

Mycobacterium tuberculosis jelátvitelt gátló hatóanyagok fejlesztése

Doktori értekezés

Székely Edina Rita

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Kéri György, egyetemi tanár, D.Sc.
- Hivatalos bírálók: Dr. Tóthfalusi László, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Bártfai Zoltán, egyetemi tanár, D.Sc.
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ádám Éva, egyetemi tanár, D.Sc.
Tömösköziné dr. Farkas Rita,
tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2	BEVEZETÉS	8
2.1	MIKOBAKTÉRIUMOK	9
2.1.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> komplex.....	10
2.1.2	Egyéb patogén mikobaktériumok.....	11
2.1.3	MDR (Multidrug-Resistant) tuberkulózis.....	12
2.1.4	XDR (Extensively Drug-Resistant) tuberkulózis.....	14
2.2	TUBERKULÓZIS TERÁPIA	15
2.2.1	Ellenőrzött gyógyszerbevételi program-DOTS (directly observed therapy with short-course chemotherapy).....	16
2.2.2	Első vonalbeli antituberkulotikumok.....	17
2.2.3	Második vonalbeli antituberkulotikumok.....	18
2.2.4	Új, ígéretes antituberkulotikum jelöltek.....	21
2.3	MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EGYES CÉLFEHÉRJÉI	22
2.3.1	Protein kinázok.....	22
2.3.1.1	PknA és PknB.....	23
2.3.1.2	PknG.....	24
2.3.2	Más célfehérjék.....	24
2.3.2.1	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (P) bioszintézis.....	24
2.3.2.1.1	Nikotinamid-adenin-dinukleotid kináz (NADK).....	24
2.3.2.1.2	Nikotinamid-adenin-dinukleotid szintetáz (NADS).....	26
2.3.2.2	II-es típusú NADH:menaquinon oxidoreduktáz (NDH-2).....	26
2.3.2.3	Dekaprenilfoszforil-β-D-ribóz 2'-epimeráz (DprE1).....	27
2.3.2.4	Foszfatidil-inozitol-mannozil transzferáz PimA.....	28
3	CÉLKITŰZÉSEK	29
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31
4.1	VEGYÜLETEK	31
4.2	FEHÉRJE EXPRESSZÁLÁS ÉS TISZTÍTÁS	31
4.2.1	<i>PknB</i>	31
4.2.2	<i>GarA</i>	31
4.2.3	<i>PknG</i>	31
4.2.4	<i>PknA</i>	32
4.2.5	NADS.....	32
4.2.6	NADK.....	33
4.2.7	<i>Na-dodecil-szulfát</i> poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE).....	33
4.3	RADIOAKTÍV ENZIM AKTIVITÁS MÉRÉS	34
4.4	FLUORESCENCIA POLARIZÁCIÓN ALAPULÓ MÉRÉSEK	34
4.4.1	IMAP (Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals) technológia.....	34
4.4.2	Transcreener technológia.....	35
4.4.2.1	ADP detektáló módszerek.....	35
4.4.2.1.1	HTRF® Transcreener ADP technológia.....	35
4.4.2.1.2	Transcreener® ADP ² FP technológia.....	36
4.4.2.2	Transcreener™ AMP/GMP technológia.....	37
4.5	VIRTUÁLIS TESZTELÉS	38
4.5.1	Szerkezet-hatás összefüggés.....	38
4.5.2	Dokkolás.....	38
4.6	BAKTÉRIUM TÖRZSEK	38
4.7	ANTIBAKTERIÁLIS TESZTELÉS	39
4.8	MIC MEGHATÁROZÁS	39
4.9	GENOTOXICITÁS MEGHATÁROZÁSA	40
4.10	CITOTOXICITÁS MEGHATÁROZÁSA	40
4.11	ANTIBAKTERIÁLIS ÉRZÉKENYSÉG MEGHATÁROZÁS AGAR-DIFFÚZIÓS TESZTTTEL	40
4.12	FERTŐZÖTT MAKROFÁG VIZSGÁLAT	40
4.13	KINATOR™	41

5	EREDMÉNYEK	44
5.1	CÉLFEHÉRJE ALAPÚ HATÓANYAGFEJLESZTÉS	44
5.1.1	<i>PknB</i> kinázon ható inhibitor keresés	44
5.1.1.1	Fehérje expresszió, tisztítás	44
5.1.1.2	Radiometriás <i>PknB</i> kináz módszer	45
5.1.1.3	Virtuális tesztelés	49
5.1.1.3.1	Szerkezet-hatás összefüggés	49
5.1.1.3.2	Dokkolás	50
5.1.1.4	Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek	51
5.1.1.4.1	IMAP technológia beállítása	52
5.1.1.4.2	<i>PknB</i> Transcreener® ADP ² FP technológia	54
5.1.1.4.2.1	Optimalizálás	54
5.1.1.4.2.2	Tesztelés	56
5.1.2	<i>PknG</i> kinázon ható inhibitor keresés	58
5.1.2.1	Fehérje expresszió, tisztítás	58
5.1.2.2	Virtuális tesztelés	58
5.1.2.2.1	Dokkolás	58
5.1.2.3	Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek	59
5.1.2.3.1	IMAP technológia beállítása	59
5.1.2.3.2	<i>PknG</i> Transcreener® ADP ² FP technológia	60
5.1.2.3.2.1	Optimalizálás	60
5.1.2.3.2.2	Tesztelés	62
5.1.3	<i>PknA</i> kinázon ható inhibitor keresés	64
5.1.3.1	Fehérje expresszió és tisztítás	64
5.1.3.2	Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek	65
5.1.3.2.1	<i>PknA</i> Transcreener® ADP ² FP technológia	65
5.1.3.2.1.1	Optimalizálás	65
5.1.3.2.1.2	Tesztelés	72
5.1.4	<i>NAD</i> kinázon ható inhibitor keresés	73
5.1.4.1	Fehérje expresszió és tisztítás	73
5.1.4.2	Virtuális tesztelés	73
5.1.4.2.1	Dokkolás	73
5.1.4.3	Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek	75
5.1.4.3.1	<i>NADK</i> Transcreener® ADP ² FP technológia	75
5.1.4.3.1.1	Optimalizálás	75
5.1.4.3.1.2	Tesztelés	76
5.1.5	<i>NAD</i> szintetázon ható inhibitor keresés	78
5.1.5.1	Fehérje expresszió és tisztítás	78
5.1.5.2	Virtuális tesztelés	78
5.1.5.2.1	Dokkolás	78
5.1.5.3	Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek	79
5.1.5.3.1	<i>NADS</i> Transcreener™ AMP/GMP FP technológia	79
5.1.5.3.1.1	Optimalizálás	79
5.1.5.3.1.2	Tesztelés	82
5.1.5.3.1.2.1	Spektrofotometriás tesztelés	82
5.1.5.3.1.2.2	<i>NADS</i> Transcreener™ AMP/GMP FP technológia	84
5.2	TELJES SEJTÉS TESZTELÉSEN ALAPULÓ HATÓANYAG FEJLESZTÉS	87
5.2.1	<i>VIC-9376</i> és származékai	89
5.2.2	<i>VIC-18469</i> és származékai	93
5.3	CÉLFEHÉRJE AZONOSÍTÁS	96
5.3.1	Biokémiai tesztrendszerek	96
5.3.1.1	<i>PknA</i> , <i>PknB</i> , <i>PknG</i> , <i>NADK</i> , <i>NADS</i> és <i>PimA</i> célfehérjék	96
5.3.2	<i>KinaTor</i> ™	97
6	MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	102
7	ÖSSZEFOGLALÁS	106
8	SUMMARY	107
9	IRODALOMJEGYZÉK	108
10	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	122

11 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS123

1 Rövidítések jegyzéke

5-FAM	5-Carboxyfluorescein; 5-karboxifluoreszcein
ACP	Acyl Carrier Protein, acil vivő fehérje
ADC	Albumin, Dextrose, Catalase; albumin, dextróz, kataláz
ADP	adenozin-difoszfát
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome; szerzett immunhiányos tünetegyüttes
AMP	adenozin-monofoszfát
APC	Antigene Presenting Cell, antigént bemutató sejt
ATP	adenozin-trifoszfát
BAC	benzylidimethyl-n-hexadecylammonium chloride; benzil-alkildimetilammónium-klorid
BTZ	Benzotiazinon
CFU	Colony Forming Unit; telepszám
DAG	diacil-glicerol
DHSA	3,4-Dihydroxy-9,10-seco-androst-1,3,5(10)-triene-9,17-dione; 3,4-dihidroxi-9,10-seco-androst-1,3,5(10)-trién-9,17-dion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilszulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DOTS	Directly Observed Therapy with Short-course chemotherapy; ellenőrzött gyógyszerbevételi program
DPA	dekaprenilfoszforil-arabinóz
DPR	dekaprenilfoszforil-ribóz
DprE1	dekaprenilfoszforil- β -D-ribóz 2'-epimeráz
DTT	ditiotritol
EC₅₀	Effective Concentration 50%; az a koncentrációérték, melynél a maximális hatás 50%-a mérhető
EC₈₅	Effective Concentration 85%; az a koncentrációérték, melynél a maximális hatás 85%-a mérhető

ESI-QTOF MS	Electrospray Ionisation-Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry; elektroporlasztásos ionizáció-kvadrupól repülési idő tömegspektrometria
EVL	Extended Validation Library
FBS	Fetal Bovine Serum; magzati marha savó
FHA	Forkhead-Associated
FP	fluoreszcencia polarizáció
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography; gyors fehérjeelválasztási folyadék kromatográfia
GMP	guanozin-monofoszfát
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HIV	Human Immunodeficiency Virus; humán immundeficiencia vírus
HTRF	Homogeneous Time Resolved Fluorescence
HTS	High-Throughput Screening; nagy áteresztőképességű tesztelés
IC₅₀	Inhibitory Concentration 50%; koncentrációérték, amely az enzim aktivitását 50%-ban gátolja
IMAP	Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals; immobilizált fémion esszé a foszfortartalmú vegyületek kimutatására
INS-P	1-L- <i>myo</i> -inozitol-foszfát
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktozid
KatG	kataláz-peroxidáz
K_i	egyensúlyi inhibitor disszociációs konstans
K_m	Michaelis-Menten konstans
K_{mapp}	látszólagos Michaelis-Menten konstans
LAM	Lipoarabinomannán
LB	Lysogeny Broth
LM	Lipomannán
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex; <i>Mycobacterium avium</i> komplex
MCC	Minimum Cytotoxic Concentration; minimális citotoxikus koncentráció
MDR-TB	Multidrug-Resistant Tuberculosis; multirezisztens tuberkulózis

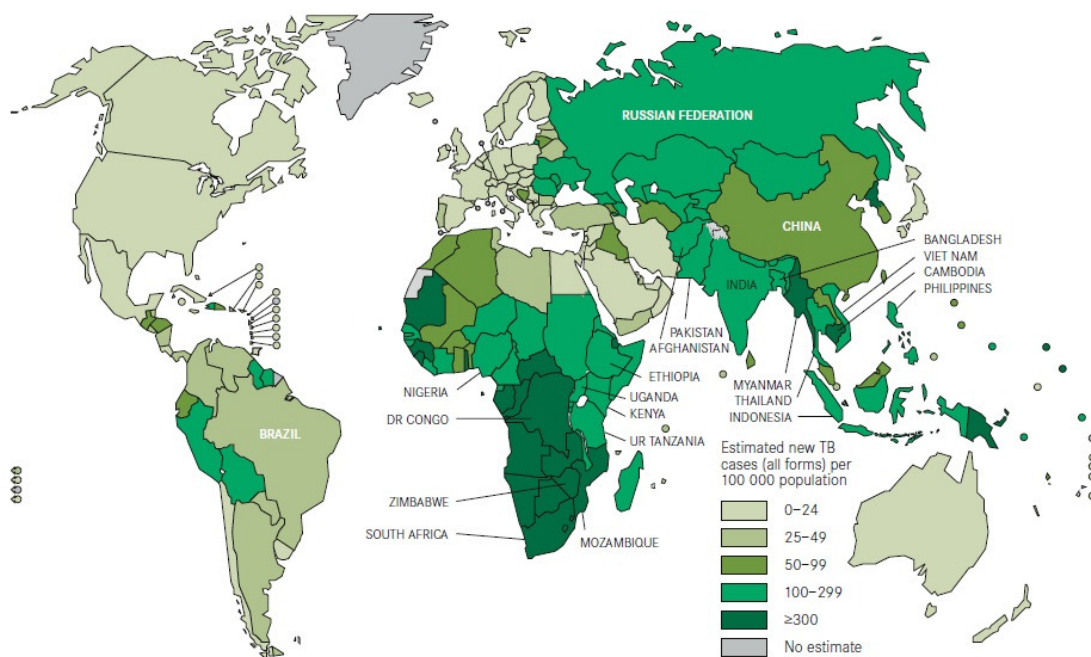
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; 2-N-morfolin-etánszulfonsav
MIC	Minimum Inhibitory Concentration; a hatóanyag minimális koncentrációja, mely a folyékony sejtkultúra növekedését több mint 99%-ban gátolja
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid; 3-N-morfolin-propánszulfonsav
MTS	Medium-Throughput Screening; közepes áteresztőképességű tesztelés
NaAD	Nicotinic acid Adenine Dinucleotide; nikotinsav-adenin-dinukleotid
NAD(P)	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (foszfát)
NADK	Nikotinamid-adenin-dinukleotid kináz
NADS	Nikotinamid-adenin-dinukleotid szintetáz
NCL	Nested Chemical Library
NDH-2	II-es típusú NADH:menaquinon oxidoreduktáz
NF-κB	Nuclear Factor-KappaB
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid; nikkelnitril-triacetsav
NM4TB	New Medicines for Tuberculosis
NTM	nem-tuberkulotikus mikobaktérium
OADC	Oleic Acid Albumin Dextrose Complex; Olajsav Albumin Dextróz komplex
PAN	Protein Accession Number
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDB	Protein Data Bank; fehérje adatbázis
PI	foszfatidil-inozitol
pIC₅₀	Az IC ₅₀ érték tízes alapú logaritmusának mínusz egyszerese
PIM	foszfatidil-inozitol-mannozid
PimA	foszfatidil-inozitol-mannozil transzferáz
PKC-α	protein kináz C-alfa
PknA	Ser/Thr protein kináz A
PknB	Ser/Thr protein kináz B
PknD	Ser/Thr protein kináz D
PknE	Ser/Thr protein kináz E

PknF	Ser/Thr protein kináz F
PknG	Ser/Thr protein kináz G
PknH	Ser/Thr protein kináz H
PknI	Ser/Thr protein kináz I
PknJ	Ser/Thr protein kináz J
PknK	Ser/Thr protein kináz K
PknL	Ser/Thr protein kináz L
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate; forbol-12-mirisztát-13-acetát
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride; fenil-metil-szulfonil-fluorid
PstP	Ser/Thr protein foszfatáz
Q²	Cross-validated correlation coefficient; keresztvalidációs korrelációs együttható
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship; kvantitatív szerkezet-hatás összefüggés
REMA	Resazurin Microtiter Assay
RNS	Ribonukleinsav
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standard Deviation; szórás
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis
Ser	Szerin
STPK	szerin/treonin protein kináz
tbc	Tuberkulózis
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylenediamine; N,N,N'N' tetrametiléndiamin
Thr	Treonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane; trisz-(hidroximetil)-aminometán,
WDI	World Drug Index
WHO	World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet
XDR-TB	Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, kiterjedten gyógyszer-rezisztens tuberkulózis

2 Bevezetés

A tuberkulózis (tbc) a világon az egyik legelterjedtebb betegség. A világ lakosságának megközelítőleg egyharmada fertőzött *M. tuberculosis* patogén által és másodpercenként egy új egyénnel bővül ez a szám [1]. Minden évben a Föld lakosságának kb. 1 %-a fertőződik meg tuberkulózis baktériummal és a fertőzöttek 10 %-ánál beszélhetünk aktív tuberkulózisról. Habár a fertőzött egyének jelentős része nem mutat betegségre utaló jeleket, az immunrendszer bármilyen okból bekövetkező legyengülése (fiziológiai stressz, HIV fertőzés, alultápláltság, terhesség) növeli az esélyt arra, hogy a mikobaktérium aktívvá váljon [2].

A tbc fertőzöttek számát 2010-ben 8,8 millióra becsülték és 1,45 millió halottat számoltak, nagy részüket Ázsiában és Afrikában. Ezen felül egyre több egyént regisztrálnak a fejlett országokban is, akiknél az immunrendszer legyengülésének köszönhetően következett be a fertőzés.



1. ábra A tuberkulózis előfordulása a Föld lakosságára nézve, 100 000 lakosra számítva [3].

Magyarországon, az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet adatai szerint 1950-ben még több mint 45 000 új megbetegedésről számoltak be a tüdőbeteg-gondozók, ezzel szemben 2009-ben már csak 1448 új esetről. Míg akkor 490 új

megbetegedés esett 100 000 lakosra, addig 2009-ben már csak 14,4. 2010-ben viszont 1811-re emelkedett a fertőzött egyének száma.

Az ország egyes részein még mindig magas az új megbetegedések aránya. A legtöbb új esetet Szabolcs-Szatmár-Bereg, Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar megyékből és Budapestről jelentették, ahol több mint 25 új eset jutott 100 000 lakosra [4].

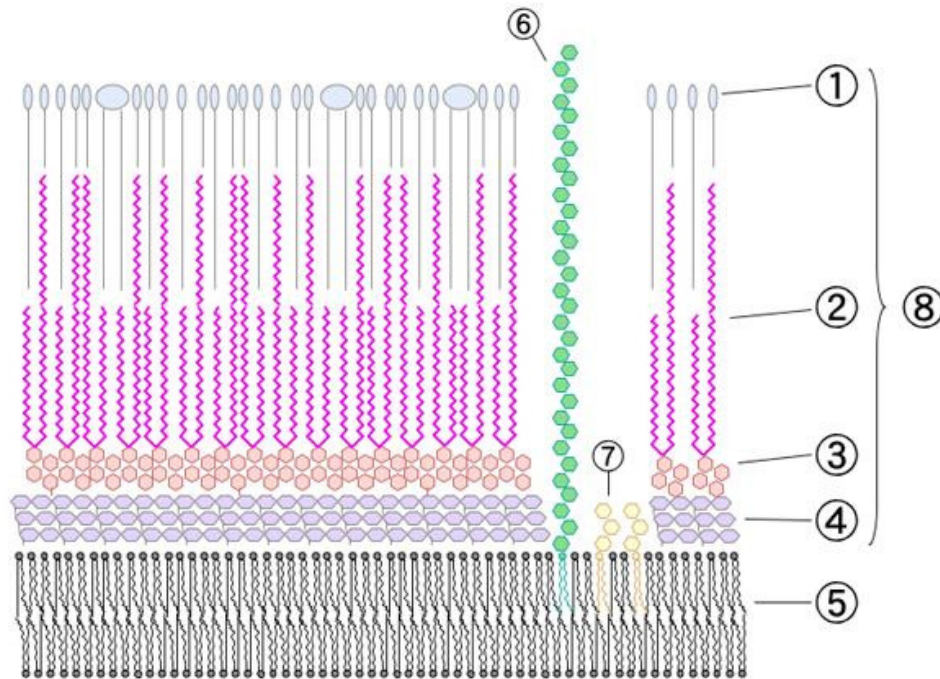


2. ábra Tuberkulózis incidenciája Magyarországon 2010-ben (százévezrelék) [4]

2.1 Mikobaktériumok

A mikobaktériumok aerob, pálcák alakú $0,2-0,6 \mu\text{m} \times 1-10 \mu\text{m}$ nagyságú spórával, csillóval nem rendelkező saválló baktériumok. A mikobaktériumokat a Gram-pozitív baktériumok közé sorolják a külső sejtmembrán hiánya miatt, de valójában Gram-féle festéssel nem osztályozhatóak.

Sejtfaluk sokkal komplexebb, mint a Gram-negatív ill. -pozitív baktériumoké (3. ábra), ami jelentős nehézséget okoz a gyógyszerfejlesztés területén.



3. ábra Mikobaktérium sejtfa szerkezete [5]: 1- külső lipid réteg; 2- mikolsav réteg; 3- poliszaharid (arabinogalaktán) réteg; 4- peptidoglikán réteg; 5- plazmamembrán; 6- lipoarabinomannán (LAM); 7- foszfatidil-inozitol-manozid (PIM); 8- sejtfa váz.

2.1.1 *Mycobacterium tuberculosis* komplex

A *Mycobacterium tuberculosis* komplexbe azok a mikobaktériumok tartoznak, melyek gümőkórt okoznak. A *Mycobacterium tuberculosis*-on kívül ide sorolható a *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canetti* és *Mycobacterium microti*. A komplex tagjai különböznek egymástól a gazdaszervezet, a fertőzés eredete, a földrajzi elterjedés, és a patogenitás tekintetében. A *M. africanum* nem elterjedt, de Afrika területein jelentős tuberkulózis kórokozónak számít [6, 7]. A *M. bovis* régen komoly tuberkulózis fertőzést okozott, de manapság a pasztörözött tej bevezetésével a fejlett országokban nem okoz problémát [8]. A *M. canettii* elég ritka, csak Afrikában van jelen, illetve néhány afrikai emigránsnál is kimutatták [9]. A *M. microti* a legtöbb esetben immundeficiens emberben fordul elő [10].

A *M. tuberculosis* általában a tüdőt támadja meg, de előfordul, hogy a szervezet más részeit is megfertőzi. A tuberkulózis csepp- és porfertőzéssel terjed (köhögés,

tüsszentés, köpet). A legtöbb fertőzöttnél látens tuberkulózisról beszélhetünk, de tőzből egy esetben aktiválódik a tuberkulózis [11]. Az aktív tuberkulózis 75 %-a pulmonáris tuberkulózis, míg 25%-ban a fertőzés nem a tüdőben, hanem más szervekben található meg, ezt extrapulmonáris tuberkulózisnak nevezzük. Az extrapulmonáris tbc általában immunszupresszált betegeknél illetve gyerekeknél gyakoribb. Az extrapulmonáris tbc a mellhártyát, központi idegrendszer (meningitis), a nyaki nyirokcsomókat (srofula), a vizeletkiválsztó rendszert, a csontokat illetve a gerincet (Pott betegség) támadhatja meg. Különösen komoly formája, amikor a tuberkulózist okozó baktériumok szóródása következtében a vérerek és a nyirokerek közvetítésével terjed a baktérium (miliáris tbc). Az extrapulmonáris tbc a pulmonárisal együttes formában is előfordulhat [12].

2.1.2 Egyéb patogén mikobaktériumok

A patogén mikobaktériumok közé solható még a *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium fortuitum* és *Mycobacterium abscessus*.

A *M. leprae* kivételével mindegyik a nem-tuberkulotikus mikobaktérium (NTM) csoportba tartozik mivel a tuberkulózishoz hasonló tüdőbetegséget okoznak. A *M. kansasii* általában krónikus tüdőfertőzés formájában jelenik meg, ami nagyon hasonlít a tüdőtuberkulózishoz, habár más szerveket is képes megfertőzni. A *M. kansasii* fertőzés, a *M. avium* komplex (MAC) után a második leggyakoribb AIDS-vel kapcsolatos oportunista mikobakteriális fertőzés [13]. A *M. avium* egy a talajban illetve szemétben megtalálható lassan növvő baktérium, ami madarakban és sertésben okoz tuberkulózist, valamint az emberi *M. avium* komplex kialakulásáért felelős [14]. A *M. marinum* hideg vagy meleg, édes vagy sós vízben egyaránt megtalálható szabadon élő mikobaktérium faj, mely általában bőr vagy lágyszöveti sérülés esetében okoz fertőzést. Általában granulóma formájában lokalizálódik, de okozhat nyirokér gyulladást vagy áttérjedhet mélyebb szövetekbe is [15]. A *M. scrofulaceum* gyerekeknél okoz nyaki nyirokcsomó gyulladást és nagyon ritkán tüdőbetegséget [16]. A *M. ulcerans* szintén egy lassan növvő mikobaktérium, ami általában a bőrt illetve az alatta levő szöveteket fertőzi meg, mely fekélyes vagy fekélymentes sérüléshez vezet. Sokszor a fertőzés csak valamilyen

környezeti változás következtében alakul ki [17]. A *M. fortuitum* subcutan tályogokat, osteomyelitist illetve disszeminált fertőzéseket okoz [18]. A *M. abscessus* által okozott fertőzés egyre gyakrabban fordul elő legyengült immunrendszerrel rendelkező egyéneknél. Ez a patogén, mely közeli rokonságban van a *Mycobacterium massiliense* és *Mycobacterium boletti* fajokkal, jelentős szerepet játszik a cisztás fibrózis kialakulásában, nehezen kezelhető, mivel csak néhány hatékony gyógyszer létezik ellene [19].

A *M. leprae*, másik nevén Hansen bacillus, főként meleg éghajlatú, trópusi országokban található meg és a lepra (Hansen betegség) kórokozója [20].

2.1.3 MDR (Multidrug-Resistant) tuberkulózis

Az MDR tuberkulózis besorolásba azok az esetek tartoznak, melyek legalább a két első vonalbeli antituberkulotikummal, az izoniaziddal és a rifampicinnel szemben rezisztenciát mutatnak. Azok az izolátumok, melyek ugyan több hatóanyaggal szemben rezisztensek, de nem az izoniazidra és rifampicinre, nem sorolhatók az MDR tuberkulózis kategóriába.

Az MDR tuberkulózis olyankor alakul ki, mikor az aktív tuberkulózis elleni kezelés valamiért félbeszakad, vagy a szervezetbe bejuttatott hatóanyag mennyisége nem elegendő ahhoz, hogy 100 %-ban elölje a baktériumot.

Ez számos ok miatt előfordulhat:

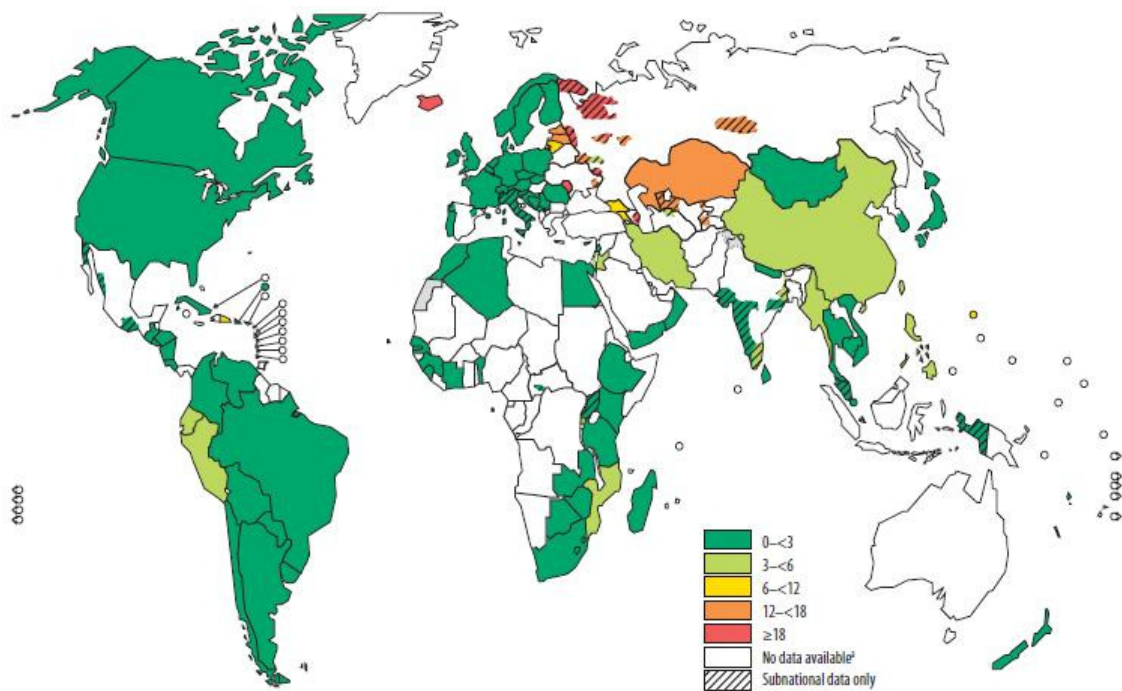
1. A beteg már jobban érzi magát és abbahagyja a gyógyszeres kezelést
2. Nem elegendő a gyógyszerutánpótlás
3. A beteg időnként elfelejti bevenni az előírt adagot

Az MDR tuberkulózis ugyanolyan úton terjed, mint a hagyományos tuberkulózis, bár nem annyira könnyen történik meg a fertőzés. Az MDR tuberkulózis fertőzés jellemzőbb a legyengült immunrendszerrel rendelkező egyéneknél [21].

