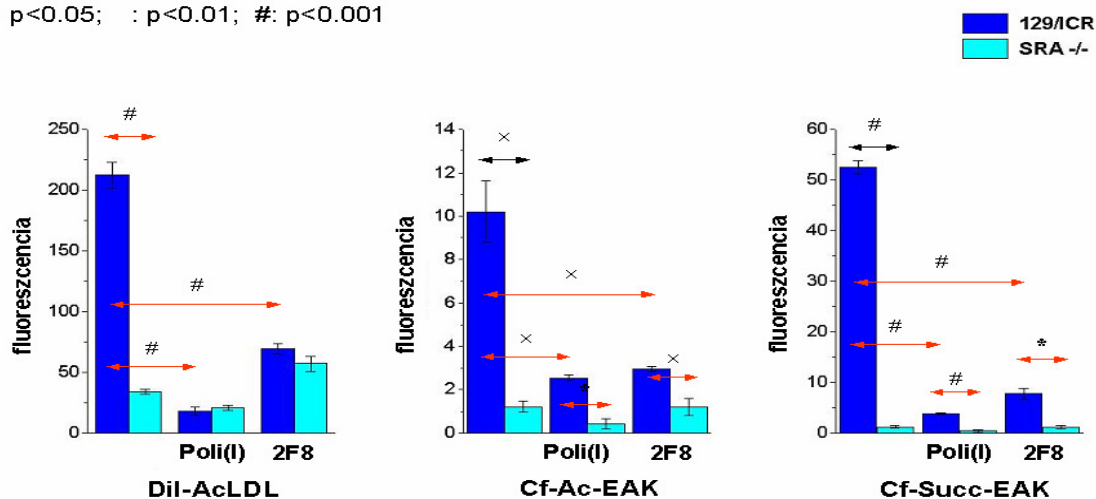


36. ábra Polilizin gerincű polipeptidek felvétele vad típusú 129/ICR és SR-A -/- makrofágokba

4.2.5.1. A scavenger receptor-A blokkolása poli(I)-val és 2F8 monoklonális ellenanyaggal

Ebben a kísérletben a két karboxifluoreszcinnel jelölt polianionos polipeptid: CF-Ac-EAK) és CF-Succ-EAK (c=50 µg/ml) felvételét tanulmányoztam, pozitív kontrollként DiI-AcLDL szolgált. A sejtekhez a polipeptidek hozzáadása előtt fél órával a scavenger receptor antagonistá polinozilsav (Poli(I)) 50 µg/ml koncentrációjú [Peiser et al, 2000], illetve az SR-A kollagénszerű doménjére specifikus 2F8 monoklonális ellenanyag 15 µg/ml koncentrációjú oldatát adtam [Fraser et al, 1993], amelyet a sejteken tartottam a polipeptidekkel történt 60 perces inkubáció ideje alatt is. Az SRA -/- makrofágokon az scavenger receptor specifikus poli(I) és MAb 2F8 nem tudták kifejteni hatásukat sem a DiI-AcLDL, sem a polianionos polipeptidek felvételére. A vad típusú 129/ICR makrofágok polipeptid-felvétele azonban mind a poli(I), mind a 2F8 ellenanyag jelenlétében jelentősen csökkent, hasonlóképpen a DiI-AcLDL sejtbe jutása is (37. ábra).

×: $p < 0.05$; : $p < 0.01$; #: $p < 0.001$



37. ábra Polianionos polipeptidek és DiI-AcLDL felvétele vad típusú 129/ICR és SR-A^{-/-} makrofágokba a scavenger receptor ligand poli(I) és SR-A specifikus 2F8 monoklonális ellenanyag jelenlétében

A scavenger receptorok eddig az irodalomban leírt ligandjai polianionos molekulák (pl. szulfáttartalmú poliszaharidok: fucoidin, maleilezett fehérjék, négyszálú nukleinsavak: poliI, poliG) [Krieger és Herz, 1994, Gough et al, 2000].

A polianionos Ac-EAK és Succ-EAK esetében az eredmények igazolják a scavenger receptorok, ezen belül is az SR-A szerepét a polipeptidek makrofágokba való felvételében.

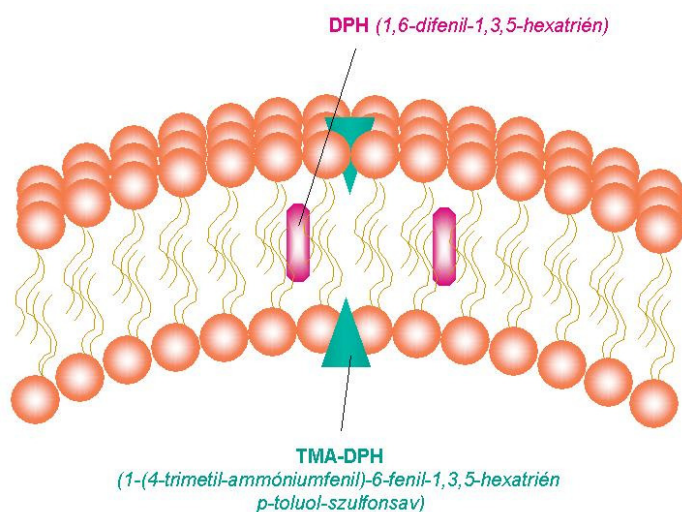
A polikationos polipeptidek között is találtam olyan vegyületeket, mint poli[Lys], H_iK és AK, amelyeket SR-A^{-/-} sejtek kisebb mértékben vesznek fel, így feltételezhetjük, hogy az SR-A szerepet játszhat ezen polipeptidek sejtbe jutásában is.

4.5. Polilizin gerincű polipeptidek kölcsönhatása foszfolipid modellmembránokkal

A polipeptidek a sejtekbe való bejutásuk során kölcsönhatásba kerülnek a sejtmembránnal. Polipeptidekkel való kölcsönhatás következtében – még ha ezek csak a membrán felszínével is lépnek kapcsolatba – megváltozhatnak a membrán fizikai tulajdonságai, pl. fluiditása [Chan, P.Y et al]. Kationos polipeptidek esetében a membránnal való kölcsönhatás szerepet játszhat e vegyületek sejtbe jutásában [Tung és Weissleder, 2003]. Kutatócsoportunkban már korábban tanulmányozták foszfolipid kettősrétegek kölcsönhatását különböző karakterű polilizin gerincű polipeptidekkel (poli[Lys], OAK, AK, SAK és EAK) [Nagy et al, 2003] valamint konjugátumaikkal [Nagy et al, 2000] [Reményi, 2003].

Vizsgálataink során kétféle összetételű liposzómát használtam: a 100% dipalmitoil-foszfatidil-kolin (DPPC) liposzómák felszíne amfoter jellegű, míg a 20% foszfatidil-glicerinnél (PG) és 80% dipalmitoil-foszfatidil-kolinból felépülő liposzómák felszíne bruttó negatív töltést hordoz.

A DPPC-liposzómák átlagos átmérője 78 nm, a DPPC:PG=80:20 (w/w) liposzómáké pedig 105 nm volt. A DPPC liposzómák fázisátalakulási hőmérséklete $T_c=40-41,5^\circ\text{C}$, a DPPC:PG=80:20 összetételű liposzómáké $T_c=32-32,5^\circ\text{C}$. A kettősréteg fluiditásában bekövetkező változást két fluoreszcens jelzőanyag segítségével követtem. Az apoláris 1,6-difenil-1,3,4-hexatrién (DPH) az alkiláncok rétegébe épül be. Amíg a membrán alacsony



38. ábra A fluoreszcens jelzőmolekulák elhelyezkedése a foszfolipid kettősrétegben

a polarizáció csökkenését eredményezi. A poláris 1-(4-trimetil-ammónium-fenil)-6-fenil-1,3,5,-hexatrién (TMA-DPH), a DPH molekula pozitív töltést hordozó trimetilamino csoporttal szubsztituált származéka, a foszfolipid kettősréteg külső régiójába épül be, és a

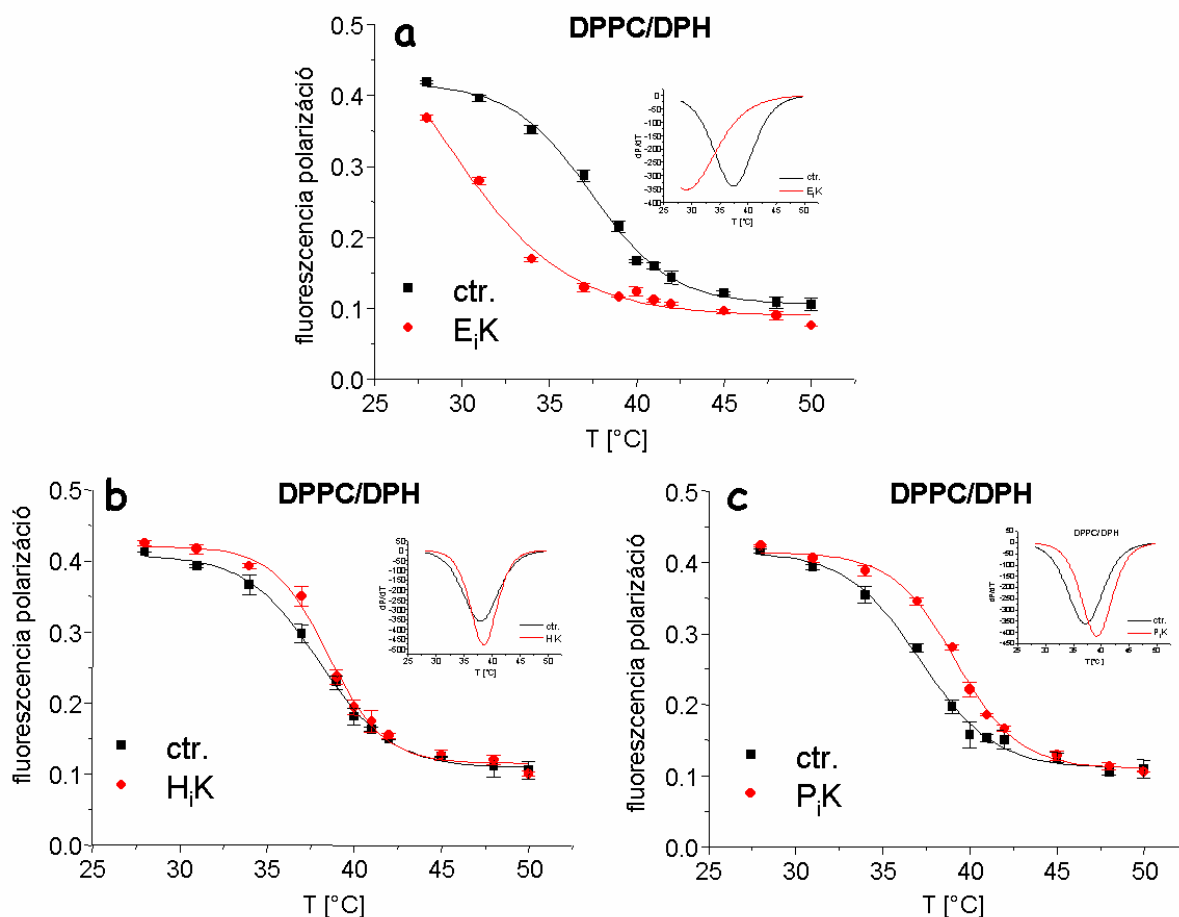
hőmérsékleten rigid állapotban van, az alkiláncok rendezetten, közel párhuzamosan helyezkednek el a membrán belső régiójában. Ebben az állapotban a DPH molekulák az alkiláncokkal azonos irányba rendeződnek, ilyenkor magas polarizációértékeket detektálhatunk. A hőmérséklet emelkedésével az

