

# Az IRSp53 és a RAGE fehérje szerepe a membrán nanocsövek képződésében

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Madarász Tamás**

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Gallyas Ferenc egyetemi tanár, DSc

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós egyetemi tanár, DSc

Kutatási témavezető: Dr. Szabó-Meleg Edina adjunktus



Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola (D93)

Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130/1993)

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Általános Orvostudományi kar

Biofizikai Intézet

Pécs

2026

# 1. Bevezetés

A sejtek közötti kommunikáció egyik módja a membrán nanocsöveken keresztül történő információ- és anyagátadás. A membrán nanocsövek képesek hosszú távú fizikai kapcsolatokat létrehozni egymástól távol eső sejtek között, lehetővé téve különböző sejtalkotók, jelzőmolekulák átvitelét. Kialakulásuk összetett molekuláris mechanizmusokon alapul, amelyekben központi szerepet játszanak az aktin filamentumok, illetve a membrángörbületet kialakító és aktin polimerizációt szabályzó fehérjék.

Munkánk célja a membrán nanocső képződés mechanizmusának feltérképezése volt, különös tekintettel az IRSp53 fehérje (Inzulin receptor szubsztrát protein 53 kDa) szerepére, amely képes a plazmamembrán görbületének kialakítására és nanocsőszerű struktúrák indukálására. Vizsgálatainkhoz két, eltérő mechanizmussal nanocsövet képző sejt vonalat használtunk. Konfokális mikroszkópia és SIM (strukturált megvilágítású mikroszkópia) segítségével vizsgáltuk az IRSp53 és az I-BAR domén (inverse Bin-Amphiphysin-Rvs) hatását a sejtek és nanocsövek morfológiájára. Emellett különböző *in vitro* technikák (pl. TIRFM (Teljes belső visszaverődésen alapuló mikroszkópia) és pirén-aktin polimerizációs teszt) segítségével mértük a teljes hosszúságú fehérje és doménje hatását az aktin polimerizációra.

A kutatás második részében egy olyan rendszert dolgoztunk ki, amivel lehetőség nyílik a nanocső képződés szabályozására, amely a RAGE receptor (Glikációs végtermékek receptora) aktiválásán és gátlásán alapul. A gátlást a receptor oldható formájával, az sRAGE (Glikációs végtermékek receptorának oldható formája) fehérjével valósítottuk meg, amely képes megkötni az extracelluláris térben a glikált fehérjéket. A receptor aktiválását ribózzal glikált marhaszérum albuminnal (RBSA) végeztük. Az sRAGE fehérjét többféle kromatográfias eljárással tisztítottuk sertéstüdőből, majd HPLC-MS/MS (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia tandem tömegspektrometriával) kapcsolt technikával azonosítottuk. A fehérjék közötti kölcsönhatást natív gélelektroforézissel is igazoltuk. Végül a glikált fehérje és az sRAGE nanocsövek képződésére gyakorolt hatásának vizsgálatát HEK 293 (Humán embrionális vesesejt vonal 293) sejt vonalon végeztük.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az I-BAR és IRSp53 fehérjék befolyásolják az aktin polimerizációt, aktinmagok képzésével segítik a membrán nanocsövek kialakulását és növekedését. Sikerült optimális tisztaságú sRAGE-t és a ligandumaként funkcionáló RBSA-t előállítanunk, amelyek segítségével szabályozni tudtuk az NT-k képződését.

## 1.1. Membrán nanocsövek

A membrán nanocsövek (az angol nanotube elnevezés következtében a továbbiakban NT-ként rövidítve) filopódiumszerű sejtnyúlványok, amelyek fizikai kapcsolatot biztosítanak egymástól távoleső sejtek között. *In vitro* sejt kultúrákon végzett vizsgálatok alapján a nanocsövekhez morfológiailag hasonló filopódiumok a tárgylemez vagy tenyésztőedény felületéhez tapadnak, míg az NT-k szabadon lebegnek a médiumban. *In vitro* kísérletek alapján az NT-k különböző transzportfolyamatokban vesznek részt. Többek közt kalciumionok, lipidek, számos fehérje (beleértve a hibás szerkezettel rendelkező fehérjéket, mint például az amiloid  $\beta$ , tau és prionok), nukleinsavak, valamint immun-kostimulátor molekulák sejtek közötti átvitelében van szerepük, de képesek akár nagy méretű sejtorganelumokat is transzportálni. Az NT-k citoskeletális filamentumokat (pl.: aktin és mikrotubulus) tartalmaznak. Ezek nemcsak az NT-k vázát képezik, hanem bizonyos transzportfolyamatok közvetítésére is képesek motorfehérjék segítségével és a filopódiumokhoz hasonlóan az NT-k képződéséhez is nélkülözhetetlenek. Annak ellenére, hogy egyre több bizonyíték van az NT-k élettani funkcióira, az NT-növekedés molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert. Az NT-k keletkezését környezeti tényezők (pl. csökkent oxigénszint, magas glükóz koncentráció, szérum-megvonás, UV-sugárzás), egyes bakteriális és virális fertőzések, ill. bizonyos fehérjék is befolyásolhatják.

Eddig két fő stratégiát írtak le arra vonatkozóan, hogyan képesek különböző sejt típusok NT-eket képezni.

1.) Az NT-k kialakulásának egyik módja az aktin-vezérelt kitüremkedésen alapuló mechanizmus. Ebben az esetben az egyik vagy mind a két sejt felületén filopódiumszerű kitüremkedés alakul ki, amely(ek) elongációja után a sejtek egymáshoz kapcsolódnak.

2.) A másik lehetőség a sejt távolodáson alapuló mechanizmus, amikor két, egymással fizikai kapcsolatban lévő sejt ellentétes irányban távolodik egymástól és NT-k segítségével kapcsolatban maradnak (a mobilis sejtekre jellemző, például T- és B-limfocitákra).

Bizonyos nanocsövek mindkét végükön nyitottak, tehát az általuk összekötött két sejt citoplazmája közvetlen kapcsolatban van egymással. Megfigyeltek ilyen NT-eket már többek között B-limfocitákban, makrofágoknál és PC12 sejtek között is. A nyitott végű csöveket három különböző alcsoportba tudjuk besorolni az alábbiak szerint.

1.) A *vékony nanocsövek* nevüket onnan kapták, hogy vastagságuk nem haladja meg a 0,7  $\mu\text{m}$ -t. F-aktint (filamentális aktint) tartalmaznak, de mikrotubulusokat nem. Ezen vékony csövek felszínén membránhoz kötött baktériumok és egyéb partikulumok „szörfölhetnek” egy folyamatos laterális membrán mozgás segítségével. Ez az áramlás aktív transzport és nem igényel mikrotubulusokat.

2.) A *vastag nanocsövek* F-aktint és mikrotubulusokat egyaránt tartalmaznak és vastagságuk meghaladja a 0,7  $\mu\text{m}$ -t. Felületükön nincs olyan laterális membrán mozgás, mint a vékony csövek esetében, viszont a cső belsejében különféle sejt szervecskék (pl. endoszómák, lizoszómák, mitokondriumok) és vezikulák aktív transzportja figyelhető meg. A vezikulák mozgása jellemzően két irányban történik, ez arra utal, hogy egyazon csőben több egymástól független "pálya" is kialakulhat. Feltehetően sejt vonalfüggő, hogy a cső belsejében történő aktív transzport milyen arányban oszlik meg az aktin és a mikrotubulus között.

3.) Ami fluoreszcens mikroszkópiában egyetlen csőnek látszik, az bizonyos esetekben több egyedi membrán nanocsőből (*iTNT* - *individual Tunneling Nano Tube*, azaz egyedi „alagútképző” membrán nanocső) áll. Az iTNT-k kötegekben futnak, egymással párhuzamosan, néha egymás köré fonódva. Ez a konfiguráció fokozza a stabilitást és a rugalmasságot, lehetővé téve az ilyen NT-k számára, hogy ellenálljanak a sejtek mozgásából adódó erőhatásoknak. Az iTNT-kben megfigyelhetőek vezikulák és egyéb sejtorganellek az aktin filamentumok mentén, tehát aktív transzport zajlik a csöveken keresztül. Az iTNT-k többségükben nyitott véggel rendelkeznek, de bizonyos esetekben végükön zárt szerkezetek is megfigyelhetők, ami azt jelzi, hogy a kapcsolódási módjuk változhat.

## **1.2. Az aktin**

Az aktin létfontosságú az NT-k képződésében, és azok fenntartásában is fontos szerepe van. Az aktin monomer szerkezetileg 2 fő doménre tagolódik ( $\alpha$  és  $\beta$  domén) és négy szubdoménből épül fel. Monomer formáját G-aktinként (globuláris aktin), polimer formáját pedig F-aktinként (filamentális aktin) ismerjük.

Az aktin polimerizáció első lépése az aktin nukleáció, ahol jellemzően három-négy G-aktinból álló stabil oligomer alakul ki, aktin nukleáló fehérjék közreműködésével. Az oligomerek két végén további G-aktin egységek gyűlnek össze és ezzel elindul a második szakasz, az elongáció, amely során a filamentum tovább növekszik és kialakul az F-aktin. A polimerizáció során megkülönböztetünk plusz véget (szöges vég, vagy barbed end) és mínusz véget (hegyes vég vagy pointed end). Az elnevezések a polimer növekedésére és depolimerizációjára utalnak.

Megfelelő számú G-aktin esetén képes beállni egy dinamikus egyensúly (Steady-state), amikor az alegységek kötésének és disszociációjának sebessége közel azonos a filamentum két végén, így egy folyamatosan megújuló polimerlánc jön létre. Ezt az egyensúlyt a szabad G-aktin és az ATP koncentrációja befolyásolja, mivel az aktin monomer ATP megkötésével épül be a filamentumba, amely az F-aktinban hidrolizál.

