

Ph.D. értekezés tézisei

**Új kismolekula-alapú módszerek kidolgozása  
és alkalmazása**

Molnár Eszter

Témavezető: Dr. Puskás László

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Funkcionális Genomika Laboratórium

Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

2013.

## **Bevezetés**

A kismolekulák, vagyis a néhány száz Dalton tömegű szerves vegyületek – amellet, hogy az élő sejtek alapvető alkotóelemei közé tartoznak – a gyakorlatban elsősorban mint gyógyszerek és molekuláris biológiai eszközök (pl. fluoreszcens festékek) ismertek.

### ***Új fluoreszcens festékek felfedezése***

A fluoreszcencia jelenségét számos tudományterület hasznosítja, köztük a biológia és az orvostudomány a sejtek és alkotóelemeik jelölésében. Erre a célra leggyakrabban fluoreszcens fehérjéket és kismolekula festékeket (fluorokrómokat) alkalmaznak. Az utóbbiak olyan előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a nagy membránpermeabilitás, az alacsony toxicitás, a minimális technikai korlátok és az alacsony költségek.

Jelenleg a racionális tervezési és a nagy áteresztőképességű szűrési (HTS) technikák jelentik az új festékek két fő forrását. A HTS módszerek közé tartozik a kismolekula microarray, ahol nagyszámú kismolekulából álló könyvtárat kapcsolnak szilárd felülethez, amelyet azután ebben a formában hoznak érintkezésbe a lehetséges kötőpartnerrel (általában egy fehérjével). Mivel itt a kölcsönhatás kimutatása a fehérje fluoreszcens jelölésén alapul, a natív fluorokrómokat célszerű kizárni ezekből a vizsgálatokból. Viszont az ilyen molekulák között új fluoreszcens próbákat fedezhetünk fel.

A konfokális pásztázó mikroszkópia révén nagy pontossággal vizsgálhatjuk az élő sejtek, organelumok és akár egyedi molekulák tulajdonságait. A mikroszkópos képek időigényes manuális analízise miatt azonban a hagyományos mikroszkópos technika alkalmatlan nagyszámú minta gyors vizsgálatára.

A két technológia, vagyis a kismolekula microarray és a konfokális pásztázó mikroszkópia előnyeinek kombinálásával

lehetőségünk nyílik arra, hogy új fluoreszcens festékeket fedezzünk fel akár több tízezer molekula között.

## ***Affinitás kromatográfia***

### *Célpontazonosítás affinitás kromatográfiával*

A gyógyszerkutató egyik fontos lépése annak a fehérjecélpontnak az azonosítása, amelyen keresztül a gyógyszerjelölt molekula a hatását kifejti. Ugyanakkor a kismolekula és más fehérjék közti kölcsönhatás nem kívánt mellékhatásokhoz vezethet. Affinitás kromatográfiával mindezen fehérjék meghatározhatók: a hordozóra rögzített gyógyszerjelölt molekula „kiválogatja” egy keverékből a hozzá kötődő fehérjéket, miközben a keverék a hordozón (oszlopon) átfolyik.

A ligand szilárd hordozón való rögzítése hasonló problémákat (szintézis szükségessége, a kikötött molekula nem megfelelő orientációja) vet fel a kismolekula microarray és a célpontazonosításban használt affinitás töltet esetében is, így az utóbbinál is felmerül megoldásként az AviLink felületmódosítási technológia bevetése.

### *Az affinitás kromatográfia hatékonyságának növelése a nem-specifikus fehérjék eltávolításával*

Összetett biológiai mintákban a kis mennyiségben jelenlévő célpontok affinitás kromatográfiával történő azonosítását különösen megnehezíti az abundáns fehérjék nem-specifikus kötődése a kismolekulát hordozó töltethez. A probléma megoldására változatos módszerek születtek, mint a kompetitív elúció, az aktív és inaktív ligand párhuzamos alkalmazása, a sorozatos affinitás kromatográfia, felületmódosítások, molekuláris távtartó kar beépítése, vagy a plazma proteomikai tanulmányokból ismert immunaffinitáson alapuló depléciós oszlopok. Az utóbbiak esetében antitestek helyett akár specifikus kismolekulák is használhatók ligandként.

A nagy mennyiségben jelenlévő citoszkeletális fehérjék, mint a tubulin és az aktin sok affinitás oszlopon nem-specifikus módon kikötődnek. Kimutatták, hogy a benzimidazol kötődik a tubulinhoz, így egy benzimidazollal-kapcsolt affinitás töltet használható lehet sejt- és szövetkivonatok előtisztítására.