alkiláncok rendezettsége csökken, így a DPH molekulák szabadabban mozognak a membránon belül, és ez

membrán poláris, feji régiójának szerkezetében bekövetkező változásról nyújt tájékoztatást [Kuhry et al, 1985], (38. ábra). Méréseink során a fluoreszcencia polarizáció változását mértem a hőmérséklet függvényében polipeptid jelenlétében, illetve polipeptid nélkül. A kölcsönhatás erősségét a polarizáció változásával jellemeztem. Ha a polarizációváltozás mértéke $0,005 < \Delta P \leq 0,01$, kismértékű kölcsönhatásról, ha $0,01 < \Delta P \leq 0,05$, közepes mértékű kölcsönhatásról, ha $0,05 < \Delta P$, jelentős mértékű kölcsönhatásról beszélek. A polarizáció-adatokra illesztett szigmoid görbe elsőrendű deriváltjának minimumértéke adja meg az adott liposzómára jellemző T_c értéket. Ha a polipeptid jelenlétében a T_c csökkenése figyelhető meg a kontrollhoz képest, az a kettősréteg fluiditásának növekedését, a T_c növekedése polipeptid jelenlétében a kettősréteg fluiditásának csökkenését jelzi.

4.5.1. A DPPC kettősréteg fluiditásának változása polipeptidek jelenlétében

Az amfoter DPPC foszfolipidból felépülő vezikulák belső régiójában nagymértékű fluiditásnövekedést idézett elő az amfoter karakterű E_iK polipeptid (39a. ábra). A belső régióban elhelyezkedő DPH polarizációértékeinek különbsége E_iK jelenlétében főként a $T < T_c$ hőmérséklettartományban volt jelentős ($\Delta P > 0,09$: 31-39°C; $\Delta P_{\max} = -0,182$: 34°C). A másik két rövid oldalláncú, ám polikationos polipeptid esetében kisebb mértékű kölcsönhatást figyeltem meg a $T < T_c$ hőmérséklettartományban, amely a modellmembrán rigiditásának kis mértékű növekedését idézte elő.



39. ábra A fluoreszcencia-polarizáció változása a hőmérséklet függvényében DPPC liposzómák belső régiójában a) E_iK, b) H_iK, c) P_iK jelenlétében

A H_iK polipeptid 37°C-on lépett jelentős mértékű kölcsönhatásba ($\Delta P_{\max}=0,052$) a DPPC kettősréteg belső régiójával (39b. ábra), a P_iK polipeptid (30c. ábra) pedig 39°C-on ($\Delta P_{\max}=0,084$).

A XAK típusú polipeptidek, a polikationos TAK és a polianionos Succ-EAK nem befolyásolták a DPPC kettősréteg fluiditását.

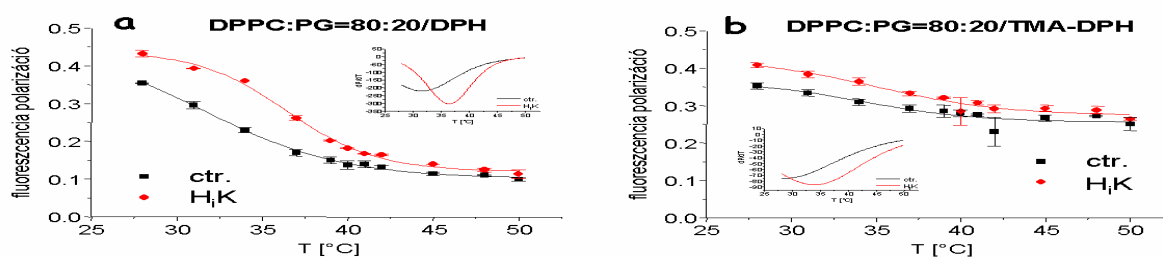
A DPPC liposzómák külső régiójában elhelyezkedő TMA-DPH fluoreszcencia polarizációjában a H_iK polipeptid okozott közepes mértékű változást ($\Delta P_{\max}=0,0259$; 34°C). A DPPC liposzómák vizsgálata során kapott fluoreszcencia polarizáció értékekből számolt ΔT_c értékeket a 8. táblázat foglalja össze.

| Polipeptid | rövidítés | $\Delta T_c = T_c \text{ (kontroll)} - T_c \text{ (polipeptid)}^*$ | |
|--|------------------|--|---------|
| | | DPH | TMA-DPH |
| Poli[Lys(His _{0,56})] | H _i K | +0,6 | -1,7 |
| Poli[Lys(Pro _{0,95})] | P _i K | +2,0 | -0,3 |
| Poli[Lys(Glu _{1,0})] | E _i K | -8,4 | 0 |
| Poli[Lys(Thr _{1,0} -DL-Ala _{3,1})] | TAK | +0,6 | +0,2 |
| Poli[Lys(Succ-Glu _{1,0} -DL-Ala _{4,0})] | Succ-EAK | 0 | -0,5 |

8. táblázat A fluoreszcencia polarizáció változása polilizin gerincű polipeptidek jelenlétében DPPC liposzómák belső (DPH) és felszíni régiójában (TMA-DPH). *A T_c hőmérsékletet a polarizációadatokra illesztett szigmoid görbe első deriváltjából határoztam meg.

4.5.2. A DPPC:PG=80:20 (m/m) összetételű kettősréteg fluiditásának változása polipeptidek jelenlétében

A 20% anionos foszfolipidet tartalmazó DPPC:PG=80:20 liposzómák esetében jelentős mértékű kölcsönhatást tapasztaltam a rövid oldalláncú polikationos polipeptidek és a foszfolipid kettősréteg között a $T < T_c$ hőmérséklettartományban. A H_iK polipeptid (40. ábra) mind a kettősréteg belső mind külső régiójával kölcsönhatásba lépett. A DPH jelzőmolekula esetében a polarizáció különbsége a kontrollhoz képest jelentős volt a 31-37°C közötti hőmérséklettartományban ($\Delta P > 0,09$), a TMA-DPH esetében pedig a 28-37°C közötti hőmérsékleteken ($\Delta P > 0,04$). A P_iK polipeptid (41a. ábra) csak a foszfolipid kettősréteg belső régiójával lépett kölcsönhatásba, és szintén csökkentette a kettősréteg fluiditását ($\Delta P_{\max} = 0,083$; 39°C).



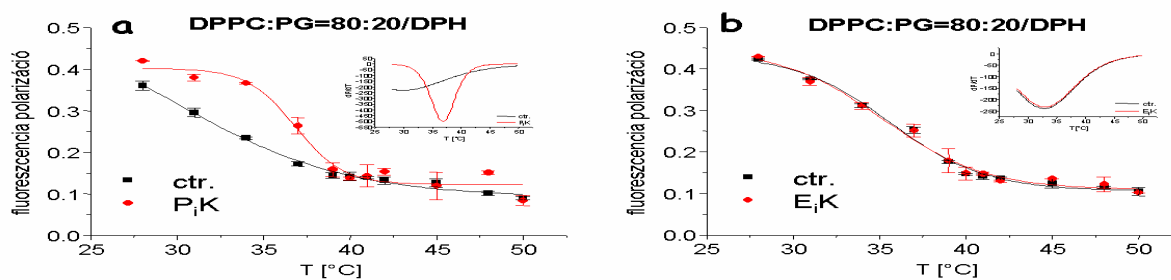
40. ábra DPH fluoreszcencia polarizációjának változása DPPC:PG=80:20 kettősréteg a) belső régiójában, illetve b) TMA-DPH fluoreszcencia-polarizációjának változása DPPC:PG=80:20 liposzómák külső régiójában H_iK jelenlétében

A amfoter E_iK polipeptid – szemben a DPPC kettősrétegekkel – nem lépett kölcsönhatásba az anionos foszfolipidet is tartalmazó DPPC:PG=80:20 összetételű liposzómákkal (41b. ábra).

A hosszú oldalláncú TAK nem befolyásolta a kettősréteg fluiditását a belső régióban, kismértékű kölcsönhatásba lépett viszont a liposzómák külső régiójával ($\Delta P_{\max}=0,008$: 34°C). A polianionos Succ-EAK a liposzómák külső rétegével lépett közepes mértékű kölcsönhatásba a $T>T_c$ hőmérséklettartományban ($\Delta P_{\max}=0,0132$: 48°C). A DPPC:PG=80:20 liposzómák vizsgálata során kapott fluoreszcencia polarizáció értékekből számolt ΔT_c értékeket az 9. táblázat foglalja össze.

| Polipeptid | rövidítés | $\Delta T = T_c$ (kontroll) - T_c (polipeptid)* | |
|---|------------------|---|---------|
| | | DPH | TMA-DPH |
| Poli[Lys(His _{0,56})] | H _i K | +4,9 | +2,8 |
| Poli[Lys(Pro _{0,95})] | P _i K | +7,0 | -0,7 |
| Poli[Lys(Glu _{1,0})] | E _i K | +0,1 | +2,0 |
| Poli[Lys(Thr _{1,0} - DL-Ala _{3,1})] | TAK | +1,0 | -2,7 |
| Poli[Lys(Succ-Glu _{1,0} - DL-Ala _{4,0})] | Succ-EAK | +0,6 | +4,3 |

9. táblázat A fluoreszcencia polarizáció változása polilizin gerincű polipeptidek jelenlétében DPPC:PG=80:20 liposzómák belső (DPH) és felszíni régiójában (TMA-DPH). *A T_c hőmérsékletet a polarizációadatokra illesztett szigmoid görbe első deriváltjából határoztam meg.



