

OTKA ZÁRÓJELENTÉS

NMR módszertani fejlesztés a fehérje-ligandum kölcsönhatások detektálására

OTKA PD83600

Dr. Hetényi Anasztázia

Bevezetés

A fragmens alapú hatóanyag tervezésnek fontos része a fehérje-ligandum kölcsönhatás oldatfázisú NMR spektroszkópiával való detektálása. Az NMR alapú technikák alkalmazhatóságának fő korlátozó tényezője hogy vízdékony ligandumot és tiszta célmolekulát igényel.

A pályázatban a következő célokat tűztem ki: (i) Ligandum- és fehérje detektált NMR kísérletek fejlesztése vízdoldhatatlan ligandumokra, (ii) izotóp jelzett antitest által közvetített STD kötődési vizsgálat kidolgozása fehérjekeverékre.

Ligandum- és fehérje detektált NMR kísérletek fejlesztése vízdoldhatatlan ligandumokra

Speciális liofilizéssel elkészítettünk egy Ophiobolin-Ciklodextrin komplexet hogy vizsgálhassuk a kalmodulin vízdoldhatatlan ligandumjának a kötődését terner rendszerben. Eredményeink szerint a HPBCD bizonyult a legjobb komplexképzőnek. A korábban vízdoldhatatlan anyag proton spektrumában a kidolgozott módszer segítségével kimutathatóvá vált az ophiobolin.

Az elkészített komplexszel megvalósítottuk a fehérje detektált kötődési vizsgálatokat terner rendszerben. A kötődési vizsgálatokhoz ^{15}N -HSQC méréseket végeztünk, mely során az amid jelek tolódása a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően volt megfigyelhető, vagyis a háromkomponensű elegyünk alkalmas volt a kötődési vizsgálatok elkészítéséhez. (Referenciaként a titrálást csak HPBCD-vel is elkészítve jeleltolódás nem volt megfigyelhető.) Eredményeinket kiterjesztettük további vízdoldhatatlan ligandumok kötődésének vizsgálatára is. Így vizsgáltuk TRPV1 aktivátor vanilloid vegyületek családjából származó kismértékben vízdoldható resiniferatoxin és kapszaicin ligandumokat. A terner rendszer alkalmazhatóságát úgy

kontrolláltuk, hogy mint komplexáló mint anélküli speciálisan előkészített vízdoldhatatlan ligandum kötődési vizsgálatait is elkészítettük. A speciális minta-előkészítésnek köszönhetően mindkét módon vizsgálhatóvá vált a vízdoldhatatlan ligandum, de a komplexáló hatására a ligandum vízdoldékonysága nőtt. Mivel a munkánk során érdekes új ligandumokat találtunk melyek kötődése az irodalomban ezidáig ismeretlen volt, így a kötődési vizsgálatokat elsődlegesen a fehérje-ligandum kötődés milyenségére helyeztük ki. A kötődési vizsgálatok értékeléséhez 3D méréseket végeztünk az általunk expresszált kalmodulin fehérjével. ^{13}C - és ^{15}N -HSQC-NOESY adatok felhasználásával nagyfelbontású szerkezet meghatározást készítettünk melynek időigénye miatt a kézirat összeállítása folyamatban van. A termer rendszer eredményeit ezen publikáció megjelenése után kívánjuk közölni hogy validálni tudjuk a háromkomponensű rendszer jóságát.

Izotóp jelzett antitest által közvetített STD kötődési vizsgálat kidolgozása fehérjekeverékre

A metodikai fejlesztések másik részéhez elsőként ^{15}N jelzett nemneutrális anti-Gal-1 monoklon antitestet expresszáltunk. Az így elkészített anti-Gal-1 antitestet oldhatósági illetve stabilitási vizsgálatoknak vetettük alá. A kísérleteink során azt találtuk, hogy az anti-Gal-1 antitestet 10 μM -os oldata alkalmas a kötődési vizsgálatok elvégzéséhez. Ehhez az anti-Gal-1 antitest mennyiséghez 1:1 arányú Galektin-1-et hozzáadva kötődési vizsgálatokat végeztünk a Galektin-1 természetes ligandumja a laktóz jelenlétében. A probléma megoldása érdekében speciális NMR pulzusszekvenciát készítettünk és optimalizáltunk. Ennek segítségével el tudtuk végezni az antitest által közvetített STD kötődési vizsgálatokat mely során ki tudtuk mutatni a Gal-1-laktóz kötődését a ^{15}N jelzett anti-Gal-1 antitest gerjesztésével. A méréseinket megismételtük HSA és annak ligandumának jelenlétében is, mely kontroll kísérlettel igazoltuk, hogy míg az ^1H -STD mindkét fehérje ligandumának kötődését mutatja, addig a ^{15}N -GS-STD-vel szelektíven csak a jelzett antitesthez kötődő fehérje ligandumának jelei mutathatók ki a spektrumban. Végül méréseinket egy sejtlizátummal is megismételtük mely során szintén csak a szelektív kötődést figyelhettük meg. Eredményeink publikálása folyamatban van.

Az NMR metodikák optimalizálása mellett ligandum optimalizáláson is dolgoztunk.

(i) Az apopinán és a béta-homoszerin láncbeli elhelyezkedésének szerkezetre gyakorolt hatásait vizsgálva egy új nagytérű H18-as hélixet mutattunk ki. (Éva Szolnoki, Anasztázia Hetényi, Tamás A. Martinek, Zsolt Szakonyi, Ferenc Fülöp: Self-association-driven transition of the beta-peptidic H12 helix to the H18 helix, Org. Biomol. Chem, 2012, 10, 255, 2012). Eredményeink az adott kötet általam készített fedőlapjaként is megjelenik.