Általában az MDR tuberkulózis kezelés sokkal hosszabb ideig tart és második vonalbeli gyógyszereket alkalmaznak, melyek sokkal drágábbak és több mellékhatással rendelkeznek, mint az első vonalbeliek. Gyakran sebészeti beavatkozásra van szükség és a halálozási ráta elérheti a 80 %-ot is attól függően, hogy:

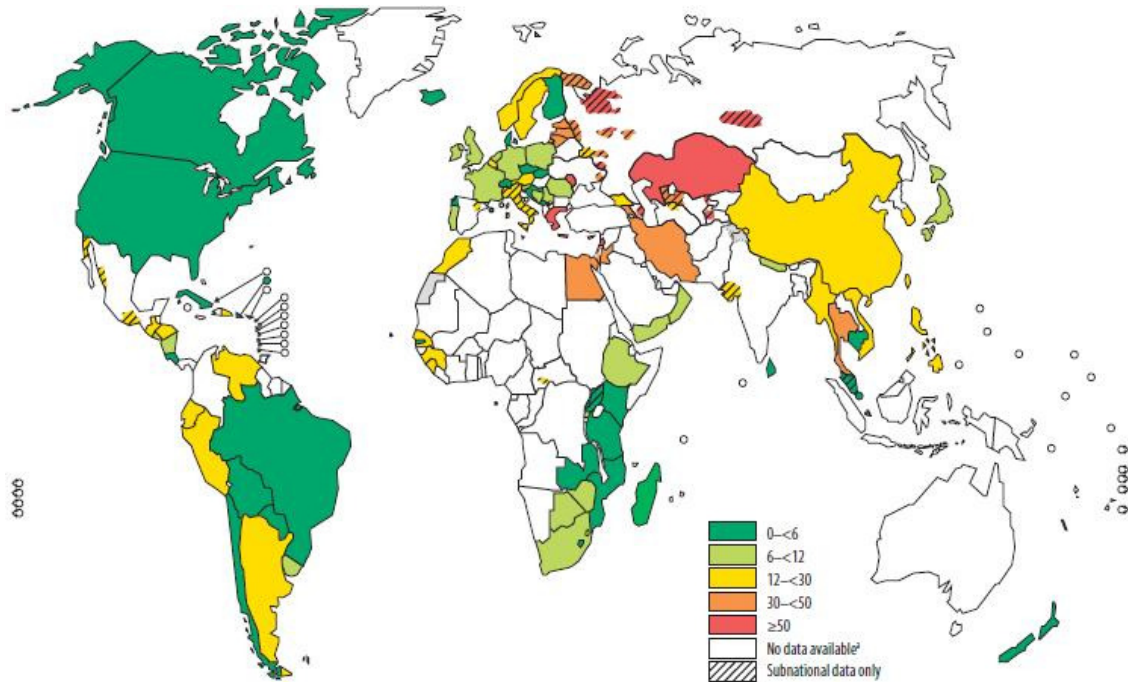
1. A szervezet hány hatóanyagra rezisztens (minél kevesebb, annál jobb)
2. Hány hatóanyaggal kezelik a beteget (ha 5 vagy annál több, jobb eredmény érhető el)
3. Injekcióban adható hatóanyagot alkalmaznak-e (legalább az első 3 hónapban kellene alkalmazni)
4. Mekkora a felelős orvos szakértelme és tapasztalata
5. A beteg mennyire képes együttműködni (a kezelés elég hosszú és nehéz)
6. A beteg HIV fertőzött-e (növeli a halálozás esélyét)

Az MDR tuberkulózissal fertőzött betegek nagy része fejletlen vagy szegény országban él és ezért nem részesül megfelelő ellátásban, mivel a drága gyógyszerekhez nem tud hozzájutni.



4. ábra Új tuberkulózis esetekből kialakult MDR tuberkulózis előfordulása a világon

[22]



5. ábra Korábban kezelt tuberkulózis esetekből kialakult MDR tuberkulózis előfordulása a világon [22]

2.1.4 XDR (Extensively Drug-Resistant) tuberkulózis

Az XDR tuberkulózissal fertőzött egyének közé azok sorolhatók, akik az első vonalbeli hatóanyagokon kívül a második vonalbeliek közül valamely fluoroquinolon származékra és legalább egy injekcióban adható gyógyszerre (capreomycin, kanamycin, amikacin) rezisztensek [23]. A rezisztencia kialakulhat saját, rosszul kezelt tuberkulózisból, de szintén előfordul, hogy valaki már rezisztens tuberkulózissal fertőződik meg. Az XDR tuberkulózis egyelőre még elég ritka betegségnek számít, de ugyanakkor kiemelt figyelmet érdemel, mert nehezen gyógyítható.

2010 januárjában 58 ország jelezte a WHO felé, hogy legalább egy XDR tuberkulózis esetet regisztráltak az adott országban (**6. ábra**). 2008-ban 33 országban összesen 963 esetet regisztráltak, míg 2007-ben 28 országban 772 fertőzöttet. Mivel nagyon sok országban nincs meg a megfelelő laboratóriumi körülmény, hogy második vonalbeli hatóanyag rezisztenciát vizsgáljanak, ezért valószínű, hogy sok XDR tuberkulózist nem is diagnosztizálnak.

2.2.1 Ellenőrzött gyógyszerbevételi program-DOTS (directly observed therapy with short-course chemotherapy)

A *M. tuberculosis* szövetekből történő eltávolítása a jelenleg alkalmazásban levő hatóanyagokkal elég hosszú és időigényes folyamat (min. 6 hónap), mely a beteg és a kezelést végző személyzet türelmét és szoros együttműködését igényli. A javasolttól eltérő, rendszertelen, a szükségesnél rövidebb ideig tartó és nem az előírt gyógyszereket alkalmazó kezelés a gyógyulás elmaradását, a betegség krónikussá válását, a betegség terjedését és gyógyszer-rezisztens törzsek kialakulását eredményezi. Mindezeknek a kiküszöbölésére a tuberkulózis kezelését a WHO ajánlása szerint úgynevezett ellenőrzött gyógyszerbevételi program (DOTS) keretében kell végezni. Ilyenkor a betegnek minden gyógyszeradagját egészségügyi dolgozó jelenlétében, annak közvetlen ellenőrzése alatt kell bevennie és ezt minden esetben dokumentálni kell.

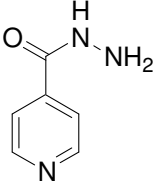
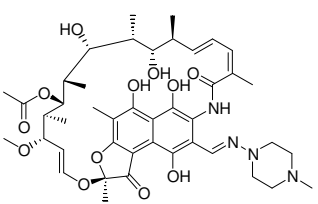
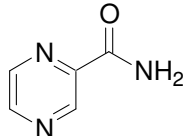
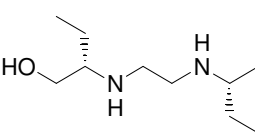
A DOTS program nem egyszerűen a tabletták ellenőrzés melletti bevitelét jelenti, hanem érvényesülnie kell a DOTS program öt fő elemének [27]:

1. Politikai és kormányzati elkötelezettség és támogatás mind szakmailag, mind anyagilag.
2. Megfelelő diagnosztikai (mikobakteriológiai és klinikai) háttér biztosítása, megléte a megbetegedések mihamarabbi felismerésére, különös tekintettel a fertőző betegekre.
3. Folyamatos és megfelelő minőségű gyógyszerellátás mind első, mind második vonalbeli antituberkulotikumokkal.
4. Aktívan és folyamatosan ellenőrző felügyelő, monitorozó rendszerek működtetése, amely a diagnosztika és a kezelés minőségbiztosításának alapja.
5. Az ajánlásoknak megfelelő standardizált gyógyszerkombinációval végzett ellenőrzött gyógyszerbevétel.

2.2.2 Első vonalbeli antituberkulotikumok

Az elsődlegesen alkalmazott tuberkulózis-kezelés két fázisból áll. A kezelés első két hónapja az ún. kezdeti, intenzív szakasz, melynek célja az aktívan metabolizáló, többnyire extracellulárisan elhelyezkedő kórokozók előlése. Ebben a szakaszban mind a négy első vonalbeli antituberkulotikum (izoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol) kombinációját alkalmazzák. A második, utókezelési szakaszban a döntően intracellulárisan elhelyezkedő alig metabolizáló szemi-dormáns kórokozók elpusztítása, a szövetek sterilizálása a cél. Ez az időszak minimum négy hónapig tart, mely alatt izoniazid és rifampicin kezelést kap a beteg.

1. táblázat Első vonalbeli antituberkulotikumok jellemzői

Vegyület név	Rövidítés	Szerkezet	Hatásmechanizmus	Mellékhatás
Izoniazid	INH		Prodrug, melyet a KatG enzim aktivál és így a zsírsav szintáz aktivitását, a mikolsavsintézist gátolja	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatotoxicitás - Perifériás neurotoxicitás - Monoamin mérgezés - Központi idegrendszeri mellékhatás
Rifampicin	RMP		A DNS függő RNS polimeráz β -alegységéhez köt és így a transzkripciót, translációt gátolja	<ul style="list-style-type: none"> - Enyhe hepatotoxicitás - Viszketés, bőrkiütés - Hányinger, hányás, étvágytalanság - Thrombocytopenia
Pyrazinamid	PZA		Prodrug, melyet a pyrazinamidáz savas körülmények közt aktivál és így a zsírsavsintézist gátolja	<ul style="list-style-type: none"> - Enyhe hepatotoxicitás - Hányinger, étvágytalanság - Bőrkiütés - Hyperuricaemia
Ethambutol	EMB		Az arabinoszil transzferáz enzim gátlásával blokkolja az arabinogalaktán szintézist	<ul style="list-style-type: none"> - Retrobulbáris neuritis - Perifériás neuritis - Bőrreakciók

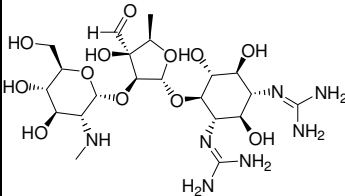
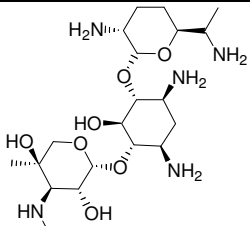
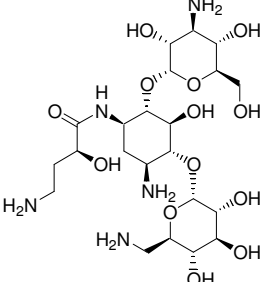
Előfordul, hogy a betegnél mellékhatások lépnek fel ezen négy első vonalbeli antituberkulotikum valamelyikére vagy meglévő egészségügyi probléma miatt terápiás célból nem alkalmazhatók. Ebben az esetben számos második vonalbeli hatóanyag létezik, mellyel a kezelés sikeresen végrehajtható.

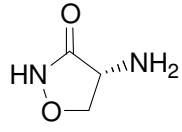
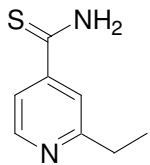
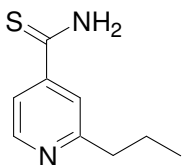
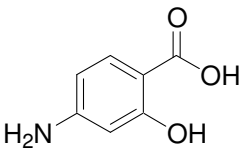
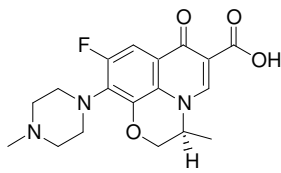
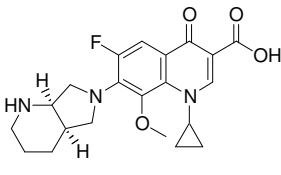
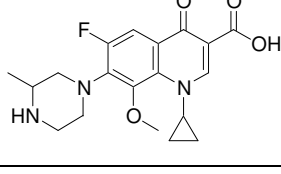
A beteg rezisztenciát is mutathat az első vonalbeli antituberkulotikumokra, mely esetben szintén a második vonalbeli készítmények nyújthatnak segítséget (pl.: MDR tuberkulózis).

A klinikumban leggyakrabban alkalmazott második vonalbeli antituberkulotikumokat a **2. táblázat** tartalmazza.

2.2.3 Második vonalbeli antituberkulotikumok

2. táblázat Második vonalbeli antituberkulotikumok jellemzői

Vegyület család	Vegyület	Szerkezet	Hatásmechanizmus	Mellékhatás
Aminoglikozid	Streptomycin		Riboszomális szinten blokkolják a fehérjeszintézist azáltal, hogy szelektíven kapcsolódnak a bakteriális 70S riboszómák 30S alegységéhez	<ul style="list-style-type: none"> - Ototoxicitás - Nephrotoxicitás - Neurotoxicitás
	Gentamicin			
	Amikacin			

Cycloserin	Cycloserin		Alanin analóg, mely a D-alanint előállító alanin racemázt és a D-alanin ligázt gátolja	<ul style="list-style-type: none"> - Enyhe fejfájás, nyugtalanság - Súlyos görcsroham - Pszichózis
Thioamid	Ethionamid		Prodrug, mely a mikolsav szintézist gátolja	<ul style="list-style-type: none"> - Hányinger, hányás - Fémesség - Étvágytalanság - Hepatotoxicitás
	Prothionamid			
p-Aminoszalicilsav	p-Aminoszalicilsav		A DNS transzkripcióért felelős fehérje komplex, NF-κB, inhibitora	<ul style="list-style-type: none"> - Gastrointesztinális mellékhatás - Hypothyreoidizmus - Hepatotoxicitás - Malabszorpciós szindróma
Ethambutol	Levofloxacin		A DNS-giráz enzimet blokkolva gátolják a DNS szintézist	<ul style="list-style-type: none"> - Hányinger - Inszomnia - Fejfájás - Bőrviszketés - Fotoszenzitivitás
	Moxifloxacin			
	Gatifloxacin			

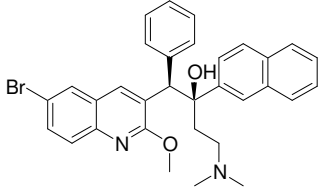
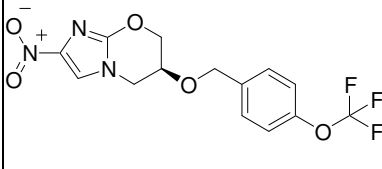
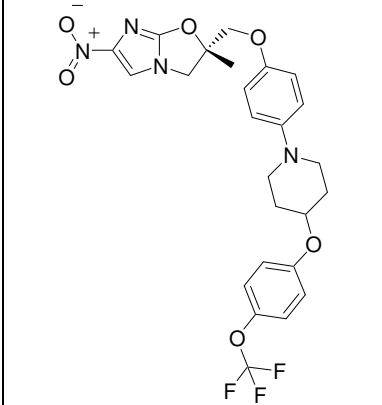
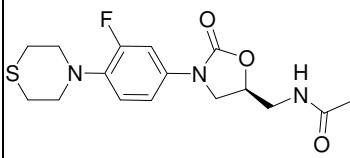
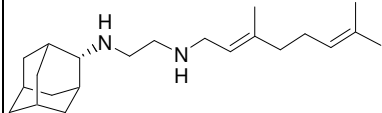
Jelenleg a tuberkulózis elleni terápiában számos hatóanyag kombinációját kell alkalmazni és a kezelés igen hosszú folyamat, mely sokszor próbára teszi a beteg türelmét és kitartását.

A kezelési idő lerövidítése és a hatóanyag kombinációk elhagyása reményében számos kutatás folyik újabb antituberkulotikus készítményekkel kapcsolatban.

A jelenleg klinikai fejlesztés alatt álló vegyületeket a **3. táblázat**ban soroltam fel.

2.2.4 Új, ígéretes antituberkulotikum jelöltek

3. táblázat Klinikai fejlesztés alatt álló antituberkulotikumok

Vegyület család	Név	Szerkezet	Gyártó	Hatásmechanizmus
Diarylquinolin	TMC207		Tibotec BVBA, TB Alliance, Janssen Pharmaceutica N.V. (fázis II)	Bakteriális ATP-szintetáz gátló
Nitroimidazol	PA-824		TB Alliance (fázis II)	Prodrug, ami a mikolsav szintézist és a fehérjeszintézist gátolja
	OPC-67683		Otsuka Pharmaceutical (fázis III)	Prodrug, ami a mikolsav szintézist és a fehérjeszintézist gátolja
Oxazolidinon	AZD-5847	Nem ismert a szerkezete.	AstraZeneca (fázis I)	Fehérje szintézis iniciációs komplex gátló
	PNU-100480		Pfizer (fázis II)	Fehérje szintézis iniciációs komplex gátló
Diamin	SQ109		Sequella, NIH (fázis II)	Sejtfal szintézis gátló

A linezolid (fázis II), moxifloxacin és gatifloxacin (fázis III) antibiotikumok is ígéretes antituberkulotikumként bizonyítanak a klinikai fejlesztés során.

2.3 *Mycobacterium tuberculosis* egyes célfehérjéi

2.3.1 Protein kinázok

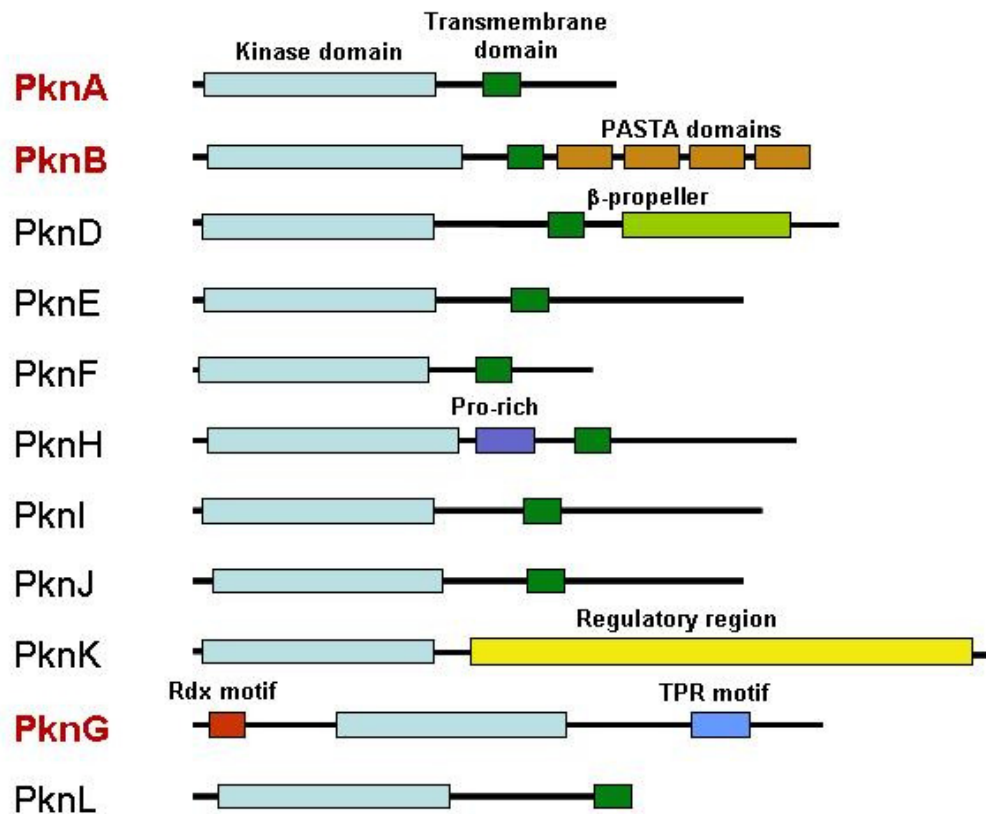
A protein kinázok sikeres hatóanyagok fontos célpontjainak bizonyultak már eddig is a tumor terápia területén, de csak nemrég bizonyították, hogy a fertőző betegségek elleni küzdelemben is kiemelt szerepük van.

A baktériumok túlélésének előfeltétele, hogy a baktérium érzékeli tudja a környezetében történő változásokat, mint pl. ozmotikus nyomás, ionerősség, pH, hőmérséklet és a tápanyagok illetve hatóanyagok koncentrációja. E célból a baktérium sejtfelszíni jeltovábbító rendszerekkel rendelkezik, melyek valójában transzmembrán fehérjék melyek hidat képeznek az érzékelők és az intracelluláris válasz között. Ilyen transzmembrán jeltovábbító rendszerek a kétkomponensű szabályozó rendszerek is [28]. A kétkomponensű rendszerek egyik tagja egy membrán szenzor hisztidin kináz, amely a környezetből érkező sajátos stimulus hatására autofoszforilálódik. A másik az egy intracelluláris szabályozó (válasz-regulátor), amely foszforilálódik és ennek során továbbítja a jelet, mely általában a génátíródást befolyásolja [29, 30, 31].

Nemcsak a kétkomponensű rendszerek, hanem a szerin/treonin protein kinázok (STPK) is széles körben fordulnak elő baktériumokban és bizonyítottan szerepet játszanak számos sejt folyamatban, mint pl. stressz válasz, virulencia vagy sejt ciklus. A prokarióták közül az Actinobacteria törzs tagjai különösen sok STPK fehérjével rendelkeznek a kétkomponensű rendszerekhez képest. Korábban monoklonális antitesttel végeztek tanulmányokat, melyek bizonyították, hogy *M. tuberculosis* esetén is történik eukarióta-szerű fehérje foszforiláció [32]. Később, olyan technikáknak köszönhetően, mint a Southern-blot, PCR illetve genom adatbázis tesztelés, kimutatták, hogy a *M. tuberculosis* genomja 9 eukarióta-szerű protein kinázt kódol [33]. A teljes *M. tuberculosis* genom feltérképezése során pedig ezen kinázok száma 11-re (PknA-PknL) egészült ki [34].

Ezek a protein kinázok olyan metabolikus folyamatok szabályozásában vesznek részt, mint pl.: transzkripció, sejtnövekedés és a gazdaszervezettel történő interakció [35, 36].

A 11 Ser/Thr protein kináz közül 9 transzmembrán receptor, melynek kináz domén része a mikobaktérium sejtben helyezkedik el, 2 pedig (PknK és PknG) oldott formában van jelen [35].



7. ábra *M. tuberculosis* Ser/Thr protein kinázok [37].

A *M. tuberculosis* Ser/Thr protein kinázok közül négy (PknA, PknB, PknG, PknL) a *Corynebacterium glutamicum*-ban is megtalálható [38, 39].

Transzpozon mutagenézisen alapuló kísérletek bizonyították, hogy a *M. tuberculosis* PknA, PknB és PknG kinázoknak szerepe van a baktérium növekedésében [40, 41] és ezért ezek a fehérjék kiemelt szerepet kaptak a hatóanyagfejlesztés területén.

2010 novemberében Kruh és munkatársai *in vivo* tengeri malac modellel bizonyították, hogy a Pkn kinázoknak fontos szerepe van a fertőzés korai és krónikus stádiumában [42].

A Mészáros és munkatársai által 2011-ben megjelentetett cikk is alátámasztja, hogy a Pkn kinázok kiemelt célfehérjék a tuberkulózis elleni hatóanyagfejlesztés területén [43].

2.3.1.1 PknA és PknB

A PknA és PknB fehérjék transzmembrán receptor kinázok, melyek fontos szerepet töltenek be a baktérium sejtosztódásának szabályozásában és a morfológiában [40, 44]. A PknA és PknB kinázok többek közt foszforilálni tudják a Wag31 fehérjét, mely a

peptidoglikán bioszintézis szabályozásában játszik szerepet [45], valamint az egyetlen *M. tuberculosis* Ser/Thr foszfatázt (PstP) is [46].

A PknB fiziológiai szubsztrátja a GarA fehérje, mely a C-terminális végén FHA (forkhead-associated) doménnel rendelkezik. Az FHA domén elengedhetetlenül szükséges a szubsztrát N-terminális végén található Thr22 foszforilációjához [47].

2.3.1.2 PknG

A PknG oldható STPK fehérje és szerepet játszik a mikobaktérium glutamát metabolizmusában [48, 49], valamint fertőzött makrofágok esetén gátolja a fagoszómalizoszóma fúziót [50, 49, 51]. A PknG inaktiválása gén diszrupcióval egyértelműen bizonyítja, hogy ez a kináz, a PknB fehérjével ellentétben, nem nélkülözhetetlen a tuberkulózis mikobaktérium növekedéséhez [40], viszont elengedhetetlenül szükséges a baktérium gazdaszervezetben történő túléléséhez [50]. Bizonyított, hogy PknG fehérjét expresszáló mikobaktérium jelenlétében csökken a gazdaszervezetben a fagocitózisnál kiemelt szerepet betöltő PKC- α mennyisége [52].

2.3.2 Más célfehérjék

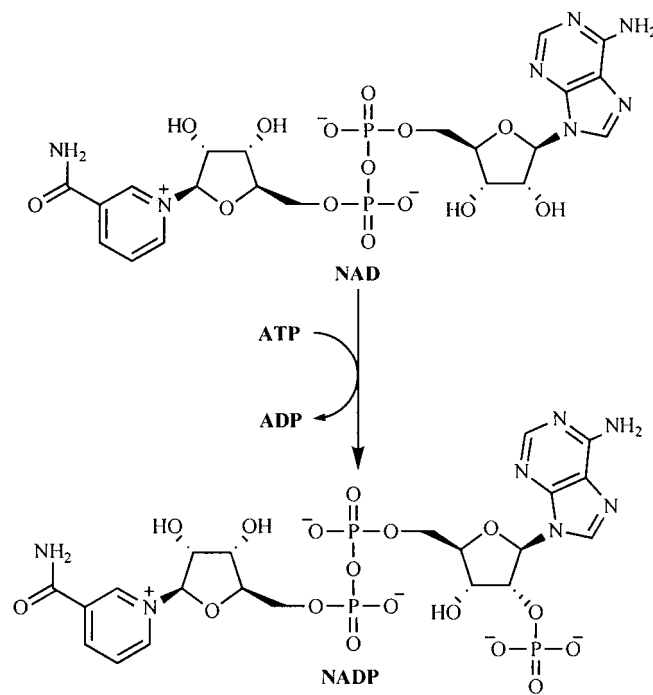
2.3.2.1 Nikotinamid-adenin-dinukleotid (P) bioszintézis

A NAD(P) bioszintézis szintén új célpontok forrása lehet antituberkulotikumok fejlesztése területén [53, 54, 55]. A NAD(P) egy kettős funkcióval rendelkező kofaktor, amely az élő szervezetben mind az energia-, mind a jeltovábbításban szerepet játszik [56, 57, 58], olyannyira, hogy a homeosztázis egyensúlyának megbontása komoly változásokat okoz a sejt életképességében, gyakran a sejt halálához vezet [59]. Több közlemény is alátámasztja, hogy a *M. tuberculosis* kiemelten érzékeny a NAD(P) homeosztázisban történt változásokra [60, 61].