41. ábra DPH fluoreszcencia polarizációjának változása DPPC:PG=80:20 kettősréteg belső régiójában a) P_iK, b) E_iK jelenlétében

Az eredmények arra utalnak, hogy amfoter foszfolipidból felépülő modellmembránok esetében a hasonló karakterű polipeptid lépett kölcsönhatásba a kettősréteg belső régiójával. A negatív felszíni töltést hordozó liposzómák külső régiójával viszont kölcsönhatásba léptek mind a polikationos polipeptidek, mind a polianionos Succ-EAK. Valószínűsíthető, hogy ebben az esetben az elektrosztatikus kölcsönhatás is szerepet játszhat a membrán-polipeptid kapcsolat létrejöttében. Feltételezhetjük, hogy a polikationos polipeptidek egy elektrosztatikus vonzó

hatás, míg a polianionos Succ-EAK a negatív töltések között fellépő taszítás révén képes stabilizálni a foszfolipid kettősréteg szerkezetét.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

5.1. A polipeptidek jelölése 5(6)-karboxifluoreszceinnel

Előállítottam a tíz polipeptid 5(6)-karboxifluoreszceinnel jelzett származékát. A polipeptidek karboxifluoreszceinre vonatkozó szubsztitúciófokának meghatározása fordított fázisú HPLC rendszerrel történt. Megállapítottam, hogy a karboxifluoreszcein és a polipeptid között kialakuló amidkötés stabil a sósavas hidrolízis körülményei között.

5.2. Polipeptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* csillós egysejtűre

5.2.1. Polipeptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* szaporodására

Megvizsgáltam a polipeptidek hatását *Tetrahymena pyriformis* szaporodására 6 és 24 órás kezelést követően. Azt találtam, hogy a polipeptidek sem rövidtávon (6 h, 2-3. generáció), sem hosszú távon (24 h, kb. 10. generáció) nem befolyásolták számottevően a *Tetrahymena* szaporodását. A polikationos polipeptidek közül a H_iK a P_iK váltott ki kis mértékű proliferációt. Ugyanakkor 24 óra elteltével 2 µg/ml koncentrációban a hosszú oldalláncú polikationos TAK volt kissé toxikus a sejtekre.

5.2.2. *Tetrahymena pyriformis* kemotaxisa

Vizsgáltam a *Tetrahymena pyriformis* kemotaktikus válaszreakcióját a polilizin gerincű polipeptidekre. A kemotaktikus szelekció módszerével olyan populációkat próbáltam kiválogatni, amelyek hosszú távon (az egysejtűek kb. 70. generációja) válaszolni képesek a polipeptidekre. Megállapítottam, hogy a polipeptidek hatását *Tetrahymena* kemotaxisára elsősorban az oldallánc N-terminális aminosavának minősége határozta meg. Kemoattraktánsnak bizonyult a H_iK, TAK, EAK, Succ-EAK polipeptidek. Széles koncentrációtartományban kemorepellens volt a poli[Lys] és az Ac-EAK polipeptidek, de az E_iK és P_iK polipeptidek esetében csak az alkalmazott legmagasabb (c=20 µg/ml) koncentrációban figyeltem meg repellens hatást. Az azonos végálló (oldallánc N-terminális) aminosavat tartalmazó, de eltérő oldallánc-hosszúságú polipeptid-pár (E_iK és EAK) esetében különböző hatást figyeltem meg. Míg az oldalláncában egy glutaminsavat tartalmazó E_iK repellensnek bizonyult 20 µg/ml koncentrációban, addig ugyanabban a koncentrációban az EAK polipeptid, amelyben a glutaminsavat egy oligo-alanin peptidrézlet választja el a polilizin gerinctől, attraktánsként viselkedett. Az amfoter EAK polipeptid magas és alacsony koncentrációban váltott ki kemotaktikus választ, a közbülső koncentrációkban hatástalan volt.

A kemotaktikus szelekció során azt tapasztaltam, hogy a polipeptidek esetében a *Tetrahymena* sejtekre gyakorolt kemotaktikus hatása csak rövidtávon érvényesült, mivel egyik polipeptiddel sem tudtam olyan *Tetrahymena* populációt szelektálni, amely megtartotta volna kemotaktikus aktivitását.

5.2.3. *Tetrahymena pyriformis* polipeptid-felvétele

Tanulmányoztam a karboxifluoreszcinnel jelölt polipeptidek fagocitózisának idő és koncentrációfüggését *Tetrahymena* sejteken. Megállapítottam, hogy a polipeptidek felvételét – a kemotaxisához hasonlóan – elsősorban az oldallánc N-terminális (végálló) aminosav minősége befolyásolta. A CF-poli[Lys], a hosszú oldalláncú polikationos CF-AK, CF-SAK és CF-TAK polipeptidek, valamint a polianionos CF-Ac-EAK és CF-Succ-EAK esetében a *Tetrahymena* sejtek polipeptid-felvétele arányos volt mind a koncentrációval, mind az idővel. A *Tetrahymena* sejtek legnagyobb mennyiségben a CF-AK polipeptidet fagocitálták. A P_iK és EAK polipeptideket csak az alkalmazott legmagasabb koncentrációban (c=20 µg/ml) vették fel a sejtek.

5.3. Polipeptidek hatása J774 sejtekre

Munkám során vizsgáltam, hogy a különböző szerkezetű oldalláncot hordozó polipeptidek hogyan befolyásolják J774 sejtek rövid távú túlélését, kemotaxisát. Tanulmányoztam a polipeptidek a sejtekbe jutását és a scavenger polipeptidek felvételében játszott szerepét.

5.3.1. J774 sejtek túlélése polipeptidek jelenlétében

Meghatároztam a polipeptidek toxicitását 1 és 24 órás kezelést követően. 1 óra elteltével, hasonlóan a 24 óra után észleltekkkel, a polikationos H_iK és a szabad ε-aminocsoportot (pK_a=10,5) tartalmazó poli[Lys]-t kivéve, nem tapasztaltam toxicitást. A sejtek pusztulása volt megfigyelhető volt a fentieken kívül két vegyület esetében (P_iK és AK), de csak a polipeptidek legnagyobb koncentrációjú oldatainak hatására. Legkevésbé toxikusnak a hosszú oldalláncú amfoter EAK bizonyult. Az oldallánc hosszabbítása, valamint a kevésbé kationos végálló aminosavak jelenléte csökkentette a polipeptidek hatását a J774 sejtek életképességére.

5.3.2. J774 sejtek kemotaxisa

Eredményeim szerint a tíz különböző karakterű polipeptid közül egyik sem idézett elő számottevő kemotaxist a J774 sejtek esetében. Egyedül a H_iK polipeptid viselkedett kis mértékben attraktánsként 0,02 µg/ml koncentrációban. Repellensnek szintén csak egy polipeptid, P_iK viselkedett a legtöményebb koncentrációban (c=20 µg/ml)

A különböző modellsejteken kapott eredményeket összehasonlítva megállapítottam, hogy a J774 sejtek kisebb kemotaktikus aktivitást mutattak a polipeptidek hatására, mint a *Tetrahymena pyriformis* egysejtű. A polilizin gerincű polipeptidek nem befolyásolták számottevően a J774 sejt vonal migrációját, így ebből a szempontból alkalmasak a neutrális makromolekuláris hordozó szerepére.

5.3.3. Polilizin gerincű polipeptidek felvétele J774 sejtekbe

5.3.3.1. Úszó J774 sejtek CF-polipeptid-felvétele

Jellemeztem a jelzett polipeptidek felvételét J774 sejtekbe. A polipeptidek felvétele jelentős mértékben függött a polipeptid töltésétől. A J774 sejtek felvették mind a rövid oldalláncú, (CF-poli[Lys], CF-H_iK és CF-P_iK), mind a hosszú oldalláncú polikationos polipeptideket. Az amfoter CF-E_iK, és CF-EAK esetében nem mutatható ki felvétel.

A konfokális mikroszkóppal készült felvételek alátámasztják a polipeptidek jelenlétét a sejtekben. A polipeptideket tartalmazó vezikulák a sejtek citoplazmájában helyezkednek el, a polilizin pedig egyes sejtek magjában is megfigyelhető volt. Különböző fixálási módszereket összehasonlítva megállapítottam, hogy a 35% etanollal történt fixálás a sejt magban fluoreszcens műtermék megjelenését okozza. A 4% formalinnal történt fixálás esetében műtermék nem keletkezik.

5.3.3.2. Letapadt J774 sejtek polipeptid-felvétele

Hat különböző karakterű polipeptid felvételét tanulmányoztam a kezelés előtt 24 órával letapasztott J774 sejteken. Megállapítottam, hogy a sejtek felvették mind a hat CF-polipeptidet (CF-P_iK, CF-AK, CF-SAK, CF-EAK, CF-Ac-EAK és CF-Succ-EAK). A sejtek által felvett vegyületek egy részénél (CF-P_iK, CF-AK és CF-Succ-EAK) a sejtbe jutott mennyiség a koncentrációval arányosan növekedett, a CF-SAK és CF-Ac-EAK polipeptid viszont csak a legnagyobb (c=20 µg/ml) koncentrációban jutott be a sejtekbe. A letapadt sejtek nagyobb mennyiségben vették fel mind a hat polipeptidet, mint az úszó sejtek.

5.3.3.3. Scavenger receptor szerepe a polipeptidok sejtbe jutásában

A scavenger receptor szerepének tisztázása érdekében három polipeptid, CF-Ac-EAK és CF-Succ-EAK és a polikationos AK felvételét vizsgáltam az ismert scavenger receptor ligand fucoidin jelenlétében. A pozitív kontrollként alkalmazott DiI-AcLDL felvételével igazoltam, hogy a scavenger receptor jelen van az általam vizsgált J774 populáción. Megfigyeltem, hogy a fucoidin 20 µg/ml koncentrációban gátolta mindkét polianionos polipeptid (Ac-EAK és Succ-EAK) felvételét a J774 sejtekbe, a polikationos AK sejtbe jutását azonban nem befolyásolta.

5.4. Polilizin gerincű polipeptidok bejuttatása egér csontvelői eredetű makrofágokba

Vizsgáltam, hogy a polipeptidok oldalláncának különböző módosítása hogyan befolyásolja a különböző polipeptidok felvételét csontvelői eredetű egér makrofágokba, valamint tanulmányoztam a scavenger receptor szerepét a polipeptidok sejtbe jutásában. A kísérletekhez két egértörzsből izolált makrofágokat alkalmaztam: a 129/ICR egerekből és a SR-A -/- egerekből származó sejteket.