### **1.3. IRSp53 fehérje és I-BAR doménje**

Az inzulin receptor tirozin kináz szubsztrát 53 (IRSp53) képes egyidőben kölcsönhatásba lépni a sejtmembránnal és az aktin citoskeletonnal. Az IRSp53 fehérje az inverse Bin-Amphiphysin-Rvs (I-BAR) doménje segítségével jelentős szerepet játszik a membrán görbületének érzékelésében és kialakításában. Az IRSp53 a PI(4,5)P2 foszfolipidhez való kötődése révén horgonyoz a lipid raft régiókhoz a membránban és összeköti a sejtmembránt az aktinvázzal. A teljes hosszúságú IRSp53 nemcsak a membrángörbület alakításában játszik szerepet, hanem az aktin polimerizációját is befolyásolja aktin szabályzó fehérjékkel kölcsönhatva. Az IRSp53 expresszióját számos emlős szövetben és sejttypusban megfigyelték, különösen neuronokban. Az IRSp53 bizonyos alléljai összefüggésbe hozhatók neurológiai betegségekkel, például a dendritikus tüskék számának változásával, figyelemhiányos rendellenességekkel és hiperaktivitással. Ezenkívül az IRSp53-knockout egerek tanulási, memória- és szinaptikus plaszticitásbeli hiányosságokat mutattak.

### **1.4. Glikozilált és glikált fehérjék**

A fehérjék glikozilációja és glikációja két különböző kémiai folyamat, amelyek eltérő biológiai hatást eredményeznek.

A *glikoziláció* egy poszttranszlációs módosítás, egy enzimátikus folyamat, amely során cukormolekulák (mint például a glükóz vagy a mannóz) specifikusan kapcsolódnak egy fehérjéhez. A glikoziláció befolyásolja a fehérjék egymással való kölcsönhatását, ezáltal biológiai aktivitását és fizikai tulajdonságait is, mint például az oldhatóságát és stabilitását. Megkülönböztetünk O- és N-kötésű glikozilációt.

A *glikáció* ezzel szemben egy nem enzimátikus folyamat, amelyben redukáló cukrok reakcióba lépnek a fehérjék szabad aminos csoportjaival. Ezt a folyamatot Maillard reakciónak nevezzük és a reaktánsoktól, illetve a körülményektől függően sokféle reaktív vegyület képződik, aminek köszönhetően a glikációs végtermékek is igen változatosak. Idővel a kezdeti termékek átrendeződnek és tovább alakulnak, amelynek eredményeként létrejönnek az ún. AGE-k (Advanced Glycation End-products, azaz előrehaladott glikációs végtermékek). A reakció

során keletkező reaktív dikarbonilek és furán származékok képesek a fehérjéket irreverzibilisen módosítani, és egyes esetekben két különböző aminosav oldallánca között kovalens keresztkötéseket hoznak létre, irreverzibilisen megváltoztatva a fehérje szerkezetét.

## **1.5. sRAGE**

A glikált fehérjék és egyéb glikációs végtermékek érzékelését a glikációs végtermékek receptora (RAGE) látja el. A RAGE egy membrán fehérje, ami tartalmaz: egy Ig-V-t (Immunglobulin V-típusú domén), két C-típusú (C1 és C2) immunglobulint (Ig), egy hidrofób transzmembrán domént és egy citoplazmatikus nyúlványt. Az AGE-k megkötése következtében a RAGE aktiválódik, így növeli a citokinek, kemokinek, adhéziós molekulák termelését, fokozza az oxidatív stresszt, ami pozitív visszacsatolással fokozza a RAGE mennyiségét és végül egy öngerjesztő gyulladást hoz létre. Az sRAGE alternatív splicing vagy proteolízis útján, vagy C-terminális hasítással a transzmembrán és citoszolikus domének nélkül jön létre. Megtartja affinitását a glikációs végtermékek (AGE-k) iránt, így kompetitív módon gátolja a RAGE által közvetített gyulladást stimuláló és patológiás hatásokat.

Az AGE-k által aktivált RAGE feltehetően az NT-k képződését is befolyásolja. Peritoneális dialízis során felmerülő gyulladós folyamatokat vizsgálva, megnövekedett membrán nanocsőképződést tapasztaltak. A glükóztartalmú dialízisoldatok hősterilizálása során AGE-k keletkeznek, ami a RAGE aktiváció révén az NT-k számának növekedéséhez vezetett.

Az sRAGE-val kapcsolatos vizsgálatokhoz megfelelő tisztaságú fehérjére volt szükségünk. A RAGE megfelelő működéséhez fontos glikozilációja. A megfelelő glikolizációs mintázat azonban csak emlős sejtekben történő expresszióval érhető el. Az emlőssejt alapú expressziós rendszerek a legdrágábbak, ezért a fehérje élő szövetből történő kivonása mellett döntöttünk. A RAGE fehérje expressziója bizonyos szövetekre és szervrendszerekre korlátozódik, mint például a vesére, az idegrendszerre és az endokrin szövetekre, tüdőben lévő expressziója kiemelkedően magas. A sertés és a marha tüdőmérete miatt több vizsgálat végezhető el egy szervből, ami jelentős javulást jelent az egértüdőkre támaszkodó korábbi eljárásokhoz képest. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a RAGE rendkívül konzervált bizonyos fajok között, mint például az ember, a marha és a sertés.

## 2. Célkitűzés

Vizsgálataink során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Az IRSp53 fehérje és annak N-terminális végén található I-BAR domén membrán nanocsövek képződésében betöltött funkciójának feltárása.
2. Annak vizsgálata, hogy a filopódiumok és az NT-k képződése azonos mechanizmus alapján történik-e, illetve, hogy az IRSp53, illetve annak I-BAR doménje hogyan befolyásolja ezt a folyamatot.
3. Mikroszkópos technikákkal annak részletes vizsgálata, hogy különböző sejtvonalak által növesztett NT-k morfológiájára milyen hatást gyakorol az I-BAR ill. a teljes hosszúságú IRSp53 fehérje.
4. TIRFM mikroszkópiával és aktin polimerizációs tesztekkel az aktin filamentumok növekedésének tanulmányozása IRSp53, illetve I-BAR domén jelenlétében.
5. Egy olyan rendszer kidolgozása, amely lehetővé teszi a membrán nanocsövek képződésének szabályozását. Ehhez az NT-k kialakulását glikált fehérjékkel terveztük serkenteni, míg a csöképződés gátlását az sRAGE kompetitív hatásán keresztül kívántuk elérni.
6. Olyan új protokollok kidolgozása, amelyek lehetővé teszik
  - a. az sRAGE sertéstüdőből való kivonását megfelelő hozammal és tisztasággal, továbbá
  - b. a ribózzal glikált BSA hatékony tisztítását.

## 3. Alkalmazott módszerek

### 3.1. IRSp53 és I-BAR vizsgálatok módszerei

#### 3.1.1. Sejtvonalak fenntartása és transzfektálás

A COS-7 vesesejteket Dulbecco féle módosított Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük, amit 10% magzati szarvasmarha szérummal (FBS) egészítettünk ki. A tenyészeteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> termosztátban, speciális boroszilikát ablakkal ellátott Petri-csészékben közel fiziológiai körülmények között tartottuk. A kísérletek során tipikusan 25 000 sejt/cm<sup>2</sup> sűrűséget használtunk. Az A20 érett B limfóma sejteket inkubátorban tenyésztettük 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában. A sejteket RPMI-1640 médiumban tartottuk, amit 2 mM L-glutaminnal, 1 mM Na-piruváttal, antibiotikumokkal és 10% FBS-sel egészítettünk ki. A további kísérletekhez tipikusan 3 × 10<sup>5</sup> sejt/cm<sup>2</sup> sűrűséget használtunk. Az élő sejtekkel végzett kísérletekhez a sejteket mCherry-IRSp53, vagy mCherry-I-BAR plazmiddal transzfektáltuk, COS-7 sejtek

esetén Lipofectamine 3000 reagenssel, A20 sejtvonala esetében Amaxa Nucleofector IIB készülékkel végzett elektroporálás segítségével, mindkét esetben a gyártó ajánlásainak megfelelően. A kontroll kísérletekben GFP-LifeAct (zöld fluoreszcens fehérjével fuzionált LifeAct peptidet kódoló plazmid) plazmidot használtunk. Minden kísérletben IRSp53 és I-BAR esetén 1, LifeAct esetében 2 µg plazmidot használtunk. Mintáinkat 16 órával a transzfekciót követően élő sejt körülmények között vizsgáltuk.

### **3.1.2. Immuncitokémia és sejt festés**

A sejteket 4% paraformaldehiddel 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk, majd 0,1% Triton X-100 + 5% BSA-val permeabilizáltuk 20 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően anti-IRSp53 antitesttel (1:500) inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd 1× PBS-sel (Phosphate Buffered Saline) mostuk és másodlagos antitesttel (1:1000; kecske anti-nyúl Alexa Fluor 488) ill. bizonyos esetekben Alexa 488- vagy 561-falloidinnal jelöltük. A sejtmagok festésére Hoechst-öt használtuk (1:1000). A mintákat VECTASHIELD antifade mounting médiummal fedtük le, majd 4 °C-on, sötétben tároltuk a mikroszkópos vizsgálatig. Az NT-k funkcionalitását Alexa 488-Cholera toxin B jelöléssel igazoltuk.

### **3.1.3 Lézerpásztázó konfokális mikroszkópia és SIM-strukturált megvilágítású mikroszkópia**

Az I-BAR domén és az IRSp53 fehérje nanocső-képződésre gyakorolt hatását konfokális és strukturált megvilágítású (SIM) mikroszkópiával vizsgáltuk. A konfokális mikroszkópia nagy felbontású, optikai szelektálással alapuló leképezést tesz lehetővé, amellyel pontosan meghatározható a nanocsövek elhelyezkedése. A SIM szuperfelbontású képalkotása további morfológiai részleteket tár fel, így alkalmas a fehérjék pontos lokalizációjának és a nanocsövek szerkezeti jellemzőinek részletes elemzésére.