2.3.2.1.1 Nikotinamid-adenin-dinukleotid kináz (NADK)

A NAD kináz ATP és magnézium jelenlétében a NAD poszforilációját katalizálja és egyben az egyetlen NADP forrást jelenti bármely élő szervezet számára [62].

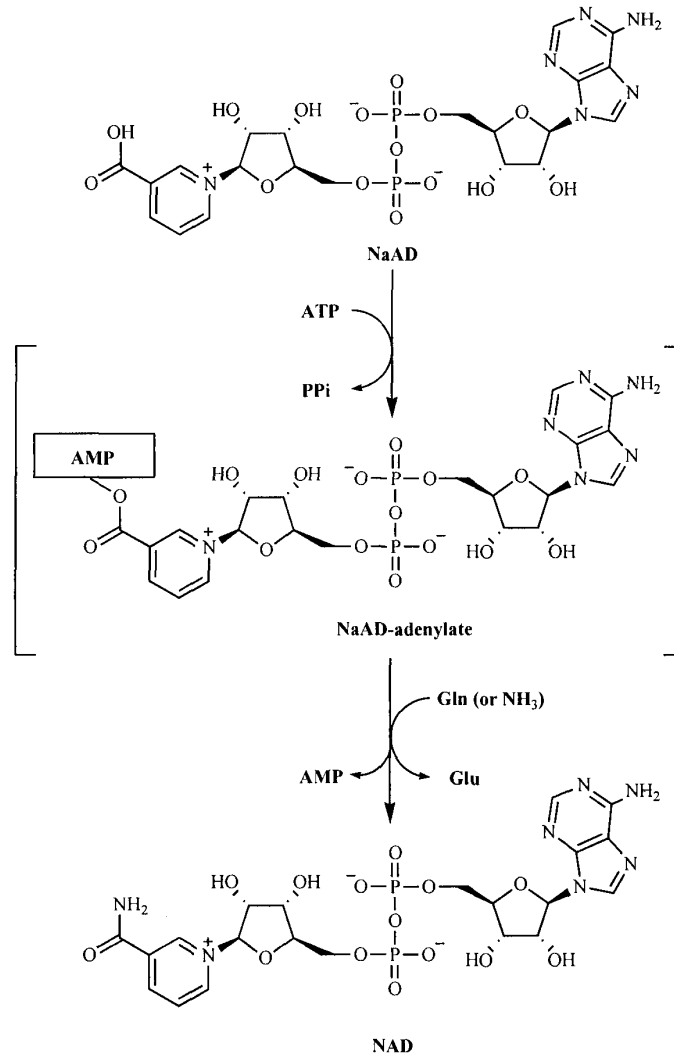
A *M. tuberculosis* NADK alloszterikus kinetikát mutat. Mind ATP-t mind szervesetlen polifoszfátot is tud foszforilezéshez donorként hasznosítani [63, 64] és ezzel jelentős működésbeli különbséget mutat a humán NAD kinázzal szemben, mely hiperbolikus kinetikával rendelkezik [65]. A NAD kináz fehérje fontos szerepet játszik a MDR tuberkulózis növekedésénél is, ebből kifolyólag fontos célpontnak bizonyul a hatóanyagtervezés során [53, 66, 67].



8. ábra NAD kináz által katalizált reakció [68]

2.3.2.1.2 Nikotinamid-adenin-dinukleotid szintetáz (NADS)

A NAD szintetáz az ATP-függő nikotinsav-adenin-dinukleotid (deamino-NAD) NAD-dá történő átalakulását katalizálja, ami a NAD *de novo* bioszintézis utolsó lépése [69].

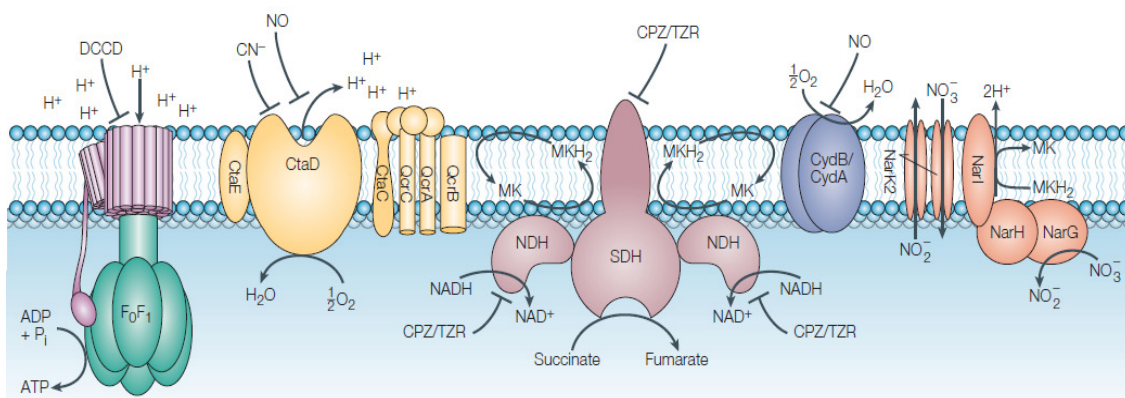


9. ábra NADS katalizált folyamat [68]

2.3.2.2 II-es típusú NADH:menaquinon oxidoreduktáz (NDH-2)

A NDH-2 a légzési lánc kezdeti lépését katalizálja, úgy hogy a NADH-t NAD⁺-dá oxidálja, miközben a menaquinont redukálja [70]. Az elektron transzport láncban elektrondonorként szolgál és fontos szerepet tölt be a nem osztódó, hipoxiás állapotban

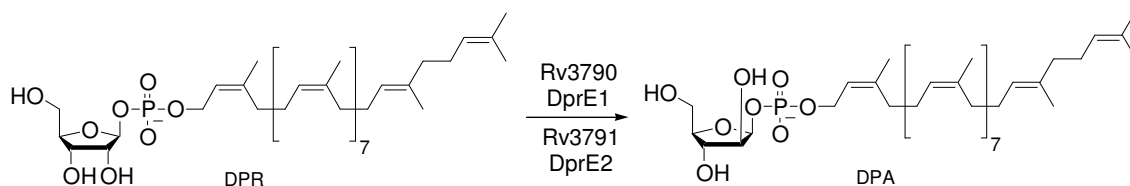
lévő baktérium NAD^+ helyének feltöltésében [71]. A légzési lánc segít a *M. tuberculosis* bacillus életképességének fentartásában különböző extracelluláris körülmények között [72], beleértve a hipoxiás állapotot is [71]. Mivel a NDH-2 fontos céfehérje a tuberkulózis elleni küzdelemben a megfelelő gátlószer kifejlesztésével a baktérium életképtelenné válna [73].



10. ábra *M. tuberculosis* mikroaerofil légzés elektron-transzport lánc tagjai [74]

2.3.2.3 Dekaprenilfoszforil- β -D-ribóz 2'-epimeráz (DprE1)

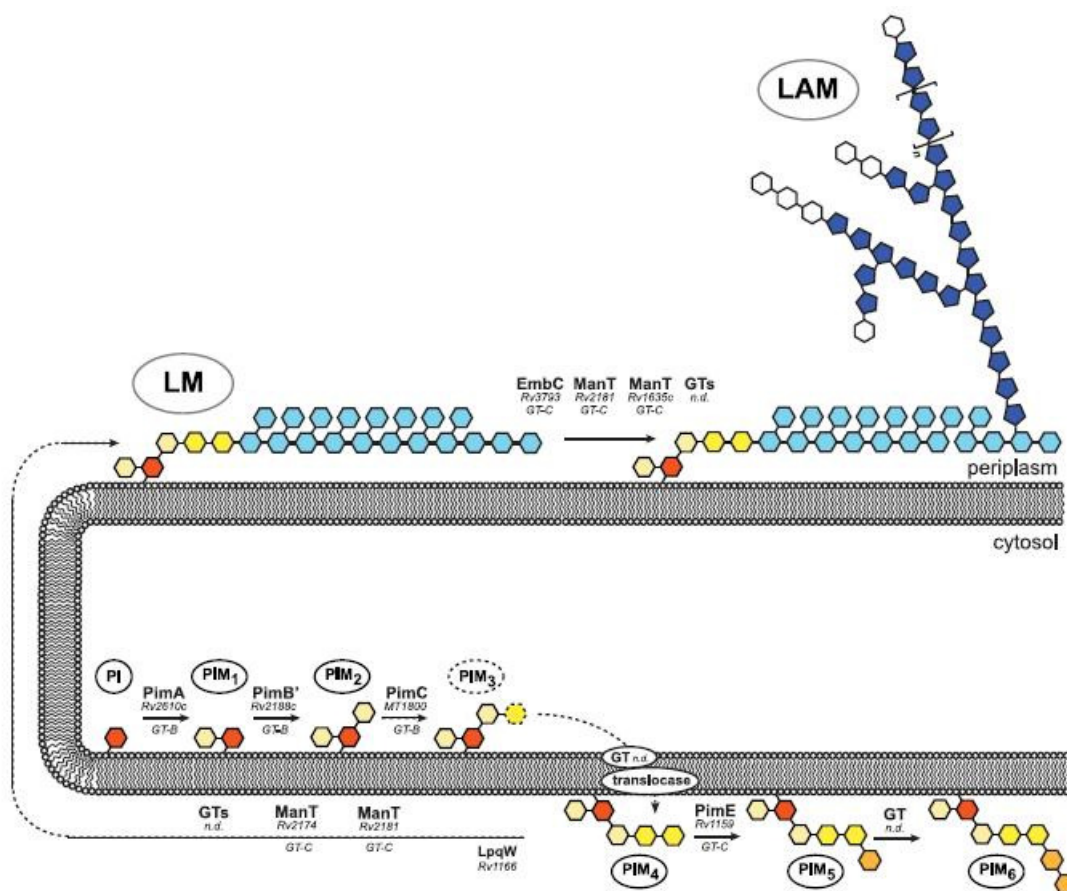
Biokémiai vizsgálatok bizonyítják, hogy az egymás szomszédságában található *rv3790* és *rv3791* gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek a dekaprenilfoszforil-ribóz (DPR) dekaprenilfoszforil-arabinózzá (DPA) történő epimerizálását katalizálják [75]. A DPA a mikobaktérium sejt falában megtalálható arabinogalaktán és lipoarabinomannán poliszacharidok szintézisének az arabinoziltranszferáz szubsztrátja [76]. A DPA prekursor nélkül nem megy végbe a teljes sejt fal szintézis. Ezek a fontos membránhoz kötött enzimek valószínűsíthetően dekaprenilfoszforil- β -D-ribóz oxidázként illetve dekaprenilfoszforil-D-2-keto-eritro-pentóz reduktázként működnek és a DprE1 és DprE2 elnevezést kapták [77].



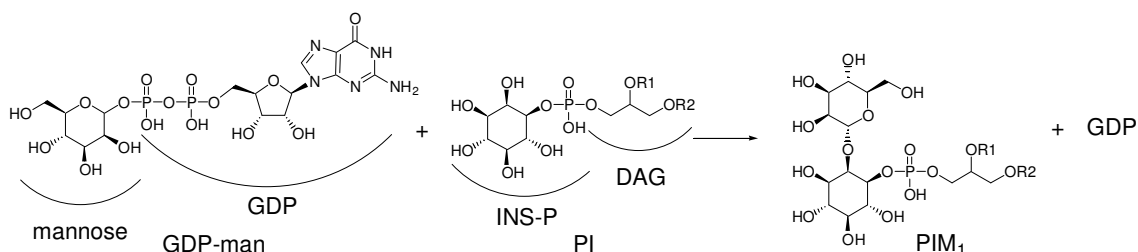
11. ábra A DprE1 szerepe a mikobaktérium sejt fal szintézisben

2.3.2.4 Foszfatidil-inozitol-mannozil transzferáz PimA

A *M. tuberculosis* sejt falban rengeteg lipoarabinomannán (LAM) található, melyeknek széles körű immunmodulátor hatása van és kulcsfontosságú virulencia faktoroknak tekinthetők, ezért kiemelt célpontok a hatóanyagfejlesztés terén. A mikobaktériumban megtalálható *pimA* gén az α -mannozil transzferázt kódolja, mely GDP-mannózáról a mannózt a foszfatidil-inozitol *myo*-inozitol részére helyezi. Így a PimA fontos szerepet tölt be a mikobaktérium növekedésében [78].



12. ábra PIM, lipomannán (LM) és LAM bioszintézis a mikobaktériumban [79]



13. ábra A PimA szerepe a mikobaktérium PIM1 bioszintézise során [80]

3 Célkitűzések

Munkám során a *M. tuberculosis* patogén különböző, validált célmolekuláin (főleg kináz enzimek) ill. a baktériumon ható és a túlélését gátló új hatóanyagmolekulák beazonosítását valamint hatástani karakterizálását tekintetem legfőbb célomnak. A munka nagy részét két nemzetközi pályázat, a New Medicines for Tuberculosis (NM4TB, LSHP-CT-2005-019923) és a SME-STREP for Tuberculosis Drug Development (TB-DRUG, FP6-CT-2006-037217) keretein belül végeztem el, (ez utóbbinak témavezetőm Dr. Kéri György volt a koordinátora) ennek köszönhetően a doktori munkámban olyan adatok is szerepelnek, melyek a partnerekkel közösen végzett munka eredménye.

A mai modern molekuláris biológiai vizsgálatoknak köszönhetően számos olyan célfehérjét azonosítottak, mely szerepet játszik a tuberkulózis baktérium fiziológiás folyamataiban és gátlásával a patogén baktérium lefegyverezhető, ill. elpusztítható.

A gyógyszerkutatás kezdeti fázisában az a cél, hogy sikeres vezető (lead) molekulát fedezzünk fel, mely ezután preklinikai ill. klinikai fejlesztés alá kerülhet. Az egyre szigorodó előírások miatt a hatóanyagfejlesztés egyre komplexebb és költségesebb, melyet a hatékonyság növelésével és ezen keresztül a dózis függő mellékhatások csökkentésével lehet optimalizálni.

Ismert célfehérjén ható sikeres vezető molekula kiválasztására több ezer vegyület biokémia tesztelése után kerülhet sor. A gyors és hatékony tesztelést közepes vagy nagy áteresztőképességű (MTS/HTS) módszerekkel érik el, melyekhez többnyire fluoreszcencián alapuló mérési rendszert alkalmaznak.

Munkámban öt, a tuberkulózis fiziológiás folyamatában bizonyítottan jelentős szerepet játszó PknA, PknB, PknG, NADK és NADS fehérjékre állítottam be olyan biokémiai rendszereket, melyeket MTS/HTS tesztrendszerben lehet alkalmazni és elvégeztem több ezer vegyület tesztelését is.

A biokémiai módszereken alapuló, adott fehérje gátlását célzó tesztelésnek vannak azonban hátrányai is, mivel nem biztosított, hogy a biokémiai rendszerben hatékonyan bizonyuló vegyület valóban kifejti hatását *in vitro* sejtes vagy *in vivo* rendszerekben is.

Ezt elkerülendő létezik olyan kutatási útvonal, melyben a vegyületeket közvetlenül a sejtes rendszerben lehet letesztelni, és így gyorsabban lehet haladni a hatóanyagfejlesztésben, ugyanakkor a célmolekula beazonosítása későbbre marad.

Munkám során a célfehérje alapú biokémiai tesztelés alapján kiválogatott vegyületek nem gátolták megfelelően a tuberkulózis baktérium növekedését, (feltehetően nem jutottak be a sejtbe) ezért pályázati partnerekkel együttműködésben teljes sejtes tesztelést végeztünk, melynek eredményeként számos olyan vegyületet találtunk mely hatékonyan gátolta a baktérium szaporodását.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Vegyületek

A doktori munkámhoz szükséges vegyületeket a Vichem Kutató Kft. biztosította. A NCL (Nested Chemical Library) vegyülettár több mint 12 000 vegyületet foglal magába, melyek kb. 108 alapváz köré csoportosulnak. A vegyületek főként ATP kötőhelyen ható ill. allosztérikus kinázgátlók, melyek egy része ismert, másik része saját fejlesztésű, szabadalmaztatható molekula.

A EVL (Extended Validation Library) vegyülettár kb. 1 000 vegyületet tartalmaz, mely diverz szerkezetekre alapul és a NCL vegyülettár szűkített formájának tekinthető.

4.2 Fehérje expresszálas és tisztítás

4.2.1 PknB

A PknB kináz katalitikus domén részét (1-279 aminosav) a korábban leírtak alapján állítottuk elő [81].

4.2.2 GarA

A recombináns GarA fehérjét korábban közölt módszerrel állítottuk elő [47]. A publikációban közölt tisztítás után még alkalmaztunk egy harmadik lépést, melyben affinitás kromatográfián alapuló TALON® fém affinitás töltetet használtunk (Clontech), hogy eltávolítsuk a fluoreszcens módszert befolyásoló fehérje szennyeződések. A fehérjét 20 mM HEPES pH=7,5; 150mM NaCl; gradiens imidazol (0-200 mM) oldattal eluáltuk és dialízist követően 50 mM Tris pH=8,0; 100 mM NaCl; 1 mM ditiotreitolt (DTT); 20 % glicerin tartalmú oldatban tároltuk -70 °C-on.

4.2.3 PknG

A PknG fehérje (1-750 aminosav) előállításánál a pET28apknG-t tartalmazó BL21(DE3) kompetens sejteket 30 µg/ml kanamicint tartalmazó LB médiumban növesztettük 37°C-on. A *pknG* expressziót OD_{600nm} = 0,6-nál egy éjszakán keresztül 18 °C-on 0,5 mM izopropil-β-D-1-tiogalaktóziddal (IPTG) indukáltuk. A sejteket 4 500 rpm, 4 °C-on 8-10 percig centrifugáltuk és ezután 1 mM PMSF; 0,5 mM DTT; 1 mg/ml

lizozim; 10 mM MgCl₂; 4 µg/ml DnázI tartalmú PBS oldatban 10 percig szonikáltuk. A felülúszót 15 000 rpm, 4 °C, 15 perc centrifugálás után Ni-NTA affinitás kromatográfia oszlopra vittük fel. Az oszlopra kötött fehérjét 300 mM NaCl; 50 mM K₂HPO₄ pH=8,0; 10 mM imidazol pH=7,2; 10 % glicerin tartalmú oldattal mostuk, majd 300 mM NaCl; 50 mM K₂HPO₄ pH=8,0; 150 mM imidazol pH=7,2; 10 % glicerin tartalmú eluáló oldattal távolítottuk el. A fehérjét -70 °C-on 50 mM HEPES pH=7,2; 2 mM MnCl₂; 5 mM MgCl₂; 500 mM NaCl; 1 mM DTT; 20 % glicerin oldatban tároltuk.

4.2.4 PknA

PknA (1-336 aminosav, katalitikus domén és juxtamembrán domén együtt) esetében a pET28Ω*pknA*-t tartalmazó BL21(DE3)pLysS kompetens sejteket 50 µg/ml kanamicint és 30 µg/ml kloramfenikolt tartalmazó LB médiumban növesztettük 30 °C-on. A *pknA* expressziót OD_{600nm} = 0,6-nál 3 és fél óráig 30°C-on 1 mM IPTG-vel indukáltuk. A sejteket 4 500 rpm, 4 °C-on 8-10 percig centrifugáltuk, majd 50 mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl; 25 mM imidazol; 5 % glicerin; proteáz inhibitor keverék (Complete EDTA-free, Roche) tartalmú pH=8,0 pufferben szonikálással lizáltuk a sejteket. A felülúszót 15 000 rpm, 4 °C, 15 perc centrifugálással távolítottuk el. A rekombináns fehérjét két lépésben tisztítottuk meg FPLC (fast protein liquid chromatography) módszerrel. A fehérjét első lépésben Ni-NTA oszlopon affinitás kromatográfiával választottuk szét, majd az oszlopon kikötődött fehérjét 50 mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl; 5 % glicerin; gradiens imidazol (0-500 mM) pH=8,0 oldattal távolítottuk el. A fehérjét második lépésben Superdex75 16/60 oszlopon 25 mM HEPES pH=8,0; 500 mM NaCl; 5 % glicerin tartalmú oldattal, 1 ml/perc áramlási sebességgel tisztítottuk meg. A fehérjét -70 °C-on 12,5 mM HEPES pH=8,0; 250 mM NaCl; 0,5 mM DTT, 50 % glicerin oldatban tároltuk.

4.2.5 NADS

Rekombináns *M. tuberculosis* NAD szintetáz expresszálása és tisztítása már korábban publikált módszer szerint történt [82].

4.2.6 NADK

Recombináns *M. tuberculosis* NAD kináz előállítása szintén már az irodalomban közölt módon történt [83].

4.2.7 Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjék tisztaságát és aktivitását Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem.

Gradiens gél:

NuPAGE 4-12 % Bis-Tris gél, 1mm, 10 zseb (Invitrogen).

Elválasztó gél (12 %, 10 ml)

30 % akrilamid /bis-akrilamid 29:1 (Bio-Rad)	4 ml
1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
Desztillált víz	3,3 ml
TEMED	4 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	100 µl

Gyűjtőgél (5 %, 3 ml)

30 % akrilamid /bis-akrilamid 29:1 (Bio-Rad)	0,5 ml
1 M Tris-HCl (pH=6,8)	0,38 ml
10 % SDS	30 µl
Desztillált víz	2,1 ml
TEMED	3 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	30 µl

Elektroforézis puffer (1 liter, pH=8,8):

Tris	3,03 g
SDS	1,00 g
Glicin	14,40 g

A gélek festése:

A gélek festésénél többféle módszert alkalmaztam.

1. A festést 45 % etanol, 40 % ecetsav, 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250 összetételű oldattal végeztem 10 percig, majd a géleket 45 % etanol és 10 % ecetsav összetételű oldatban áztattam, míg a háttérben levő felesleges festék kioldódott.
2. Fermentas PageBlue™ Protein Staining Solution a megadott leírás szerint [84].

4.3 Radioaktív enzim aktivitás mérés

A radiometriás PknB mérést 20 µl végtérfogóban, 96-lyukú rakciólemezen végeztem. A kináz oldathoz (10 µM GarA; 2,5 nM PknB; 50 mM HEPES pH=7,0; 0,01 % Brij35; 1 mM DTT; 5 % glicerin) hozzáadtam az ATP tartalmú oldatot (20 µM ATP; 1,5 µCi [γ - 33 P]ATP; 500 µM MnCl₂), melyet 30 perces inkubáció követett szobahőmérsékleten.

A reakció leállításához 5 µl 150 mM H₃PO₄-t használtam. Ezt követően minden lyukból 4 µl-t pipettáztam a P81 cellulóz papírra, melyet 5x10 percig mostam 1 % H₃PO₄ oldattal, hogy a nem kötődött jelölt ATP-t eltávolítsam. A száraz P81 papíron lévő foltokat PhosphorImager (Storm, Molecular Dynamics) készülékkel hívtam elő és értékeltem ki. Minden vegyületet először 50 µM, majd az aktívakat 5 µM-ban teszteltem duplikátumban. Az IC₅₀ értékeket 8 pontos hígításban, duplikátumban, KaleidaGraph program segítségével határoztam meg. K252-a és strausporin vegyületeket használtam referencia inhibitoroként [85].

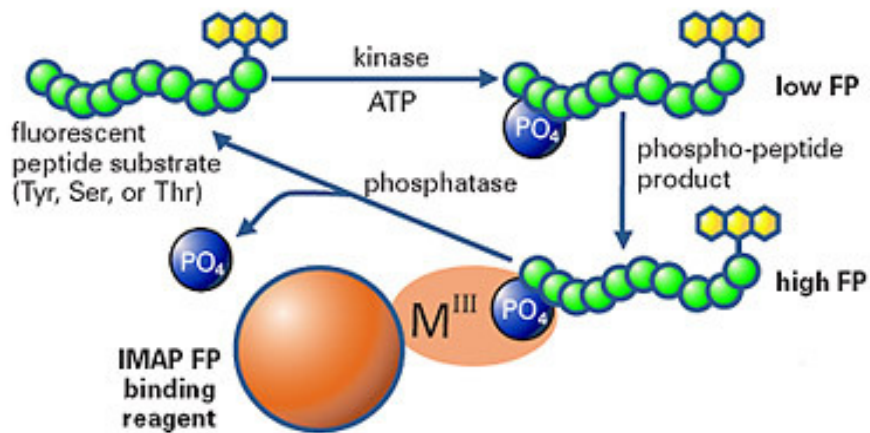
4.4 Fluoreszcencia polarizáción alapuló mérések

4.4.1 IMAP (Immobilized Metal Assay for Phosphochemicals) technológia

Az IMAP technológia alapelve, hogy nanorészecskékhez koordinációs komplex-szel rögzített (immobilizált) fémionokhoz (M³⁺) – megfelelően nagy só koncentráció (ionerősség) esetén – nagy affinitással kötődik a foszfát csoport. Az IMAP „kötő reagens” komplexet képez – a kináz által katalizált reakció során – a peptid szubsztrátra kötődő foszfát csoporttal. A szubsztrátok fluoreszcens festékekkel vannak megjelölve. Az általunk használt peptid szubsztrátokon 5-karboxifluoreszcein (5-FAM) jelzés van.

A kötődés lecsökkenti a jelölt peptid szubsztrát molekuláris mozgását, ami a mért fluoreszcencia polarizáció (FP) értékének növekedésével detektálható.

Az IMAP „kötő oldat” kétféle gyári pufferből áll, és ebben a pufferben van feloldva IMAP „kötő reagens” megfelelő hígításban.



14. ábra IMAP technológia alapelve [86]

Az IMAP módszernél használt különböző peptid szubsztrátokat az ELTE-n található Dr. Mező Gábor vezetése alatt működő Magyar Tudományos Akadémia Peptidkémiai Kutatócsoportja biztosította számomra.

4.4.2 Transcreener technológia

4.4.2.1 ADP detektáló módszerek

4.4.2.1.1 HTRF® Transcreener ADP technológia

A HTRF® Transcreener® ADP technológia (Cisbio) egy kompetitív immunassay, melyben a natív ADP és a d2-jelölt ADP verseng az Eu^{3+} kriptáttal jelölt monoklonális ADP ellenes antitestért. A módszer 2 lépésből áll: az enzimatis reakcióból és az ezt követő általános detektáló lépésből [87].

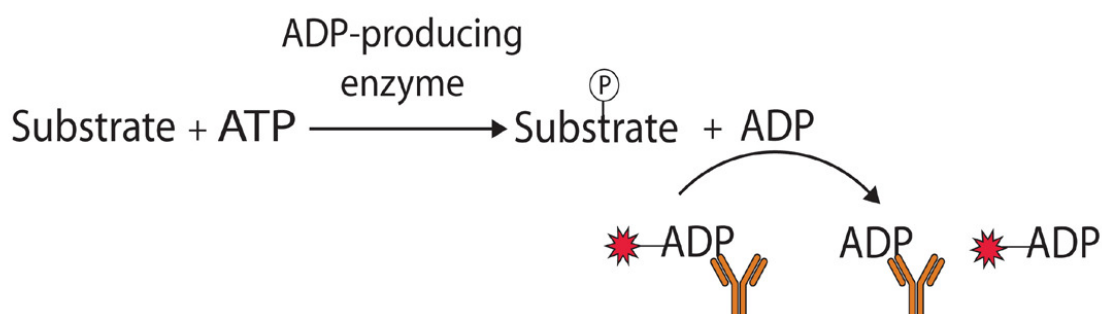


15. ábra HTRF[®] Transcreener ADP módszer

Ezt a detektáló módszert PknA enzim esetén használtuk.