5.4.1. A makrofágok túlélése polipeptidok jelenlétében

Meghatároztam a makrofágok túlélését a polipeptidokkal történt 1 órás kezelés után. A 129/ICR egerekből származó makrofágokra nézve 1 µg/ml koncentrációban a vizsgált tíz polipeptid egyike sem bizonyult toxikusnak. 20 µg/ml koncentrációban adva a három polikationos, rövid oldalláncú polipeptid, P_iK, H_iK és poli[Lys] esetében tapasztaltam toxikus hatást, a többi polipeptid nem csökkentette e sejtek életképességét.

5.4.2. Polipeptidok felvétele egér csontvelői makrofágokba

5.4.2.1. A polipeptid-felvétel függése a polipeptid koncentrációtól

Meghatároztam a polipeptidok sejtbe jutásának mértékét 129/ICR egerekből izolált makrofágokon. A polipeptid-felvétel szoros összefüggést mutatott a polipeptid töltésével. A polikationos poli[Lys], H_iK, P_iK, és AK polipeptidok kis koncentrációban (c=1 µg/ml) bejutottak a makrofágokba, a hosszú oldalláncú SAK és TAK polipeptidok csak 10 µg/ml koncentrációban adva jutottak be a sejtekbe. Az amfoter EAK felvétele kis mértékű volt még 100 µg/ml koncentrációban is. A polianionos Ac-EAK csak 100 µg/ml koncentrációban jutott be a makrofágokba, míg a nagyobb töltéssűrűségű, szintén polianionos Succ-EAK esetében a sejtek már 1 µg/ml koncentrációban fel vették a polipeptidet.

5.4.2.2. A polipeptid-felvétel kinetikája

Vizsgáltam a polipeptidek sejtbe jutásának időfüggését. A felvételre jellemző görbe a polipeptid töltésétől és az oldallánc hosszától függetlennek bizonyult. Telítési görbével jellemezhető polikationos polipeptidek felvétele, kivéve a P_iK polipeptidet. A polianionos Ac-EAK-hoz és Succ-EAK-hoz hasonlóan a polipeptid felvétele időben egyenletesen történt.

4.4.2.3. A hőmérséklet csökkentésének hatása a polipeptidek sejtbe jutására

A P_iK, SAK, Ac-EAK és Succ-EAK polipeptidek esetében a sejtek jelentősen nagyobb mennyiségű polipeptidet vettek fel 37°C-on, mint 4°C-on. A polipeptidek sejtbe jutása 4°C-on szoros összefüggést mutatott felvételük kinetikájával: azok a polipeptidek, amelyek felvétele nem mutatott telítődést, nem, vagy csak nagyon kis mértékben jutottak be a sejtekbe 4°C-on.

5.4.2.4. Karboxifluoreszcinnel jelölt polipeptidek felvételének gátlása jelöletlen polipeptiddel

Vizsgáltam jelöletlen polipeptiddel való előkezelés hatását polikationos CF-AK illetve polianionos CF-Succ-EAK felvételére. A jelöletlen polipeptidet a jelölt polipeptidhez képest 10-szeres koncentrációban, fél órával a jelölt polipeptid hozzáadása előtt adtam a sejtekhez. A polikationos AK polipeptid felvételét nem gátolta sem a jelöletlen AK polipeptid, sem a hasonló karakterű SAK polipeptid. A polianionos Succ-EAK polipeptid esetében azonban azt tapasztaltam, hogy a jelöletlen Succ-EAK, valamint a szintén polianionos Ac-EAK jelenléte a médiumban csökkentette a CF-Succ-EAK felvételét a makrofág sejtekbe.

5.4.3. A scavenger receptor szerepe a polipeptidek felvételében

Vizsgáltam a scavenger receptorok, ezen belül is az SR-A szerepét a polipeptidek felvételében. Kísérleteimben két primer makrofág kultúrát használtam: a scavenger receptorra nézve vad típusú 129/ICR és a génkiütött SR-A -/- egerek csontvelőjéből izolált makrofágokat. A polianionos polipeptidek esetében jelentős különbséget tapasztaltam a SR-A-t expresszáló 129/ICR makrofágok, és a között. Az SR-A -/- sejtek nem (Succ-EAK), vagy csak kis mértékben vették fel (Ac-EAK) a polianionos vegyületeket, míg a Succ-EAK polipeptid nagy mennyiségben jutott be a vad típusú makrofágokba.

A polikationos polipeptidek között találtam olyan vegyületeket, mint poli[Lys], H_iK és AK, amelyek nagy mennyiségben bejutnak a vad típusú sejtekbe, ám a SR-A -/- sejtek jelentősen kisebb mértékben veszik fel őket.

Amennyiben a scavenger receptort a scavenger receptor ligand poli(I)-val (SR-A, C, E, F) vagy SR-A specifikus monoklonális ellenanyaggal (2F8) blokkoltam, a polianionos polipeptidek felvétele mindkét sejttípus esetében jelentősen csökkent.

5.5. Polilizin gerincű polipeptidek kölcsönhatása foszfolipid modellmembránokkal

Tanulmányoztam különböző töltésviszonyokkal rendelkező polipeptidek különböző összetételű modell membránnal való kölcsönhatását. Ehhez két fluoreszcens jelzőanyagot építettem a foszfolipid kettősrétegbe: a TMA-DPH (1-(4-timetil-ammóniumfenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrién *p*-toluol-szulfonsav) hidrofil csoportot hordoz, így a foszfatid-régióba, míg a DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrién) hidrofób molekula az alkiláncok közé épül be. Megállapítottam, hogy az amfoter DPPC kettősrétegek esetében az amfoter karakterű E_iK polipeptid nagymértékű fluiditásnövekedést idézett elő az alkiláncok régiójában. A polikationos polipeptidek (P_iK, H_iK) kismértékű kölcsönhatásba léptek a DPPC liposzómákkal, a két polipeptid a T < T_c hőmérséklettartományban kis mértékben stabilizálta a DPPC liposzómákat. A DPPC liposzómák külső régiójával egyik polipeptid sem lépett jelentős mértékű kölcsönhatásba. Azt is észleltem, hogy a H_iK polipeptid az anionos foszfolipidet tartalmazó DPPC:PG=80:20 liposzómák belső és külső régiójával is kölcsönhatásba lépett. A polikationos TAK és a polianionos Succ-EAK a membrán fluiditásának kismértékű változását idézte elő a DPPC:PG=80:20 kettősréteg külső régiójában, míg a P_iK polipeptid csak az alkiláncok rétegében okozta a fluiditás csökkenését. Az amfoter E_iK nem befolyásolta a DPPC:PG=80:20 kettősréteg fluiditását.

RÖVIDÍTÉSEK

| | |
|-------------------------------|--|
| Ac | acetyl |
| ACTH | adenokortikotrop hormon |
| AXK | poli[Lys(DL-Ala _m -X _i)], ahol X természetes aminosav |
| BSA | bovine serum albumin, marha-szérumalbumin |
| BVVS | birka-vörösvérsejt |
| cAD | <i>cisz</i> -akonitil daunomicin |
| CF | 5(6)-karboxifluoreszcein |
| Ch_{sel} | kemotaktikus szelekciós hányados |
| CR | komplement-receptor |
| Dau | daunomicin |
| DiI | 1,19-dioctadecil-1-3,3,3',3'-tetrametil-indokarbocianin perklorát |
| DIVEMA | divinil-éter–maleinsav-anhidrid kopolimer |
| DMF | <i>N, N</i> -dimetil formamid |
| DPH | 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién |
| DP_n | a polipeptidek átlagos polimerizációfoka |
| DPCC | dipalmitoil-foszfatidilkolin |
| DTH | Delayed type hypersensitivity, késői típusú túlérzékenységi reakció |
| EPR | enhanced permeability and retention |
| ET-1, 2, 3 | endotelin-1, 2, 3 |
| FACS | fluorescence-activated cell sorter, áramlási citométer |
| F_cR | F _c -receptor |
| FGF | fibroblast growth factor, fibroblaszt növekedési faktor |
| GM-CSF | granulocita-monocita növekedési factor |
| GnRH | gonadotropin releasing hormon |
| HDL | high density lipoprotein |
| HIV | humán immundeficiencia vírus |
| HPLC | nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia |
| HPMA | <i>N</i> -(2-hidroxi-propil)-metakrilamid |
| HSV | Herpes simplex vírus |
| ICAM | intercellular cell adhesion molecule, sejtek közötti adhézións molekula |
| IFNγ | interferon γ |
| IL-1, 4, 6, 8, 10, 12, | Interleukin-1, 4, 6, 8, 10, 12 |
| iNOS | indukálható nitrogén-oxid szintáz |
| KLH | keyhole limpet hemocyanin |
| LCM | L-sejt kondicionált medium |
| LDL | low density lipoprotein |
| LFA | leukocita funkcionális antigén |
| LPS | lipopoliszaharid |
| mal | maleil |

| | |
|-----------------------|--|
| MARCO | <i>macrophage receptor with collagenous domen</i> , kollagén-doménnel rendelkező makrofág receptor |
| MBL | mannan binding lectin, mannánkötő lektin |
| MCP-1 | macrophage chemoattractant protein-1, makrofág kemoattraktáns fehérje |
| MDR1, MRP1 | Multidrog rezisztenciáért felelős transzmembrán transzportfehérjék |
| MHC | major histocompatibility complex, fő hisztokompatibilitási komplex |
| MTT | 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid |
| \bar{M}_w | A polipeptidek átlagos molekulatömege |
| Ox | oxidált |
| PAMP | pathogen associated molecular patterns, patogénhez kötődő molekuláris mintázatok |
| PBS | phosphate buffered saline, foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat |
| PEG | poli-etilén-glikol |
| PG | foszfatidil-glicerin |
| poli[Glu] | poliglutaminsav |
| poli[Lys] | polilizin |
| poli[Tyr] | politirozin |
| poliA | poliadenilsav |
| poliC | policitidilsav |
| poliG | poliguanilsav |
| poliI | poliinozilsav |
| poliU | poliuracilsav |
| PRR | pattern recognition receptor, „mintázatfelismerő receptor” |
| SOD | szuperoxid diszmutáz |
| SR | scavenger receptor |
| SR-A | A típusú scavenger receptor |
| SREC | scavenger receptor expressed by endothelial cells, endotél sejteken található scavenger receptor |
| Succ | szukcinil |
| T_c | a foszfolipid membrán átcsapási hőmérséklete |
| TFA | trifluor-ecetsav |
| TGFβ | transforming growth factor β |
| T_H1 | T-helper 1 sejt |
| T_H2 | T-helper 2 sejt |
| TLR | Toll-like receptor, Toll-szerű receptor |
| TMA-DPH | 1-(4-trimetil-ammónium-fenil)-6-fenil-1,3,5,-hexatrién |
| TNF | tumor nekrosis factor |
| VEGF | vaszkuláris-endoteliális növekedési faktor |
| VSV | Vezikuláris sztomatitisz vírus |
| XAK | poli[Lys(X _i -DL-Ala _m)], ahol X természetes aminosav |
| X_iK | poli[Lys(X _i)], ahol X természetes aminosav |