A transzfekció sejtekre és nyúlványaikra gyakorolt hatását Zeiss LSM 710 lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal vizualizáltuk 63× nagyítással (olajimmerziós objektív; N.A.: 1.4). A felvételeket a Zen black 2.1 SP3/Zen blue 2.3 szoftverekkel rögzítettük és elemeztük, majd a további képfeldolgozást az Image J és esetenként az Imaris 8.2 szoftverekkel végeztük. Az IRSp53 és az F-aktin pozíciója közötti kapcsolatot a nanocső teljes hosszát magában foglaló területen belül végzett kolokalizációval vizsgáltuk. A fehérjék kolokalizációját a „stressz szálak” mentén egy hosszúkas ellipszis ROI-n belül vizsgáltuk az aktin kötegek körül. A M1 és M2 (Manders együtthatók) kolokalizációs együtthatókat a Zen black 2.1 SP3 szoftverrel számoltuk ki.

Az NT-k és a filopódiumok morfológiájának vizsgálatánál aktin transzfekciót használtunk kontrollként. A statisztikai elemzést három független vizsgálatban végeztük, ahol minden kísérletben legalább 800 sejtet vizualizáltunk.

### **3.1.4 I-BAR expresszió és tisztítás**

Az IRSp53 I-BAR doménjét bakteriális expressziós rendszerben termeltük meg, míg az IRSp53-at a MyBioSource-tól szereztük be. A fehérje expresszióhoz az IRSp53 I-BAR domén cDNS-ét a pGEX-4T2 (Plazmid- Glutation S-Transzferáz Expressziós vektor, 4T2) vektorba illesztve, GST (Glutation S-transzferáz) fúziós fehérjeként expresszáltuk *Escherichia coli* BL21 törzsben. A plazmid Laura Machesky-től származott (University of Cambridge, Department of Biochemistry, Cambridge, UK). A baktériumokat 37 °C-on tenyésztettük Luria Broth médiumban. A fehérje expresszióját 1 mM izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid hozzáadásával indukáltuk egy éjszakán át 25 °C-on, majd a sejteket centrifugálással pelletáltuk és 6 g-os aliquotokban -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

A GST-taggel ellátott rekombináns fehérjék tisztításához glutation-affinitáskromatográfiát alkalmaztunk. A GST-tag leválasztását trombinnal végzett proteolitikus hasítással az oszlopon végeztük. Majd a keletkezett tag-mentes célfehérjét benzamidin affinitásoszlop segítségével tisztítottuk meg a trombintól. Általában 5–6 g baktérium pelletből 3,5–4,0 mg/mL koncentrációjú fehérjeoldatot nyertünk.

### **3.1.5. Aktin tisztítás**

Az aktint nyúl hátizomból izoláltuk és Superdex 200 oszlopon gél szűréssel tisztítottuk tovább. A tisztításhoz alkalmazott méretkizárásos kromatográfia (SEC - Size Exclusion Chromatography) (más néven géliszűrési kromatográfia) során a fehérjék elválasztása méretük és alakjuk (Stokes térfogat) alapján történt. Az elválasztás során, a SEC-re jellemzően, a nagyobb méretű fehérjék hamarabb eluálódtak. Ez a lépés tette lehetővé az aktin további tisztítását a kisebb szennyeződésektől és aggregátumoktól. A tisztított aktint G-pufferben (pH=7,8, 4 mM Tris-HCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM ATP, 0,5 mM 2-merkaptoetanol és 0,005% NaN<sub>3</sub> (m/V %) tároltuk. A TIRFM mérésekhez a G-aktint Lys328 (Lizin 328) aminosavnál Alexa Fluor® 488 karboxil-sav-szukcinimidil-észterrel (Alexa 488 NHS) jelöltük. Az aktin összeszerelődés kinetikájának méréséhez a G-aktint Cys374 (cisztein 374) helyen N-(1-pirenil) jódiacetamiddal jelöltük.

### 3.1.6. Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcens mikroszkópia

Mikroszkópiához használt fedőlemezek segítségével készítettünk áramlási cellákat, amiket 100  $\mu$ L N-etilmaleimid miozinnal inkubáltunk 1 percig, majd 200  $\mu$ L miozin pufferrel (pH=7,8, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM ditioneitol, 1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol (DTT), 0,2 mM ATP, 4 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  és 0,2 mM etilén-glikol-bisz ( $\beta$ -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA)) és 200  $\mu$ L 0,1% (m/V%) BSA-pufferrel (pH=7,8, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM DTT, 0,2 mM ATP, 4 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM EGTA és 0,1% (m/V%) BSA) mostunk át. 200  $\mu$ L TIRFM puffert (F\* puffer (pH=7,8), 0,5% (m/V%) metilcellulóz, 0,5% (m/V%) BSA, 50 mM 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]oktán és 100 mM DTT) közvetlenül a mérés előtt adtuk a fehérjéhez. Az F\* puffer (pH=7,8) 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM DTT, 0,2 mM ATP, 4 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$  és 0,2 mM EGTA-t tartalmazott. A szabad G-aktin polimerizációját az I-BAR/IRSp53 jelenlétében és hiányában a fentebb ismertetett módon előkészített áramlási cellákban vizsgáltuk, úgy, hogy I-BAR-t/IRSp53-at és G-aktint kevertünk össze különböző arányokban a TIRFM pufferben (0,5  $\mu$ M aktin és 10% Alexa 488 NHS-G-aktin). Az I-BAR-t az aktinhez viszonyítva 0,1 $\times$ , 60 $\times$  és 120 $\times$ -os mennyiségben alkalmaztuk. Az IRSp53-at 0,5 $\times$  és 10 $\times$ -es koncentrációban kevertük az aktinhez. A képeket 10 másodpercenként rögzítettük CCD kamerával egy Olympus IX81 mikroszkópra felszerelt lézeralapú (491 nm) TIRFM modul (apokromatikus objektív lencse (APON) TIRF 60 $\times$ , N.A.: 1,45 olaj immerziós objektív) segítségével. A TIRFM képeket a Fiji szoftverrel elemeztük. Azonos pozícióban kijelölt területet (724  $\times$  724 pixel) használtunk minden képen a széleken jelentkező intenzitás különbségek kiszűrése érdekében. A háttér kivonása után (a zajsűréshez alkalmazott kör sugara 50 pixel volt, „sliding paraboloid” beállítást alkalmaztunk) 1%-os küszöbértéket állítottunk be. A maradék háttérzaj vagy irreleváns apró objektumok kizárása érdekében a kiértékelés során öt pixelnyi minimális méretet határoztunk meg. Az elemzett és a nyers képeket összehasonlítottuk, és szükség esetén manuálisan korrigáltuk az esetleges eltérések elkerülése érdekében.

### 3.1.7. Aktin polimerizációs teszt

A polimerizációs teszt során 2,5  $\mu$ M, 5% pirén-jódacetamiddal jelölt G-aktint használtunk, amit különböző I-BAR koncentrációk jelenlétében (és kontrollként I-BAR nélkül tisztán az aktint) polimerizáltunk 2 mM  $\text{MgCl}_2$  és 100 mM KCl segítségével. A pirén fluoreszcencia intenzitás változását fluoriméterrel (Safas Xenius FLX) követtük nyomon. 3 nm-es rés szélességet alkalmaztunk az excitációs és 5 nm-eset az emissziós oldalon. A gerjesztéshez  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  nm-t,

míg az emisszióhoz  $\lambda_{em} = 404$  nm hullámhosszúságot állítottunk be 720 V detektor feszültség mellett. A teljes hosszúságú rekombináns IRSp53 fehérjével, annak alacsony koncentrációja miatt, nem tudunk polimerizációs vizsgálatokat végezni.

A mintákat minden koncentrációnál külön kevertük közvetlenül a mérés előtt és a küvettában indítottuk el a polimerizációt, majd pár másodperc alatt megkezdjük a mérést.

### **3.1.8. Általános kísérleti körülmények**

A konfokális képeket élő sejteken, termosztált körülmények között rögzítettük (37 °C; 5% CO<sub>2</sub> atmoszféra), és optikai szeletelést alkalmaztunk a Z tengely mentén, hogy egyértelműen megkülönböztessük a membrán nanocsöveket.

Minden TIRFM és aktin polimerizációs mérést 20 °C-on végeztünk. Kísérleteinkben Mg<sup>2+</sup>-ATP-aktint használtunk. Ehhez az aktin monomerhez kötött Ca<sup>2+</sup>-t Mg<sup>2+</sup>-ra cseréltük 200 μM EGTA és 50 μM MgCl<sub>2</sub> hozzáadásával, a minták 5 percig szobahőmérsékleten történő inkubálása mellett. Az adatokat legalább három független kísérletből nyertük.

### **3.1.9. Statisztika**

Az NT-k és filopódiumok relatív gyakoriságát legalább három független kísérletből, mintánként legalább ~800 sejtől számítottuk. A képanalízist ImageJ/Fiji, illetve Imaris 8.2. szoftverrel, míg a statisztikai számításokat, beleértve a hipotézisvizsgálatokat (Student t-teszt vagy Mann-Whitney teszt), az Origin 2020, vagy az IBM SPSS Statistics statisztikai programokkal végeztük. Amennyiben a normalitás vizsgálat eredményei megcáfolták a normál eloszlást, Kruskal-Wallis tesztet (vagy normál eloszlás esetén varianciaanalízist (ANOVA - Analysis of Variance)) végeztünk az egyes kezelések kontrollal való összehasonlítására. Az utóbbi két tesztet Post-hoc vizsgálattal egészítettük ki, Tukey és Bonferroni összehasonlítást alkalmaztuk. A Mann-Whitney U tesztet (vagy normál eloszlás esetén a Student t-tesztet) alkalmaztuk a II. fajú hibák elkerülésére és a Kruskal-Wallis elemzés által javasolt szignifikancia megerősítésére. A szignifikancia szintjét  $p < 0,05$  értéken állítottuk be.

Regresszióanalízist végeztünk annak vizsgálatára, hogy az NT-szám és a látótérben fellelhető sejtek száma között lineáris kapcsolat van-e. Az illeszkedés erősségét a korrelációs együtthatóval jellemeztük, míg a determinációs együtthatóval azt fejeztük ki, hogy a modell a függő változó varianciájának mekkora részét magyarázza.

## **3.2. sRAGE tisztítás és vizsgálat módszerei**

### **3.2.1. Sertéstüdő feltárása**

Sertés (*Sus scrofa*) tüdőből kivágtuk a porcos részeket és a lágy szövetből tíz grammot (nedves tömeg) homogenizáltunk 200 ml lízispufferben. A lízisoldatot jégen szonikáltuk.