(ii) Az NMR metodikák optimalizálása mellett ligandum optimalizáláson is dolgoztunk. Az alternáló ACPC láncosszótól és az N-terminális acetilezésétől függő szerkezeti hatását vizsgálva egy újabb nagyméretű H18/20-as szerkezetre bukkantunk, melynek eredményei a következő kéziratban jelentek meg: Szolnoki E, Hetényi A, Mándity IM, Fülöp F, Martinek TA, Foldameric β -H18/20P mixed helix stabilized by head-to-tail contacts: A way to higher-order structures, EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY (17) pp. 3555-3559. (2013)

(iii) Egy H14-es vízdékony foldamert mely gyenge kötődést mutatott az A β (1-42) fehérjéhez dedrimerre kapcsoltunk melynek hatására az egykarú ligandum kötődését nagyságrendekkel tudtuk javítani. (Livia Fülöp, István M. Mándity, Gábor Juhász, Viktor Szegedi, Anasztázia Hetényi, Edit Wéber, Zsolt Bozsó, Dóra Simon, Mária Benkő, Zoltán Király, Tamás A. Martinek: A Foldamer-Dendrimer Conjugate Neutralizes Synaptotoxic β -Amyloid Oligomers, PlosOne, (7) p. e39485., 2012).

HSA fehérje-ligandum kölcsönhatás vizsgálatok

A saját célkitűzéseim mellett a HSA fehérje-ligandum kölcsönhatásait is vizsgáltam melyből két közlemény is született. (BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY 19:(14) pp. 4202-4210. (2011), MAGYAR KÉMIAI FOLYÓIRAT x:(&) p. &. (2014))

További eredmények

Posztdoktori időszakom alatt egyéb kutatási eredményeimből további 4 közlemény társszerzője voltam

Tudományos közlemények:

1. Szolnoki E, Hetényi A, Mándity IM, Fülöp F, Martinek TA: Foldameric β -H18/20P mixed helix stabilized by head-to-tail contacts: A way to higher-order structures, EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY (17) pp. 3555-3559. (2013)
2. Fülöp L, Mándity IM, Juhász G, Szegedi V, Hetényi A, Wéber E, Bozsó Z, Simon D, Benkő M, Király Z, Martinek TA: A Foldamer-Dendrimer Conjugate Neutralizes Synaptotoxic β -Amyloid Oligomers, PLOS ONE 7:(7) p. e39485. 17 p. (2012)
3. Szolnoki E, Hetenyi A, Martinek TA, Szakonyi Z, Fulop F: Self-association-driven transition of the beta-peptidic H12 helix to the H18 helix, ORGANIC AND BIOMOLECULAR CHEMISTRY 10:(2) pp. 255-259. (2012)
4. Dömötör Orsolya, Bali Krisztina, Hetényi Anasztázia, Enyedy Éva A: Rákellenes gallium(III)komplexek oldategyensúlyi jellemzése és szérumfehérjével való kölcsönhatásuk vizsgálata, MAGYAR KÉMIAI FOLYÓIRAT x:(&) p. &. (2014)
5. Éva A Enyedy, László Horváth, Anasztázia Hetényi, Tiziano Tuccinardi, Christian G Hartinger, Bernhard K Keppler, Tamás Kiss: Interactions of the carrier ligands of antidiabetic metal complexes with human serum albumin: a combined spectroscopic and separation approach with molecular modeling studies, BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY 19:(14) pp. 4202-4210. (2011)
6. Mernyak E, Huber J, Szabo J, Schneider G, Hetenyi A, Mark L, Maasz G, Berenyi A, Kovacs I, Minorics R, Zupko I, Wolfling J: Cycloaddition of Steroidal Cyclic Nitrones to C=N Dipolarophiles: Stereoselective Synthesis and Antiproliferative Effects of Oxadiazolidinones in the Estrone Series., STEROIDS 78:(10) pp. 2021-2028. (2013)
7. Szolomajer-Csikos O, Beery E, Kosa L, Rajnai Z, Jani M, Hetenyi A, Jakab KT, Krajcsi P, Toth GK: Synthesis and ABCG2 Inhibitory Activity of Novel Fumitremorgin C Analogs - Specificity and Structure Activity Correlations. MEDICINAL CHEMISTRY 9:(4) pp. 494-509. (2013)
8. Hunyadi A, Veres K, Danko B, Kele Z, Weber E, Hetenyi A, Zupko I, Hsieh TJ: In vitro Anti-diabetic Activity and Chemical Characterization of an Apolar

Fraction of *Morus alba* Leaf Water Extract., PHYTOTHERAPY RESEARCH 27:(6) pp. 847-851. (2013)

9. G K Tóth, A Hetényi, I Ilisz, A Péter: A simple chromatographic route for the isolation of meso diaminopimelic acid., CHIRALITY: THE PHARMACOLOGICAL, BIOLOGICAL, AND CHEMICAL CONSEQUENCES OF MOLECULAR ASYMMETRY 23: pp. 133-137. (2011)

Tudományos előadások:

1. Éva Szolnoki, Anasztázia Hetényi, Tamás A. Martinek, Zsolt Szakonyi, Lívია Fülöp, Ferenc Fülöp: *β -peptidic H18 helices*, http://jornades.uab.cat/foldamers_barcelona/sites/jornades.uab.cat/foldamers_barcelona/files/FOLDAMERS_PROGRAM.pdf, 2011
2. Anasztázia Hetényi, Éva Szolnoki, Ferenc Fülöp, Tamás A. Martinek: *A large-diameter β -peptidic H18/20 mixed helix*, http://www.iecb.u-bordeaux.fr/foldamers2012/pdf/0_book_of_abstract_merged.pdf, 2012