4.4.2.1.2 Transcreener[®] ADP² FP technológia

A Transcreener[®] ADP² FP technológia a távoli vörös tartományban mérhető kompetitív fluoreszcencia polarizáción alapuló módszer, amely az ADP kimutatásán alapul, ezért bármely olyan enzim esetén használható, amely ADP-t termel: fehérje, lipid, szénhidrát kinázok, ATPázok, DNS helikázok, karboxiláz és glutamin szintetáz. A Transcreener[®] ADP² FP technológia egy egyszerű, egylépéses, homogén detektáló módszer, amely nagy rugalmassággal bír az ATP koncentráció terén (0,1-1 000 μM). A módszer kitűnő jelet ad alacsony szubsztát átalakulásnál. A $Z' \geq 0,7$ és a polarizációs különbség ≥ 85 10 % ATP átalakulásnál, 1 μM ATP jelenlétében.



16. ábra Transcreener[®] ADP² FP technológia

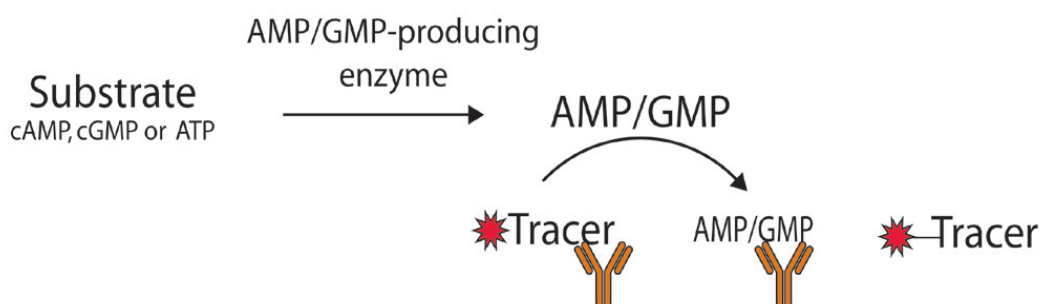
A Transcreener[®] ADP² FP módszert ADP termelő enzimfolyamatok nyomonkövetésére fejlesztették ki. A Transcreener ADP detektáló oldat ADP² antitesthez kötött Alexa633

tracer jelölt ADP-t tartalmaz. Az enzimreakció során termelődött natív ADP leszorítja a tracer jelölt ADP-t az antitestről (**16. ábra**) és így a tracer-ADP szabadon foroghat mely a fluoreszcencia polarizáció csökkenéséhez vezet. A távoli vörös tartományban mérhető tracer segítségével kiküszöbölhető a fluoreszcens vegyületekkel történő interferencia [88].

A Transcreener[®] ADP² FP technológiát a PknA, PknB, PknG illetve NADK enzimek tesztelésére állítottam be.

4.4.2.2 Transcreener[™] AMP/GMP technológia

A Transcreener[™] AMP/GMP technológia a távoli vörös tartományban mérhető kompetitív fluoreszcencia polarizáción alapuló módszer, amely az AMP vagy GMP kimutatásán alapul, ezért bármely olyan enzim esetén használható, amely AMP-t vagy GMP-t termel: ubiquitin, SUMO, nukleinsav és protein ligázok, foszfodiészterázok és szintetázok. A Transcreener[™] AMP/GMP technológia egy egyszerű, egy lépéses, homogén detektáló módszer, melyben bármilyen natív, nem módosított szubsztrát alkalmazása lehetséges 1-1 000 μM tartományban. Az módszer kitűnő jellel rendelkezik alacsony szubsztrát átalakulásnál. A $Z' \geq 0,7$ és a polarizációs különbség $\geq 85\%$ 10% szubsztrát átalakulásnál, 10 μM donor szubsztrát jelenlétében.



17. ábra Transcreener[™] AMP/GMP technológia

A Transcreener[™] AMP/GMP módszert AMP vagy GMP termelő enzimfolyamatok nyomkövetésére fejlesztették ki. Az enzimreakció folyamatát fluoreszcencia polarizáció csökkenés jelzi. A Transcreener AMP/GMP detektáló oldat AMP/GMP antitesthez kötött Alexa633 tracer jelölt AMP/GMP-t tartalmaz. Az enzimreakció során termelődött natív AMP vagy GMP leszorítja a tracer jelölt AMP/GMP-t az antitestről (**17. ábra**), mely ezután szabadon foroghat. Az AMP/GMP arányos a polarizáció

csökkenéssel. A távoli vörös tartományban mérhető tracer segítségével kiküszöbölhető a fluoreszcens vegyületekkel történő interferencia [89].

A Transcreener™ AMP/GMP technológiát *M. tuberculosis* NAD szintetáz tesztelésre állítottam be.

4.5 Virtuális tesztelés

4.5.1 Szerkezet-hatás összefüggés

A modell elkészítéséhez a Vichem Kft.-ben kifejlesztett programot használtuk. A biológiai mérések eredményein alapuló szerkezet-hatás összefüggést (QSAR) az ADABOOST módszerrel készítettük el, melyben több ezer kiszámított molekulaleíró (molecular descriptors) és a biológiai adatok közti korrelációt vizsgáltuk [90, 91].

4.5.2 Dokkolás

Dokkolásnál a célfehérjék korábban publikált kristályszerkezetét használtuk fel. A dokkolás során a Vichem, Tripos és WDI vegyülettárat (19 033 vegyület) teszteltük virtuálisan. A dokkolást FlexX 1.20.1. programmal végeztük, alapbeállítások szerint. A kölcsönhatási energiák (H-híd, Van der Waals, Coulomb kölcsönhatás) alapján történt az illesztés. Minden ligand esetén 30 pózt generált a program, melyekhez az empirikus pontozófüggvény pontszámot rendelt és a legjobb pontszámú került kiválasztásra [92].

4.6 Baktérium törzsek

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS és *E. coli* PQ37 törzseket 37 °C-on LB (Luria broth) médiumban 30 µg/ml kloramfenikol illetve 50 µg/ml ampicillin jelenlétében tenyésztettük. A *C. glutamicum* (ATCC 13032) tenyésztését 30 °C-on LB médiumban, a *Mycobacterium smegmatis* mc²155 tenyésztését 0,05 % Tween 80-t tartalmazó LB médiumban 37 °C-on végeztük. A *M. bovis* BCG Pasteur és *M. tuberculosis* H37Rv sejtvonalakat 10 % ADC (albumin, dextrose, catalase, Becton Dickinson), 0,05 % Tween 80 és 0,2 % glicerin tartalmú Middlebrook 7H9 médiumban növesztettük fel.

A benzotiazinon (BTZ) rezisztens mutáns *M. smegmatis* MN47, *M. smegmatis* MN84, *M. bovis* BCG Pasteur BN2 törzseket Prof. G. Riccardi-tól kaptuk [93]. A *C. glutamicum* PS1 mutánst úgy állítottuk elő, hogy BTZ043 (10 µg/ml) tartalmú LB-agar

lemezen tenyésztettünk vad típusú *C. glutamicum*-ot (ATCC 13032) 30 °C-on, két hétig.

4.7 Antibakteriális tesztelés

A vegyületek (10 µM) *C. glutamicum* (ATCC 13032) és *M. tuberculosis* H37Rv elleni *in vitro* aktivitásának meghatározása rezazurin redukción alapuló mikrotiter módszerrel (REMA) történt [94].

Az egy dóziszú hatóanyag érzékenység meghatározás *C. glutamicum* esetén 384-lyukú átlátszó, lapos aljú polisztrén mikrolemezen (Corning) történt, 20 µl térfogatban. A vegyületekhez növekedési fázisban lévő, OD_{600nm} = 0,001 sejt kultúrát adtunk és 30 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A rezazurin (2 µl; 0,025 w/v%) hozzáadása után a lemezeket 4 órán keresztül inkubáltuk. A baktérium növekedésére a rezazurin redukció fluoreszcencián alapuló (excitáció 570 nm, emisszió 590 nm) monitorozásából következtettünk.

Az egy dóziszú hatóanyag érzékenység meghatározás *M. tuberculosis* esetén hasonlóan történt, de 96-lyukú átlátszó, lapos aljú polisztrén lemezen (Corning), 100 µl térfogatban.

A párolgás elkerülése miatt a lemezeket poliészter fóliával fedtük le. 7 nap 37 °C-os inkubálás után hozzáadtuk a rezazurint és további 20 órát inkubáltuk 37 °C-on mielőtt fluoreszcens értékelésre került sor.

Az anyagok lemezre pipettázásában a Zephyr® Liquid Handling Workstation (Caliper LifeSciences) pipettázó robot volt a segítségünkre. A baktérium és rezazurin pipettázása *M. tuberculosis* esetén kézzel, *C. glutamicum* esetén pedig pipettázó robot (EL406, BioTek) segítségével történt. A fluoreszcencia polarizációt Tecan Infinite 500 készülékkel mértük.

C. glutamicum esetén 32 pozitív (rifampicin, 1 µM) és 32 negatív (nincs inhibitor) kontrollt, illetve *M. tuberculosis* esetén 8-8 kontrollt használtunk.

4.8 MIC meghatározás

A MIC (a hatóanyag minimális koncentrációja, mely a folyékony sejt kultúra növekedését több mint 99 %-ban gátolja OD_{600nm} = 0,001 esetén) meghatározás 96-lyukú átlátszó lemezen (Corning) rezazurin alapú módszerrel történt.

4.9 Genotoxicitás meghatározása

A vegyületek genotoxicitását SOS-kromoteszttel határoztuk meg LB agar lemezen [95]. A vegyületeket (10 µl, 10 mM) ampicillin (50 µg/ml), bróm-klór-indolil-galactopiranozid (0,006 %) és *E. coli* PQ37 (OD_{600nm} = 0,04) tartalmú LB agar lemezre cseppentettük. A negatív kontroll izoniazid volt, míg a pozitív kontroll 4-nitroquinolin *N*-oxid volt. Az anyagok genotoxicitását kolorimetriásan értékeltük ki.

4.10 Citotoxicitás meghatározása

A vegyületek toxicitás vizsgálatát REMA módszerrel végeztük humán tüdő epitél sejtvonalon (A549) és humán leukémia monocita sejtvonalon (THP-1). A sejteket (2×10^4 sejt/lyuk, 500 µl 10 % FBS tartalmú DMEM médium) 3 napig 37 °C-on 5 % CO₂ jelenlétében inkubáltuk 1,5 és 100 µM közötti vegyület koncentrációval. A THP-1 viabilitás meghatározásnál a rezazurint közvetlenül a sejt médiumhoz adtuk (0,0025 %), míg az A549 sejtvonal esetében a médiumot eltávolítottuk és a rezazurint (0,0025 %) foszfát pufferben adtuk hozzá. A lemezeket további 2 órán keresztül inkubáltuk és ezután a viabilitást fluoreszcenciával határoztuk meg (excitáció 570 nm, emisszió 590 nm). A vegyületeket duplikátumban teszteltük. A minimális citotoxicitási koncentráció (MCC) pedig az a hatóanyag koncentráció, amely fluoreszcencia csökkenést vagy más jelentősebb morfológiai változást okoz.

4.11 Antibakteriális érzékenység meghatározás agar-diffúziós teszttel

Az antibakteriális aktivitás meghatározása számos baktérium törzsön agar-diffúziós módszerrel történt. Az 50 µg vegyületet tartalmazó 6 mm átmérőjű szűrőpapír korongot az előzetesen beoltott agar lemezre helyeztük. A megfelelő inkubálási idő elteltével lemértük a szűrőpapír korong körüli inhibíciós terület átmérőjét.

4.12 Fertőzött makrofág vizsgálat

A 20 ng/ml PMA-val differenciált THP-1 sejtvonalat egy éjszakán át 10 % FBS és 1 % glutamin tartalmú RPMI oldatban növesztettük, 5 % CO₂ jelenlétében, 37 °C-on. A makrofágokat humán szérummal opsonizált *M. bovis* BCG-vel 2 órán keresztül fertőztük (10 baktérium/sejt), majd friss médiummal mostuk. A nem internalizált

baktériumokat 100 µg/ml gentamicin hozzáadásával öltük el. A fertőzött makrofágokat 10 µM végkoncentrációjú inhibitorral 48 órán keresztül inkubáltuk. A viabilitás vizsgálathoz a médiumot antibiotikum mentes médiumra cseréltük, majd a begyűjtött fertőzött makrofágokat meleg PBS-sel mostuk. A makrofágokat 7H10/10 % OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex) lemezre helyezve meghatároztuk a telepszámot (CFU).

4.13 KinaTor™

A kiválasztott molekula gyantához kötését a vegyészek végezték a korábban már publikált eljárásnak megfelelően [96]. Az inaktivált *M. tuberculosis* lizátumot az EPFL intézet biztosította számomra. Az affinitás kromatográfiához Superdex 75 HR 10/300 GL oszlopot használtam.

Az oszlop töltetet 5 ml 20 mM HEPES; 0,25 % Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 M NaCl oldattal ekvilibráltam (v=100 µl/perc). Ezután 10 ml 15mg/ml tbc lizátumot engedtem át az oszlopon v=50 µl/perc áramlási sebesség mellett. A fehérjéket az oszlop mosása után (3 ml, 20 mM HEPES; 0,25 % Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 150 mM NaCl, v=100 µl/perc) 3 ml 20 mM HEPES; 0,25 % Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 150 mM NaCl, 10 mM ATP, 20 mM MgCl₂ és 1 mM inhibitor tartalmú oldattal eluáltam (v=50 µl/perc).

Az affinitás kromatográfiát az inhibitorral kötött és az inhibitor mentes gyantával is elvégeztem.

A fehérjéket a kloroform-metanolos kicsapás [97] után, mintaoldó pufferben feloldva 16-BAC/SDS-PAGE 2D elektroforézissel választottam szét. Az elektroforézist nagy gélen (Bio-Rad PROTEAN II System) végeztem el.

Mintaoldó puffer (10 ml)

Karbamid	4,5 g
BAC	1 g
Glicerín (100 %)	1 ml
Desztillált víz	4 ml
Melegítés 60 °C-on amíg homogén nem lesz az oldat!	
1,5 M DTT	500 µl

5 % Pyronin Y	100 µl
---------------	--------

16-BAC gél (első dimenzió)Elválasztó gél (7,5 %; 80 ml)

Karbamid	16,4 g
30 % akrilamid /bis-akrilamid 29:1 (Bio-Rad)	25,83 ml
300 mM KH ₂ PO ₄ (pH=2,1)	22,66 ml
Desztillált víz	22,66 ml
250 mM BAC	0,9 ml
5 mM FeSO ₄ x7H ₂ O	0,15 ml
80 mM aszkorbinsav	4,5 ml
H ₂ O ₂ (1:1 200)	3,63 ml

Gyűjtőgél (4 %, 16 ml)

Karbamid	2 g
30 % akrilamid /bis-akrilamid 29:1 (Bio-Rad)	2,66 ml
300 mM KH ₂ PO ₄ (pH=2,1)	5 ml
Desztillált víz	6 ml
250 mM BAC	0,14 ml
5 mM FeSO ₄ x7H ₂ O	0,017 ml
80 mM aszkorbinsav	1 ml
H ₂ O ₂ (1:750)	1 ml

A 250 mM BAC; 5 mM FeSO₄x7H₂O; 80 mM aszkorbinsav; H₂O₂ oldatokat mindig frissen kell elkészíteni illetve a hidrogén-peroxid hozzáadása előtt 10 percig gázmentesíteni kell az oldatot.

Elektroforézis puffer (2 liter):

BAC	1,98 g
0,5 M H ₃ PO ₄	200 ml
Glicin	22,52 g

Futtatás után a gélt fixáló oldatba (izopropanol:ecetsav:víz = 3,5:1:5,5) tettem éjszakára, majd másnap az SDS-PAGE futtatás előtt 375 mM Tris-HCl (pH=8,8) és 0,2%-os SDS elegyében ekvilibráltam.

SDS-PAGE (második dimenzió)

Elválasztó gél (10 %, 150 ml)

30 % akrilamid /bis-akrilamid 29:1 (Bio-Rad)	50,1 ml
1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	37,5 ml
20 % SDS	1,5 ml
Desztillált víz	59,4 ml
TEMED	60 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	1,5 ml

Gyűjtőgél (5 %, 25 ml)

30 % akrilamid /bis-akrilamid 29:1 (Bio-Rad)	4,15 ml
1 M Tris-HCl (pH=6,8)	3,15 ml
20 % SDS	250 µl
Desztillált víz	17,0 ml
TEMED	25 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	250 µl

Elektroforézis puffer (1 liter, pH=8,8):

Tris	3,03 g
SDS	1,00 g
Glicin	14,40 g

A géleket futtatás után Fermentas PageBlue™ Protein Staining Solution oldattal festettem [84].

A fehérjéket a SZTE Orvosi Vegytani Intézet ESI-QTOF rendszeren elemezte ki és azonosította.

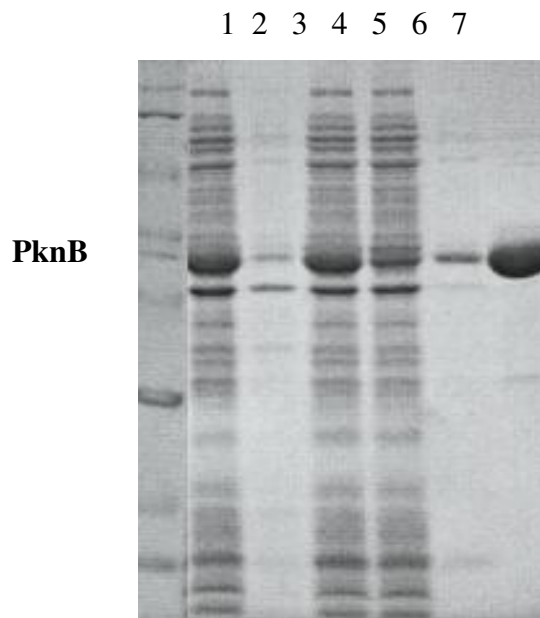
5 Eredmények

5.1 Célfehérje alapú hatóanyagfejlesztés

5.1.1 PknB kinázon ható inhibitor keresés

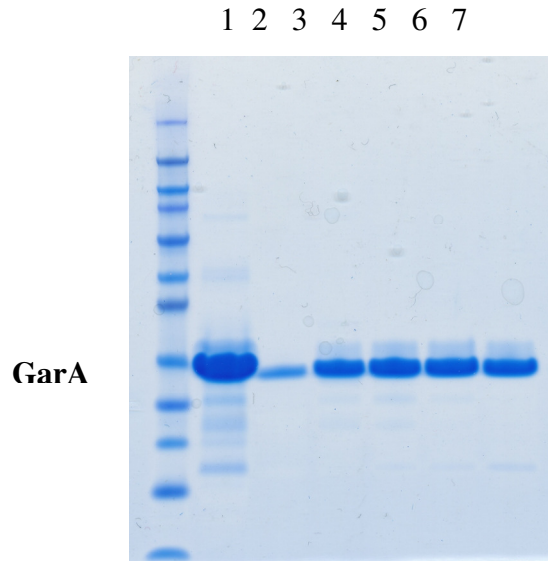
5.1.1.1 Fehérje expresszió, tisztítás

A PknB fehérjét a 4.2.1 fejezetben leírtak alapján állítottam elő. A fehérje eluátum tisztaságát Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem 12 %-os gélen. A 18. ábra a PknB fehérje tisztítása során készült frakciók fehérjeösszetételét mutatja.



18. ábra PknB (MW 32414 Da): 1. marker; 2. totál; 3. pellet; 4. felülúszó; 5. átengedett; 6 mosás; 7. eluátum

A PknB Transcreener[®] ADP² FP tesztelés során a PknB kináz szubsztrátjaként a GarA fehérjét használtam, melynek előállítását a 4.2.2 fejezetben leírtak alapján történt. A GarA fehérje tisztaságát 4-12 %-os gradiens gélen, Na-dodecil-szulfát gélelektroforézissel ellenőriztem. A 19. ábra a GarA fehérje különböző frakcióit mutatja eltérő imidazol koncentrációban.



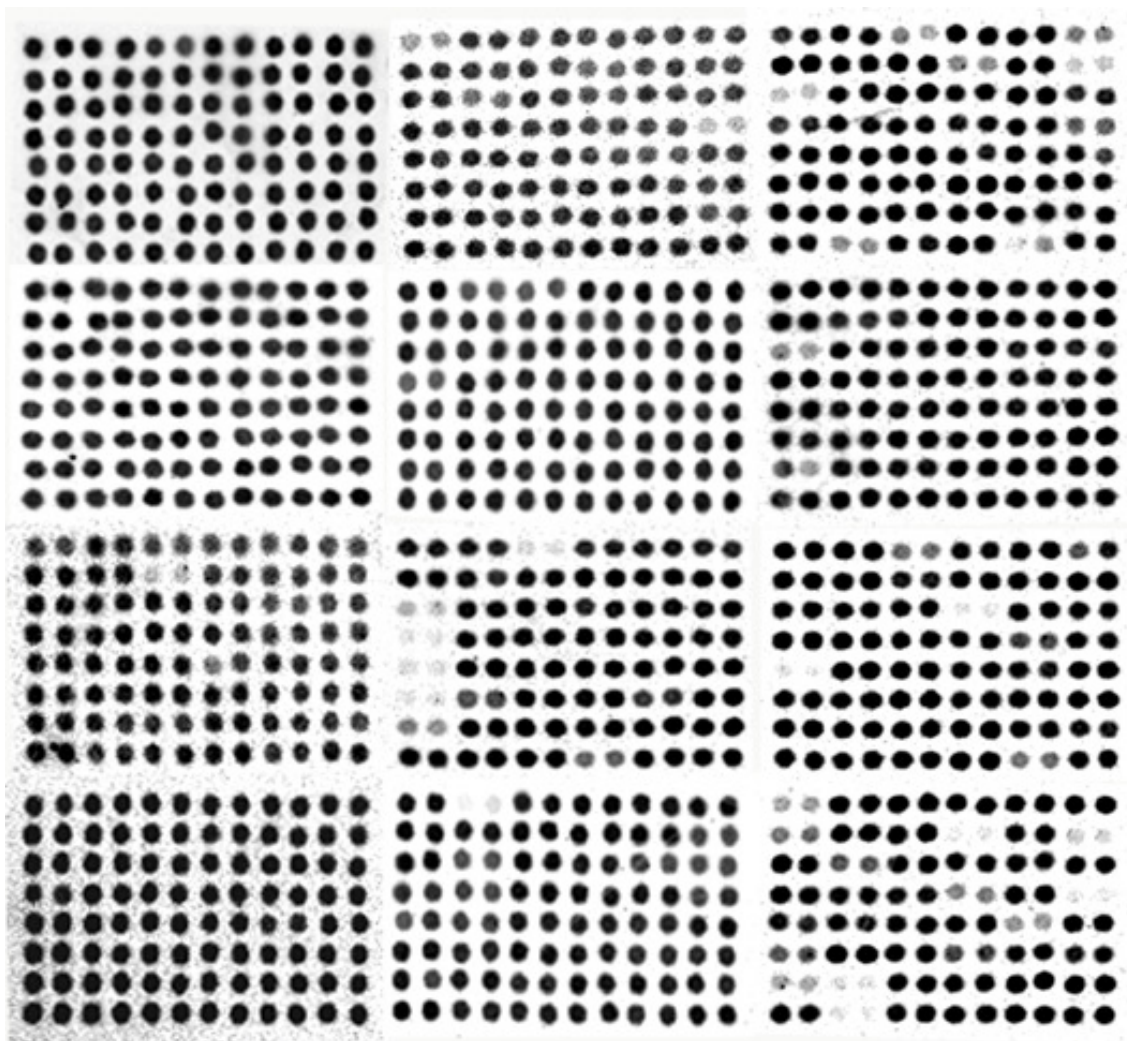
19. ábra GarA (MW 216464 Da) TALON® fém affinitás kromatográfia után: 1. marker; 2. GarA tisztítás előtt; 3. imidazol nélkül; 4. 20 mM imidazol; 5. 40 mM imidazol; 6. 60 mM imidazol; 7. 200 mM imidazol

5.1.1.2 Radiometriás PknB kináz módszer

2006 őszén alkalmam nyílt, hogy a New Medicines for Tuberculosis (NM4TB) FP6 pályázat keretében elsajátítsam a PknB radiometriás kináz tesztelési módszert a párizsi Pasteur Intézetben, Prof. Pedro Alzari laborjában. Az ott eltöltött 6 hét alatt részt vettem a módszer 96-lyukú lemezre történő adaptálásában és elvégeztem a szűkített kináz vegyülettár (EVL) tesztelését (~1 000 molekula).

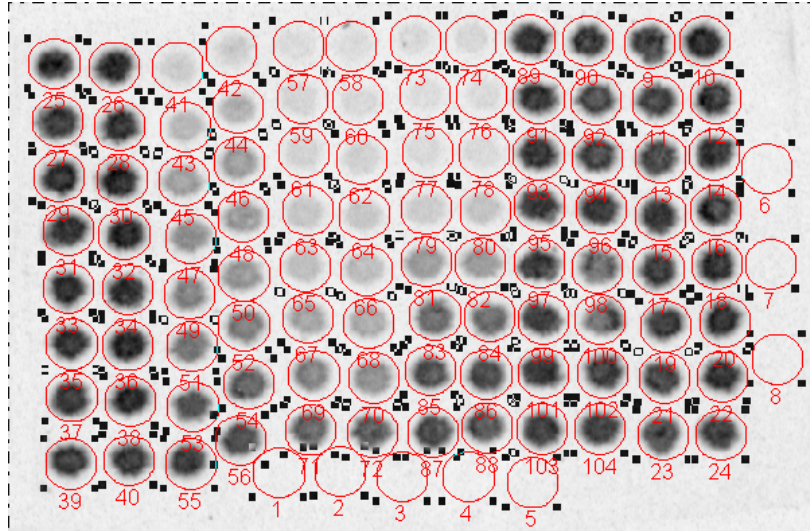
A vegyületeket első körben 50 μM koncentrációban teszteltem le duplikátumban, majd az így gátlást mutató molekulákat (85 inhibitor) 5 μM -ban is leteszteltem és végül 35 vegyületnek az IC_{50} értékét határoztam meg duplikátumban, 8 pontban, harmadoló hígításban.

A száraz P81 papíron lévő foltokat (**20. ábra**) PhosphorImager (Storm, Molecular Dynamics) készülékkel hívtam elő és ImageQuant TL programmal értékeltem ki.



20. ábra Vegyületek tesztelése PknB radiometriás kináz módszerrel

A radiometriás tesztelés során minden egyes 96-lyukú lemezen 16 lyukba 2 % DMSO tartalmú oldatot tettem, mely a 0 % gátlást reprezentálja. A papír háttérét 8 pontban mértem le, majd kivontam a kapott foltok denzitásából.