### **3.2.2. Hemoglobin szelektív kicsapása**

A feltárt oldat habzása és magas viszkozitása gátolta a kromatográfiás elválasztást, ezért a tisztítás előtt a hemoglobin eltávolításához szelektív kicsapást alkalmaztunk 0,5 M-os cink-szulfát oldattal. A keletkezett csapadékot ultracentrifugálással távolítottuk el, majd a pH-t 9,0-re állítottuk. A pH-változás hatására a feleslegben lévő cink kivált cink-Tris komplex formájában. Ezt a csapadékot az ultracentrifugálás megismétlésével távolítottuk el. Ezután semleges pH-n (7,0)  $Mn^{2+}$  és  $Ca^{2+}$  ionokat adtunk az oldathoz.

### **3.2.3. Concanavalin A kromatográfia**

A Concanavalin A (Con A) affinitáskromatográfia hatékony módszer glikozilált fehérjék, így az sRAGE (amely két N-kötésű glikozilációs hellyel rendelkezik) tisztítására. A Concanavalin A a *Canavalia ensiformis* magjából izolált lektin, amely specifikusan köti a szénhidrátokat és glikozilált fehérjéket. Metalloprotein jellegéből adódóan  $Mn^{2+}$  és  $Ca^{2+}$  ionok jelenlétében zárt konformációt vesz fel, ami elengedhetetlen a szénhidrátkötő aktivitásához. Az immobilizált Con A-t tartalmazó állófázis képes szelektíven megkötni a lizátum glikozilált komponenseit. A nem kötődő fehérjék eltávolítása után a célfehérje elúciója kompetitív módon metil- $\alpha$ -D-mannopiranozával történik, amely a későbbi tisztítási lépésekben könnyen eltávolítható.

### **3.2.4. Heparin kromatográfia**

A Con A kromatográfia után nyert fehérjeoldatot 5 mL HiTrap heparin oszlopra vittük fel, amelyet korábban 20 mL A-pufferrel ekvilibráltunk (pH=7,5, 50 mM NaCl és 20 mM Tris-HCl). A gradiens elúcióhoz B-puffert használtunk (pH=7,5, 1 M NaCl és 20 mM Tris-HCl). A puffereket 0,22  $\mu$ m-es pórusátmérővel rendelkező cellulóz-acetát membránon szűrtük.

A mintát perisztaltikus pumpával, 0,5 mL/perc áramlási sebességgel töltöttük az oszlopra. Az elválasztáshoz gradiens elúciót alkalmaztunk és 1,2 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. A kromatogram különböző pontjain mintákat vettünk és SDS-PAGE-vel vizsgáltuk a frakció fehérje tartalmát.

### 3.2.5. Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HIC)

A heparin kromatográfia során gyűjtött sRAGE-t tartalmazó frakciókat összeöntöttük és kis részletekben, annyi ammónium-szulfátot adtunk hozzá, hogy 1 M-os végkoncentrációt érjünk el. A Capto-butyl Impres oszlopot HIC-A pufferrel (pH=7,0, 1 M NH<sub>4</sub>Cl és 20 mM Tris-HCl) mostuk, majd ezt követően a mintát az oszlopra injektáltuk. Az elúciót 100% HIC-A pufferrel indítottuk és lineáris gradiens profilt alkalmaztunk HIC-B pufferrel (pH=7,0, 5 mM CaCl<sub>2</sub> és 20 mM Tris-HCl). Az elválasztás során 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Minden lépésnél mintát vettünk és SDS-PAGE segítségével vizsgáltuk a minta fehérjeösszetételét. A gélkép által megfelelőnek ítélt frakciókat összeöntöttük és 2 × 2 L PBS-ben (pH=7,2, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> és 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) egy éjszakán át dializáltuk (cellulózmembrán dialízis zsákkal). Koncentrálócső segítségével (10 kDa) 3000 × g-n koncentráltuk a dializált fehérjét az 500 µL végleges térfogat eléréséig. A mintát 50-100 µL-es aliquotokra osztottuk és folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

### 3.2.6. Fehérje azonosítás tömegspektrometriával

Mintáink tömegspektrometriás elemzése a HUN-REN SzBK (Hungarian Research Network Szegedi Biológiai Kutatóközpont) és HCEMM (Hungarian Centre of Excellence for Molecular Medicine, azaz Magyar Molekuláris Medicina Kiválósági Központ) Proteomikai Laboratóriumában történt. A tisztított fehérjét 2 × 2 L PBS-ben dializáltuk az ammónium sók eltávolítása érdekében, majd 15%-os SDS-PAGE-n futtattuk és Coomassie festéssel vizsgáltuk. A gélből három pontról 2×2 mm mintát vágunk ki. A három metszetet mikrocentrifuga csőbe helyeztük és tisztított vízzel nedvesen tartva továbbítottuk Szegedre. A mintákat DTT-s redukálás és jóacetamidós alkilálás után tripszinnel emésztették (4 óra, 37°C-on). Extrakció után az emésztett fehérjéket beszárították, majd 30 µL 0,1%-os hangyasavban feloldották, amiből 5-5 µL-t tandem-tömegspektrometriás (HPLC-MS/MS) analízisnek vetettek alá. A lineáris ioncsapdában (itCID, Ion Trap Collision-Induced Dissociation) ütközéssel indukált disszociáció segítségével fragmentálták a peptideket, majd a fragmentumok pontos tömegét a Waters nanoAcquity-LTQ–Orbitrap Elite MS rendszer orbitrap analizátorával határozták meg. A nyers adatokat Proteome Discoverer program segítségével dolgozták fel és az adatbázis-lekérdezést a saját ProteinProspector adatbázisból végezték. A SwissProt.2019.6.12 adatbázis segítségével ellenőrizték a célfehérje melletti szennyeződések jelenlétét. Azonban, mivel a sertés adatbázis nem teljes, az Uniprot adatbázisra tértek át, ahol a *Homo sapiens* és a sertés (*Sus scrofa*) adatbázist használták a továbbiakban.

### **3.2.7. BSA glikálás**

10 ml glikáló puffer oldatot készítettünk (pH=7,4, 20 mM Tris-HCl, 10 mg/L BSA és 1 M ribóz) amit 0,22 µm-es fecskendőszűrőn szűrtünk át lamináris boxban, steril körülmények között. Az oldatot 15 ml-es steril falkoncsőbe helyeztük és a zárt csövet a sterilitás megőrzése érdekében parafilmmel hermetikusan lezártuk. A mintát ezt követően 37 °C-on inkubáltuk 7 napon keresztül, a glikációs folyamat lezajlásáig. A glikáció következtében egy halvány barna oldatot kaptunk. Az oldatot 2,5 ml végső térfogatra koncentráltuk be 30 kDa koncentráló cső segítségével.

### **3.2.8. Glikált fehérje tisztítás**

A nem reagált BSA-t a glikált formától egy 20 ml Q Sepharose anioncserélő állófázist tartalmazó XK 16/20 oszlopon választottuk el. A kiindulási puffer 20 mM Tris-BASE-t (pH=9,0) és 5 mM NaCl-ot tartalmazott, a gradiens elúció 20 mM Tris-BASE-el (pH=9,0) és 2 M NaCl-dal történt. Az elválasztás során gradiens elúciót alkalmaztunk. A tisztítás során 1,5 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, és a glikált frakciókat 30 kDa-os koncentráló cső segítségével 2,5 ml végső térfogatra koncentráltuk. A puffert Sephadex G-25 állófázis segítségével PBS-re cseréltük. A detektálás 280 nm-en történt.

### **3.2.9. Natív és SDS-gélelektroforézis**

Az SDS-PAGE-gélek 50 µl 20%-os (m/V%) nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) tartalmaztak, a futtatópufferben az SDS 1 g/l koncentrációban volt jelen. A szeparálógel összetétele: 0,4 M Tris-HCl, 6,8% / 0,2% (m/V%) akrilamid/bisz-akrilamid, 0,05% (m/V%) ammónium-perszulfát és 0,5% (V/V%) N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin. A koncentráló gel összetétele: 0,1 M Tris-HCl, 4,0% / 0,1% (m/V%) akrilamid/bisz-akrilamid és 0,07% (m/V%) ammónium-perszulfát.

Kísérleteinkben a natív gélelektroforézis során sem a gel, sem a futtató puffer nem tartalmazott SDS-t. A futtató pufferből egy tízszeres töménységű koncentrátumot készítettünk, ami 25 mM Tris-HCl-t és 200 mM glicint tartalmazott. A koncentrátumot közvetlen a felhasználás előtt hígítottuk tízszeresére.

A natív gélelektroforézis során a minta futásának nyomon követéséhez brómfenol-kék festéket használtunk. Egy háromszorosan töményebb törzsoldatot készítettünk, amit 1:3 arányban adtunk a mintához. A törzsoldat 240 mM Tris-HCl-t (pH=6,8), 30% glicerint és 0,03% brómfenol-kéket tartalmazott. A törzsoldat elkészítéséhez a brómfenol-kék 0,4%-os (m/V%) nagy tisztaságú ioncserélt vízzel készített oldatát használtuk.

A fehérjék festéséhez SDS-PAGE és Natív-PAGE esetében is Coomassie-kéket használtunk. A gélt először 50% (V/V%) metanol és 10% (V/V%) ecetsav oldatában fixáltuk, ezt követően 0,1% (m/V%) Coomassie-kék R350, 20% (V/V%) metanol és 10% (V/V%) ecetsav oldatával festettük.

A szintelenítést 50% (V/V%) metanol és 10% (V/V%) ecetsav oldatával végeztük, majd a géleket 5% (V/V%) ecetsav oldatban tároltuk.