IRODALOMJEGYZÉK

Abraham, R. Singh, N., Mukhopadhyay, A., Basu, S.K., Baal, V., Rath, S. Modulation of immunogenicity and antigenicity of proteins by maleylation to target scavenger receptors on macrophages. *J. Immunol.* (1995) 154: 1-8

Abraham, R., Choudhury, A., Basu, S.K., Baal, V., Rath, S. Disruption of T cell tolerance by directing a self antigen to macrophage-specific scavenger receptors. *J. Immunol.* (1997) 158: 4029-4035

Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., Inoue, K., Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* (1997) 272: 31217-31220

Aderem, A., Underhill, D. M.. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* (1999) 17: 593-623

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. Molecular Biology of the Cell, (1994) 3. kiadás; New York, London. Garland Publishing

Alexander, J., Satoskar, A. R., Russell, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.* (1999) 112: 2993-3002

Amer, A. O., Swanson, M. S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in macrophage. *Curr. Opin. Microbiol.* (2002) 5: 56-61

Bar-Shavit, R., Kahn, A., Fenton, J. W., Wilner, G. D. Receptor mediated chemotactic response of a macrophage cell line (J774) to thrombin. *Lab. Invest.* (1983) 46: 702-707

Basu, S. K. Receptor mediated endocytosis of macromolecular conjugates in selective drug delivery. *Biochem. Pharmacol.* (1990) 40: 1941-1946

Bello Roufaï, M., Midoux, P. Histidylated polylysine as DNA vector: elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes. *Bioconjugate Chem.* (2001) 12: 92-99

Bellocq, N. C., Pun, S. H., Jensen, G. S., Davis, M. E. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery *Bioconjugate Chem.* (2003) 14: 1122-1132

Bermudez, L. E., Parker, A., Goodman, J. R. Growth within macrophages increases the efficiency of *Mycobacterium avium* in invading other macrophages by a complement receptor-independent pathway. *Infect. Immun.* (1997) 65: 1916-1925

Bourke, S. L., Kohn, J. Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polyacarbonates, polyatylates and copolymers with poly(ethylene glycol). *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2003) 55: 447-466

Brasseur, N., Langlois, R., La Madeleine, C., Ouellet, R., van Lier, J.E. Receptor-mediated targeting of phtalocyanines to macrophages via covalent coupling to native or maleylated bovine serum albumin. *Photochem. Photobiol.* (1999) 69: 345-352.

Brown, M. S., Goldstein, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage – implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* (1983) 52: 223-261

Chan, P.Y., Lawrence, M.B.,Dustin, M.L., Ferguson, L.M., Golan, D.E., Springer, T.A. Influence of receptor lateral mobility on adhesion strengthening between membranes containing LFA-3 and CD2. *J. Cell. Biol.* (1991) 115: 245-255,

Christopher, G. K., Sundermann, C. A. Isolation and partial characterization of the insulin binding sites of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1995) 212: 515-523

Claus, V., Jahraus, A., Tjelle, T., Berg, T., Kirschkei, H., Faulstich, H., Griffiths, G. Lysosomal Enzyme Trafficking between Phagosomes, Endosomes, and Lysosomes in J774 Macrophages. *J. Biol.Chem.* (1998) 273: 9842–9851

Clegg, J. A., Hudecz, F., Mező, G., Pimm, M. V., Szekerke, M., Baldwin, R. W. Carrier design: biodistribution of branched chain polypeptides with poly(L-lysine) backbone. *Bioconjugate Chem.* (1990) 2: 425-430

Csaba, Gy. Hormonal imprinting: its role during the evolution and development of hormones and receptors. *Cell Biol. Int.* (2000) 24: 407-414

Csaba, Gy. Phylogeny and ontogeny of chemical signalling: origin and development of hormone receptors. *Int. Rew. Cytol.* (1994) 155: 3-48

De Villiers, W. J. S., Fraser, I. P., Gordon, S. Cytokine and growth factor regulation of macrophage scavenger receptor expression and function. *Immunol. Lett.* (1994) 43: 73-79

De Vries, H., Moor, A. C. E., Dubbelman, T. M. A. R., Van Berkel, T. J. C., Kupier, J. Oxidized low-density lipoprotein as a delivery system for photosynthetizers: implications for photodynamic therapy of atherosclerosis. *J. Pharm. Exp. Ther.* (1999) 289: 528-534

Dias, N., Nicolau, A., Carvalho, G. S., Mota, M., Lima, N. Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *J. Basic Microbiol.* (1999) 39: 103-108

Duncan, R., Kopečková-Rejmanova, P., Strohalm, J., Hume, I., Cable, H. C., Pohl, J., Lloyd, J. B., Kopecek, J. Anticancer agents coupled to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. I. Evaluation of daunomycin and puromycin conjugates in vitro. *Br. J. Cancer* (1987) 55: 165-74

Falus, A. Az immunológia élettani és molekuláris alapjai, második kiadás (1998) Semmelweis Kiadó, Budapest

-
- Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* (2001) 108: 785–791
- Fillion, I., Ouellet, N., Simard, M., Bergeron, Y., Sato, S., Bergeron, M. G. Role of chemokines and formyl peptides in pneumococcal pneumonia-induced monocyte/macrophage recruitment. *J. Immunol.* (2001) 166: 7353-61
- Fraser, I., Hughes, D. A., Gordon, S. Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature* (1993) 364: 343-346
- Freeman, M. Scavenger receptors in atherosclerosis. *Curr. Opin. Hematol.* (1997) 4: 41-47
- Gaál, D., Hudecz, F. Low toxicity and high antitumour activity of daunomycin ba conjugation to an immunopotential amphoteric branched polypeptide. *Eur. J. Cancer* (1998) 34:155-161
- Gaál, D., Hudecz, F., Szekerke, M. Immunomodulatory effect of synthetic branched polypeptides I. *J Biol Response Mod.* (1984) 3: 174-84.
- Gergely, J., Erdei, A., Rajnavölgyi, É., László, G., Sármay, G., et al. Immunobiológia Szerk: Gergely J., Erdei, A. (1998), Medicina Könyvkiadó, Budapest
- Gough, P. J., Gordon, S. The role of scavenger receptors in innate immune system. *Microbes Infect.* (2000) 2: 305-311
- Greenberg, S., Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* (2002) 14: 136–145
- Haworth, R., Platt, N., Keshav, S., The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J. Exp. Med.* (1997) 186: 1431–1439
- Hegyesi, H., Csaba, Gy. A calcium-dependent protein kinase is present in *Tetrahymena*. *Cell Biochem. Funct.* (1994) 12: 221-226
- Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E., Kubes, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J. Cell. Biol.* (2002) 159: 91-102
- Hostetter, J., Steadham, E., Haynes, J., Bailey, T., Cheville, N. Phagosomal maturation and intracellular survival Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in J774 cells. *CIMID* (2003) 26: 269-283
- Hudecz, F. Design of synthetic branched-chain polypeptides as carriers for bioactive molecules. 1995. *Anti-Cancer Drugs* 6: 171-193

Hudecz, F., Gaál, D., Kurucz, I., Lányi, Á., Mező, G., Rajnavölgyi, É., Szekerke, M. Carrier design: cytotoxicity and immunogenicity of synthetic branched polypeptides with poly(L-lysine) backbone. *J. Controlled Release* (1992) 19: 231-244

Hudecz, F., Hilbert, Á., Mező, G., Mucsi, I., Kajtár, J., Bősze, Sz., Kurucz, I., Rajnavölgyi, É. Epitope mapping of the region of HSV glycoprotein D by synthetic branched polypeptide carrier conjugates. *Peptide Research* (1993) 6: 263-271

Hudecz, F., Kutassi-Kovács, S., Kajtár, J. GPC, CD and sedimentation analysis of polylysine and branched chain poly-Lys–poly-DL-Ala polypeptides, *Colloid Polym. Sci.* (1984) 262: 208–212.

Hudecz, F., Pimm, M. V., Rajnavölgyi, É., Mező, G., Fabra, A., Gaál, D., Kovács, A. L., Horváth, A., Szekerke, M. Carrier design: new generation of polycationic branched polypeptides containing OH groups with prolonged blood survival and diminished in vitro cytotoxicity. *Bioconjugate Chem.* (1999) 10: 781-790

Hudecz, F., Reményi, J., Szabó, R., Kóczán, Gy., Mező, G., Kovács, P., Gaál, D. Drug targeting by macromolecules without recognition unit? *J. Mol. Recognit.* (2003) 16: 288–298

Hudecz, F., Szekerke, M. Investigation of drug-protein interactions and the drug-carrier concept by the use of branched polypeptides as model systems. Synthesis and characterisation of model peptides. *Coll. Czech Chem. Commun.* (1980) 45: 933-940

Hudecz, F., Votavova, H., Gaál, D., Sponar, J., Kajtár, J., Blaha, K., Szekerke, M. Branched polypeptides with a poly(L-lysine) backbone: synthesis, conformation, and immunomodulation. 1985. In: *Polymeric Materials in Medication* (Ch. G. Gebelein and Ch. E. Carraher, Eds.) pp 265-289, Plenum Press, New York

Hughes, D. A., Fraser, I. P., Gordon, S. Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* (1995) 25: 466-473

Illyés, E., Bősze, Sz., Láng, O., Sebestyén, F., Kőhidai, L., Hudecz, F. A new class of chemotactic peptides containing EWS motif: A mini-review. *Chimica Oggi* (2002b) 7: 55-61

Illyés, E., Láng, O., Kőhidai, L., Sebestyén, F., Hudecz, F. Synthesis of SXWS peptides and their chemotactic activity on a ciliated prorozoan, *Tetrahymena pyriformis*. *J. Peptide Sci.* (2002a) 8: S202

IUPAC-IUB Commision on biochemical nomenclature. *Eur. J. Biochem.* (1984) 138: 9-37

Jensen, K. D., Nori A., Tijerina M., Kopečková P., Kopeček, J.. Cytoplasmic delivery and nuclear targeting of synthetic macromolecules. *J. Controlled Release* (2003) 87: 89–105

Johannes, L., Lamaze, C. Clathrin-dependent or dot: is it still the question? *Traffic* (2002) 3:443 –451

Kóczán, G., Ghoose, A. C., Mookerjee, A., Hudecz, F. Methotrexate conjugate with branched polypeptide influences *Leishmania donovani* infection *in vitro* and in experimental animals. *Bioconjugate Chem.* (2002) 13: 518-524

Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P., Krieger, M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils, *Nature* (1990) 343: 531–535.