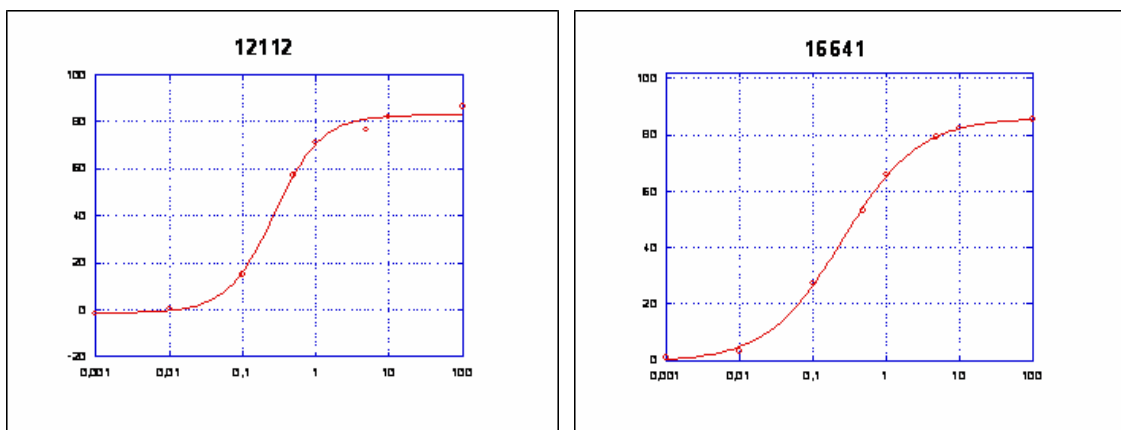
21. ábra IC₅₀ meghatározás radioaktív módszerrel. Foltok denzitásának kiértékelése PhosphorImager készülékkel ImageQuant TL software segítségével

A gátlást mutató vegyületek IC₅₀ értékeit duplikátuban, 8 hígítási pontból (**21. ábra**) KaleidaGraph software segítségével határoztam meg. A görbét jellemző paraméterek a következők voltak: hill<1,5; R²>0,996; görbe illesztés hibája<0,02. Az IC₅₀ meghatározás estén használt görbe egyenlete:

$$y = a + \frac{b - a}{1 + \left(\frac{c}{x}\right)^d}$$

1. egyenlet IC₅₀ görbe egyenlete, y=inhibíciós %, x=vegyület koncentrációja, a=görbe minimuma, b=görbe maximuma, c=IC₅₀ érték, d=görbe meredeksége (hill)

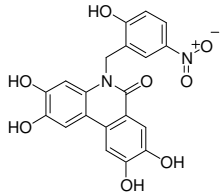
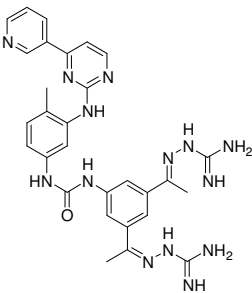
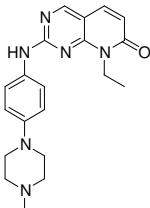
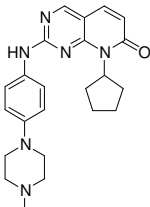
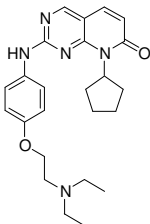
A két leghatékonyabb vegyület IC₅₀ görbéjét a **22. ábra** mutatja.



22. ábra VIC-12112 és VIC-16641 vegyületek IC₅₀ görbéje

A radiometriás tesztelés után kapott hit vegyületek szerkezetét, IC_{50} és MIC értékét a **4. táblázat**ban tüntettem fel.

4. táblázat Radiometriás tesztelés után kapott hit vegyületek szerkezete, IC_{50} és MIC értéke

Vegyület	Szerkezet	IC_{50} (μ M)	MIC (μ M)
VIC-12112		0,274	49
VIC-12147		2,37	>34
VIC-16212		0,82	>55
VIC-16641		0,258	49
VIC-17103		0,584	>47

5.1.1.3 Virtuális tesztelés

5.1.1.3.1 Szerkezet-hatás összefüggés

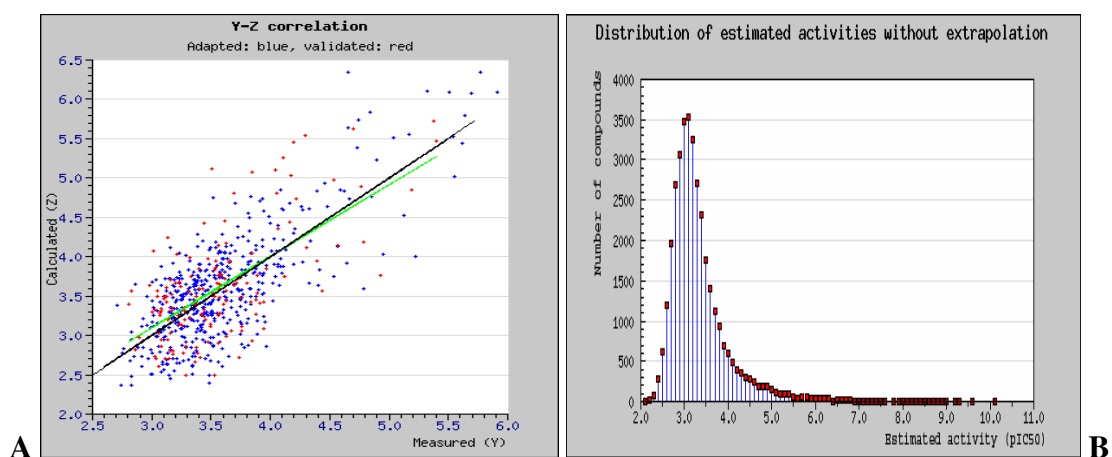
A hatóanyagtervezés egyik fő lépése a szerkezet-hatás vizsgálat, mely történhet a vegyész személyes meglátása szerint, de vannak ezt segítő számítógépes programok is. Mi mindkettőt alkalmaztuk.

A QSAR modell elkészítéséhez 1050 mérési pontból származtatott pIC_{50} érték állt rendelkezésünkre. A mérési pontok a mért inhibíciós % illetve IC_{50} adatokból tevődtek össze. A negatív értékeket a modell elkészítésénél nem vettük figyelembe. A végső adabázis 606 adatpontot tartalmazott. Ennek a 25 %-át külső validáló halmazként használtuk a modell betanításához, míg 75 %-a az adaptív halmazt alkotta.

Az **23. ábra A** része mutatja a mért és a modell által jósolt pIC_{50} értékek közti összefüggést.

A legjobb modell statisztikai paraméterei 26 molekulaleíró tartalmaztak, miközben a modellezés 3 355 molekulaleíróval indult. A végső modell saját (cégen belüli) fejlesztésű software-rel került kiválasztásra [90,91]. A Q^2 (keresztvalidációs korrelációs együttható) = 0,6546 érték alátámasztja, hogy a modell megbízható és virtuális tesztelésnél alkalmazható.

A legjobb modellel leteszteltük a virtuális vegyülettárat (~70 000 molekula) új, szabadalmaztatható szerkezetkeresés végett. A megjósolt aktivitások eloszlását a **23. ábra B** része mutatja.



23. ábra A) Összefüggés a mért és a QSAR modell által jósolt pIC_{50} értékek között. A kék pontok az adaptív halmazt, a piros pontok a külső validáló halmazt jellemzik. **B)** A jósolt aktivitások eloszlása a virtuális vegyülettár (~70 000 vegyület) tesztelése után.

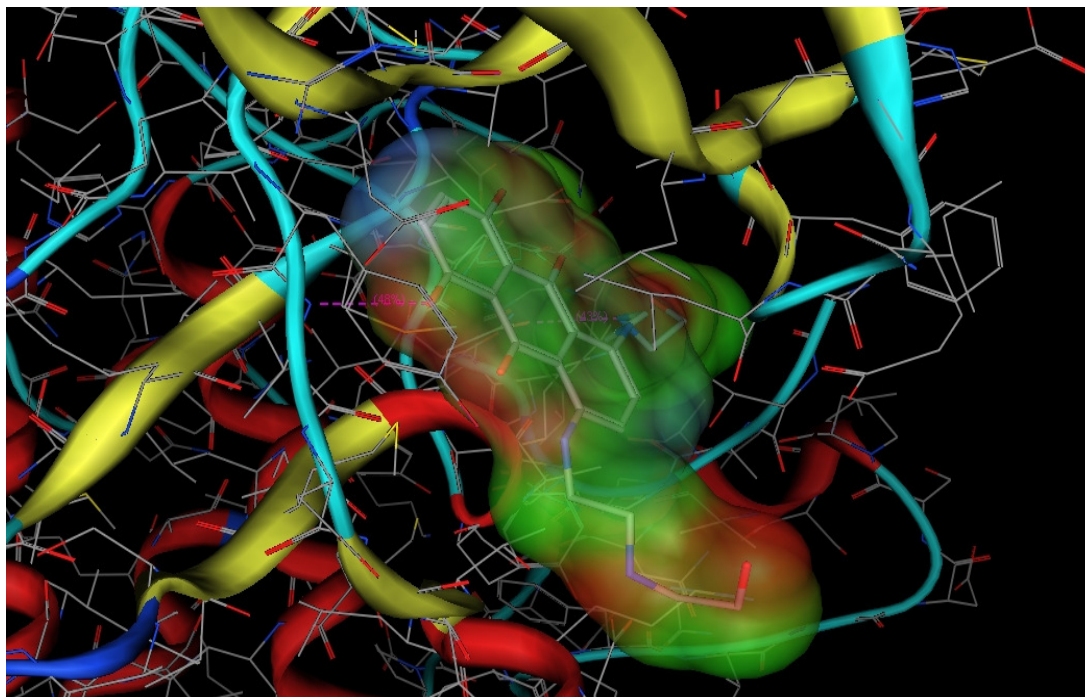
A számítógépes szerkezet-hatás összefüggésre és a vegyészek személyes tapasztalatára alapozva kiválasztásra került néhány új szerkezet, melyeket a vegyészek előállítottak és ezek hatását *in vitro* biokémiai módszerrel igazoltam.

5.1.1.3.2 Dokkolás

A dokkolás alapvetően a módszerek fejezet 4.5.2 pontjában leírtak szerint történt. PknB kináz esetén 3 kristályszerkezetet is találtunk a PDB (Protein Data Bank) adatbázisban, amit dokkoláshoz tudtunk használni (5. táblázat). Ezek közül a PknB-mitoxantron komplex képét a 24. ábra mutatja.

5. táblázat PknB kristályszerkezete különböző ligandokkal [98 ,99 ,100]

PDB ID	Ligand név	Ligand azonosító
1MRU	foszfotiofoszforsav adenil észter	AGS
2FUM	Mitoxantron	MIX
1O6Y	foszfometilfoszfonsav adenil észter	ACP



24. ábra PknB kináz mitoxantronnal komplexben

A dokkolás alapján a legjobbnak talált 271 vegyületet leteszteltem biokémiai módszerrel, melyek közül néhánynak meghatároztam az IC_{50} értékét is.

5.1.1.4 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

Ugyan a radiometriás módszerek érzékenységét nehéz felülmúlni, hátrányuk az, hogy elvégzésükhöz speciális engedéllyel rendelkező labor szükséges; a radiometriás mérés időigényes és körülményes, mivel jelentős előkészületet igényel (radioaktív izotóppal jelzett szubsztrát beszerzése, tárolása, felezési idő figyelembevétele, stb.). Munkám során nyilvánvalóvá vált, hogy ez a módszer nem alkalmazható MTS/HTS tesztelésre, ezért célul tűztem ki más, nem-radioaktív módszer felkutatását és beállítását.

A MTS/HTS tesztelésre alkalmas módszer beállításakor néhány alapvető statisztikai jellemzővel karakterizálhatjuk a tesztrendszert.

A tesztrendszerek statisztikai jellemzői és követelmények:

1. ΔS : jelkülönbség: a minimum kontroll/háttér átlagos polarizációs értéke (nincs kináz), és a maximum kontroll átlagos polarizációs értéke (nincs inhibitor) közötti különbség. Az optimalizálás során a jelkülönbséget 100 mP körüli értékre szoktuk beállítani.
2. S/B: jel/háttér: az átlagos maximum jelszint és átlagos minimum jelszint/háttér aránya. Problémája, hogy nem tartalmaz információt a szórásról. (Minél nagyobb, annál jobb.)
3. S/N: jel/zaj: megadja, hogy a jel mennyire tér el a háttértől (**2. egyenlet**). Optimális esetben ez az érték nagyobb, mint 5.

$$S / N = \frac{\overline{\max_{jel}} - \overline{\min_{jel}}}{SD_{\min_{jel}}}$$

2. egyenlet $\overline{\max_{jel}}$ = elméleti maximális jelszint (nincs inhibitor) átlagos értéke,

$\overline{\min_{jel}}$ = elméleti minimális jelszint/háttér (nincs kináz) átlagos értéke, $SD_{\min_{jel}}$ =

elméleti minimális jelszint/háttér szórása

4. Z' : Zhang és munkatársai által bevezetett HTS tesztelések statisztikai mérőszáma, melynek ideális esetben nagyobbak kell lennie, mint 0,5 [101] (**3. egyenlet**).

$$Z' = 1 - \frac{3SD_{\max_{jel}} + 3SD_{\min_{jel}}}{|\max_{jel} - \min_{jel}|}$$

3. egyenlet $\overline{\max_{jel}}$ = elméleti maximális jelszint (nincs inhibitor) átlagos értéke, $\overline{\min_{jel}}$ = elméleti minimális jelszint/háttér (nincs kináz) átlagos értéke, $SD_{\max_{jel}}$ = elméleti maximális jelszint/háttér szórása, $SD_{\min_{jel}}$ = elméleti minimális jelszint/háttér szórása

A doktori munkám során beállított módszerek minden esetben megfeleltek a fent említett statisztikai követelményeknek, ezért ezeket az értékeket külön nem tüntetem fel a továbbiakban.

5.1.1.4.1 IMAP technológia beállítása

A IMAP technológia előnye, hogy nem-radioaktív, illetve nem igényel antitestet, valamint általánosan alkalmazható, robusztus, jól reprodukálható, homogén FP módszer, mely könnyen robotizálható és miniatürizálható.

Az módszer beállításához alapvetően szükséges hogy a szubsztrát 5-karboxifluoreszcein jelzéssel ellátott peptid legyen.

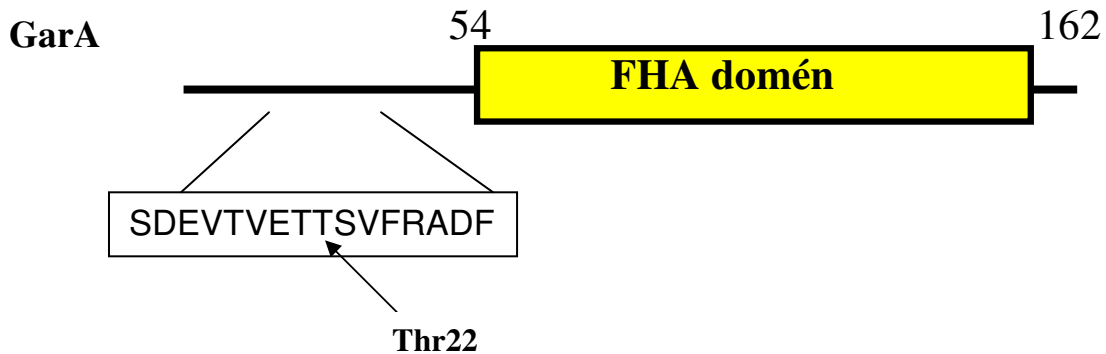
A munkám elején elsősorban a PknB és PknG célfehérjékre összpontosítottam, mert ezekkel kapcsolatban több kutatás bizonyította, hogy fontosak a baktérium növekedése szempontjából.

Az IMAP technológia beállításánál számos paramétert figyelembe kell venni.

A beállítás lépései:

- 1- A kiindulópont és a szubsztrát optimalizálása
- 2- Az IMAP paraméterek optimalizálása
- 3- Kináz puffer optimalizálása
- 4- K_{mapp} meghatározása
- 5- Inkubációs idő és kinázkoncentráció optimalizálása
- 6- Referencia anyagok IC_{50} -ének meghatározása

2005-ben Villarino és társai azonosították a PknB kináz fiziológias szubsztrátját, a GarA fehérjét, valamint kimutatták, hogy a foszforiláció a Thr22-n jön létre [47]. Mivel az IMAP technológiánál peptid szubsztrátra van szükség úgy gondoltuk, hogy a fehérje foszforilációs helyét tartalmazó szekvenciát kellene szubsztrátként alkalmazni.



25. ábra GarA foszforilációs helye PknB által

Ezeket a szubsztrátokat állítottuk elő:

1. 5FAM-SDEVTVETTSVFRADFL-NH₂
2. 5(6)FAM-SDEVTVETTSVFRADFL-NH₂

Egy 2008-ban közölt cikk arról számol be, hogy peptid vegyülettár tesztelés során meghatározták, hogy mik a kedvelt szubsztrát motívumok PknB esetén. Az egyik itt közölt peptidszekvenciát MAREFGTQMFFRAGKKK [102] karboxifluoreszceninnel többféleképpen jelzett formában szintetizáltattuk meg.

1. 5FAM-MAREFGTQMFFRAGKKK-NH₂
2. 5(6)FAM-MAREFGTQMFFRAGKKK-NH₂
3. MAREFGTQMFFRAGKKK-5(6)FAM-OH

Az összes fentebb felsorolt peptid szubsztrátot kipróbáltam az IMAP módszerben, de egyik peptid esetén sem kaptam elegendő jelet.

Mivel az IMAP módszer esetében nem jártam sikerrel másik megoldás után néztem.

Örömmel fedeztem fel, hogy a BellBrook Labs olyan módszerrel állt elő, mely alkalmas MTS/HTS kináz tesztrendszerek beállítására és nincs szükség speciális szubsztrátra.

5.1.1.4.2 PknB Transcreener[®] ADP² FP technológia

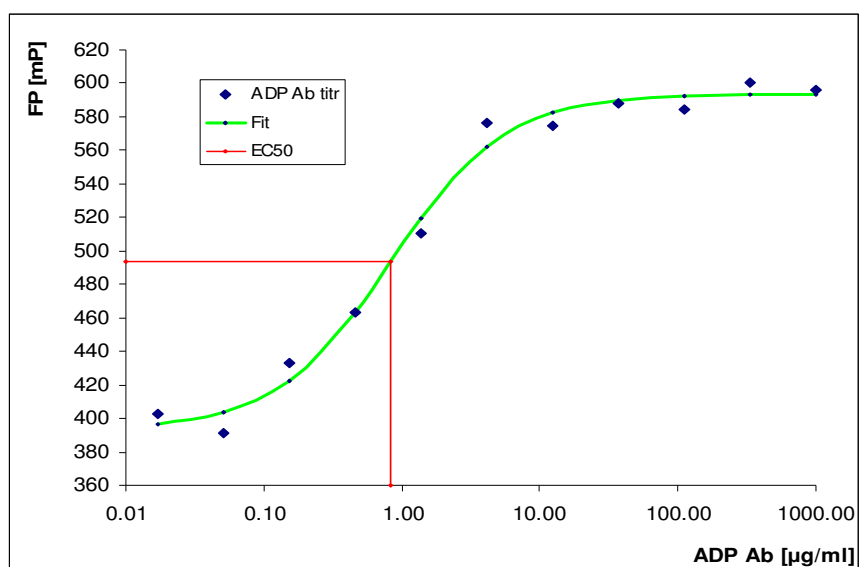
5.1.1.4.2.1 Optimalizálás

A Transcreener technológia előnye, hogy a módszerben alkalmazott szubsztrát bármilyen fehérje lehet csak az a lényeges, hogy az enzim-szubsztrát reakció során ADP keletkezzen, amit lehet detektálni.

Ezt a könnyebbséget kihasználva a PknB mérés beállításánál a kináz saját fiziológiás szubsztrátját, a GarA fehérjét használtam.

A módszer beállításánál nem kellett teljesen az elejéről kezdenem, hiszen a korábban alkalmazott radiometriás módszernél már beállított pufferkörülményt nem kellett újból kikísérletezni. A mérés során alkalmazott puffer összetétele: 50 mM HEPES pH=7,0; 1 mM DTT; 0,5 mM MnCl₂; 0,01 % Brij35 és 5 % glicerin. Az ATP koncentrációja 2,25 μM, mely megfelel a szakirodalomban közölt K_m értéknek [103].

A Transcreener technológia esetén a módszerben használatos antitest titrálására van szükség, mivel az ATP nagy feleslegben van jelen az ADP-hez képest és az antitest véges szelektivitást mutat az ADP iránt. A kiválasztott ADP antitest koncentráció meghatározza a „mérési ablakot” (assay window) és az ADP kimutatási határt. A szükséges antitest koncentráció függ az enzimreakcióban alkalmazott ATP koncentrációtól. Az antitest titrálást (**26. ábra**) az adott enzim működéséhez szükséges optimális puffer rendszerben kell végrehajtani.



26. ábra ADP² antitest titrálás a PknB Transcreener[®] ADP² FP módszer beállítása során

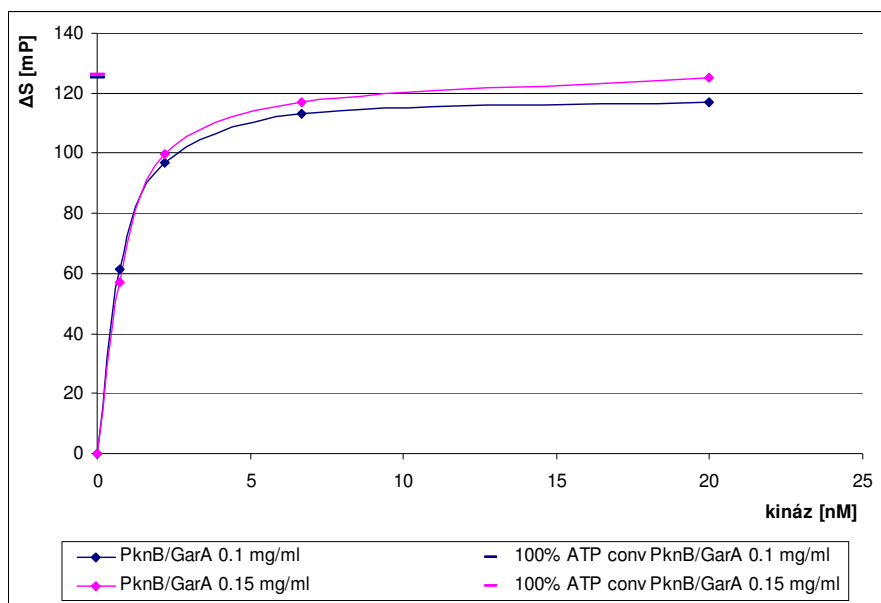
Az antitestet 1 000 μ g/ml koncentrációtól induló harmadoló hígításban titráltam meg. Az ajánlott antitest koncentráció az EC_{85} érték, mivel ez egy jó kompromisszumot jelent az érzékenység és a maximális jel között.

$$EC_{85} = \left(\frac{85}{100 - 85} \right)^{\frac{1}{hill}} \times EC_{50}$$

4. egyenlet Az EC_{85} érték kiszámítása

A kiválasztott ADP antitest koncentrációja 4,5 μ g/ml.

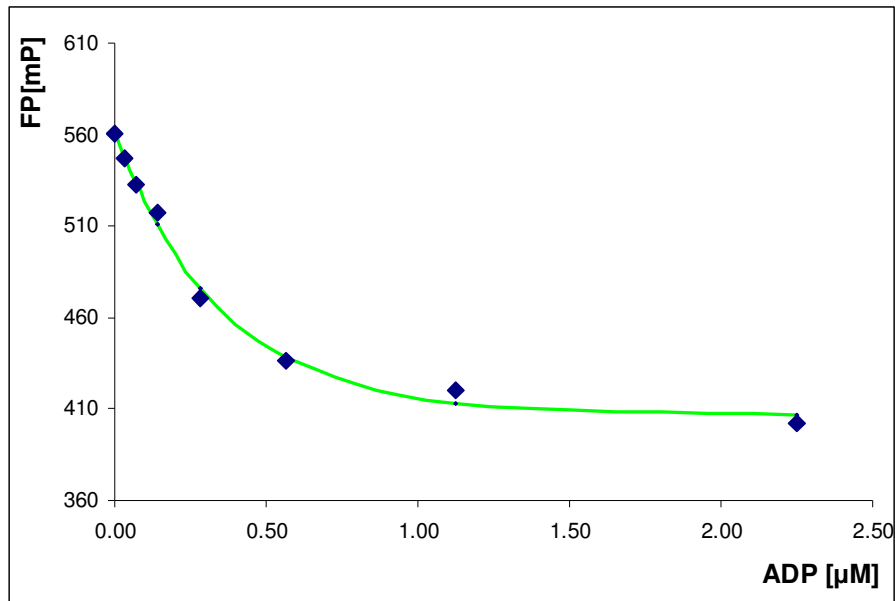
Az antitest koncentráció meghatározása után elvégeztem a kináz titrálást két különböző (0,1 és 0,15 mg/ml) GarA szubsztrát koncentrációnál 20 nM PknB kinázból indulva, harmadoló hígítással (**27. ábra**).



27. ábra PknB kináz titrálás két különböző szubsztrát koncentrációnál

A PknB mérés optimalizálása során úgy találtam, hogy 0,1 mg/ml GarA és 1 nM PknB koncentrációnál megfelelően detektálható jelet kapok, így a további tesztek során ezeket a koncentrációkat használtam. A GarA-PknB reakció idő 30 perc, míg a deketáló oldat inkubációs ideje 60 perc volt.

A megfelelő paraméterek kiválasztása után ellenőriztem, hogy a későbbiekben %-os inhibíció (Inh%) kiszámításához használt ATP/ADP kalibrációs görbe lefutása megfelelő meredekségű-e.



28. ábra ATP/ADP kalibrációs görbe PknB Transcreener[®] ADP² FP módszernél

A **28. ábra** mutatja, hogy a kalibrációs görbe maximum (0 % ATP konverzió) és minimum (100 % ATP konverzió) pontja között több mint 100 mP egység a különbség, ami a beállítás követelményeinek megfelel.

5.1.1.4.2.2 Tesztelés

A szerkezet-hatás összefüggés felállítása után és a dokkolási eredményekre alapozva ~300 vegyületet teszteltem le PknB Transcreener[®] ADP² FP módszerrel. A **6. táblázatban** megtalálható az újabb hit vegyületek szerkezete, IC₅₀ és MIC értéke.

A vegyületeket először duplikátumban 10 μM-ban teszteltem és az itt 75 %-nál nagyobb gátlást mutató molekulák IC₅₀ értékét duplikátumban 8 pontos hígításban határoztam meg.

A PknB Transcreener[®] ADP² FP módszert a radiometriás tesztelésben gátlást mutató vegyületek IC₅₀ értékének meghatározásával validáltam.

6. táblázat PknB Transcreener[®] ADP² FP tesztelés után kapott hit vegyületek szerkezete, IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	Szerkezet	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)
VIC-12150		0,6211	>100
VIC-16135		4,98	>100
VIC-16640		0,99	>100
VIC-16719		0,27	>100
VIC-17494		0,129	>100
VIC-17499		0,688	>100

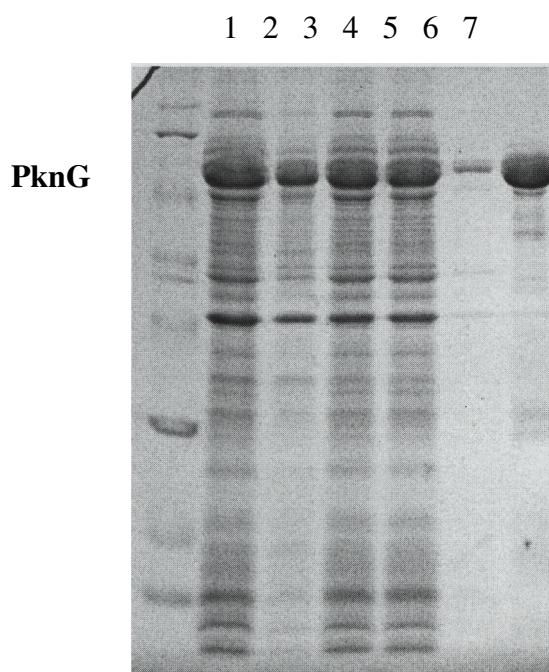
A táblázatból jól látható, hogy habár a PknB kináz tesztelés során sikerült hatékony vegyületeket találni, ezek mégsem hatnak a tuberkulózis baktériumon.

Mind a radiometriás, mind a dokkoláson alapuló Transcreener mérés esetén piridopirimidinon alapvázú vegyületeket találtam hatékony PknB inhibitoroknak.

