

A második projektév összefoglalója

Előzmények, bevezetés

A tervezett műszeregyüttes beszerzése, üzembeállítása, a felhasználás szabályainak kialakítása, valamint a felhasználók betanítását követően (lásd: <https://pak.elte.hu/content/az-első-projektév-összefoglalója.t.7292>)

- a) megtörtént a kromatográfiás elválasztás és MS/MS detektálás optimalizációja különböző általunk szintetizált vegyülettípusokon, oligo- és polipeptideken, konjugátumokon oligo- és polipeptid típusú vegyületekre.
- b) tesztméréseket végeztünk természetes, növényi és gomba eredetű természetes metabolitok azonosítására: már ismert, potenciálisan értékes összetevők új forrásainak meghatározása és ismeretlen vegyületek kromatográfiás izolálása és szerkezeti azonosítása céljából.

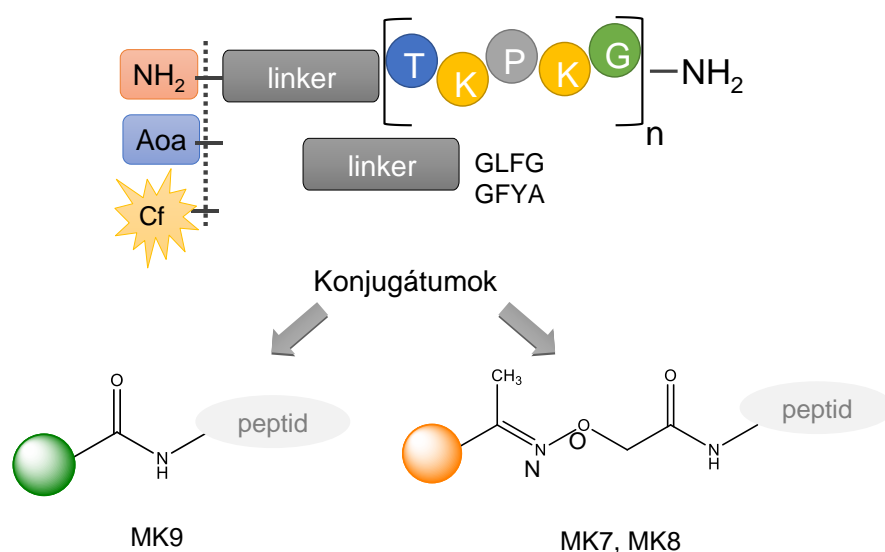
Létrejött a projekt honlapja az ELTE Pályázati Központ segítségével <https://pak.elte.hu/vekop-2-3-3-15-2017-00020>, amely 2018. április óta folyamatosan ad tájékoztatást, bemutatja a tudományos eredményeket ([cikkek: <https://pak.elte.hu/content/publikaciok.t.17512>], [előadások: <https://pak.elte.hu/content/konferencia-megjelenesek.t.7294>]), az oktatásba bevezetett kurzusokat (<https://pak.elte.hu/content/oktatasi-tevekenyseg.t.17607>), a hallgatók által készített tudományos diákköri dolgozatok, BSc és MSc szakdolgozatok, valamint a PhD disszertációk adatait (<https://pak.elte.hu/content/bsc-msc-diplomadolgozatok-es-phd-ertekezesek.t.7296>). Az projekt első évének kísérleti eredményeiről a projektvezető 2019. május végén beszámolt a PM VEKOP Monitoring Bizottság ülésén (<https://pak.elte.hu/content/projektbemutato-a-vekop-monitoring-bizottsag-ulesen.t.8252>).

Új kutatási eredményeink angolul, 12 cikkben, nemzetközi folyóiratokban jelentek meg. Jelen beszámoló a 2018. június 30. és 2020 január 24. között elért eredményekről ad rövid áttekintést.

Kutatási eredmények

1. Célbajuttató egységként használhatók jellemző sejtfelszíni struktúrák (pl. receptorok) peptid ligandumai. Hatóanyagok hordozópeptidekhez konjugálásával nagyobb célsejt specificitás, jobb biohasznosíthatóság, valamint megnövekedett sejtbejutás érhető el receptor-mediált endocitózis révén. Munkánk során új, antimikobakteriális 4-aminosalicilsav származékot - közvetlenül vagy enzimlabilis linkerrel (GFLG, GFYA) keresztül - tuftsin oligopeptiddel konjugáltunk, többféle kötéstípus (amid, oxim) kialakításával a hatóanyag célzott sejtbejutásának/szelektivitásának növelése érdekében. A szabad vegyületek karboxilcsoportja és a peptid N-terminálisa között amidkötés, míg a karbonilcsoport és aminoszalicilsav származék között oximkötés alakítható ki. A tuftsin egy természetes tetrapeptid (humán: TKPR, kutya: TKPK), széleskörű biológiai aktivitással: immunstimuláló, antibakteriális és antitumor hatása van. Megfelelően tervezett tuftsin származékot alkalmasak lehetnek többek között alveoláris makrofágok (az egyik legjellemzőbb gazdasejtjei a *Mycobacterium tuberculosis* intracelluláris kórokozónak) célzására (ábra, Horváth, L., Bősze, Sz. BOKÉMIA, 44 [3] pp. 16-33 [2020]).