### **3.2.10. sRAGE HEK-293 sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata konfokális mikroszkópiával**

A HEK-293 sejtvonalat fenolvörös-mentes MEM Alpha (alfa-minimum esszenciális tápoldat) médiumban, 10% FBS-sel kiegészítve, 37 °C-on és 5% CO<sub>2</sub> koncentráción tenyésztettünk, 80%-os konfluencia fenntartásával. A mikroszkópos képalkotást 6-csatornás tárgylemezen végeztük. A sejteket PBS-el mostuk majd tripszin-EDTA 0,25%-os oldatával választottuk le a tenyészedenyről, ezt követően PBS-ben centrifugáltuk (1000 rpm), végül médiummal szuszpendáltuk. A tárgylemezre csatornánként 54 000 sejtet helyeztünk el a szuszpenzióból. A sejtek megtapadása után (kb. 1 óra) a médiumot a kísérletben használt fehérje-tartalmú, vagy a kontroll esetében a tenyésztéshez használt médiumra cseréltük. A glikált és nem glikált BSA közötti különbség vizsgálatához 5 µM BSA-t vagy 5 µM RBSA-t adtunk a kontroll médiumhoz. Az sRAGE kísérletekben a kontroll médium 5 µM sRAGE-t tartalmazott. Egy éjszakán át történő inkubációt követően a sejteket a 3.1.2 Immuncitokémia és sejtfestés fejezetben részletezett módon jelöltük (az aktint Alexa 561 falloidinnel és a sejtmagokat Hoechst festékkel). A konfokális mikroszkópiát Zeiss LSM 710 mikroszkóppal és 20× objektívvel (Plan-Apochromat, N.A.: 0,8, M27) végeztük. A tárgylemez csatornáját Tile scan módban vizualizáltuk, és amennyiben több síkban helyezkedtek el a sejtek, Z-stacket alkalmaztunk az optikai szelektálás megvalósítására. A sejtszámlálást Fiji ImageJ szoftverrel végeztük. A képeket automatikus küszöbértékek alkalmazásával kontrasztosítottuk a sejtsűrűségtől függően Brensen és Panshalkar módszerekkel, alkalmanként 15 pixeles sugárral, Contrast opcióval. A kép bináris formátummá alakítása után a „Fill hole” funkcióval töltöttük fel a pixel hiányból adódó réseket és a szomszédos sejtmagokat a watershed algoritmussal különítettük el. A kapott képet a Particle Analyzer funkcióval elemeztük. A küszöbértéket 50-100-150 pixel között változtattuk. Azt a legalacsonyabb küszöbértéket alkalmaztuk, ahol maximum 50 sejtmagot kellett manuálisan korrigálni a háttér miatt. A sejtszámlálás során keletkezett maszkokat manuálisan ellenőriztük, és ahol 50 db sejtmagnál többet vétett a számolás, azt magasabb küszöbértékkel megismételtük. Ahol 50 db alatt volt a hibák száma, ott manuálisan korrigáltuk az eredményt.

## **4. Eredmények**

### **4.1. IRSp53 és I-BAR vizsgálatok**

#### **4.1.1. IRSp53 endogén expressziója és jelenléte a membrán nanocsövekben**

Konfokális mikroszkópiával kimutattuk az IRSp53 endogén expresszióját COS-7 és A20 sejtekben, ill membrán nanocsövekben, A sejtekben a fehérje eloszlása egyenletes volt, de a sejtmembrán alatt feldúsult.

#### **4.1.2. Az IRSp53 és az aktin kolokalizációja**

Az IRSp53 és a filamentális aktin kolokalizált a membrán alatt, a citoplazmában és a nanocsövekben. A kolokalizáció erősségét Manders-koefficiensekkel jellemeztük. A kolokalizáció mértéke eltért a két sejttypusban, azonban a nanocsövekben mindkét sejtvonalon esetében szoros átfedés volt megfigyelhető a csövek teljes hossza mentén.

#### **4.1.3. IRSp53 és I-BAR domén transzfekciójának hatása a COS-7 sejtek morfológiájára**

Vizsgálataink célja annak feltárása volt, hogy az IRSp53 fehérje és az I-BAR domén miként befolyásolja a filopódiumok és az NT-k morfológiáját COS-7 sejtekben. Az I-BAR és az IRSp53 túlzott expressziója hatással volt a sejtnyúlványok morfológiájára. A kontroll sejtekhez képest mind az I-BAR domén, mind a teljes hosszúságú IRSp53 túlexpressziója jelentősen növelte a filopódiumok számát és hosszát, utóbbi esetben erőteljesebb mértékben. Emellett mindkét fehérje fokozta az NT-k gyakoriságát és elágazásainak számát, miközben az NT-k átmérője csökkent. Az IRSp53 túltermelés hatására nemcsak az NT-k, de elágazásaik hosszúsága is növekedett. Fluoreszcens jelintenzitás méréseink alapján mind az I-BAR, mind az IRSp53 bizonyos helyeken feldúsul az NT-kben. Ezeknél a feldúsulási pontoknál a nanocsövek jellemzően megtörnek és más irányban futnak tovább.

#### **4.1.4. IRSp53 és I-BAR domén transzfekciójának hatása A20 B-limfóma sejtekre**

A20 sejtekben az IRSp53 és I-BAR transzfektálása jelentősen növelte a filopódiumok számát és hosszát a kontroll sejtekhez képest. Az I-BAR túltermelődése - a COS-7 sejteknél tapasztaltakhoz hasonlóan - erőteljesebb hatást okozott. Ezzel szemben az NT-k képződését egyik fehérje túltermelése sem befolyásolta számottevően: sem gyakoriságuk, sem hosszúságuk nem változott szignifikánsan. Az I-BAR expresszió vékonyabb NT-k kialakulásához vezetett, és bár mindkét fehérje fokozta az NT-k elágazását, alacsony előfordulásuk miatt ezek hossza nem volt statisztikailag értékelhető. A COS-7 sejtekkel ellentétben a túltermelt fehérjék NT-kben történő felhalmozódása csak minimális mértékben volt megfigyelhető.

#### **4.1.5. Az IRSp53 és I-BAR doménjének hatása az aktin polimerizációjára**

Az IRSp53 fehérje és az I-BAR domén aktin polimerizációra gyakorolt hatását TIRF mikroszkópiával és fluoreszcens aktin polimerizációs tesztekkel vizsgáltuk, különböző szub- és szuper-sztöchiometrikus koncentrációk mellett. Kontroll körülmények között (0,5  $\mu\text{M}$  aktin) átlagosan  $85 \pm 55$  aktin filamentum képződött. Az aktinhoz képest alacsony I-BAR koncentráció esetén (aktin:I-BAR = 10:1) a filamentumok száma kismértékben ( $100 \pm 53$ ), átlagos hosszuk számottevően megnövekedett ( $15,67 \pm 4,27$   $\mu\text{m}$ -ről  $19,08 \pm 5,0$   $\mu\text{m}$ -re). Az előbbinél magasabb, de még mindig szub-sztöchiometrikus I-BAR koncentrációnál (aktin:I-BAR = 5:1) a filamentumok száma jelentősen csökkent ( $22 \pm 14$ ), míg magas I-BAR koncentrációnál (60  $\mu\text{M}$  I-BAR, aktin:I-BAR = 1:120) a filamentumok száma drámaian megnőtt ( $450 \pm 150$ ), és hosszuk jelentősen lecsökkent, főként aktin magok voltak megfigyelhetők.

A pirénnel jelölt aktin polimerizációs kísérletek (2,5  $\mu\text{M}$  aktin, 5% pirén) megerősítették, hogy magas I-BAR koncentráció mellett (aktin:I-BAR = 1:36) az aktin nukleációja felgyorsul, míg alacsony koncentrációnál (aktin:I-BAR = 1:10) a kinetika nem tér el a kontrolltól.

Az IRSp53 hatásának vizsgálata során a TIRFM képek statisztikai elemzése azt mutatta, hogy szub-sztöchiometrikus IRSp53 koncentrációban (0,25  $\mu\text{M}$  IRSp53, aktin:IRSp53 = 2:1) elsősorban közepes hosszúságú filamentumok képződnek, míg magas IRSp53 koncentrációnál (5  $\mu\text{M}$  IRSp53, aktin:IRSp53 = 1:10) jelentősen megnő az aktin magok száma.

Eredményeink azt mutatják, hogy mind az I-BAR domén, mind az IRSp53 fehérje aktin nukleációs magok képződésének elősegítése révén gyorsítja az aktin filamentumok polimerizációját.

#### **4.2. sRAGE tisztítással és BSA glikálással kapcsolatos eredmények**

A nanocsövek képződésének mechanizmusát egy olyan rendszerben lehet megfelelően tanulmányozni, ahol azok képződését szabályozni tudjuk. Egy ilyen lehetőséget biztosít számunkra a RAGE aktiválása glikációs végtermékekkel, illetve kompetitív gátlása sRAGE fehérjével. Ennek a módszernek a kidolgozásához szükségünk van megfelelő tisztaságú sRAGE és glikált fehérje (esetünkben glikált BSA) előállítására. A filogenetikai elemzés alapján a sertés (*Sus scrofa*) és a szarvasmarha (*Bos taurus*) RAGE fehérjéi mutatták a legnagyobb hasonlóságot a humán RAGE-hez, ezért a fehérjét sertéstüdőből izoláltuk.

#### **4.2.1. A hemoglobin-szennyeződés eltávolítása sertéstüdő homogenizátumból**

Az sRAGE fehérjét sertéstüdőből nyertük ki, azonban a feltárás után kapott, magas fehérjetartalmú, vörös és erősen viszkózus folyadék DNáz kezelésre sem veszítette el viszkozitását, és instabilitása miatt kromatográfiás elválasztásra alkalmatlan volt. A szövet vértartalma következtében a feltárás során kapott oldat jelentős albumin és hemoglobin szennyezést tartalmazott, ezért könnyen habosodott, ami elősegíti a tisztított fehérje kicsapódását. Ezért a hemoglobint cink kezeléssel távolítottuk el: az oldathoz adott cinkionok hatására a hemoglobin denaturálódott és pH 8,0 felett kicsapódott. Ezt SDS-PAGE és abszorbancia mérésekkel igazoltuk. A tiszta sRAGE mintán végzett kontrollkísérletek alapján a cinkkezelés nem okozott sRAGE-veszteséget, megfelelő módszernek bizonyult a hemoglobin szelektív eltávolítására.