5.1.2 PknG kinázon ható inhibitor keresés

5.1.2.1 Fehérje expresszió, tisztítás

A PknG fehérjét a 4.2.3 fejezetben leírtak alapján állítottam elő. A fehérje eluátum tisztaságát Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel, 12 %-os gélen ellenőriztem. A 29. ábra PknG fehérje tisztítása során készült frakciók fehérjeösszetételét mutatja.



29. ábra PknG (MW 85973 Da): 1. marker; 2. totál; 3. pellet; 4. felülúszó; 5. átengedett; 6 mosás; 7. eluátum

A PknG Transcreener[®] ADP² FP tesztelés során a PknG kináz szubsztrátjaként a GarA fehérjét használtam, melynek előállítását 4.2.2 fejezetben leírtak alapján történt.

5.1.2.2 Virtuális tesztelés

5.1.2.2.1 Dokkolás

Potenciális inhibitor keresés céljából PknG kináz esetén is elvégeztük a dokkolást a 4.5.2 fejezetben leírtak szerint, de ebben az esetben csak egy kristályszerkezet áll rendelkezésünkre PDB adatbázisban.

7. táblázat PknG kináz kristályszerkezete az AX20017 inhibitorral komplexben [104]

PDB ID	Ligand név	Ligand azonosító
2PZI	AX20017	AXX

A Vichem, Tripos és WDI adatbázisban szereplő 19 033 vegyület dokkolása után 521 lehetséges PknG kinázgátlót választottunk ki további biokémiai tesztelésre.

5.1.2.3 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

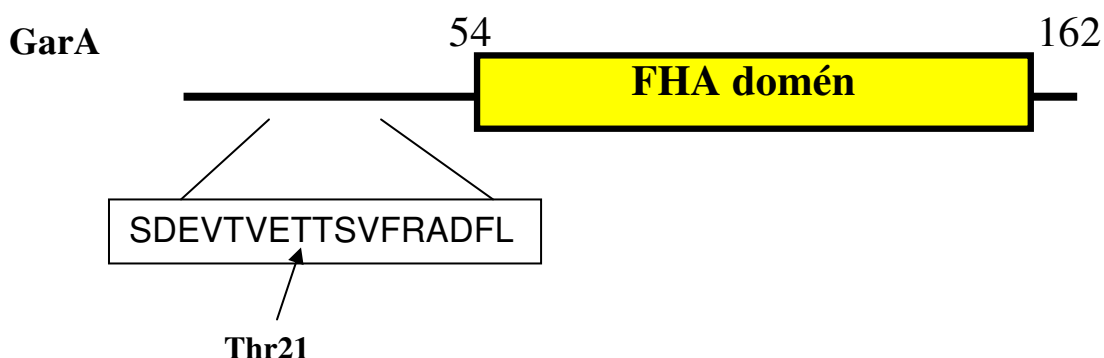
5.1.2.3.1 IMAP technológia beállítása

Szintetizált peptid szubsztrátok:

Az első 3 peptid a PknG autofoszforilációs szekvenciájának egy része, melyet személyes közlemény [105] alapján állítottunk elő. A PknG kináz autofoszforilációs szekvenciáját azóta publikálták is [106].

1. 5FAM-STQAVFRPDFGDE-NH₂
2. 5FAM-RPLSTQAVFRPDFGDE-NH₂
3. 5FAM-ATVRPLSTQAVFRPDFGDE-NH₂

Egy közlemény szerint a *C. glutamicum* PknG az OdhI szubsztát Thr14-es aminosavát foszforilálja, ami a GarA Thr21-es aminosavának felel meg [107].



30. ábra GarA foszforilációs helye PknG által

Mivel az autofoszforilációs szekvencia alapján szintetizált peptidok nem bizonyultak megfelelő szubsztrátnak, így előállítottuk a GarA fehérje foszforilációs pontját tartalmazó következő két peptidet is:

1. 5FAM-SDEVTVETTSVFRADFL-NH₂
2. 5(6)FAM-SDEVTVETTSVFRADFL-NH₂

Sajnos ezen peptidok esetében sem tudtam elegendő jelet detektálni, így a PknG esetén is a Transcreener[®] ADP² FP módszert állítottam be és alkalmaztam a tesztelés során.

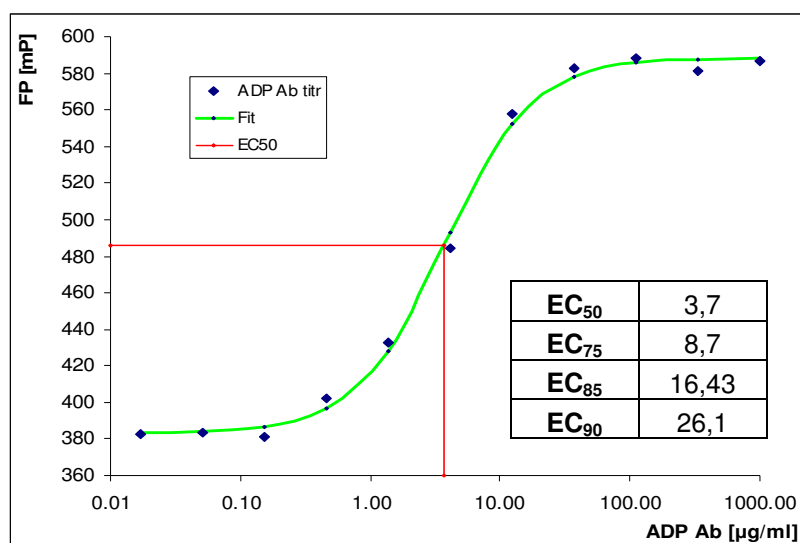
5.1.2.3.2 PknG Transcreener[®] ADP² FP technológia

5.1.2.3.2.1 Optimalizálás

A PknG Transcreener technológia beállításánál a már korábban, együttműködő partnerek által beállított radiometriás módszernél használt puffer kondíció nyújtott alapot [108].

Szubsztrátnak szintén a GarA fehérjét használtam, míg az ATP koncentráció a K_m (10 μ M) volt.

Az antitest titrálást ebben az esetben is el kellett végezni a megváltozott pufferkörülmény és ATP koncentráció miatt.

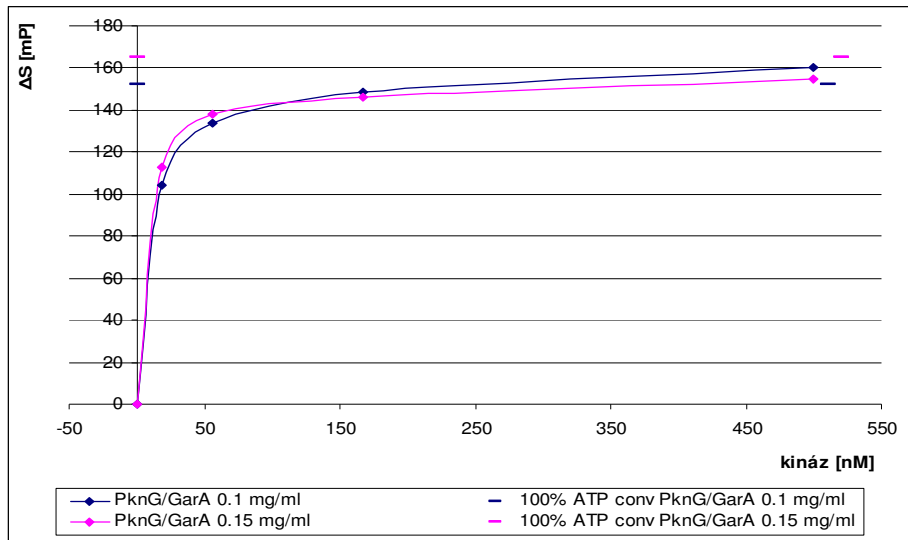


31. ábra ADP² antitest titrálás a PknG Transcreener[®] ADP² FP módszernél

Az antiest titrálása során 20 mM MOPS pH=7,5; 1 mM DTT; 10 mM MnCl₂; 0,01 % Brij35; 5 % glicerin összetételű puffer oldatot használtam.

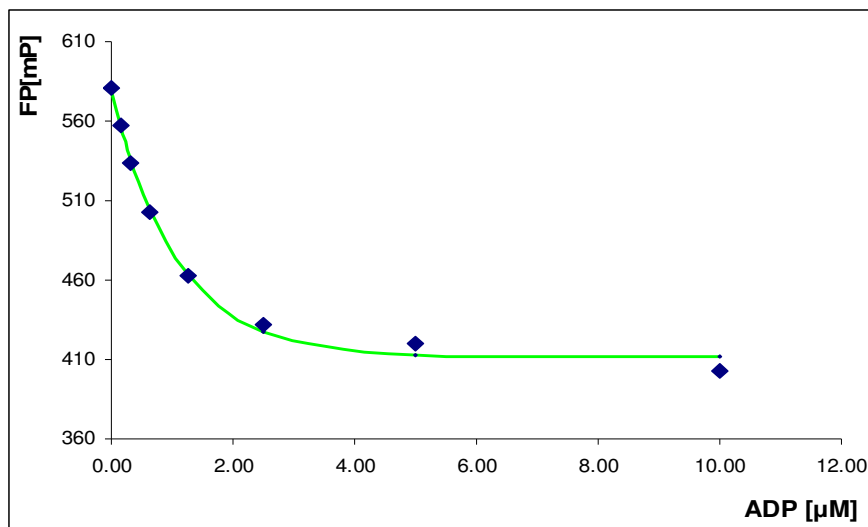
Az optimálisnak vélt ADP² antitest koncentráció 16,43 µg/ml.

A PknG kináz titrálását két különböző GarA koncentrációnál (0,1 és 0,15 mg/ml) harmadoló hígításban, 500 nM kináztól indulva végeztem el.



32. ábra PknG kináz titrálás két különböző szubsztrát koncentrációnál

A 32. ábra két görbét összevetve látható, hogy a két szubsztrát koncentrációhoz tartozó görbe lefutása között nincs nagy eltérés, ezért az alacsonyabb szubsztrát koncentrációt (0,1 mg/ml) választottam. Az általam kiválasztott 15 nM PknG még a görbe lineáris tartományába esik és elegendően magas jelet produkál. Az enzim reakciót 60 percig futtatam, míg a detektáló oldattal 60 percig inkubáltam a rendszert.



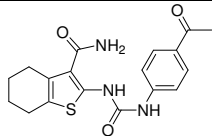
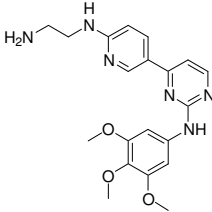
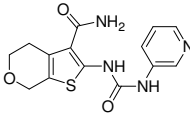
33. ábra ATP/ADP kalibrációs görbe PknG Transcreener[®] ADP² FP módszer esetén

Az módszert ellenőrző ATP/ADP kalibrációs görbe lefutásánál több mint 100 mP egység a jelkülönbség, ami megfelel a követelményeknek (**33. ábra**).

5.1.2.3.2.2 Tesztelés

A dokkolás alapján hatékonyak vélt vegyületeket PknG Transcreener[®] ADP² FP módszerrel letesztelve 12 molekula rendelkezett 1 µM-nál alacsonyabb IC₅₀ értékkel (**8. táblázat**), de ezek közül egyik sem gátolta jelentősen a *M. tuberculosis* növekedését.

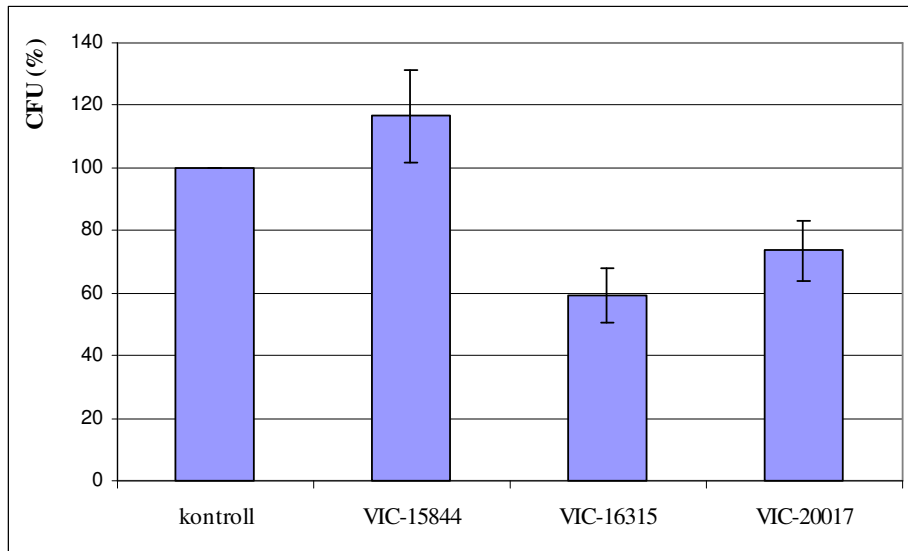
8. táblázat Dokkolásból származó PknG gátlók szerkezete, IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	Szerkezet	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)
VIC-15473		0,42	>100
VIC-15662		0,06	>100
VIC-15844		0,69	>100

VIC-15870		0,24	>100
VIC-16027		0,07	>100
VIC-16048		0,23	>100
VIC-16077		0,1	>100
VIC-16092		0,47	>100
VIC-16113		0,02	>100
VIC-16204		0,56	>100
VIC-16284		0,26	>100
VIC-16315		0,01	>100
VIC-20017		0,3	>100

Mivel a *M. tuberculosis* PknG célfehérjének szerepet tulajdonítanak a fagoszómalizoszóma fúzió gátlásában, ezért néhány vegyület hatását megvizsgáltuk fertőzött makrofágon is. A **34. ábra** oszlopdiagramján látható, hogy a vizsgált 3 inhibitor közül a VIC-16315 gátolta legjobban a telepszám képződést (~60 % CFU), míg a dokkoláshoz használt VIC-20017 (AX20017) vegyület csak 26 %-os gátlást mutatott.

A VIC-15844 pedig statisztikai hibahatáron belül, de inkább elősegítette a telepkeződést (116 % CFU).

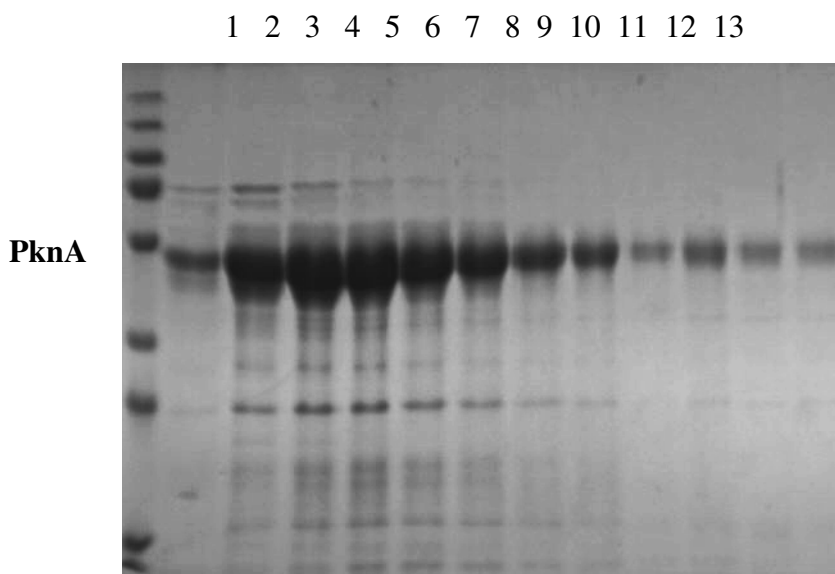


34. ábra Fertőzött makrofág vizsgálat PknG inhibitorok esetében

5.1.3 PknA kinázon ható inhibitor keresés

5.1.3.1 Fehérje expresszió és tisztítás

A PknA fehérjét a 4.2.4 fejezetben leírtak alapján állítottam elő. A fehérje eluátum tisztaságát Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem 12 %-os gélen. A 35. ábra PknA fehérje tisztítása során készült frakciók fehérjeösszetételét mutatja különböző imidazol koncentrációnál.



35. ábra PknA (MW 40065 Da) Ni-NTA affinitás kromatográfia után: 1. marker; 2-3. PknA 80 mM imidazol; 4-5. 100 mM imidazol; 6-9. 120 mM imidazol; 10-11. 160 mM imidazol; 12-13. 200 mM imidazol

A PknA Transcreener® ADP² FP mérésnél a GarA fehérjét használtam szubsztrátként, melyet a 4.2.2 pontban leírtak alapján tisztítottam meg.

5.1.3.2 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

5.1.3.2.1 PknA Transcreener® ADP² FP technológia

5.1.3.2.1.1 Optimalizálás

Sokáig nehezen lehetett a PknA kinázt oldható formában kinyerni, ezért időben csak később került sor a módszer beállítására, és mivel korábbi pufferkörülmények nem álltak rendelkezésre, ezért a teljes optimalizálási folyamatot el kellett végezni.

Az optimalizáló lépések célja, hogy megtaláljuk az adott kinázhoz az optimális puffert, amellyel a legnagyobb ΔS értéket érhetjük el. Vizsgáljuk a Mg^{2+}/Mn^{2+} ionok arányát, az ionerősséget (NaCl), a Ca^{2+} ionok, detergensok (Tween 20, Brij35, NP-40, Triton X-100) és a pH hatását különböző puffer rendszerekben (HEPES, Tris, MOPS, MES). Ezeket a körülményeket 384-es lemezen vizsgáltam a **9. táblázatban (A, B)** megadott körülmények szerint. A lemezen a páratlan számú oszlopok 2 500 nM, a párosak 0 nM PknA kinázt tartalmaztak. A Mg^{2+} koncentrációt két oszloponként (1-8), míg a Mn^{2+} koncentrációt két soronként (A-J) növeltem. Vizsgáltam a NaCl valamint a $CaCl_2$

hatását 4-4 különböző koncentrációban; Tween 20, Brij35, NP-40, Triton X-100 detergenset 0,01 %-ban illetve a pufferkörülmenyt 100 mM koncentrációban.

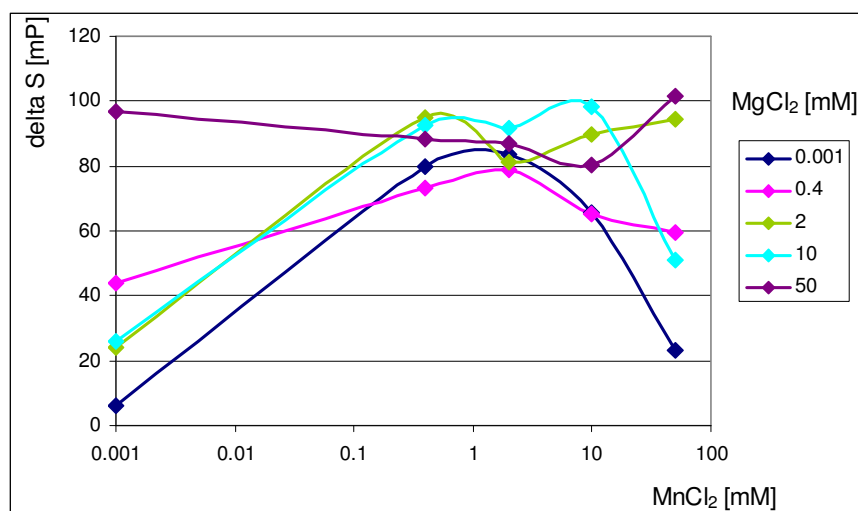
9. táblázat A mérési körülmény beállításának 384-es reakciólemez térképe

A

	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
A	0 Mg/ 0 Mn	0,4 Mg/ 0 Mn	2 Mg/ 0 Mn	10 Mg/ 0 Mn	50 Mg/ 0 Mn	0 mM NaCl
B	0 Mg/ 0 Mn	0,4 Mg/ 0 Mn	2 Mg/ 0 Mn	10 Mg/ 0 Mn	50 Mg/ 0 Mn	0 mM NaCl
C	0 Mg/ 0,4 Mn	0,4 Mg/ 0,4 Mn	2 Mg/ 0,4 Mn	10 Mg/ 0,4 Mn	50 Mg/ 0,4 Mn	20 mM NaCl
D	0 Mg/ 0,4 Mn	0,4 Mg/ 0,4 Mn	2 Mg/ 0,4 Mn	10 Mg/ 0,4 Mn	50 Mg/ 0,4 Mn	20 mM NaCl
E	0 Mg/ 2 Mn	0,4 Mg/ 2 Mn	2 Mg/ 2 Mn	10 Mg/ 2 Mn	50 Mg/ 2 Mn	100 mM NaCl
F	0 Mg/ 2 Mn	0,4 Mg/ 2 Mn	2 Mg/ 2 Mn	10 Mg/ 2 Mn	50 Mg/ 2 Mn	100 mM NaCl
G	0 Mg/ 10 Mn	0,4 Mg/ 10 Mn	2 Mg/ 10 Mn	10 Mg/ 10 Mn	50 Mg/ 10 Mn	500 mM NaCl
H	0 Mg/ 10 Mn	0,4 Mg/ 10 Mn	2 Mg/ 10 Mn	10 Mg/ 10 Mn	50 Mg/ 10 Mn	500 mM NaCl
I	0 Mg/ 50 Mn	0,4 Mg/ 50 Mn	2 Mg/ 50 Mn	10 Mg/ 50 Mn	50 Mg/ 50 Mn	X
J	0 Mg/ 50 Mn	0,4 Mg/ 50 Mn	2 Mg/ 50 Mn	10 Mg/ 50 Mn	50 Mg/ 50 Mn	X
K	x	x	x	x	x	X
L	x	x	x	x	x	X
M	x	x	x	x	x	X
N	x	x	x	x	x	X
O	x	x	x	x	x	X
P	x	x	x	x	x	X

B

	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22	23-24
A	0,2 mM CaCl ₂	0,01% Brij35	MES 5,5	MES 6,0	MES 6,5	MES 7,0
B	0,2 mM CaCl ₂	0,01% Brij35	MES 5,5	MES 6,0	MES 6,5	MES 7,0
C	1 mM CaCl ₂	0,01% Tween20	MOPS 6,5	MOPS 7,0	MOPS 7,5	MOPS 8,0
D	1 mM CaCl ₂	0,01% Tween20	MOPS 6,5	MOPS 7,0	MOPS 7,5	MOPS 8,0
E	5 mM CaCl ₂	0,01% Triton100	HEPES 7,0	HEPES 7,5	HEPES 8,0	HEPES 8,5
F	5 mM CaCl ₂	0,01% Triton100	HEPES 7,0	HEPES 7,5	HEPES 8,0	HEPES 8,5
G	25 mM CaCl ₂	0,01% NP40	Tris 7,0	Tris 7,5	Tris 8,0	Tris 8,5
H	25 mM CaCl ₂	0,01% NP40	Tris 7,0	Tris 7,5	Tris 8,0	Tris 8,5
I	x	x	x	x	x	x
J	x	x	x	x	x	x
K	x	x	x	x	x	x
L	x	x	x	x	x	x
M	x	x	x	x	x	x
N	x	x	x	x	x	x
O	x	x	x	x	x	x
P	x	x	x	x	x	x



36. ábra MgCl₂, MnCl₂ koncentráció beállítása PknA kináz esetén

A **36. ábra** a Mg²⁺ és Mn²⁺ koncentráció kináz aktivitásra gyakorolt hatását mutatja be. Látható, hogy az 50 mM Mg²⁺ és 50 mM Mn²⁺ esetében detektált jel közel azonos a 10 mM Mg²⁺ és 10 mM Mn²⁺ koncentrációnál mért értékkel, ezért az alacsonyabb koncentrációkat választottam ki a továbbiakban.

A reakció során viszont felmerült a gyanu, hogy bizonyos Mg²⁺/Mn²⁺ összetételnél a PknA fehérje kicsapódik az oldatból és ezért az optimális arányoknál megvizsgáltam mikroszkóppal az oldatot 96-lyukú lemezen.

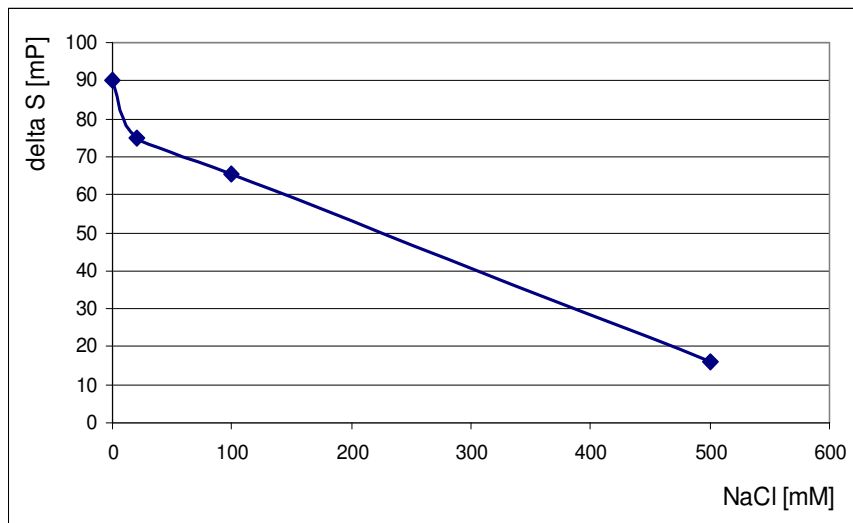
A tesztelés során 20 mM HEPES pH=7,5; 1 mM DTT; 0,01 % Brij35 és 5 % glicerin összetételű oldatot használtam. A MnCl₂ és MgCl₂ koncentrációkat, illetve a PknA koncentrációt a **10. táblázat**ban megadott értékekre állítottam be.

10. táblázat Fehérje kicsapódási vizsgálat mikroszkóppal, különböző Mg²⁺/Mn²⁺ aránynál. „nem” jelöli, ha nem történt kicsapódás, „igen” jelzi, ha a fehérje kicsapódott.

PknA (nM) Mn/Mg (mM)	1000	2500	3500	5000
0,8/10	nem	nem	nem	nem
0,8/2	nem	nem	nem	nem
3/2	nem	nem	nem	igen
10/10	igen	igen	igen	igen

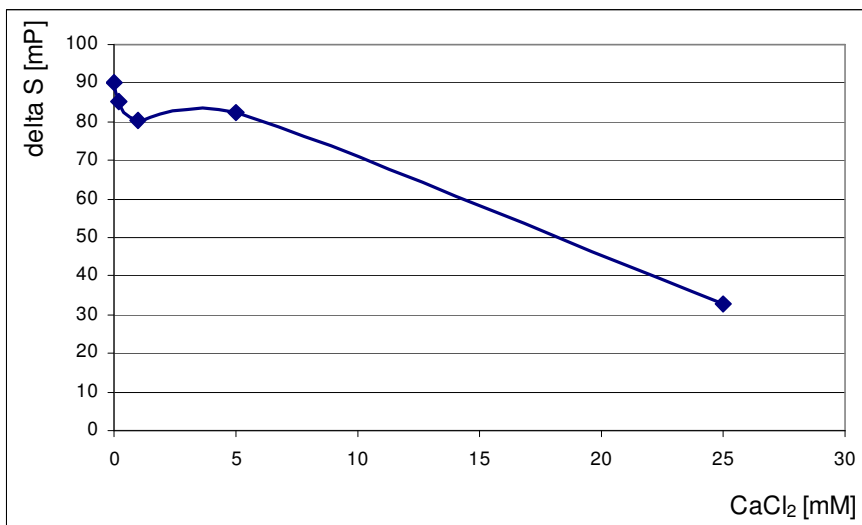
A kicsapódási vizsgálat azt mutatta, hogy az optimálisnak tűnő 10 mM MgCl_2 , 10 mM MnCl_2 összetételnél a kináz még alacsony koncentrációban is kicsapódott, ezért a továbbiakban 0,8 mM MnCl_2 -t és 10 mM MgCl_2 -t használtam (**36. ábra**), mivel ennél az összetételnél elhanyagolhatóan alacsonyabb FP jelet detektáltam.