## **Célkitűzések**

1. A kismolekula microarray és a konfokális pásztázó mikroszkópia kombinált módszerével új fluoreszcens festékek felfedezése és ezen festékek tulajdonságainak vizsgálata.
2. Az AviLink felületmódosítás eljárás kipróbálása affinitás töltet előállításában és célpontfehérjék meghatározásában.
3. Egy olyan előtisztító töltetet kifejlesztése, amely képes megkötni a sejtekben nagy mennyiségben jelenlévő tubulint, és ezáltal megkönnyíteni a kis mennyiségben jelenlévő intracelluláris gyógszercélpontok azonosítását.

## **Alkalmazott módszerek**

1. Kismolekula microarray-ek előállítása
2. A fluoreszcencia intenzitások mérése és kiértékelése
3. Sejtkultúra kezelések
4. Konfokális pásztázó mikroszkópia
5. Teljes fehérjekivonat előállítása sejtkultúrából és különböző szövetekből
6. Ac-2010-zel kapcsolt affinitás töltet előállítása
7. Affinitás kromatográfia
8. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)
9. Tömegspektrometriai elemzés
10. Protein diszulfid izomeráz enzimaktivitás mérése
11. 2-aminobenzimidazollal kapcsolt affinitás töltet előállítása

12. A széntartalom meghatározása és a felületi lefedettség kiszámítása
13. Nem-specifikusan kötődő fehérjék depléciója 2-aminobenzimidazol töltettel
14. Kétdimenziós gélelektroforézis

## Eredmények

### ***Kismolekula microarray és konfokális pásztázó mikroszkópia együttes alkalmazása élő sejteket festő fluoreszcens markerek azonosítására***

1. 14585 különböző vegyületet rögzítettünk microarray formátumban, majd lézerszkennel segítségével detektáltuk a lenyomatott molekulákból származó fluoreszcens jeleket. Az adatok szoftveres analízise során kiválasztottunk 278 db erős fluoreszcenciát mutató kismolekulát, majd ezeket élő sejteken tanulmányoztuk konfokális mikroszkóppal.
2. Mikroszkópos vizsgálataink során az impermeábilis, toxikus, rosszul oldódó vagy a sejtekben gyengén emittáló jelölteket kiszűrtük és a megmaradt 11 potenciális fluoreszcens festéket vizsgáltuk tovább.
3. Ismert fluoreszcens markerek segítségével megállapítottuk a fluorokrómok intracelluláris lokalizációját: a vizsgált vegyületek a lipidcseppecskéket, a mitokondriumokat, a plazmamembránt illetve a sejtmag körüli régiót *in vivo* festették, egyikük pedig ismételt lézeres gerjesztés hatására a mitokondriumokból a citoplazmába és a sejtmagvacskákba relokalizálódott.
4. A 11 molekulának a sejtek hosszútávú életképességére gyakorolt hatását is vizsgáltuk. A 24 órás kezelés alatt egyik általunk felfedezett fluoreszcens festék sem bizonyult toxikusnak, így akár hosszabb kísérletekben is használhatók lehetnek.

## ***Speciális felülethez kapcsolt kismolekulák alkalmazása affinitás kromatográfiában***

*AviLink felületmódosítással ellátott affinitás töltet előállítás és felhasználása célpontazonosításban*

1. Ac-2010 vegyületet kapcsoltunk AviLink technológiával előállított felülethez.
2. A kapott töltettel teljes fehérjekivonaton affinitás kromatográfiát végeztünk, majd a specifikusan kötődő fehérjéket tömegspektrometriával meghatároztuk. 30 találatot kaptunk.
3. Előzetes eredményeink alapján a kikötődött fehérjék közül a protein diszulfid izomerázt vizsgáltuk tovább: inzulin-turbidimetriás módszerrel teszteltük az Ac-2010 hatását az enzimre, és úgy találtuk, hogy az már 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban gátolta az enzim működését, az  $\text{IC}_{50}$  értéke pedig 3.158  $\mu\text{M}$  volt.

*Nem-specifikusan kötődő fehérjék eltávolítása sejt- és szövetkivonatokból 2-aminobenzimidazollal kapcsolt affinitás töltettel*

1. Egy 2-aminobenzimidazollal kapcsolt depléciós töltetet hoztunk létre, amelynek alapjául szilanizált, reaktív oldalláncokat hordozó felületet állítottunk elő, amelyre molekuláris távtartó karként izoftálsavat építettünk be a benzimidazol csoport elé.
2. Az egyes lépések reakciótermékeinek széntartalmát elemezve arra a következtetésre jutottunk, hogy a szilanizált felület aktív csoportjainak feléhez sikerült 2-aminobenzimidazol molekulát kapcsolnunk.
3. A töltet hatékonyságát sejt illetve szövetminták teljes fehérjekivonatának depletálásával demonstráltuk. Kétdimenziós gélelektroforézist követően tömegspektrometriai módszerekkel

azonosítottuk azokat a fehérjéket (20-at az A549 sejt- és 16-ot az agymintából), amelyek a tölteten megkötődtek. Főként citoszkeletális komponenseket (tubulinokat és aktinokat), a 14-3-3 fehérjecsald tagjait és hősokkfehérjéket mutattunk ki.