#### **4.2.2. Concanavalin A kromatográfia**

Az sRAGE biológiailag aktív, N-kötésű glikoformájának elválasztására Con A affinitás-kromatográfiát alkalmaztunk, mivel ez a glikoforma szükséges a fehérje megfelelő kötőképességéhez. A Con A specifikusan kötődik a mannóz- és glükóz-oldalláncokat tartalmazó glikoproteinekhez, így lehetővé tette az aktív sRAGE szelektív elválasztását az inaktív formáktól és egyéb fehérjéktől. A cinkionos kezelés után az oldat stabilitása és viszkozitása már lehetővé tette a minta közvetlen injektálását az oszlopra, anélkül, hogy fehérjekicsapódást vagy nyomásnövekedést tapasztaltunk volna. A Con A kötéséhez szükséges kalcium- és mangánionok jelenlétét pH 7,0-n biztosítottuk, elkerülve az állófázis affinitásvesztését.

A tisztítás során a nem glikoproteinek hatékonyan eltávolításra kerültek, jelentősen növelve a minta tisztaságát. Az elválasztás hatékonyságát, a gyűjtött frakciók tisztaságát SDS-PAGE segítségével igazoltuk.

#### **4.2.3. Heparin kromatográfia**

A heparin affinitás-kromatográfiát alkalmaztuk további tisztításra, kihasználva a heparin RAGE extracelluláris doménjéhez való specifikus kötődését. A heparin erősen szulfatált, ismétlődő diszacharid egységekből álló szerkezete nemcsak affinitásalapú kötődést, hanem gyenge ioncserélő hatást is biztosít, ezáltal növelve az elválasztás hatékonyságát. A heparin oszlopon végzett tisztítás során több szennyező fehérjét sikerült eltávolítani, amit SDS-PAGE-vel igazoltunk. A fennmaradó szennyeződések eltávolítására további tisztításra volt szükség, amelyet a sógradiensből adódó magas sókoncentrációt kihasználva hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfiával (HIC) valósítottunk meg.

#### **4.2.4. Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HIC)**

Az sRAGE fehérje nem tartalmazza az apoláris transzmembrán domént, de rendelkezik hidrofób felületekkel. A módszer alapelve azon a jelenségen alapul, hogy magas ionerősségű mozgófázisban a fehérjék hidrofób oldalukat az apoláris állófázis felé fordítják, és így kötődnek hozzá. A heparin oszlopról eluált minta eleve nagy sókoncentrációval rendelkezik, így minimális ammónium-szulfát hozzáadásával már biztosítható a HIC-oszlop butil oldalláncaihoz történő kötődés. Az állófázissal történő kölcsönhatás reverzibilis, így a mozgófázis sókoncentrációjának csökkentésével a fehérjék eluálhatnak. Az elválasztás hatékonyságát azonban meghatározza, hogy a fehérje hidrofób régiói mennyire hozzáférhetők: amennyiben ezek a térszerkezet átrendeződése miatt a fehérje belsejébe kerülnek, a HIC-elválasztás hatékonysága jelentősen csökkenhet.

Az SDS-PAGE analízist megnehezítette a különböző frakciók eltérő ionerőssége, amely (a glikoproteinek gyengébb SDS-kötő tulajdonságával együtt) látszólagos molekulatömegeltolódást eredményezett. Az oszlopra felvitt, 1 M ammónium-szulfátot tartalmazó mintában az sRAGE kb. 60 kDa-os sávként jelent meg a gélképen. A HIC során további szennyező fehérjéket sikerült eltávolítani, egy ~50 kDa-os fehérje a gradiens elején, míg egy ~70 kDa-os komponens a célfehérje eluálása után jelent meg, alacsonyabb sókoncentrációnál.

#### **4.2.5. Azonosítás HPLC-MS/MS-sel**

A HIC kromatográfiával tisztított mintát tripszines emésztés után HPLC-MS/MS kapcsolt technikával vizsgáltuk. Az eredmények alapján a tisztított fehérje nem tartalmazott jelentős szennyezést, csak minimális keratin, valamint alacsony mennyiségben sertés eredetű kitináz-3-szerű fehérje 1 és protrombin volt kimutatható. A célfehérje izoformáit a módszer nem mutatta ki, azonban a sertés RAGE fehérje (Uniprot: A0A4X1V556) egyértelműen azonosítható volt. Kizárólag az extracelluláris doménre jellemző peptidek kerültek detektálásra, míg a transzmembrán régió nem, ami igazolja, hogy a minta a hasított formát, az sRAGE-t tartalmazta. Továbbá a mintában egy nagyfokú szekvenciahasonlóságot mutató RAGE-variáns (B9TSR6) jelenléte is feltételezhető volt.

#### **4.2.6. Marha szérum albumin (BSA) glikációja ribózzal**

A glikált fehérjéket tipikusan glükózzal való inkubálással állítják elő. A folyamat gyorsítható a hőmérséklet emelésével. A ribóz lényegesen reaktívabb a glikáció során, mint a D-glükóz, mivel oldatban jóval nagyobb arányban fordul elő nyílt láncú (aldehidosoportot tartalmazó) formában. Az öttagú gyűrű instabilitása miatt a ribóz könnyebben alakul vissza reaktív (nyílt

láncú) formába, így gyorsabban és intenzívebben képes fehérjékhez kötődni, mint a stabilabb gyűrűs szerkezetű D-glükóz. A glikáció során megváltozik a fehérje izoelektromos pontja, így a visszamaradt reaktánsokat és reaktív dikarbonil vegyületeket anioncsere kromatográfiával választottuk el a glikált fehérjétől, majd a magas sótartalmú eluátumot méretkizárásos kromatográfiával PBS pufferre cseréltük. A 7 napos glikálás során jellegzetes barnás elszíneződés alakult ki, amely a ribózmentes kontrollban nem volt megfigyelhető, és a koncentráció során tovább erősödött. Az anioncserélő oszlopon történő elválasztás során a nem reagált ribóz, a reaktív karbonil vegyületek és a belőlük képződő pigmentek a korai frakciókban jelentek meg, míg a glikált BSA csak a gradiens végén eluált barnás színű frakciók formájában. A glikált frakciókat összegyűjtöttük és 30 kDa-os koncentráció segítségével 2,5 ml végső térfogatra koncentráltuk.

#### **4.2.7. sRAGE kötődésének vizsgálata natív-PAGE módszerrel**

A natív gélelektroforézis során sRAGE, RBSA és nem glikált BSA különböző arányú keverékeit vizsgáltuk, amelyeket 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltunk. A natív gélben a fehérjék megőrzik eredeti szerkezetüket, így vizsgálható két fehérje egymáshoz való affinitása. Az RBSA és az sRAGE önállóan, eltérő migrációjú sávként jelent meg a natív gélben. Ez megfigyelhető volt az 1:1 arányú keverékük esetén is, azonban egy lassabban vándorló komplex sávja is megjelent. Az RBSA arányának növelése tovább erősítette a komplex sávját. A feleslegben alkalmazott sRAGE esetén is jól detektálható komplexképződés volt megfigyelhető. A komplex nem jelent meg, amikor az sRAGE-t nem glikált BSA-val inkubáltuk, ami arra utal, hogy mind az sRAGE, mind a glikált fehérje funkcionális, és specifikus kölcsönhatás alakul ki közöttük.

#### **4.2.8. Az sRAGE és a glikált BSA hatása HEK-293 sejtvonal membrán nanocső képzésére**

Korábbi kísérletek alapján a RAGE aktiválása NT képződést indukál, ezért megvizsgáltuk, hogy glikált BSA is kiválthatja-e ezt a hatást, és a csövek kialakulása gátolható-e sRAGE alkalmazásával. Az NT-k képződését HEK-293 sejtvonalon konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk kontroll körülmények között (csak médium), illetve nem glikált BSA, RBSA, sRAGE és sRAGE + RBSA jelenlétében.

A sejtek tömör elrendeződése miatt a membrán nanocsövek csak alacsony konfluenciájú területeken voltak vizualizálhatók. A sejtszámot magfestéssel határoztuk meg, az NT-ket az F-aktin fluoreszcens jelölésével azonosítottuk, majd ezek alapján relatív csőszámot számoltunk a hipotézisvizsgálatokhoz.

A sejtszám és az NT-szám kapcsolatát regresszióanalízissel vizsgáltuk, amely erős pozitív összefüggést mutatott a kontroll mintákban. Az NT-k száma a sejtszámmal arányosan nőtt mindaddig, amíg a sejtsűrűség ezt lehetővé tette.

A kontroll mintában a magas korrelációs együttható ( $r = 0,98$ ) erős lineáris kapcsolatot jelez, míg az  $R^2$  érték (96,03%) azt mutatja, hogy a lineáris modell kiválóan leírja az adatok közti összefüggést.

A regressziós elemzés alapján a BSA- és RBSA-kezelések esetében is erős lineáris kapcsolat mutatkozott a sejtszám és az NT-szám között. A modell BSA esetén az NT-szám változásának 85,36%-át, RBSA esetén pedig 81,15%-át magyarázta, ami a kontrollhoz hasonlóan jó illeszkedést és szoros pozitív korrelációt jelez.

A kontroll-, a BSA- és az RBSA-kezelések esetében egyaránt erős lineáris összefüggést találtunk a sejtszám és az NT-k száma között, vagyis az NT-k száma a sejtszám növekedésével arányosan emelkedett. RBSA jelenlétében a magasabb regressziós koefficiens nagyobb NT-számot jelezett minden vizsgált sejtszám mellett, miközben a meredekség a kontrollmintához hasonló maradt. Ez arra utal, hogy az RBSA fokozza az NT-k képződését.

sRAGE jelenlétében a regressziós modell hatékonysága jelentősen csökkent. Míg a kontroll, a BSA- és RBSA-kezelt mintákban erős pozitív korreláció volt megfigyelhető a sejtszám és az NT-szám között, addig sRAGE esetén ez csak közepes kapcsolatot mutatott ( $r = 0,64$ ), és a modell az NT-szám változásának mindössze 40%-át magyarázta. RBSA és sRAGE 1:1 arányú alkalmazásakor a kapcsolat tovább gyengült, a regresszió statisztikailag nem volt szignifikáns, ami arra utal, hogy sRAGE jelenlétében a sejtszám hatása az NT számra nagymértékben csökken. RBSA és sRAGE együttes jelenlétében a sejtszám már nincs hatással az NT-k számára.