A **37. ábra** a NaCl koncentráció tesztelésének eredményét mutatja. Jól látható, hogy a növekvő NaCl koncentráció csak rontja a detektálható jel nagyságát, ezért a továbbiakban nem alkalmaztam NaCl-ot.



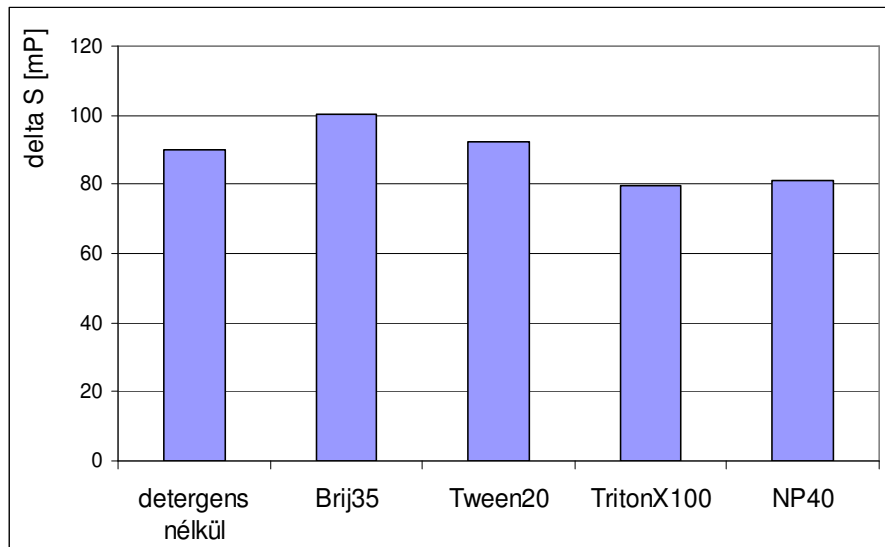
37. ábra NaCl koncentráció tesztelése PknA kináz esetén

A **38. ábra** azt mutatja, hogy a CaCl_2 koncentráció növelésével csökken a detektálható jel erőssége, ezért CaCl_2 -ot sem alkalmaztam a PknA kináz tesztrendszerben.



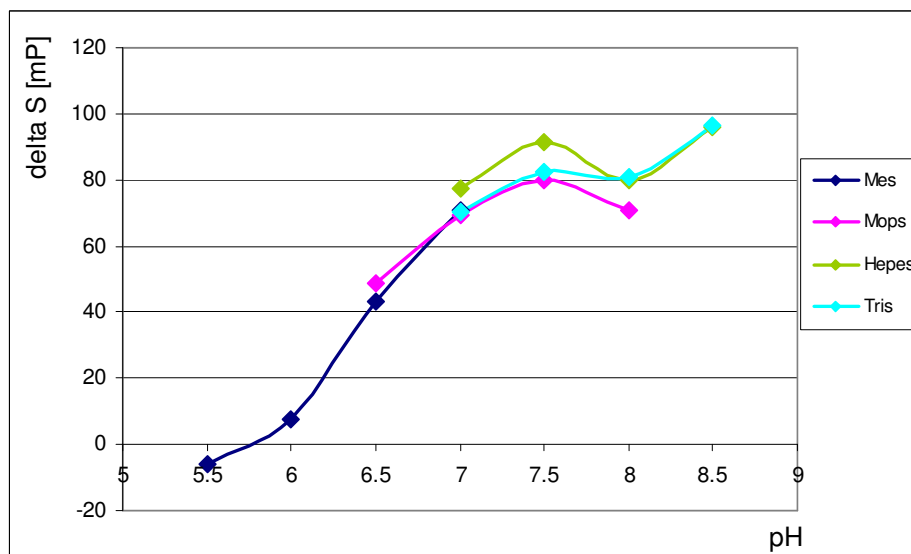
38. ábra CaCl_2 koncentráció tesztelése PknA kináz esetén

A detergensok közül a Brij35 esetén a bizonyított legaktívabbnak a kináz, ezért a továbbiakban 0,01 % Brij35-öt használtam a PknA kináz tesztelés során (**39. ábra**).



39. ábra 0,01 % detergens jelenléte PknA kináz esetén

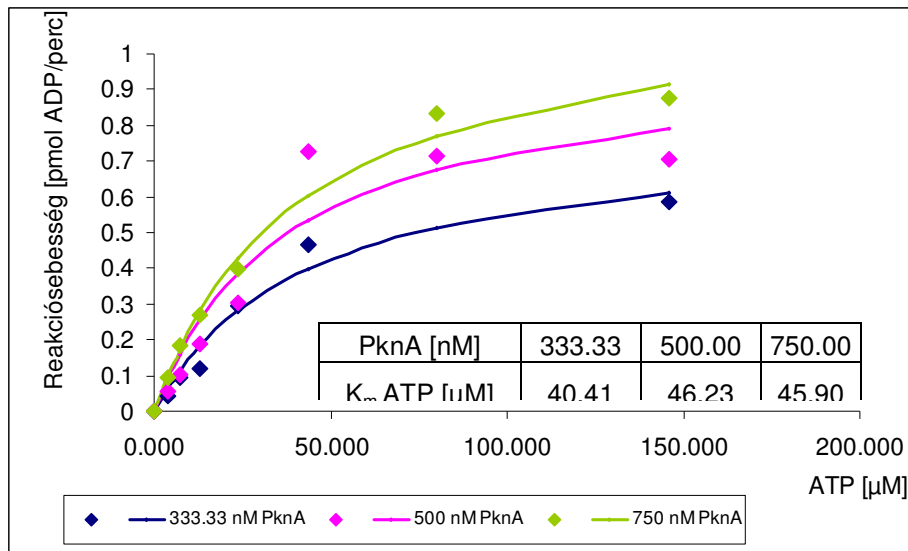
A pufferek kiválasztásánál a HEPES pH=7,5 és a Tris pH=8,5 esetén kaptam a legnagyobb ΔS értéket (**40. ábra**), én a kettő közül a HEPES-t választottam.



40. ábra Pufferkörülmeny tesztelése PknA kináz esetén

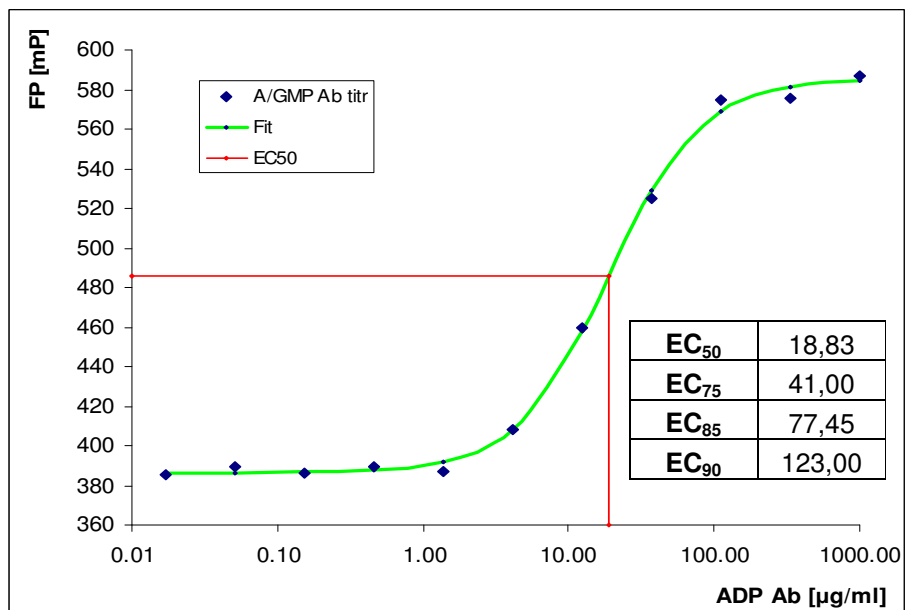
A **41. ábra** az ATP K_m értékének meghatározását mutatja, melyre azért van szükség, mert ezt az értéket használjuk a tesztelésben és a további optimalizáló lépésekben is az ATP végkoncentrációjaként. A teszteléseknél az IC_{50} érték függ az ATP

koncentrációtól, amit úgy választjuk meg, hogy $\frac{[ATP]}{K_m ATP} = 1$. Ekkor i) kompetitív és unkompetitív gátlás esetén az $IC_{50} = 2 \times K_i$, ii) nem kompetitív gátlás esetén $IC_{50} = K_i$.



41. ábra $K_m ATP$ meghatározás különböző PknA koncentrációk mellett

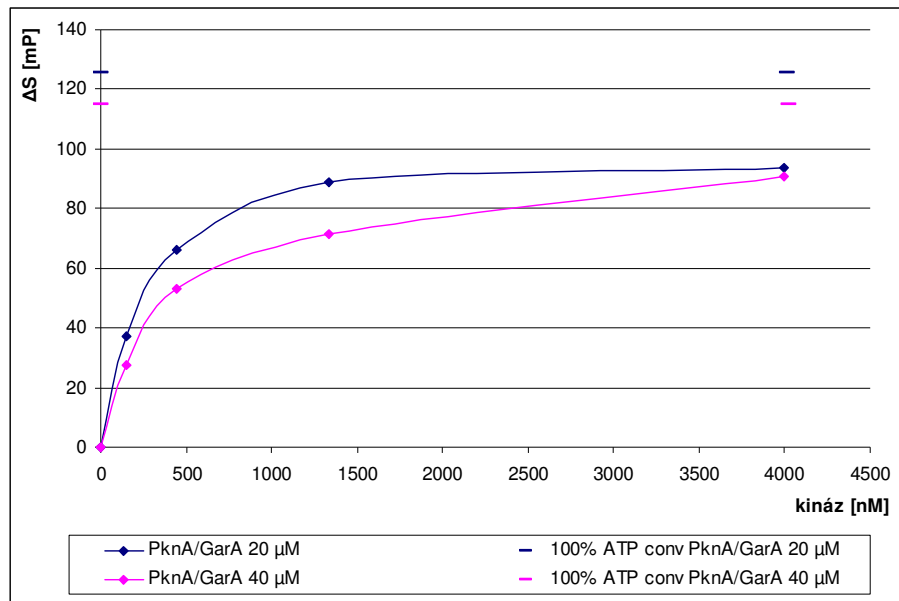
Az antitestet a PknA kináznak megfelelő pufferkörülmeny mellett 1 000 µg/ml koncentrációtól induló harmadoló hígításban titráltam meg. Az optimális EC_{85} érték 77,45 µg/ml.



42. ábra ADP^2 antitest titrálás PknA Transcreener[®] ADP^2 FP módszer esetén

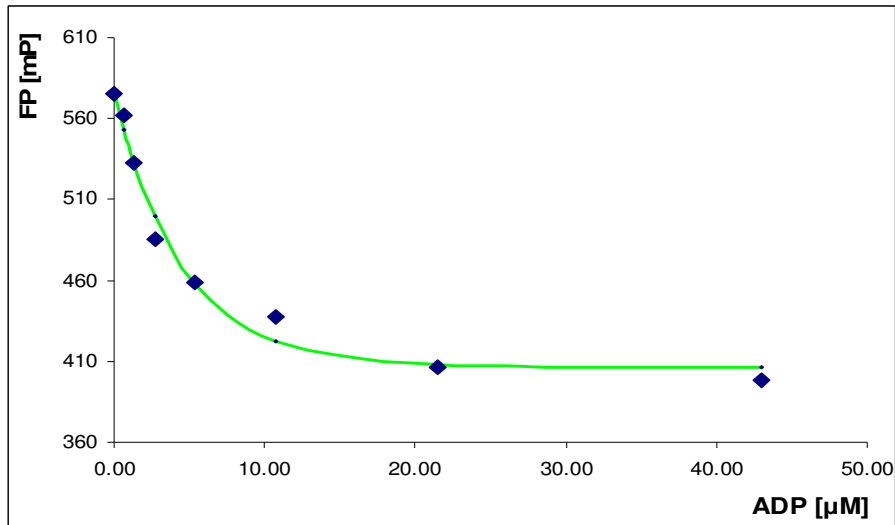
Az optimális kináz illetve szubsztrát koncentráció kiválasztásához 20 ill. 40 μM GarA jelenlétében 4 μM -ról induló harmadoló hígításban határoztam meg az optimális PknA koncentrációt (**43. ábra**). A görbék lefutásából látható, hogy habár a kináz mutat aktivitást, még magas koncentrációban sem képes 100 %-ban átalakítani a jelenlévő ATP-t és 90 mP egységénél nagyobb jelet adni.

A továbbiakban 20 μM GarA és 500 nM PknA koncentráció mellett teszteltem a vegyületeket.



43. ábra PknA kináz titrálás két különböző szubsztrát koncentrációnál

Az ATP/ADP kalibrációs görbe megfelelő lefutása, illetve a maximum és minimum jel közti különbség jelzi, hogy a rendszer a fent említett körülmények között jól működik, tesztelésre alkalmas (**44. ábra**).



44. ábra ATP/ADP kalibrációs görbe PknA Transcreener® ADP² FP módszer esetén

A tesztelés során az enzimreakció ideje 120 perc volt, míg a detektáló oldattal 60 percig inkubáltam a rendszert.

5.1.3.2.1.2 Tesztelés

Az tesztrendszer körülményének optimalizálása után alkalmam nyílt, hogy az EVL vegyülettárat Svájcban a lausanni EPFL intézetben, Prof. Stewart Cole kutatócsoportjával együttműködésben teszteljem le.

Ott a HTRF® Transcreener® ADP technológiát alkalmaztuk, ezért a tesztelés előtt finomítani kellett az körülményeken, hogy megfelelő jelet tudjunk detektálni a tesztelés során. Meglepően tapasztaltuk, hogy ennél a módszernél a Mg²⁺ jelenlétében alacsonyabb jelet kaptunk, mint Mg²⁺ nélkül, ezért a tesztelés során nem használtunk MgCl₂-t.

A Transcreener® FP rendszerben használt PknA kináz illetve GarA szubsztrát koncentrációt megemeltük, mert a Z' érték túl alacsony volt.

PknA tesztelési körülmény:

Puffer: 20 mM HEPES pH=7,5; 1 mM DTT; 1 mM MnCl₂; 5 % glicerin; 0,01 % Brij35

Enzim: 1,5 µM *M. tuberculosis* PknA

Szubsztrátok: 40 µM GarA; 45 µM ATP

Reakció idő: 120 perc

Inkubálási idő: 60 perc

A HTRF módszer rövid beállítása után teszteltük az EVL vegyülettárat 10 μM koncentrációban, duplikátumban. Az elsődleges tesztelés során az Inh% helyett „score” értékek szerepelnek (**5. egyenlet**).

$$score = \frac{S_{CPD} - S_{DMSO}}{S_{poz} - S_{DMSO}}$$

5. egyenlet „score” érték kiszámítása, S_{CPD} =vegyület mért FP jele, S_{DMSO} =DMSO mért FP jele, S_{poz} =pozitív kontroll FP jele

A **11. táblázat** a PknA inhibitorok score, IC_{50} és MIC értékeit tartalmazza.

11. táblázat PknA inhibitorok aktivitása biokémiai és teljes sejtes tesztelés során.

Vegyület	HTRF teszt score (10 μM)	IC_{50} (μM)	MIC (μM)
VIC-6557	0,4	42	>200
VIC-15739	0,5	19	>200
VIC-16317	0,6	5,2	>200
VIC-16819	1,0	10	>200

5.1.4 NAD kinázon ható inhibitor keresés

5.1.4.1 Fehérje expresszió és tisztítás

A *M. tuberculosis* NAD kináz fehérjét az „Amadeo Avogadro” Piemontei Egyetemen Prof. Menico Rizzi csoportja állította elő a módszerek fejezetben megadott módon és biztosította számomra a kísérletekhez.

5.1.4.2 Virtuális tesztelés

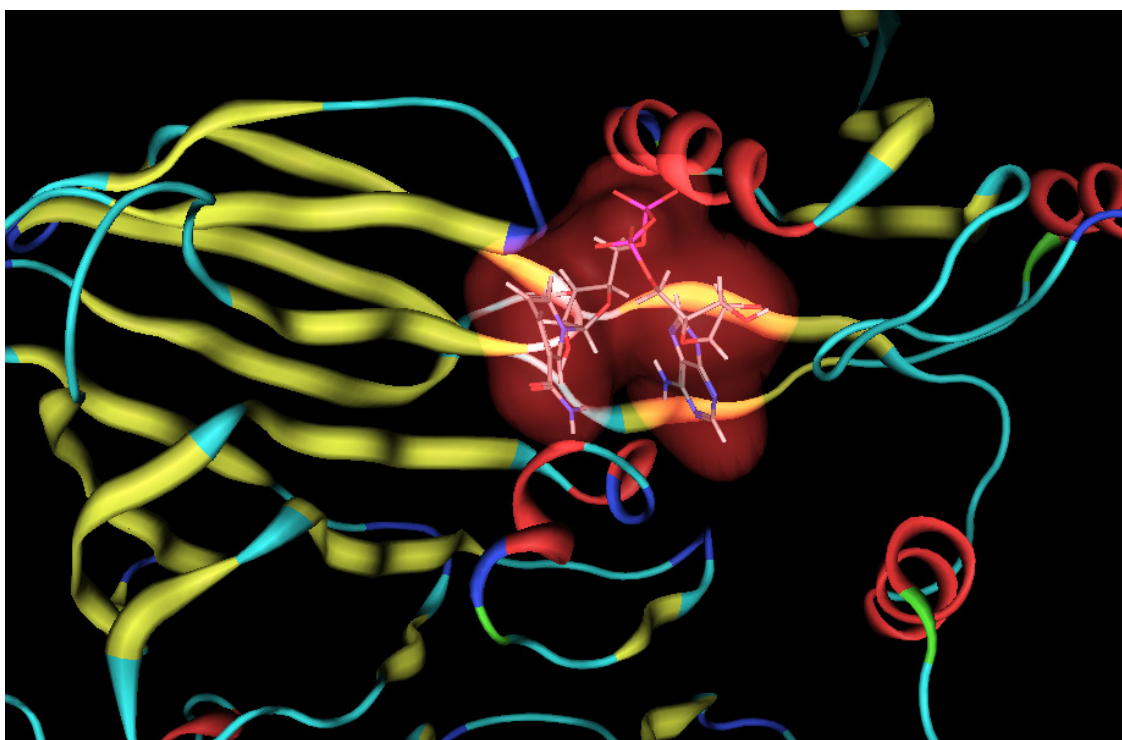
5.1.4.2.1 Dokkolás

Mivel a *M. tuberculosis* NAD kinázon ható inhibitorokról irodalmi adat nem állt rendelkezésünkre, ezért úgy gondoltuk, hogy a kristályszerkezeten alapuló virtuális vegyülettár tesztelése kiindulópontot jelenthet.

A tesztelésnél a korábban közölt *M. tuberculosis* NAD kináz és NAD komplex kristályszerkezetét használtuk (**12. táblázat, 45. ábra**).

12. táblázat NADK és NAD komplex kristályszerkezetének adatai

PDB ID	Ligand név	Ligand azonosító
1Y3I	nikotinamid-adenin-dinukleotid	NAD



45. ábra *M. tuberculosis* NADK kristályszerkezet NAD liganddal [109]

Az 19 033 vegyület dokkolása után 49 vegyületet válsztottunk ki NADK *in vitro* tesztesésre. A vegyületek gátlását spektrofotometriás módszerrel tesztelték le a Piemontei Egyetemen Prof. Menico Rizzi csoportjában. A teszelés során egyik kiválasztott vegyület sem mutatott gátlást.

A spektrofotometriás módszer átbecsátóképessége elég alacsony, így szerettem volna MTS/HTS rendszerben használható módszert beállítani.

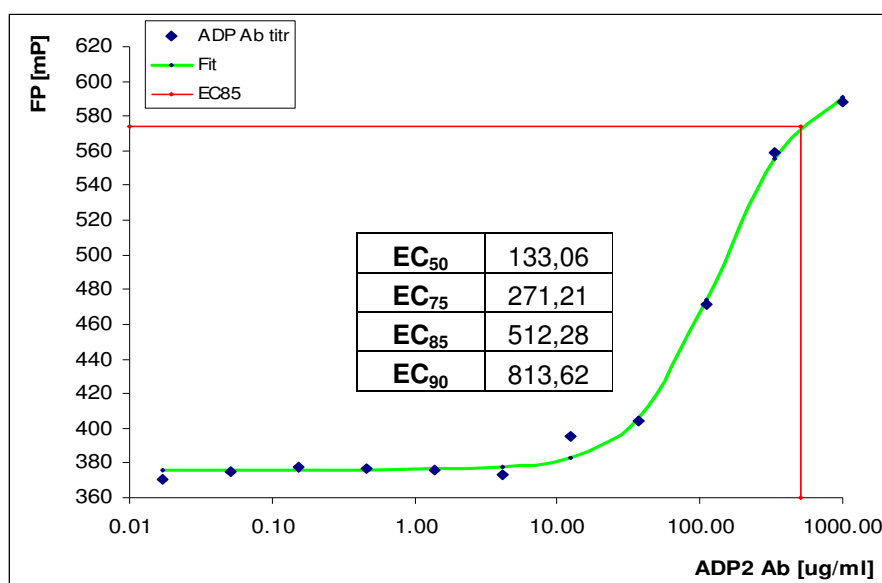
Mivel a NADK enzimreakció során is ADP keletkezik ezért úgy gondoltam a Transcreener[®] ADP² FP technológia alkalmas lenne hatékony inhibitor keresésre.

5.1.4.3 Fluoreszcencia polarizáció alapuló módszerek

5.1.4.3.1 NADK Transcreener® ADP² FP technológia

5.1.4.3.1.1 Optimalizálás

A NADK Transcreener® ADP² FP módszer beállításánál segítséget nyújtott a partnerek által korábban beállított spektrofotometriás mérés során használt pufferösszetétel [92].



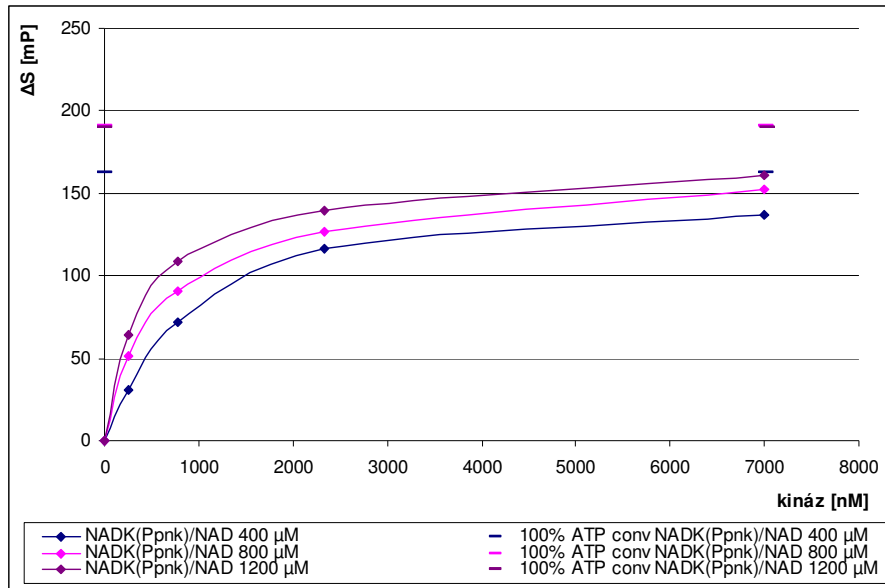
46. ábra ADP² antitest titrálás a NADK Transcreener® ADP² FP módszer során

Az antitest titrálást 40 mM Tris pH=8,0; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 100 mM KCl; 0,01 % NP-40; 5 % glicerin pufferösszetétel és 400 μM ATP mellett végeztem. Az optimális EC₈₅ érték 512,28 μg/ml.

Az enzim titrálást 3 eltérő szubsztrát koncentrációban 7 000 nM NADK koncentrációtól indulva harmadoló hígításban végeztem (**47. ábra**).

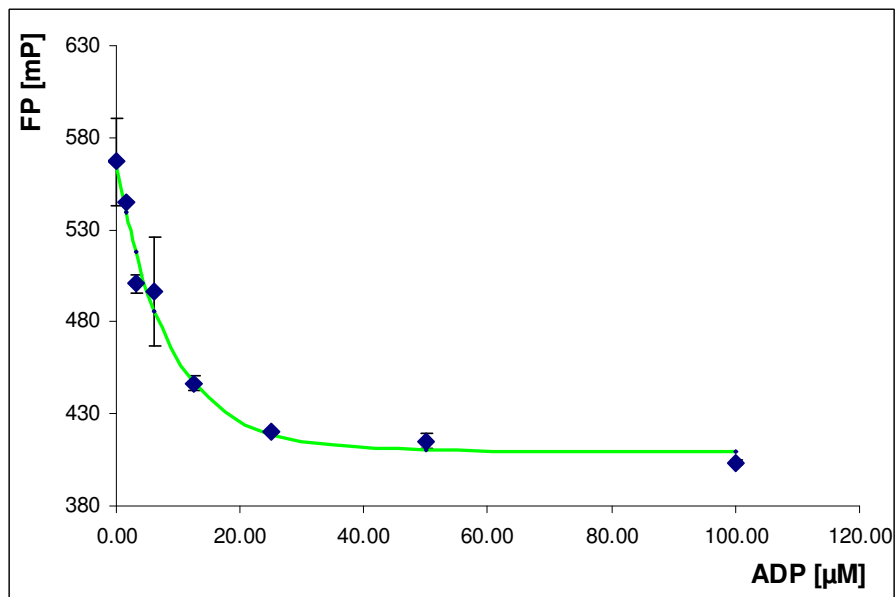
400, 800, 1 200 μM NAD estén a görbék lefutása közt van eltérés, a legnagyobb jelet 1200 μM NAD koncentrációnál detektáltam, ezért a továbbiakban ezt, valamint 800 nM kinázt alkalmaztam a tesztelések során.

Az enzimreakció ideje és a detektáló oldat inkubációs ideje is 60 perc volt.



47. ábra NADK titrálás három különböző szubsztrát koncentrációjánál

Az ATP/ADP kalibrációs görbe alapján a beállított körülmény megfelelő a kináz működéséhez és alkalmas a tesztlésre (48. ábra).



48. ábra ATP/ADP kalibrációs görbe NAD kináz esetén

5.1.4.3.1.2 Tesztelés

Ugyan a *M. tuberculosis* NAD kináz a baktérium szempontjából esszenciális fehérjének számít, mégis a vele kapcsolatos kutatás még elég gyerekcipőben jár. Munkám során nem találtam olyan cikket, mely *M. tuberculosis* NADK gátlószerről számolt volna be,

ezért referencia anyag hiányában álltam neki a tesztelésnek, annak reményében, hogy inhibitort találok.

A NAD kináz elleni inhibitor keresés során az EVL vegyülettárat 98 μM koncentrációban teszteltem duplikátumban. Ez egy viszonylag magas koncentráció, de mivel nem volt semmi kiindulópontom, ezért jobbnak láttam magas koncentrációban tesztelni a vegyületeket.

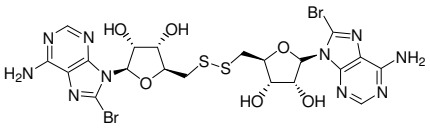
A vegyületek pipettázásánál a Tecan Freedom Evo 150 típusú pipettázó robot segített, így a 384-lyukú lemezre egyszerre lehetett rápipettázni a vegyületeket.