Hordozópeptidek – tuftsin származékok



A szerves kémiai szintézissel előállított új vegyületeket, a nyers termékeket félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk, izoláltuk, a konjugátumok homogenitását analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztük. Az új vegyületek MS szerkezetellenőrzése kétféle módon történt: a tisztított vegyületek molekulatömeg-meghatározását közvetlen mintaadagolással (kromatográfiás elválasztás nélkül), vagy folyadékkromatográfiás elválasztás mellett (LC-MS, UHPLC oszlop). Az új műszerrel minden esetben elérhető volt az összegképlet igazolásához szükséges (max. 5 ppm) eltérés az elméleti molekulatömeghez képest (*Bárány, 2018; Boros, 2019; Jernei, 2019*). Az LC-MS mérésekhez meghatároztuk az adott vegyületcsalád esetében optimális körülményeket, oszloptípust (C18, C8, C4, HILIC). A mérések során törekedtünk a gyors kromatográfiás elválasztások alkalmazására, így csökkentve az elemzésekhez szükséges szerves oldószer mennyiségét (*Fendrik, Mammadova, Lénárt, 2018* szakdolgozatok).

A peptidkonjugátumok sejten belüli degradáció kinetikáját, patkánymáj lizoszóma preparátum jelenlétében vizsgáltuk. A bomlástermékek, metabolitok szerkezetének bizonyítását, mennyiségének meghatározását szemikvantitatív RP-HPLC oszlopon nagy felbontású LC-MS módszerrel valósítottuk meg (*Kiss, 2019; Nagy, 2018* szakdolgozat).

Peptidek és peptid-hatóanyag konjugátumok esetén részletesen tanulmányoztuk az MS mérési körülmények és ütközési energia hatását az MS/MS spektrumok minőségére. Daunomicin konjugátumok esetén pl. a hatóanyag ionforrásban történő degradációjának csökkentésére, optimalizáltuk a mérési körülményeket (*Pethő, 2019*). Az elérhető ütközés-indukált disszociáció (CID) esetén pedig részletesen tanulmányoztuk az ütközési energia hatását a tandem MS (MS/MS) spektrumok minőségére, különös tekintettel a szekvenciális fragmensek kialakulásához vezető bomlási útvonalakon (*Steckel, 2018; Papp, 2018* szakdolgozat).

2. A nagyfokú érzékenységet/felbontást biztosító orbitrap analizátorral felszerelt hibrid tömegspektrométer (LC-MS/MS) segítségével természetes metabolitok, eddig ismeretlen vegyületek azonosítását valósítottuk meg a pályázatban megfogalmazott céloknak megfelelően, törekedve ismert, potenciálisan értékes összetevők új forrásainak meghatározására, illetve ismeretlen vegyületek azonosítására.

Növényi metabolitok: a *Forsythia* nemzetség (3 faj, 6 fajta), *Linum* nemzetség (5 faj), *Odontites* nemzetség (2 faj) és a *Celtis* nemzetség (1 faj) került részletes növénykémiail vizsgálatra. A növények különböző szerveiből/szöveteiből készített kivonatokban elsősorban lignánok, feniletanoid-glikozidok, iridoidok kerültek azonosításra. A lignánok és feniletanoid-glikozidok izolálása - a kiválasztott összetevőre optimális kiindulási növényi szövetből - is megtörtént.

Gombametabolitok: ~100 izolátum metabolit-ujjlenyomatát készítettük el. Ezen gombák különböző nemzetségekre tartoznak, köztük több olyan is van, amelyet kutatócsoportunk fedezett fel és írt le, mint új leszármazási vonal. Vizsgáltuk bizonyos környezeti tényezők metabolitösszetételre gyakorolt hatásait és az azonosított metabolitok szintéziséért felelős genomi régiókat. Számos ismert vegyület mellett összesen 11 új vegyület sikerült azonosítani. Az azonosított (új, és már ismert) összetevők közül 8-at sikerült (kiválasztott optimális tenyészetekből) izolálni.