Kóhidai, L. A kemotaxis biológiai és klinikai jelentősége. Egyetemi Jegyzet, Semmelweis Egyetem, 2000

Kóhidai, L. Method for determination of chemoattraction in *Tetrahymena pyriformis*. *Curr. Microbiol.* (1995) 30: 251-253

Kóhidai, L., Bánky, Cs., Csaba, Gy. Comparison of lectin induced chemotactic selection and chemical imprinting in *Tetrahymena pyriformis*. *Acta Protozool.* (2003a) 42: 91-97

Kóhidai, L., Bősze, Sz., Soós, P., Illyés, E., Láng, O., Mák, M., Sebestyén, F., Hudecz, F. Chemotactic activity of oligopeptides containing an EWS motif on *Tetrahymena pyriformis*: the effect of amidation of the C-terminal residue. *Cell. Biochem. Funct.* (2003d) 21: 113–120

Kóhidai, L., Csaba, Gy. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines IL-8, RANTES and TNF α in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine* (1998) 10: 481-486

Kóhidai, L., Katona, J., Csaba, Gy. Effects of steroid hormones on five functional parameters of *Tetrahymena*: evolutionary conclusions. *Cell Biochem Funct.* (2003b) 21: 19–26

Kóhidai, L., Kovács, K., Csaba, Gy. Direct chemotactic effect of bradykinin and related peptides – significance of amino- and carboxyterminal character of oligopeptides in chemotaxis of *Tetrahymena pyriformis*. *Cell. Biol. Int.* (2002b) 26: 55-62

Kóhidai, L., Kovács, P., Csaba, Gy. Chemotaxis of the unicellular green alga *Dunaliella salina* and the ciliated *Tetrahymena pyriformis* – effects of glycine, lysine and alanine and their oligopeptides. *Bioscience Reports* (1996) 16: 467-476

Kóhidai, L., Schiess, N., Csaba, Gy. Chemotactic selection of *Tetrahymena pyriformis* GL induced with histamine, di-iodotyrosine or insulin. *Comp. Biochem. Physiol.* (2000) 126: 1-9

Kóhidai, L., Soós, P., Csaba, Gy. Effects of peptides containing the amino acid proline on the chemotaxis of *Tetrahymena pyriformis*. Evolutionary conclusions on the formation of hormone receptors and hormones. *Cell. Biol. Int.* (1997) 21: 341-345

Kóhidai, L., Török, K., Illyés, E., Tamási, J., Sebestyén, F., Láng, O., Csaba, Gy., Hudecz, F. Characterization of chemotactic ability of peptides containing N-formyl-methionyl residues in *Tetrahymena* fMLP as a targeting ligand. *Cell. Biol. Int.* (2003c) 27: 695-700

-
- Kőhidai, L., Tóth, K., Ruskoaho, H., Csaba, Gy. Effect of vasoactive peptides on *Tetrahymena*. Chemotactic properties of endothelins (ET-1, ET-2, ET-3, fragment 11-21 of ET-1 and big endothelin-1): short term inducible signalling mechanism of chemotaxis. *Cell. Biol. Int.* (2001) 25: 1173-1177
- Kőhidai, L., Vakkuri, O., Keresztesi, M., Leppäluoto, J., Csaba, Gy. Melatonin in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*: effect of different lighting conditions. *Cell. Biochem. Funct.* (2002a) 20: 269-272
- Kopp, E., Medzhitov, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors *Curr. Opin. Immunol.* (2003) 15: 396-401
- Kovács, P., Csaba, Gy. Involvement of the phosphoinositol (PI) system in the mechanism of hormonal imprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1990) 170: 119-126
- Kovács, P., Sundermann, C. A., Csaba, G. Investigations of receptor-mediated phagocytosis by hormone-induced (imprinted) *Tetrahymena pyriformis*. *Experientia* (1996) 52: 769-773
- Kraal, G., van der Laan L. J. W., Elomaa, O., Tryggvason, K. The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect.* (2000) 2: 313-316
- Krieger, M. Charting the fate of the “good cholesterol”: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* (1999). 68: 523-558
- Krieger, M., Herz, J. Structures and function of multiligand lipoprotein receptors – macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Ann. Rev. Biochem.* (1994) 63: 601-637
- Kügler, S., Schüller, S., Goebel, W. Involvement of MAP-kinases and -phosphatases in uptake and intracellular replication of *Lysteria monocytogenes* in J774 macrophage cells. *FEMS Microbiol. Lett.* (1997) 157: 131-136
- Kuhry, J-G., Duportail, G., Bronner, C., Laustriat, G. Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumhexatriene. *Biochim. Biophys. Acta* (1985) 845: 60-67
- Lehrer, R. I. Ganz, T. Defensins of vertebrate animals *Curr. Opin. Immunol.* (2002) 14: 96-102
- Lenhoff, H. M. On the mechanism of action and evolution of receptors associated with feeding and digestion. In: „*Coelenterate Biology*” (Eds: L. Muscantine, H. M. Lenhoff) (1974) pp. 238-239
- Li, C. Poly(L-glutamic acid) – anticancer drug conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2002) 54: 695-713

Liang-Takasaki, C-J., Mäkelä, P. H., Leive, L. phagocytosis of bacteria by macrophages: changing the carbohydrate of lipopolysaccharide alters interaction with complement and macrophages. *J. Immunol.* (1982) 128: 1229-1235

Linehan, S. A., Martínez-Pomares, L., Stahl, P. D., Gordon, S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and non-lymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J. Exp. Med.* (1999) 189: 1961-72

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. *Molecular Cell Biology*, (2000) 4. kiadás, W. H. Feeman, New York.

Lothstein, L., Israel, M., Sweatman, T. W. Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear – a fork in the road. *Drug. Resist. Update* (2001) 4: 169-177

Majumdar, S. and Basu, S.K. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by receptor-mediated drug delivery. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (1991) 35: 135-140

Mankerz, J., Nündel, M., von Baeyer, H., Riedel, E. Low density lipoprotein in the therapy of macrophage-associated diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) 240: 112-115

Mann, D. A., Frankel, A. D. Endocytosis of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* (1991) 10: 1733-1739

Mansfield, P. J., Suchard, S. J. Thrombospondin promotes chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* (1994) 153: 4219-4229

Martínez-Pomares, L., Mahoney, J. A., Káposzta, R., Linehan, S. A., Stahl, P. D., Gordon, S. A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages *in vitro* and is present in mouse serum. *J. Biol.Chem.* (1998) 273: 23376–23380

Matsumoto, A., Naito, M., Itakura, H., Ikemoto, S., Asaoka, H., Hayakawa, I., Kanamori, H., Aburatani, H., Takaku, F., Suzuki, H., Kobari, Y., Miyai, T., Takahashi, K., Cohen, E. H., Wydro, R., Hausman, D. E., Kodama, T. Human macrophage scavenger receptors: Primary structure, expression and localization in atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87: 9133-9137

McCloskey, M. A., Fan, Y., Luther, S. Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J. Immunol.* (1999) 163: 970-977

McKay, T., Reynolds, P., Jezzard, S., Curiel, D., Coutele, C. Secretin-Mediated Gene Delivery, a Specific Targeting Mechanism with Potential for Treatment of biliary and pancreatic disease in cystic fibrosis. *Mol. Therap.* (2002) 5: 447-454

Mező, G, Mező, I., Pimm, M. V., Kajtár, J., Seprődi, J., Teplán, I., Kovács, M., Vincze, B., Pályi, I., Idei, M., Szekerke, M., Hudecz, F. Synthesis, conformation, biodistribution, and

hormone-related *in vitro* antitumor activity of a gonadotropin-releasing hormone antagonist-branched polypeptide conjugate. *Bioconjugate Chem.* (1996) 7: 642-650

Mező, G., de Oliveira, E., Kirkorian, D., Fejlbrieff, M., Jakab, A., Tsikaris Sakarellos, C., Welling-Wester, S., Andreu, D., Hudecz, F. Synthesis and comparison of antibody recognition of conjugates containing Herpes simplex virus type 1 glycoprotein D epitope VII. *Bioconjugate Chem.* 14 (2003) 1260-1269

Mező, G., Kajtár, J., Hudecz, F., Szekerke, M. Carrier design: Conformational studies of amino acid (X) and oligopeptide (X-DL-Ala_m) substituted poly(L-lysine). *Biopolymers* (1993) 33: 873-885

Monner, D. A. An assay for growth of mouse bone marrow cells in microtiter liquid culture using tetrazolium salt MTT, and its application of studies of myelopoiesis. *Immunol. Lett.* (1998) 19: 261-268

Mukhopadhyay, A., Chaudhuri, G., Arora, S K., Sehgal, S., Basu, S. K. Receptor-mediated delivery to macrophages in chemotherapy of leishmaniasis. *Science* (1989) 2: 705-707

Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, B., Srivastava, R. K., Basu, S. K. Scavenger-receptor mediated delivery of daunomycin elicits selective toxicity towards neoplastic cells of macrophage lineage. *Biochem. J.* (1992) 284: 237-241

Nabi, I. R., Le, P. U. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* (2003) 161: 673-677

Nagy I. B., Alsina, M. A., Haro, I., Reig, F., Hudecz, F. Interaction of branched polymeric polypeptides with phospholipid model membranes. *Biopolymers* (1998) 46: 169-179

Nagy, I. B., Alsina, M. A., Haro, I., Reig, F., Hudecz, F. Phospholipid model membrane interactions with branched polypeptide conjugates of a Hepatitis A virus peptide epitope. *Bioconjugate Chem.* (2000) 11: 30-38

Nagy, I. B., Hudecz, F., Alsina, M. A. Reig, F. Physicochemical characterization of branched chain polymeric polypeptide carriers based on a poly-lysine backbone. *Biopolymers* (2003) 70: 323-335

Naito, M., Kodama, T., Matsumoto, A., Doi, T., Takahashi, K. Tissue distribution, intracellular localization, and *in vitro* expression of bovine macrophage scavenger receptors. *Am. J. Pathol.* (1991) 139: 1411-1423

Pearce F. A., Roy, P., Nicholson, A. C., Hajjar, D. P., Febbraio, M., Silverstein, R. L. Recombinant glutathione S-transferase/CD36 fusion proteins define an oxidized low density lipoprotein-binding domain. *J. Biol. Chem.* (1998) 273: 34875-34881

Pearson, A., Lux, A., Krieger, M. Expression cloning of dSR-CI a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 4056-4060

Peiser, L., Gordon, S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect.* (2001) 3: 149-159