A hipotézisvizsgálatok igazolták, hogy az RBSA és az sRAGE hatással vannak az NT-képződésre. Mivel az adatok nem minden esetben követték a normál eloszlást, nemparaméteres statisztikai tesztek alkalmaztunk, amelyek szignifikáns különbséget mutattak a kontroll, az RBSA-val kezelt és az sRAGE-vel kezelt sejtek relatív NT-száma között. A post hoc elemzések alapján az sRAGE-, valamint az sRAGE+RBSA kezelésben részesült sejtek relatív NT-száma szignifikánsan alacsonyabb a kontrollhoz képest, míg az RBSA-kezelés az NT-k számának jelentős növekedését eredményezte. A kontroll és a BSA-val kezelt minták között nem mutatkozott szignifikáns különbség a relatív nanocsőszámban.

Az sRAGE és az sRAGE+RBSA (1:1) hatása között nem volt szignifikáns különbség. Ezek a minták jelentősen kevesebb nanocsövet tartalmaztak, mint a kontroll és a BSA-kezeltek, míg az RBSA-kezelés szignifikánsan növelte az NT-k számát. Az eredmények alapján az RBSA serkenti, az sRAGE pedig gátolja a nanocső-képződést.

## **5. Diszkusszió**

### **5.1. IRSp53 és I-BAR eredmények konklúziója**

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az endogén módon expresszálandó citoplazmatikus IRSp53 fehérje a COS-7 és az A20 sejtek által képzett NT-kben is jelen van. A teljes hosszúságú IRSp53 mindkét sejtvonalonban (COS-7 és A20) növelte az NT-k és filopódiumok számát és hosszát. Sejtvonalspecifikus különbségeket is tapasztaltunk: COS-7 sejtekben az IRSp53 és I-BAR túltermelés az NT-k számára erőteljesebb hatást gyakorolt az A20 sejtekhez képest, ami feltehetőleg a két sejtípus eltérő NT-képző mechanizmusával magyarázható.

Az IRSp53 vagy annak I-BAR doménjének transzfekciója COS-7 és A20 sejtekbe egyaránt a filopódiumok számának és hosszának növekedését eredményezte. Ugyanakkor kizárólag a teljes hosszúságú IRSp53 fehérje volt képes mindkét sejtvonalonban azonos változást kiváltani az NT-k és a filopódiumok számában. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az IRSp53 és annak I-BAR doménje egyaránt fontos szerepet játszanak az NT-k dinamikájának szabályozásában. Míg az I-BAR domén membrángörbületet kialakító tulajdonsága révén elsősorban az NT-k képződésében vehet részt, addig a teljes hosszúságú IRSp53 fehérje inkább az NT-k elongációjában tölt be meghatározó szerepet.

Az NT-k elvékonyodását is megfigyeltük, amely feltehetően azok fokozott növekedési dinamikájával magyarázható. Emellett megemelkedett IRSp53- vagy I-BAR koncentráció esetén az NT-k több elágazást növesztettek, ami összhangban áll az I-BAR domén membrángörbületet kialakító tulajdonságával.

Továbbá TIRFM-alapú vizsgálataink és aktin polimerizációs kísérleteink igazolták, hogy mind az IRSp53, mind annak I-BAR doménje aktinnukleáló hatással rendelkezik.

Modellünk szerint az I-BAR és IRSp53 lokális felhalmozódása gócpontokat képez, amelyek elősegítik a membránnyúlványok és NT-k növekedését, miközben az IRSp53 biztosítja az aktin filamentumok egyenletes eloszlását az NT-k teljes hossza mentén. Az IRSp53 nukleáló hatása révén kialakult aktin magok új kötőhelyet biztosítanak az aktin filamentumok növekedéséhez. Az újonnan keletkező aktin filamentumok megerősítik a növekvő aktin kötegeket. Ezek a

molekuláris támaszpontok biztosítják azokat a mechanizmusokat, amelyek lehetővé teszik, hogy az aktin filamentumok száma az NT-k teljes hosszában hozzávetőlegesen állandó maradjon. Mivel az IRSp53 dimerek a membránhoz rögzülnek, így tehát mechanikai támaszpontként is szolgálnak az aktin filamentum-kötegek növekedéséhez és az erő kifejtéshez az NT-k mentén.

## **5.2. sRAGE tisztítással kapcsolatos eredmények konklúziója**

Az sRAGE sertés tüdőből történő izolálása mellett döntöttünk, mivel fehérje erősen konzervált szekvenciával, megfelelő mérettel és az emlősökre jellemző N-kötésű glikozilációs mintázattal rendelkezik. A tüdőszövet magas vértartalma miatt a fehérje kivonása során jelentős hemoglobin szennyezést tapasztaltunk, amit cinktartalmú pufferrel szelektíven kicsaptunk. Ennek eredményeként tiszta oldatot kaptunk, amely már alkalmasnak bizonyult további kromatográfiás tisztításra. Concanavalin A oszlop segítségével sikerült a glikozilált fehérjéket elválasztani a többi, cukoroldalláncot nem tartalmazó fehérjétől. Az sRAGE-t - heparin affinitása révén - hatékonyan tisztítottuk tovább heparin oszlop segítségével, amit erősített az oszlop ioncserélő hatása is. A fennmaradó szennyeződések eltávolítása céljából hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfiát is alkalmaztunk. Egy, az irodalomban eddig nem elérhető komplexebb tisztítási módszert alkalmaztunk, amellyel 10 gramm sertés tüdőből 0,77-1,5 mg tiszta sRAGE fehérjét nyertünk, amit végül HPLC-MS/MS módszerrel is azonosítottunk.

Az sRAGE ligandumaként ribózzal glikált BSA-t (RBSA) alkalmaztunk, amelyet a glikálás után ioncserés kromatográfiával tisztítottunk a megfelelő tisztaság biztosítása érdekében. Az RBSA sRAGE-hoz való kötődését natív PAGE segítségével igazoltuk. Eredményeink alapján a kapott fehérjék alkalmasnak bizonyultak a sejt kultúrában történő NT-képződés szabályozásának vizsgálatára. Ezért az sRAGE és az RBSA hatását a HEK-293 sejtvonalon vizsgáltuk, mivel ez endogén módon expresszálja a RAGE fehérjét. A kontrollhoz képest a BSA-val történő kezelés nem eredményezett jelentős változást az NT-k számában. Az RBSA tenyészetbe adása jelentősen növelte az NT-k számát, mind a kontrollhoz, mind a nem glikált BSA-hoz képest. Az sRAGE fehérjével történő kezelés ugyanakkor szignifikánsan csökkentette az NT-k számát, de teljes gátlást nem tapasztaltunk, amely összhangban van a korábbi RAGE knockout vizsgálatokkal, ahol a receptor hiánya a nanocsövek számának csökkenését eredményezte.

A RAGE receptor kompetitív módon történő gátlását sRAGE és RBSA együttes alkalmazásával

vizsgáltuk. Az sRAGE hatása az NT számra még azonos mennyiségű RBSA jelenlétében is észlelhető volt.

Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a glikált fehérje (RBSA) jelentősen növelte az NT-számot, míg az sRAGE gátló hatást mutatott az NT-képződésre. Ezzel teljesítettük a kitűzött célunkat, hiszen egy olyan kísérleti rendszert alakítottunk ki, amely lehetővé teszi a membrán nanocsövek képződésének szabályozását.

## **6. Új eredmények bemutatása:**

### **6.1. IRSp53 és I-BAR domén hatása a nanocsövek (NT-k) képződésére**

- 6.1.1. Kimutattuk, hogy az IRSp53 fehérje endogén módon expresszálódik COS-7 majomvese- és A20 egér B-limfóma sejtekben, és jelen van az általuk képzett nanocsövekben is.
- 6.1.2. Megmutattuk, hogy az IRSp53 fehérje, valamint I-BAR doménje jelentős hatást gyakorol a vizsgált sejtek morfológiájára.
- 6.1.3. Megmutattuk, hogy az IRSp53-t és I-BAR-t kódoló plazmid transzfektálása után a COS-7 és A20 sejt vonal esetében is megnőtt a filopódiumok száma és hossza.
- 6.1.4. Megfigyeltük a fehérjék hatására a képződött csövek átmérőjének csökkenését, amit a gyorsabb növekedésüknek tulajdonítunk.
- 6.1.5. Megfigyeltük, hogy a túltermeltetett fehérjék hatására az NT-ken jelentősen több elágazás keletkezett, különösen az I-BAR domén esetében, amely ismert erőteljes membrángörbületet kialakító tulajdonságokkal bír.
- 6.1.6. Bizonyítottuk TIRFM vizsgálatainkkal és aktin polimerizációs tesztekkel, hogy mind a teljes hosszúságú IRSp53 fehérje, mind annak N-terminális I-BAR doménje, aktin nukleáló hatással rendelkezik. A membránhoz rögzült I-BAR és IRSp53 új aktin filamentumok képződését segíti elő, így serkenti az aktin összeszerelődését és a sejtnyúlványok kialakulása mellett azok elongációját is.
- 6.1.7. Kimutattuk, hogy az IRSp53 a vizsgált sejtípustól függetlenül kolokalizál az aktin filamentumokkal, és membránköti képessége révén elősegítheti az NT-k szerkezetének kialakulását.
- 6.1.8. Bizonyítottuk, hogy az IRSp53 főként az aktin filamentum által vezérelt, filopódiumszerű kitüremkedésekből kiinduló NT-k képződését segíti. Ez a COS-7 sejtekre jellemző. Ez a hatás nem figyelhető meg az A20 sejtekben,

amelyek NT-iket egy másik módszerrel, a sejtek ellentétes irányú eltávolodásának eredményeként alakítják ki.