4. Mindkét mintánál megfigyelhető volt, hogy az előtisztítás utáni átfolyóban új fehérjék jelentek meg, illetve egyes fehérjék mennyisége megnőtt, amit a nem-specifikus fehérjék depléciójának tulajdonítunk.

## **Következtetések**

1. A kismolekula microarray és a konfokális pásztázó mikroszkópia kombinálása megfelelő stratégiának bizonyult új, *in vivo* körülmények között alkalmazható fluoreszcens próbák felfedezésére és 11 új fluorokróm azonosítását eredményezte.

2. Az AviLink technológia alkalmas kismolekula affinitás töltetek létrehozására, és az így előállított töltetek révén az adott kismolekulával kölcsönható fehérjék azonosítására.

3. A protein diszulfid izomeráz nemcsak kötődik az Ac-2010 molekulához, de a kötődés az enzim aktivitására is hatással van.

4. A 2-aminobenzimidazollal kapcsolt előtisztító töltet nyers fehérjekivonaton alkalmazva köti a tubulint és néhány más, nagy mennyiségben jelenlévő fehérjét, így megkönnyítheti az intracelluláris gyógszercélpontok azonosítását.

## Publikációk jegyzéke

\*Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények.

### *Referált folyóiratokban megjelent cikkek:*

**1. Molnár E**, Hackler L, Jankovics T, Üрге L, Darvas F, Fehér LZ, Lőrincz Z, Dormán G, Puskás LG. Application of small molecule microarrays in comparative chemical proteomics. QSAR Comb Sci. 2006 Nov;25(11):1020-6.

IF: 1.987

**2. Ménesi D**, Kitajka K, **Molnár E**, Kis Z, Belleger J, Narce M, Kang JX, Puskás LG, Das UN. Gene and protein expression profiling of the fat-1 mouse brain. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009 Jan;80(1):33-42.

IF: 2.530

**3. Puskás LG**, Fehér LZ, Vizler C, Ayaydin F, Rásó E, **Molnár E**, Magyary I, Kanizsai I, Gyuris M, Madácsi R, Fábián G, Farkas K, Hegyi P, Baska F, Ozsvári B, Kitajka K. Polyunsaturated fatty acids synergize with lipid droplet binding thalidomide analogs to induce oxidative stress in cancer cells. Lipids Health Dis. 2010 Jun 2;9:56.

IF: 2.14

**\*4. Molnár E**, Fábián G, Klem J, Darula Z, Hunyadi-Gulyás E, Medgyesi A, Medzihradsky KF, Puskás LG. Removal of nonspecific binding proteins from cell and tissue extracts using 2-aminobenzimidazole-tethered affinity resin. Pharmazie. 2011 Sep;66(9):662-5.

IF: 1.006



**\*5. Molnár E,** Kuntam S, Cingaram PKR, Peksel B, Suresh B, Fábíán G, Fehér LZ, Bokros A, Medgyesi Á, Ayaydin F, Puskás LG. Combination of small molecule microarray and confocal microscopy techniques for live cell staining fluorescent dye discovery. *Molecules*. (beküldve 2013-ban, megosztott első szerző)

**\*6. Nagy LI, Molnár E,** Kanizsai I, Ózsvári B, Fehér LZ, Fábíán G, Marton A, Vizler C, Ayaydin F, Kitajka K, Hackler L, Mátés L, Deák F, Kiss I, Puskás LG. Lipid droplet binding thalidomide analogs activate endoplasmic reticulum stress and suppress hepatocellular carcinoma in a chemically induced transgenic mouse model. *Curr Pharm Design*. (beküldve 2013-ban)

### ***Szabadalmak:***

1. Bejelentés címe: Aktív hordozó, eljárás az aktív hordozó előállítására és az aktív hordozó alkalmazása. Ügyiratszám: P0600668 Bejelentés dátuma: 2006.08.22.

2. Bejelentés címe: Lipidcseppecskék jelzésére szolgáló vegyületek, lipidcseppecskék jelzésére szolgáló kompozíciók, valamint eljárás sejtek és/vagy sejtalkotók megjelenítésére. Ügyiratszám: P0700432 Bejelentés dátuma: 2007.06.21.

3. Bejelentés címe: Celluláris vezikuláris rendszerek, különösen lipidcseppecskék kialakulását és/vagy működését befolyásoló vegyületek, az ilyen vegyületeket tartalmazó gyógyászati kompozíciók, valamint ilyen vegyületek alkalmazása betegségállapotok kezelésére. Ügyiratszám: P0700433 Bejelentés dátuma: 2007.06.21.

4. Bejelentés címe: Fehérjék tisztítására szolgáló új affinitás-felület, ennek előállítása és alkalmazása. Ügyiratszám: P1000515 Bejelentés dátuma: 2010.09.23.