Peiser, L., Gough, P.J., Kodama, T., Gordon, S. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: Role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions *in vitro*. *Infect. Immun.* (2000) 68: 1953-1963

Peiser, L., M. de Winther, P. J., Makepeace, K., Hollinshead, M., Coull, P., Plested, J., Kodama, T., Moxon, E. R., Gordon, S.. The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses. *Infect. Immun.* (2002a) 70: 5346–5354

Peiser, L., Mukhopadhyay, S., Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* (2002b) 14: 123-128

Pike, L.J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* (2004) 378, 281–292

Pimm, M. V., Gribben, S. J., Bogdán, K., Hudecz, F. The effect of charge on the biodistribution in mice of branched polipeptides with poli(L-lysine) backbone labelled with ¹²⁵I, ¹¹¹In or ⁵¹Cr. *J. Controlled Release* (1995) 37:161-172

Prasad, V., Hashim, S., Mukhopadhyay, A., Basu, S. K., Roy, R. P. Oligonucleotides tethered to a short polyguanylic acid stretch are targeted to macrophages: Enhanced antiviral activity of a vesicular stomatitis virus-specific antisense oligonucleotide. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 2689-2696

Przybylski, M., Zaharko, D. S., Chirigos, M. A., Adamson, R. H., Schultz, R. M., Ringsdorf, H. DIVEMA-methotrexate: immune-adjuvant role of polymeric carriers linked to antitumor agents. *Cancer Treat Rep.* (1978) 62: 1837-43

Rajnavölgyi, É., Hudecz, F., Mező, G., Szekerke, M., Gergely, J. Isotype distribution and fine specificity of the antibody response of inbred mouse strains of four compounds belonging to of a new group of synthetic branched polypeptides. *Mol. Immunol.* (1986) 23: 27-37

Rajnavölgyi, É., Hudecz, F., Mező, G., Watari, E., Heber-Katz, E., Gaál, D., Kurucz, I., Szekerke, M., Gergely, J. Synthetic branched polypeptides as carriers for low- molecular weight antigens: Correlation between chemical structure and biological functions. *Chimica Oggi* (1990) 8: 21-29

Ralph, P., Nakoinz, I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* (1975) 257: 393-394

Reményi, J. Daunomicin tartalmú konjugátumok kémiai és biológiai jellemzése. *PhD dolgozat* (2003)

Reményi, J., Balázs, B., Tóth, S., Falus, A., Tóth, G., Hudecz, F. Isomer-dependent daunomycin release and in vitro antitumour effect of cis -aconityl-daunomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 303: 556–561

Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., Lebleu, B. Cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* (2003) 278: 585-590

Sandor, F., Lack, E., Re, F., Mandell, L., Repik, G., Golenbock, D. T., Espevik, T., Kurt-Jones, E. A., Finberg, R. W. Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NF κ B signaling. *J. Cell. Biol.* (2003) 162: 1099-1110

Sautebin, L., Ianaro, A., Rombolà, L., Ialenti, A., Sala, A., Di Rosa, M. Cyclooxygenase-2-dependent generation of 8-epiprostaglandin F2a by lipopolysaccharide-activated J774 macrophages. *Inflamm. Res.* (1999) 48: 503-508

Schlosser, G., Takáts, Z., Mező, G. Hudecz, F., Vékey, K. Polylysine characterisation using mass spectrometry. *J. Peptide Sci.* (2002) 8: S139

Seymour L. W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* (1992) 9: 135-87

Shinitzky, N., Barenholz, Y. Fluorescence parameters of lipid regions determined by fluorescence polarisation. *Biochim. Biophys. Acta* (1978) 515: 367-394

Singh, N., Bhatia, S., Abraham, R., Basu, S. K., George, A., Bal, V., Rath, S. Modulation of T cell cytokine profiles and peptide-MHC complex availability in vivo by delivery to scavenger receptors via antigen maleylation. *J. Immunol.* (1998) 160: 4869–4880

Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cyn-shi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Horiuchi, S., Takahashi, K., Kruijt, J. K., VanBerkel, T. J. C., Steinbrecher, U.P., Ishibashi, S., Maeda, N., Gordon, S., Kodama, T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* (1997) 386: 292–296

Takaura, Y., Hashida, M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Clin. Rev. Oncol.* (1995) 18: 207-231

Tsuji, T., Kawada, Y., Kai-Murozono, M., Komatsu, S., Han, S. A., Takeuchi, K., Mizushima, Miyazaki, K., Irimura, T. Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and alpha3beta1 integrin (VLA-3). *Clin. Exp. Metastasis* (2002) 19: 127-134

Tung, C-H. Weissleder, R. Arginine containing peptides as delivery vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2003) 55: 281–294

Vaidyay, S. A., Cheng, G. Toll-like receptors and innate antiviral responses. *Curr. Opin. Immunol.* (2003) 15: 402–407

Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Cell. Biol.* (1997) 25: 1610-1617

Voyta, J.C. Via, D. P., Butterfield, C. E., Zetter, B. R. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Biol.Chem.* (1984) 99: 2034-2040

Ward, C. M., Read, M. L., Seymour, L. W. Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood* (2001) 97: 2221-2229

Wiedermann, C. J., Reinisch, N., Bellmann, R., Schratzberger, P., Kowald, E., Kahler, C. M. Different patterns of deactivation of chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood mononuclear leukocytes by soluble and surface-bond attractants. *J. Leukoc. Biol.* (1995) 58: 438-444

Wilkinson, K. A., Hudecz, F., Vordermeier, M. H., Ivanyi, J., Wilkinson, R. J. Enhancement of the T-cell response to a mycobacterial peptide by conjugation to synthetic branched polypeptide. *Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2788-2796

Wong, K., Qiu, Y., Hyun, W., Nixon, R., VanCleave, J., Sanchez-Salazar, J., Prusiner, S. B., DeArmond, S. J. Decreased receptor-mediated calcium response in prion-infected cells correlates with decreased membrane fluidity and IP3 release. *Neurology* (1996) 47: 741-750

Wu, G. Y., Wu, C. H. Evidence for targeted gene delivery to HepG2 cells in vitro. *Biochemistry* (1988) 27: 887-892