- 6.1.9. Felállítottunk egy olyan modellt, amely szerint az IRSp53 nemcsak membrángörbületet kialakító hatásával, hanem aktin-szervező tulajdonságai révén is stabilizálja a képződő nanocsövek szerkezetét, és szerkezeti támaszt nyújt az új aktin filamentumok növekedéséhez. Az IRSp53 fehérje gócpontokba csoportosulva az aktin polimerizáció kezdeti szakaszát (nukleáció) serkentve segíti az új aktin filamentumok képződését, továbbá összeköttetést biztosít a membrán és a F-aktin között.

## **6.2. sRAGE előállítása és glikált fehérjékhez való kötődése**

- 6.2.1. Kidolgoztunk egy tisztítási protokollt, amely segítségével nagy tisztaságú sRAGE fehérjét tudunk kinyerni sertéstüdőből. Ezzel jelentősen csökkentettük az állatáldozatok mértékét a korábbi protokollokhoz képest. Méretének köszönhetően egy sertés tüdő több kísérletre elegendő fehérjét biztosított számunkra. A protokoll részeként:
- 6.2.1.1. Kidolgoztunk egy hatékony eljárást a kromatográfiás elválasztást lehetetlenné tévő hemoglobin eltávolítására, annak cinktartalmú pufferrel való kicsapása révén, úgy, hogy az sRAGE mennyisége a kezelés hatására ne csökkenjen.
- 6.2.1.2. Elsőként alkalmaztunk sikeresen sRAGE tisztításához hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfiát (HIC), a feltárás után a mintában jelenlévő szennyezőanyagok eltávolítására.
- 6.2.2. Kidolgoztunk egy, a korábbi protokolloktól eltérő, több kromatográfiás lépésből álló (affinitás-, ioncsere- és hidrofób kölcsönhatáson alapuló) eljárást, amely lehetővé tette megfelelő mennyiségű, nagy tisztaságú sRAGE fehérje kinyerését sertés tüdőszövetből.
- 6.2.3. Kimutattuk HPLC-MS/MS technikával, hogy a tisztított fehérje azonos az sRAGE fehérjével.
- 6.2.4. Megfelelő tisztaságú glikált BSA-t állítottunk elő az sRAGE működőképességének bemutatásához és a HEK-293 sejtvonalra gyakorolt hatásának vizsgálatához.
- 6.2.5. Kidolgoztunk a glikált BSA előállításához egy protokollt, ahol D-ribózt használtunk redukáló cukorként, amely sajátos szerkezetéből adódóan lehetővé tette a glikáció gyorsítását. Méréseink szerint már egy hetes, 37 °C-on történő

inkubációval megfelelő glikációs fokot értünk el. Kidolgoztunk egy protokollt a BSA glikálása során megmaradt reaktánsok, melléktermékek és a glikált fehérje elválasztására.

A módszer egyedisége, hogy végül egy reaktív melléktermékektől mentes natív pufferben oldott glikált fehérjét kaptunk, amit élősejtes kísérletekhez tudunk felhasználni. A technika gyorsasága az eddig kidolgozott leggyorsabb protokollokkal összemérhető.

- 6.2.6. Megerősítettük natív PAGE segítségével, hogy az sRAGE specifikusan és megfelelő affinitással kötődik a glikált BSA-hoz, míg a kontrollként használt BSA-hoz nem.
- 6.2.7. Megvizsgáltuk a glikált BSA (RBSA) HEK-293 sejtvonagra gyakorolt hatását. A fehérje működőképesnek bizonyult, hiszen szignifikánsan növelte a sejtek között képződő nanocsövek számát, míg a nem glikált BSA nem okozott változást a kezeletlen (kontrollként használt) sejtekhez képest.
- 6.2.8. Bizonyítottuk az sRAGE fehérje működőképességét élő sejteken is, hiszen jelenléte a HEK-293 sejttenyészetben jelentősen csökkentette az NT-k számát. Teljes gátlás nem volt megfigyelhető, de hatását azonos mennyiségű RBSA mellett is tapasztaltuk.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Szabó-Meleg Edinának a munkám során nyújtott szakmai segítségéért és iránymutatásáért.

Köszönettel tartozom a Biofizikai Intézet egykori és jelenlegi vezetőinek, Prof. Dr. Nyitrai Miklósnak és Prof. Dr. Lukács Andrásnak, amiért biztosították a kutatásomhoz szükséges feltételeket.

Hálás vagyok a membrán nanocső kutatócsoport minden tagjának az együttműködésért, külön is kiemelve Dr. Halász Henriett és Brunner Brigitta közreműködését.

Köszönöm a szakmai tanácsokat Dr. Matkó Jánosnak, valamint az együttműködést a Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpont Imaging Core Facility és az ÁOK Ábrahám István Nano-Bioimaging Központ munkatársainak. Köszönettel tartozom továbbá a Biofizikai Intézet minden munkatársának, akik hozzájárultak munkám sikeréhez.

Külön köszönöm a fehérjeazonosításban nyújtott segítséget Dr. Hunyadi-Gulyás Éva Csillának. Köszönöm az I-BAR plazmidot Dr. Laura Macheskynek, valamint az aktin tisztításban nyújtott segítséget Prof. Dr. Bugyi Beátának.

Hálával tartozom feleségemnek, Ibolyának, aki végig türelemmel, szeretettel és biztatással állt mellettem. Köszönöm kisfiamnak, Márknak, hogy derűjével és mosolyával mindig emlékeztetett arra, mi az igazán fontos az életben. Hálás vagyok szüleimnek, édesanyámnak és édesapámnak, akik szeretetükkel, támogatásukkal végig kísérték ezen az úton.

A kutatást az alábbi támogatások tették lehetővé:

Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program, Magyarország, támogatási szám: GINOP-2.3.2-15-2016-00036; az Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválóság Programja a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap forrásából, Magyarország, támogatási szám: ÚNKP-21-3-II (H.H.); a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kara Dr. Szolcsányi János Kutatási Alapjának támogatása (ÁOK-KA) (Sz.M.E.); valamint az Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Program, támogatási szám: EFOP 3.6.1-16.2016.00004.

## A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

**Madarász T**, Brunner B, Halász H, Telek E, Matkó J, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. Molecular Relay Stations in Membrane Nanotubes: IRSp53 Involved in Actin-Based Force Generation. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 23;24(17):13112. doi: 10.3390/ijms241713112. PMID: 37685917; PMCID: PMC10487789.

**IF: 4,9**

**Q1/D1**

**Madarász T**, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. Efficient purification of soluble receptor for advanced glycation end-products from *Sus scrofa* lung tissue and synthesis of its binding ligand, glycated bovine serum albumin. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2024 Oct 15;1247:124326. doi: 10.1016/j.jchromb.2024.124326. Epub 2024 Sep 30. PMID: 39369589.

**IF: 2,8**

**Q2**

## Egyéb közlemények

Halász H, Ghadaksaz A, **Madarász T**, Huber K, Harami G, Tóth EA, Osteikoetxea-Molnár A, Kovács M, Balogi Z, Nyitrai, M. Live cell superresolution-structured illumination microscopy imaging analysis of the intercellular transport of microvesicles and costimulatory proteins via nanotubes between immune cells.

METHODS AND APPLICATIONS IN FLUORESCENCE 6: 4 Paper: 045005, 13 p. (2018)

Boros B, Jakabová S, **Madarász T**, Molnár R, Galambosi B, Kilár F, Felinger A, Farkas Á. Validated HPLC method for simultaneous quantitation of bergenin, arbutin, and gallic acid in leaves of different *Bergenia* species

CHROMATOGRAPHIA 77: 17-18 pp. 1129-1135., 7 p. (2014)

## A témához kapcsolódó tudományos előadások

**Madarász T**, Halász H, Szeiliné Türmer K, Matkó J, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. How membrane sculpturing proteins influence the growth and morphology of membrane nanotubes? Second Symposium on Super-resolution and Advanced Fluorescence Microscopy and István Ábrahám Memorial Workshop (2022).

**Madarász T**, Türmer K, Telek E, Halász H, Brunner B, Bisi S, Scita G, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. Investigating the regulatory function of IBAR and IRSp53 proteins in the formation of membrane nanotubes. Hungarian Molecular Life Sciences 2019 conference (2019).

**Madarász T**, Brunner B, Türmer K, Matkó J, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. Az IRSp53 fehérje membrán nanocsövek képződésében betöltött szerepe. A Magyar Biofizikai Társaság XXVII. Kongresszusa (2019).

**Madarász T**, Türmer K, Futó K, Telek E, Hencz A, Halász H, Matkó J, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. The role of IBAR and IRSp53 proteins in the formation of membrane nanotubes.

18th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS network CIII-SK-0044 (2018) 1 p.

**Madarász T**, Halász H, Ghadaksaz A, Osteikoetxea-Molnár A, Tóth Eszter A, Huber K, Nyitrai M, Matkó J, Szabó-Meleg E. Immunsejtek közötti transzportfolyamatok vizualizálása, 48. Membrán-Transzport Konferencia (2018).

**Madarász T**, Brunner B, Futó K, Telek E, Matkó J, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. Az IRSp53 fehérje membrán nanocsövek képződésében betöltött szerepe. DKK17-Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban absztraktkötet. Pécs, Magyarország: Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat (2017) 89 p. p. 32, 1p.

**Madarász T**, Brunner B, Futó K, Telek E, Matkó J, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. Az IRSp53 fehérje szerepe a membrán nanocsövek kialakulásának mechanizmusában. 5th Interdisciplinary Doctoral Conference. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia: Absztraktkötet Pécs, Magyarország: Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat (2016) 206 p. pp. 168-168., 1 p.

**Madarász T**, Molnár A, Tóth Eszter A, Matkó J, Halász H, Nyitrai M, Szabó-Meleg E. A membrán nanocsövek szerepe az intercelluláris anyagtranszport folyamatokban. 46. Membrán-Transzport Konferencia (2016).

**Madarász T**, Szabó-Meleg E, Molnár A, Tóth Eszter A, Matkó J, Nyitrai M. A membrán nanocsövek, mint transzporterek szerepe a sejtek közötti kommunikációban. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai Szekciójának IX. Szimpóziuma: Transzlációs kutatások a neuro- és kardiovaszkuláris farmakológiában. (2015) 60 p. pp. 12-12., 1 p.