Mindkét csoport esetében az izolált vegyületek szerkezetét MS/MS adatok mellett együttműködések keretében NMR vizsgálatokkal is bizonyítottuk. A vegyületek antivirális/antiproliferatív hatásának vizsgálata megkezdődött, több közülük számottevő és szelektív hatással rendelkezik.

3. Az atomi erő mikroszkópot (AFM) is több kutatási témában alkalmaztuk, együttműködésben a konzorciumi illetve ELTE-partnerekkel. Az első vizsgálatok nanoméretű objektumok, polimer hatóanyag hordozók, **nanorészecske rendszerek** méret- és alak meghatározására, méreteloszlási profiljának jellemzésére irányultak. Más mérési technikával (dinamikus fényszórás) nyert adatokkal összevetve az alakra vonatkozó új információ szerzésére nyílt lehetőség.

Az AFM különösen nagy segítséget nyújtott különböző **fehérje aggregátumok** (pl. amiloid) kialakulásának tanulmányozásában. Az AFM segítségével egyértelműen meg tudtuk határozni, hogy a különböző kísérleti körülményeknek kitett fehérjékben bekövetkező szerkezeti változások aggregációhoz, vagy amiloid szájképzéshez vezetnek-e. Kimutattuk, hogy az amiloid képződést a határfelületek jelenléte képes indukálni. Ennek időbeli folyamatát víz-levegő határfelületen AFM segítségével közvetlenül is nyomon lehetett követni. Próbamérések keretében lágy kolloid objektumokat is vizsgáltunk. A tapasztalatokat vízben való mérés lehetőségét elemezve polimer membránra felvitt lipid réteg tanulmányozására használtuk fel.

Antibakteriális hatóanyagok sejtpenetráló peptidokkal alkotott konjugátumainak sejt membránnal való kölcsönhatását vizsgáltuk lipid modell rendszerek alkalmazásával. A nagyfelbontású képalkotó technika (AFM) segítségével vált lehetővé annak megállapítása, hogy a kis molekulás hatóanyagok membránnal való kölcsönhatásuk során kis léptékű perturbációt okoznak. Ezzel szemben a hatóanyagok sejtpenetráló peptidokkal kialakított konjugátumai kiterjedt, 10-50 nm laterális méretű rendezetlenséget, „roncsolódást” idéznek elő a **modell membrán** lipid kettősrétegében. Ez a molekuláris szintű, képi információ lényeges az antibakteriális peptidokat alkalmazó hatóanyag konjugációk tervezésében, segítséget jelent a hatásmechanizmus feltáráshoz, megértéséhez. Új hatóanyagok *in vitro* hatásának vizsgálata során az AFM módszerrel követhető volt a **teljes sejt** morfológiájának, a sejtmembrán „érességének” a megváltozása.

Oktatási tevékenység

A beszerzett, új műszeregyütttest **oktatási célra** is használtuk (<https://pak.elte.hu/content/oktatasi-tevekenyseg.t.17607>): **vegyész MSc** (NMR- és MS-

spektroszkópia, röntgendiffrakció gyakorlat, kód: nmrsgyakk17lm, Korszerű kolloid- és felületkémiai vizsgálati módszerek, gyakorlat, kód: korszkolk17lm, Szerkezetvizsgáló módszerek laborgyakorlat, kód: stuclabk20lm, **biotechnológia MSc** (Bioanalitika és biospektroszkópia gyakorlat, kód: bioanak18lm), **anyagtudomány MSc** (Szupramolekuláris szerkezetvizsgáló labor, kód: szupramolk17lm, Anyagszerkezet vizsgálati laboratórium, kód: anyszerkvk17lm) és biológus PhD kurzusokban (Bioinformatika szemináriumok, kód: BIO/05/12E, Anyagszerkezet vizsgálati gyakorlat), valamint TDK, BSc, MSc szakdolgozati munka vagy PhD kutatómunka során (<https://pak.elte.hu/content/bsc-msc-diplomadolgozatok-es-phd-ertekezesek.t.7296>).

Pályázati aktivitás: A platform jelentette lehetőség alapul szolgál egy 2020-ban elnyert pályázathoz (NKFIH K), egy pályázati együttműködési részfeladat előkészítéséhez, egy nemzetközi együttműködési pályázat (CELSA – KU Leuven) és több OTKA pályázat benyújtásához.

Ipari együttműködések kialakítása is elkezdődött. Két magyar cégnek (Biofi Kft., Albitech Kft.) végeztünk a termékeikhez és termékfejlesztésekhez kapcsolódóan vizsgálatokat bizonyos rendszerek növényi hormontermelő képességét (K+F együttműködési szerződések keretében). Az ELTE szolgáltatások között megjelenítettük a „Felületi morfológia jellemzése” mérési kompetenciát, szolgáltató központ kialakítása érdekében.