TARTALOM

| | |
|--|-----------|
| Köszönetnyilvánítás | 2 |
| Bevezetés | 4 |
| 1. Irodalmi áttekintés | 6 |
| 1.1. Kis molekulájú hatóanyagok célbajuttatása makromolekuláris hordozó segítségével | |
| 1.1.1. A makromolekuláris hordozók csoportosítása | 7 |
| 1.1.2. Polilizin gerincű polipeptidok mint makromolekuláris hordozók..... | 9 |
| 1.1.2.1. A polipeptidok szintézise és kémiai jellemzése | 11 |
| 1.1.2.2. A polipeptidok biológiai tulajdonságai | 11 |
| 1.1.3. A polipeptid konjugátumok biológiai hatása | 15 |
| 1.1.3.1. Tumorellenes hatóanyagot tartalmazó polipeptid konjugátumok. | 15 |
| 1.1.3.2. Eritropoietin peptid kapcsolása polilizin gerincű polipeptidokhoz | 16 |
| 1.1.3.3. Nukleinsavak sejtbe juttatása polilizin gerincű polipeptid vektor segítségével | 17 |
| 1.2. A kemotaxis | 18 |
| 1.2.1. A kemotaxis jelentősége..... | 18 |
| 1.2.2. A kemotaxis alapfogalmai..... | 19 |
| 1.2.3. Tetrahymena: a sejtélettani vizsgálatok kedvelt modellje..... | 19 |
| 1.2.3.1. A Tetrahymena pyriformis GL: a kemotaxis-kísérletek modellje | 20 |
| 1.3. Az endocitózis | 23 |
| 1.4. A hivatásos fagocita sejtek..... | 25 |
| 1.4.1. A makrofágok..... | 25 |
| 1.4.1.1. A makrofágok fagocitózisa | 26 |
| 1.4.1.2. A makrofágok effektorfunkciói | 29 |
| 1.4.1.3. A makrofágok szerepe az adaptív immunválasz során | 30 |
| 1.4.2. A makrofágok mintázatfelismerő receptorai..... | 32 |
| 1.4.2.1. Mannóz receptor..... | 32 |
| 1.4.2.2. Toll-szerű receptorok | 32 |
| 1.4.2.3. Scavenger receptorok | 33 |
| 1.5. Hatóanyagok specifikus célbajuttatása makrofágokba | 38 |
| 1.5.1. A makrofágokban élősködő kórokozók | 38 |
| 1.5.2. Hatóanyagok specifikus célbajuttatása makrofágokba scavenger receptoron keresztül | 39 |
| 2. Célkitűzések | 42 |
| 3. Kísérleti rész | 44 |
| 3.1. Sejtek | 44 |
| 3.1.1. Tetrahymena pyriformis | 44 |
| 3.1.2. J774 sejtvonal | 44 |
| 3.1.3. A csontvelői eredetű egér makrofágok | 44 |
| 3.2. Anyagok | 45 |
| 3.2.1. Polipeptidok..... | 45 |
| 3.2.2. Reagensok, oldószerek | 45 |
| 3.2.3. Foszfolipidek..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. Módszerek | 46 |
| 3.3.1. Anionos és jelzett polipeptidek előállítása | 46 |
| 3.3.1.1. Ac-EAK előállítása | 46 |
| 3.3.1.2. Succ-EAK előállítása | 46 |
| 3.3.1.3. Polipeptidek jelölése 5(6)-karboxifluoreszceinnel..... | 46 |
| 3.3.1.4. A jelölt polipeptidek karboxifluoreszcein-tartalmának meghatározása | 47 |
| 3.3.2. A polipeptidekkel kezelt sejtek túlélésének meghatározása | 47 |
| 3.3.2.1. A polipeptidek toxicitása Tetrahymena és J774 sejtekre | 47 |
| 3.3.2.2. A polipeptidek toxicitása egér csontvelői makrofágokra | 48 |
| 3.3.3. Kemotaxis meghatározása..... | 48 |
| 3.3.3.1. Tetrahymena pyriformis kemotaxisa..... | 48 |
| 3.3.3.2. Kemotaktikus szelekció..... | 49 |
| 3.3.3.3. J774 sejtek kemotaxisa..... | 50 |
| 3.3.4. A polipeptidek sejtbe jutásának meghatározása áramlási citometriával | 51 |
| 3.3.4.1. Tetrahymena pyriformis polipeptid-felvétele..... | 51 |
| 3.3.4.2. Úszó J774 sejtek polipeptid-felvétele | 51 |
| 3.3.4.3. Letapadt J774 sejtek polipeptid-felvétele..... | 52 |
| 3.3.4.4. A J774 polipeptid-felvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal..... | 52 |
| 3.3.4.5. Egér csontvelői makrofágok polipeptid-felvétele | 53 |
| 3.3.5. Polimer polipeptidek kölcsönhatása foszfolipid kettősrétegekkel | 54 |
| 3.3.5.1. A liposzómák készítése | 54 |
| 3.3.5.2. Fluoreszcencia-polarizáció mérése | 55 |
| 4. Eredmények | 56 |
| 4.1. A karboxifluoreszceinnel jelölt polipeptidek jellemzése | 56 |
| 4.2. A polipeptidek hatása Tetrahymena pyriformis GL csillós egysejtűre | 58 |
| 4.2.1. Polipeptidek hatása Tetrahymena pyriformis túlélésére és szaporodására | 58 |
| 4.2.2. Tetrahymena pyriformis kemotaxisa polilizin gerincű polipeptidek hatására | 61 |
| 4.2.2.1. Kevert Tetrahymena populáció kemotaxisa | 61 |
| 4.2.2.2. Kemotaktikusan szelektált Tetrahymena szubpopulációk kemotaxisa | 64 |
| 4.2.3. Tetrahymena polipeptid-felvétele | 65 |
| 4.3. Polilizin gerincű polipeptidek hatása J774 sejtekre | 69 |
| 4.3.1. Polipeptidek hatása J774 sejtek túlélésére | 69 |
| 4.3.2. J774 sejtek kemotaxisa polilizin gerincű polipeptidek hatására | 72 |
| 4.3.3. J774 sejtek polipeptid-felvétele..... | 74 |
| 4.3.3.1. Úszó J774 sejtek polipeptid-felvétele | 74 |
| 4.3.3.2. Letapadt J774 sejtek polipeptid-felvétele..... | 79 |
| 4.3.3.4. A scavenger receptor szerepe J774 sejtek polipeptid-felvételében..... | 82 |
| | 83 |
| 4.4. A polipeptidek felvétele egér csontvelő makrofág sejtekbe | 84 |
| 4.4.1. A polipeptidek hatása a makrofágok túlélésére..... | 84 |
| 4.4.2. A polipeptidek felvétele a makrofágokba | 85 |
| 4.4.2.1. A koncentráció hatása a polipeptid-felvételre | 85 |
| 4.4.2.2. Az inkubáció időtartamának hatása a polipeptid-felvételre | 87 |
| 4.4.2.3. A hőmérséklet hatása a polipeptidek felvételére..... | 88 |
| 4.4.2.4. Jelöletlen polipeptidekkel való előkezelés hatása | 89 |
| 4.4.2.5. Scavenger receptorra nézve vad típusú 129/ICR, és SR-A +/- makrofágok polipeptid-felvétele. | 90 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.5.1. A scavenger receptor-A blokkolása poli(I)-val és 2F8 monoklonális ellenanyaggal..... | 91 |
| 4.5. Polilizin gerincű polipeptidok kölcsönhatása foszfolipid modellmembránokkal ... | 93 |
| 4.5.1. A DPPC kettősréteg fluiditásának változása polipeptidok jelenlétében..... | 94 |
| 4.5.2. A DPPC:PG=80:20 (m/m) összetételű kettősréteg fluiditásának változása polipeptidok jelenlétében..... | 96 |
| 5. Összefoglalás | 99 |
| 5.1. A polipeptidok jelölése 5(6)-karboxifluoreszceinnel | 99 |
| 5.2. Polipeptidok hatása Tetrahymena pyriformis csillós egysejtűre | 99 |
| 5.2.1. Polipeptidok hatása Tetrahymena pyriformis szaporodására | 99 |
| 5.2.2. Tetrahymena pyriformis kemotaxisa..... | 99 |
| 5.2.3. Tetrahymena pyriformis polipeptid-felvétele..... | 100 |
| 5.3. Polipeptidok hatása J774 sejtekre | 100 |
| 5.3.1. J774 sejtek túlélése polipeptidok jelenlétében | 100 |
| 5.3.2. J774 sejtek kemotaxisa..... | 101 |
| 5.3.3. Polilizin gerincű polipeptidok felvétele J774 sejtekbe..... | 101 |
| 5.3.3.1. Úszó J774 sejtek CF-polipeptid-felvétele | 101 |
| 5.3.3.2. Letapadt J774 sejtek polipeptid-felvétele..... | 101 |
| 5.3.3.3. Scavenger receptor szerepe a polipeptidok sejtbe jutásában..... | 102 |
| 5.4. Polilizin gerincű polipeptidok bejuttatása egér csontvelői eredetű makrofágokba | 102 |
| 5.4.1. A makrofágok túlélése polipeptidok jelenlétében | 102 |
| 5.4.2.1. A polipeptid-felvétel függése a polipeptid koncentrációtól | 102 |
| 5.4.2.2. A polipeptid-felvétel kinetikája..... | 103 |
| 5.4.2.3. A hőmérséklet csökkentésének hatása a polipeptidok sejtbe jutására..... | 103 |
| 5.4.2.4. Karboxifluoreszceinnel jelölt polipeptidok felvételének gátlása jelöletlen polipeptiddel..... | 103 |
| 5.4.3. A scavenger receptor szerepe a polipeptidok felvételében..... | 103 |
| 5.5. Polilizin gerincű polipeptidok kölcsönhatása foszfolipid modellmembránokkal . | 104 |
| Rövidítések | 105 |
| Irodalomjegyzék | 107 |
| Tartalom..... | 118 |
| Összefoglaló..... | 121 |
| Summary | 122 |

ÖSSZEFOGLALÓ

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban már a nyolcvanas évektől kezdve vizsgálják a polilizin gerincű elágazó láncú polipeptid hordozók kémiai és biológiai sajátosságait. Megállapították, hogy a polipeptidek oldalláncainak aminosav-összetétele (töltése, polaritása) befolyásolja a makromolekula és annak hatóanyag konjugátumainak biológiai tulajdonságait, eloszlását a szervezetben [Hudecz, 1995].

Kísérleteimben háromféle szerkezetű elágazó láncú polipeptid: i. poli[Lys(X_i)], X_iK , ii. poli[Lys(DL-Ala_m)], AK és X_iK , iii. poli[Lys(X_i -DL-Ala_m)], XAK hatását vizsgáltam csillós egyszettű és egér modellsejtek túlélésére, illetve szaporodására és kemotaxisára. Tanulmányoztam a különböző karakterű polipeptidek felvételét a sejtekbe. Jellemeztem a polipeptidek és különböző összetételű foszfolipid modellmembránok között kialakuló kölcsönhatást. Összefüggést kerestem az oldallánc-szerkezete, (különösen is az oldalláncok töltése) és a polipeptid által kiváltott hatás között. Polianionos polipeptidek makrofágokba, illetve makrofág tumorsejtvonal sejtjeibe való felvételének meghatározásával tisztázni akartam, hogy a scavenger receptor szerepet játszik-e a polipeptidek sejtbe jutásában.

Eredményeim igazolták, hogy a polipeptid töltésviszonyai, és a töltésnek a polilizin gerinctől való távolsága nagymértékben befolyásolják a makromolekula toxicitását az emlős sejteken. Ezzel szemben a polipeptidek nem befolyásolták szignifikáns mértékben a *Tetrahymena* sejtek életképességét. A polipeptidek kemoattraktáns/repellens jellegét *Tetrahymenára* nézve elsősorban az oldallánc N-terminális aminosavának szerkezete határozta meg, annak töltésétől függetlenül. A polipeptidek felvételének mértékét *Tetrahymena* sejtekbe szintén az oldallánc N-terminális aminosav minősége határozta meg: a polikationos és plianionos polipeptideket nagy mennyiségben felvették a sejtek, míg az amfoter polipeptideket kevésbé. A J774 sejtek esetében a polipeptidek közül egy sem idézett elő számottevő kemotaktikus választ. A jelzett polipeptidek bejutottak mindhárom modellsejtbe. A felvétel mértékét meghatározta a polipeptid töltése és oldalláncának hosszúsága. A csontvelői makrofágokon végzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a polipeptidek receptor-közvetített folyamattal történik. J774 sejtek és egér csontvelői makrofágok esetében igazoltam a scavenger receptor szerepét a polianionos polipeptidek sejtbe jutásában. Az amfoter foszfolipidből felépülő modellmembránok esetében a hasonló karakterű polipeptid lépett kölcsönhatásba a kettősréteggel. A negatív felszíni töltést hordozó liposzómákkal kölcsönhatásba léptek mind a polikationos, mind a polianionos polipeptidek. Valószínűsíthető, hogy ebben az esetben az elektrosztatikus kölcsönhatás is szerepet játszhat a membrán szerkezetének stabilizálásában.

SUMMARY

Polylysine based branched chain polymeric polypeptides have been used as macromolecular carriers of antitumour drugs and epitope peptides. The biological properties of polymeric polypeptides based on poly[L-lysine] were investigated in many aspects, for example *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity, immunogenicity, immunomodulatory effects, biodistribution, blood survival were studied. It was ascertained that the composition of the side chain and particularly the character of the terminal amino acid significantly influences the biological properties of the polymers and even their drug-conjugates. Several pathogenic organisms such as *Mycobacterium* or *Leishmania* species survive in the macrophages. Selective delivery of antibiotics and anti-parasitic drugs by appropriate cell-specific macromolecules as carriers seems to be a feasible approach to improve chemotherapeutic effect. For this I studied the uptake and related properties of structurally related branched chain polypeptides.

In our experiments ten polypeptides with different structural properties (amino acid composition and charge) were studied. We have performed a comparative study on the unicellular *Tetrahymena pyriformis*, the macrophage cell-line J774 and murine bone marrow derived macrophages. We identified the structural requirements for a non-toxic, non-chemotactic carrier polypeptide that is efficiently internalized by the cells.

Results indicate that the toxicity of the polypeptides on the mammal model cells is dependent on the charge properties and length of the side chain, but none of the polypeptides are toxic on the unicellular *Tetrahymena*. The effect of the polypeptides on the chemotaxis of *Tetrahymena pyriformis* and J774 cells was determined by the quality of the side-chain N-terminal amino acid and in case of *Tetrahymena* cells by the length of the side chain. All the three types of cells took up the labelled fluorescent polypeptides. The uptake properties were determined by the charge of the polypeptide and it was influenced by the chemical structure of the N-terminal amino acid of the side chain. We found, that scavenger receptors, particularly SR-A is involved in the internalisation of the polyanionic compounds by macrophage cells. I have demonstrated for the first time that polycationic polypeptides are also possibly taken up via the SR-A receptor. We found that the polarity and charge of side chains have a pronounced effect on the interaction of the polymers with phospholipid bilayers. Except the polypeptide containing glutamic acid side chain, none of the polypeptides destabilized the bilayers.