A pipettázó robot előnye, hogy nanoliter mennyiségben képes pipettázni és így plussz hígítási lépés nélkül, közvetlenül a 100 % DMSO-ban oldott 5 mM koncentrációjú oldatot lehet használni törzsoldatként.

Sajnos közel 1 000 vegyületből egy sem mutatott gátló hatást még elenyésző százalékban sem, ami az eddigi, más kináz tesztelések során szerzett tapasztalatokkal ellentmond.

2009-ben jelent meg egy publikáció [110], mely leírja, hogy az ATP kötőhelyen ható vegyületek helyett a NAD analógok bizonyulnak sikeres gátlószereknek. Erre a tudományos megállapításra alapozva megmagyarázató, hogy a NAD kinázon miért nem hatottak az eredetileg ATP kötőhelyen ható inhibitorok. Miután a vegyészek szintetikus úton előállították a publikációban közölt di-(8-bróm-adenozin)-diszulfid NAD analógot (VIC-23779), leteszteltem NADK Transcreener[®] ADP² FP módszerrel, mint referencia anyag.

13. táblázat A referencia anyagként használt NAD analóg szerkezete, irodalmi és mért IC_{50} értéke illetve MIC értéke

Vegyület	Szerkezet	Molekula tömeg	IC_{50} (μM) irodalmi	IC_{50} (μM) mért	MIC (μM)
VIC-23779		722,40	19	97,4	>100

A **13. táblázat**ban látható, hogy a referencia anyag irodalomban publikált IC_{50} értéke eltér az általam NADK Transcreener[®] ADP² FP módszerrel mért értéktől, ami magyarázható azzal, hogy a cikkben más módszerrel határozták meg ezt az értéket és

pontosan nincs feltüntetve a tesztelés során használt körülmény (NAD koncentráció, NADK koncentráció stb.). A 2009-es közleményben nincs adat arról, hogy a di-(8-bróm-adenozin)-diszulfidnak milyen hatása van bakteriális tesztelés során. Az általunk mért MIC értékből látható, hogy habár ez a vegyület a biokémiai mérések során mutat valamiféle gátló hatást, a *M. tuberculosis* növekedését nem gátolja.

5.1.5 NAD szintetázon ható inhibitor keresés

5.1.5.1 Fehérje expresszió és tisztítás

A *M. tuberculosis* NAD szintetáz fehérjét az “Amadeo Avogadro” Piemontei Egyetemen Prof. Menico Rizzi csoportja biztosította a kísérletekhez, melyet a 4.2.5 fejezetben megadott módon állítottak elő.

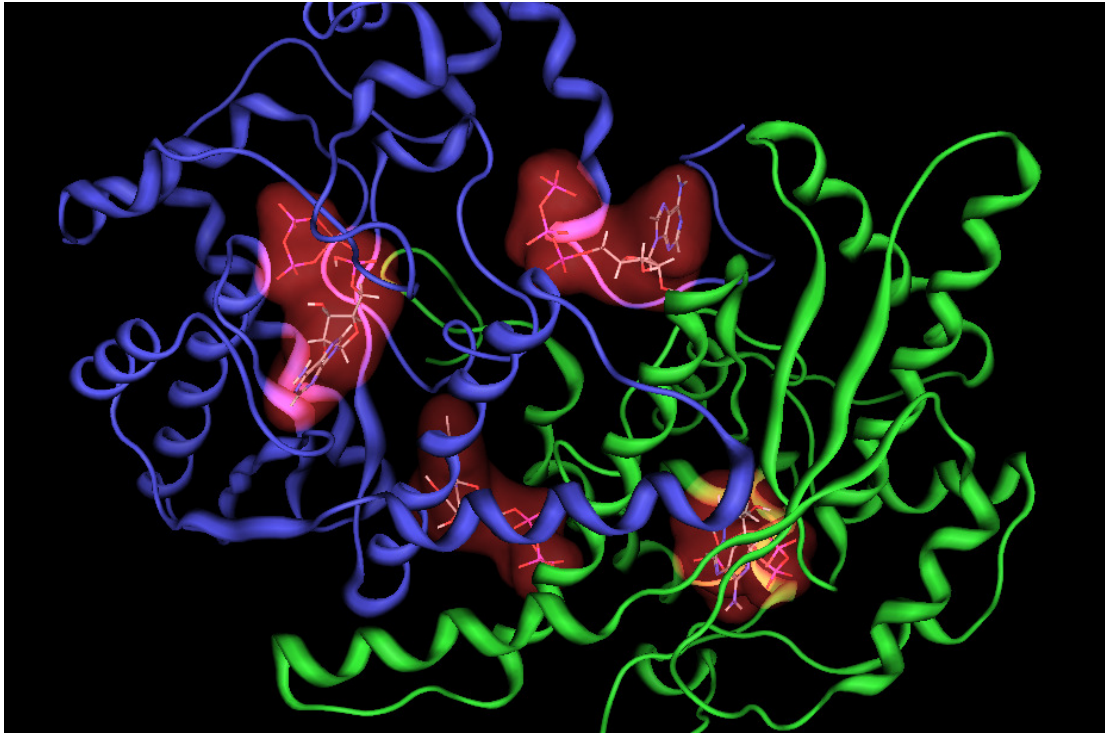
5.1.5.2 Virtuális tesztelés

5.1.5.2.1 Dokkolás

A NAD szintetáz dokkolásnál csak a *B. subtilis* NADS kristályszerkezete állt rendelkezésünkre, és mivel a *M. tuberculosis* és *B. subtilis* NAD szintetázok közt 40 % homológia van és a bizonyítottan katalitikus szerepet betöltő szekvenciák nagymértékben megőrzöttek, ezért úgy gondoltuk ezt használjuk.

14. táblázat *B. subtilis* NADS kristályszerkezet ATP, AMP, PPi liganddal

PDB ID	Ligand név	Ligand azonosító
1NSY	adenozin-5'-trifoszfát, adenzin-5'-monofoszfát, pirofoszfát	ATP, AMP, PPi



49. ábra *B. subtilis* NADS kristályszerkezet ATP, AMP-PPi (dimer) liganddal [111]

A dokkolás után 19 033 vegyületből 47 lehetséges NADS gátlót választottunk ki további *in vitro* biokémiai tesztelésre, melyet Prof. Menico Rizzi csoportja végzett el spektrofotometriás módszerrel. A tesztelés eredményét a **15. táblázat** foglalja össze.

Mivel a spektrofotometriás módszer nem alkalmas MTS/HTS tesztelésre, ezért szerettem volna a Transcreener™ AMP/GMP FP technológiát beállítani.

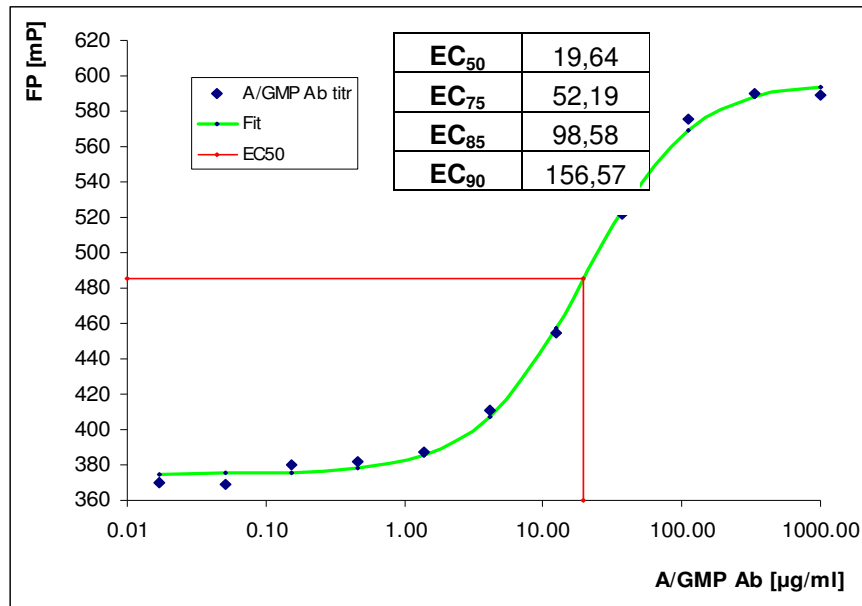
5.1.5.3 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

5.1.5.3.1 NADS Transcreener™ AMP/GMP FP technológia

5.1.5.3.1.1 Optimalizálás

A NADS Transcreener™ AMP/GMP FP módszer beállításánál segítséget nyújtott a partnerek által korábban beállított spektrofotometriás módszerben használt pufferösszetétel [92]. De ezen kívül még meg kellett találni az optimális antitest, szubsztrát és kináz koncentrációt.

Az antitest titrálását 20 mM HEPES pH=7,5; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 22 mM KCl; 10 mM NH₄Cl pufferösszetétel és 100 µM ATP mellett harmadoló hígításban végeztem el 1 000 µg/ml koncentrációból indulva.

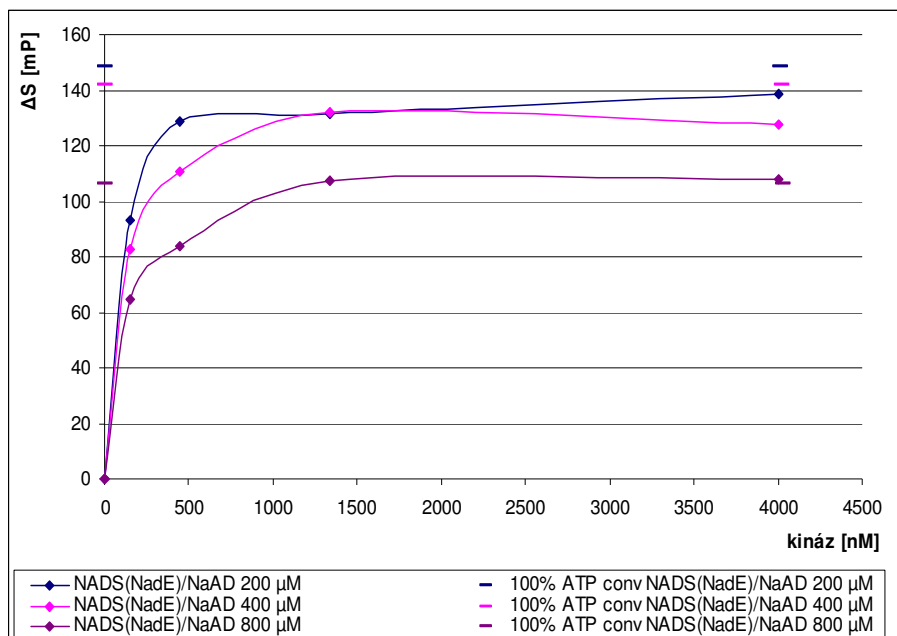


50. ábra AMP/GMP antitest titrálás a NADS Transcreener™ AMP/GMP FP módszer során

Az **50. ábra** alapján 98,58 µg/ml az optimális EC₈₅ koncentráció, melyet a további optimalizáló lépések során alkalmaztam.

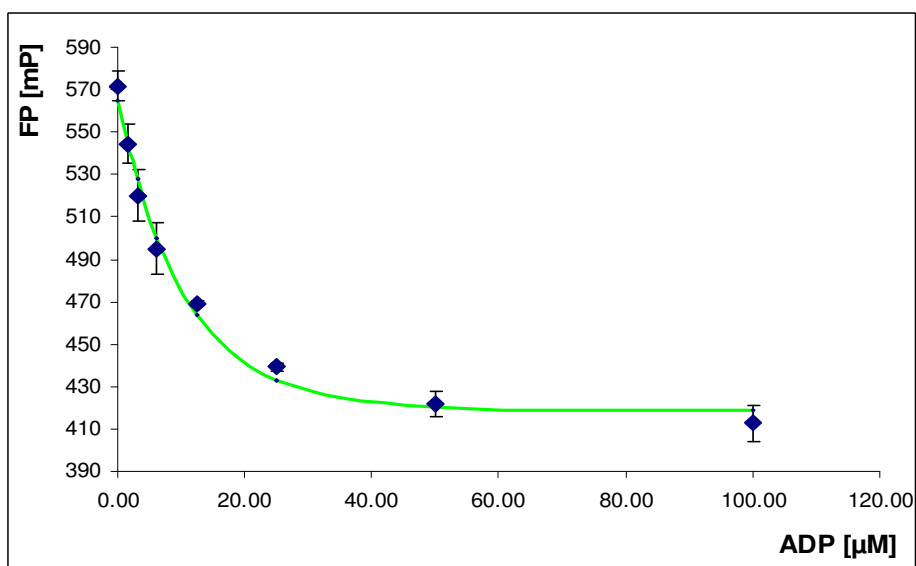
A spektrofotometriás mérések során alkalmazott szubsztrát koncentráció nagyon magas lett volna egy ilyen érzékeny rendszerben, ezért több szubsztrát koncentrációban titráltam meg a kinázt. Az **51. ábra** alapján 200 µM NaAD koncentrációnál elegendően magas jelet kaptam, így a továbbiakban 200 µM NaAD-t és 140 nM NAD szintetáz enzimet használtam.

Az optimális reakció illetve inkubációs idő 60 perc.



51. ábra NADS titrálás három különböző szubsztrát koncentrációjánál

Mivel a tesztelés során a vegyületek gátlását kalibrációs görbe alapján számoljuk, ezért a NADS Transcreener™ AMP/GMP FP módszer beállításának utolsó lépéseként ellenőriztem, hogy a kalibráló görbe esetén megfelelő nagyságú jelet kapok-e (52. ábra).



52. ábra ATP/AMP kalibrációs görbe NADS Transcreener™ AMP/GMP FP módszer esetén

5.1.5.3.1.2 Tesztelés

5.1.5.3.1.2.1 Spektrofotometriás tesztelés

A dokkolás során kiválogatott vegyületeket spektrofotometriás módszerrel tesztelték le Prof. Menico Rizzi kutatócsoportjában.

15. táblázat Dokkolásból származó vegyületek biokémiai tesztelése utáni hatékony molekulák IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)
VIC-3242	67	ND
VIC-6026	50	-
VIC-6569	50	-
VIC-8995	80	ND
VIC-9311	72	ND
VIC-11085	69	-
VIC-12507	55	500
VIC-12524	67	ND
VIC-12538	64	ND
VIC-12539	60	500
VIC-13047	71	ND
VIC-13632	58	500
VIC-15108	73	50
VIC-15666	62	ND
VIC-15765	94	ND
VIC-15901	66	ND
VIC-15929	102	ND
VIC-16047	76	-
VIC-16315	55	500
VIC-16581	72	500
VIC-16816	63	ND
VIC-17731	82	500

Tekintve, hogy a **15. táblázatban** szereplő vegyületek IC₅₀ értéke 50 μM-nál nem alacsonyabb, és a *M. tuberculosis* baktériumon sem igazán hatékonyak, ezért újabb vegyületeket (100 molekula) válogattunk ki további tesztelésre.

Érdemes viszont megjegyezni, hogy a **15. táblázatban** 55 μM IC_{50} (NADS) értékkel rendelkező VIC-16315 vegyület egyike a legjobb, dokkolás alapján kiválogatott és tesztelt PknG gátlóknak ($\text{IC}_{50}=0,01 \mu\text{M}$) és a fertőzött makrofág vizsgálatban is 40 %-ban gátolta a telepképződést.

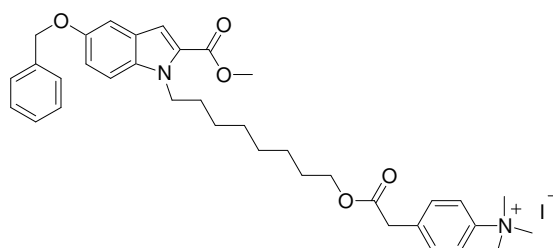
A **15. táblázat** eredménye alapján kiválogatott anyagok között szerepelt a VIC-19014 molekula is, mely egy 2003-as publikáció szerint *B. subtilis* NADS biokémiai rendszerben 20 μM IC_{50} értékkel rendelkezett [112]. A *M. tuberculosis* és *B. subtilis* NADS közti szekvencia homológia miatt úgy gondoltuk, hogy a VIC-19014 vegyület megfelelő referencia lehet a *M. tuberculosis* NADS biokémiai tesztelés során is.

A **16. táblázatban** felsorolt vegyületek esetében látható, hogy az *M. tuberculosis* NAD szintetázon tesztelt IC_{50} értékek jelentős része 10 μM alatti és a vegyületek antituberkulotikus hatása is javult.

16. táblázat 100 vegyület teszteléséből származó *M. tuberculosis* NADS inhibitorok IC_{50} és MIC értéke

Vegyület	IC_{50} (μM)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC (μM)
VIC-12976	6,2	64	127
VIC-12977	4,5	32	67
VIC-12979	5,1	64	99
VIC-13268	3,5	16	33
VIC-15108	45	16	36
VIC-19014	20	>64	>109

A VIC-19014 referencia anyag (**53. ábra**) *M. tuberculosis* NADS IC_{50} értéke megegyezik a korábbi publikációban közölt *B. subtilis* NADS IC_{50} értékkel, de nincs jelentős antimikobakteriális hatása.



53. ábra VIC-19014 referencia anyag szerkezete

A VIC-15108 ill. VIC-13268 vegyületek alapszerkezetére, valamint a VIC-12976, VIC-12977, VIC-12979 vegyületek struktúrájára alapozva összesen 30 analóg született, melyek hatását spektrofotometrián alapuló biokémiai rendszerben valamint mikobakteriális tesztben vizsgáltuk. A **17. táblázat** tükrözi, hogy az újabb analógok hatása nem javult szignifikánsan, habár a szakirodalomban sem találhatunk ennél jobb *M. tuberculosis* vagy *B. subtilis* NADS gátlókat. 2009-ben Moro és munkatársai *B. subtilis* NADS dokkolásból származó vegyületek gátló hatását vizsgálták *Bacillus anthracis* NADS enzimen illetve magán a patogénen, melynek eredményeképp az egyik inhibitor IC₅₀ értéke 10 µM, MIC értéke 1,9 µM volt [113, 114].

17. táblázat 30 vegyületből álló szűkített vegyülettár teszteléséből származó NADS inhibitorok IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	IC ₅₀ (µM)	MIC (µg/ml)	MIC (µM)
VIC-4450	18	32	99
VIC-9982	18	32	64
VIC-11647	17	32	65
VIC-11649	14	32	64
VIC-12553	13	32	72
VIC-12592	8	32	51
VIC-12595	5	32	56
VIC-12965	10	16	35
VIC-12990	4	16	26
VIC-13017	12,5	32	69

5.1.5.3.1.2.2 NADS Transcreeper™ AMP/GMP FP technológia

A MTS/HTS módszerrel a dokkolából származó eredményektől függetlenül a Vichem vegyülettár szűkített, változatos szerkezeteket tartalmazó, kb. 1 000 vegyületből álló részét (EVL) teszteltük le 98 µM-ban. 15 vegyület IC₅₀ értékét határoztuk meg, melyeket a **18. táblázat**ban tüntettem fel. Látható, hogy habár sokkal több vegyületet teszteltünk, nem sikerült az eddigieknél hatékonyabb molekulákat találni. A 15 vegyület közül 7 (eltérő szerkezetek) hatását vizsgáltuk *M. tuberculosis* patogénen, melyek közül csak a VIC-16319 és a VIC-7479 MIC értékét lehetett meghatározni.

18. táblázat EVL vegyülettár teszteléséből származó NADS inhibitorok IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	IC₅₀ (μM)	MIC (μM)
VIC-6316	23,88	-
VIC-6369	53,01	ND
VIC-7256	22,85	ND
VIC-7479	45,84	40
VIC-8493	93,84	ND
VIC-8920	29,86	ND
VIC-9164	23,49	ND
VIC-13138	62,30	ND
VIC-13708	6,77	-
VIC-13734	13,78	>20
VIC-14185	10,30	-
VIC-14201	9,72	-
VIC-15740	15,22	-
VIC-16319	19,42	20
VIC-16815	39,91	ND

A **18. táblázat**ban szereplő NADS gátlók szerkezetére alapozva egy 700 vegyületből álló vegyülettárat állítottunk össze. A vegyületeket NADS Transcreeper™ AMP/GMP FP módszerrel tesztelve látható, hogy a válogatott szerkezetek eredményeként sokkal nagyobb számú NADS gátlókat sikerült találni.

A **19. táblázat**ból kitűnik, hogy habár 700-ból 26 vegyülethez sikerült IC_{50} értéket rendelni, egyik sem gátolja hatékonyabban a NADS enzimet, mint a korábbiak.

19. táblázat 700 vegyületből álló szűkített vegyülettár biokémiai tesztelésének eredménye

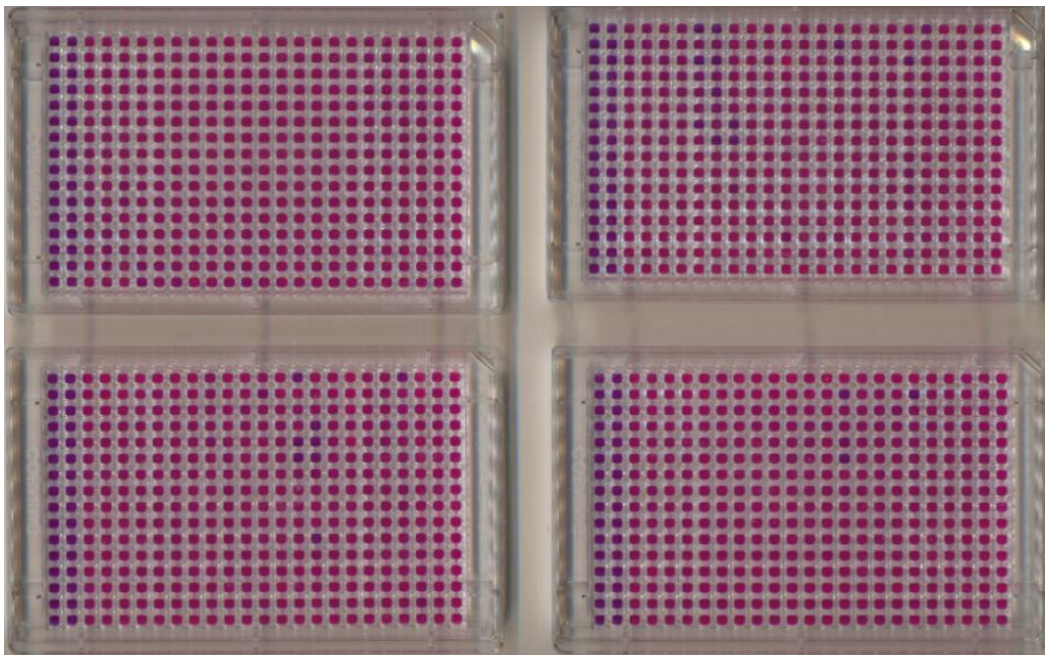
Vichem ID	IC_{50} (μM)	Vichem ID	IC_{50} (μM)
VIC-12171	27,83	VIC-13717	24,18
VIC-12730	4,91	VIC-13718	44,86
VIC-12733	34,49	VIC-13720	7,81
VIC-12734	5,41	VIC-13722	9,45
VIC-12735	10,18	VIC-13723	25,55
VIC-12737	17,16	VIC-13724	40,72
VIC-13592	5,64	VIC-13731	10,94
VIC-13593	44,22	VIC-14002	123,65
VIC-13594	12,45	VIC-14005	67,42
VIC-13595	10,37	VIC-14201	14,38
VIC-13597	15,71	VIC-14858	19,93
VIC-13598	31,90	VIC-15441	87,20
VIC-13599	38,64	VIC-16889	18,53
VIC-13600	27,48	VIC-17538	39,95
VIC-13603	41,06	VIC-18545	35,71
VIC-13605	18,03	VIC-22399	33,76
VIC-13716	8,59	VIC-22514	33,66

5.2 Teljes sejtes tesztelésen alapuló hatóanyag fejlesztés

Az elmúlt tíz évben számos gyógyszergyártó cég választotta hatóanyagfejlesztésben a célfehérje alapú stratégiát, ami sajnos kevés sikerrel járt [115, 116] mivel eddig minden klinikai fejlesztés alatt lévő tuberkulózis ellenes hatóanyagot először az antibakteriális hatása miatt fedeztek fel [117, 118, 119, 120, 121]. Ennek következtében a teljes sejtes tesztelés még mindig a legjobban alkalmazható új, hatékony szerkezetek [116, 122] illetve ezekhez kapcsolódóan új célfehérjék azonosítására [77].

A teljes sejtes tesztelés során a rezazurin redukción alapuló mikrotiter módszert alkalmaztuk, mellyel ~12 000 vegyületet teszteltünk le *C. glutamicum* baktériumon (**54. ábra**) és ~1 000 vegyületet *M. tuberculosis*-on. Az ok, amiért a gyorsan növekvő, nem patogén *C. glutamicum*-ot alkalmaztuk a nagy mennyiségű vegyület tesztelésénél az, hogy a sejtfa szerkezete hasonló a tuberkulózis bacilluséhoz [123], a genomja sokkal kisebb, és a *M. smegmatis*-szal ellentétben csak négy STPK-t tartalmaz (PknA, PknB, PknG, PknL).

Ezzel a módszerrel olyan gátlószereket szerettünk volna találni, melyek ATP-t hasznosító enzimeket, esetleg STPK-t gátolnak.



54. ábra *C. glutamicum* tesztelés 384-lyukú lemezen REMA módszerrel

Mindkét tesztelésnél a Z' statisztikai paraméter nagyobb volt, mint 0,9. A *C. glutamicum* tesztelés során 184 vegyület mutatott gátlást (score >0,3), melyeket ezután *M. tuberculosis*-on tesztelve 14 vegyület a tuberkulózis bacillus növekedését is gátolta (score >0,3).

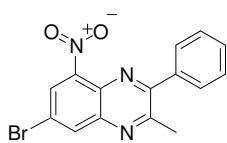
A EVL vegyülettárat, melyet magába foglal a NCL vegyülettár, közvetlenül *M. tuberculosis* baktériumon is teszteltük, melynek során 5 vegyület bizonyult hatásosnak (score > 0,5) és ebből 2 egyezik a *C. glutamicum* tesztelés eredményével.

A két tesztelés alapján 17 vegyület gátolta a *M. tuberculosis* növekedését (**20. táblázat**).

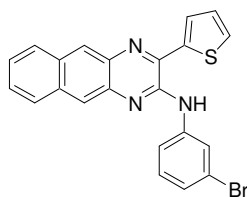
20. táblázat *M. tuberculosis* növekedését gátló vegyületek (M = mutagén)

Vegyület	Tesztelés score		Genotoxicitás 10 mM	Citotoxicitás MCC (μ M)	MIC (μ M)
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>C. glutamicum</i> ATCC 01332			
VIC-3521	1	0,7	M	0,8	3,1
VIC-3992	1	1	M	0,8	3,1
VIC-6378	0,8	1	-	50	12,5
VIC-7777	0,9	-0,1	-	>100	3,1
VIC-8679	0,9	1,1	M	>100	3,1
VIC-9376	1	0,5	-	>100	3,1
VIC-9502	0,9	1,1	M	50	6,25
VIC-11955	0,8	1,1	-	100	12,5
VIC-12029	1	1,1	-	25	25
VIC-12121	1	0	-	12,5	25
VIC-12955	0,8	1,1	M	3,1	6,25
VIC-13292	1	0,9	-	12,5	3,1
VIC-14072	0,5	0,5	-	>100	12,5
VIC-17416	0,7	0,9	-	>100	12,5
VIC-17918	0,5	0,6	-	3,1	6,25
VIC-18469	0,5	0,2	-	100	6,25
VIC-18678	1	1,1	M	>100	<0,2

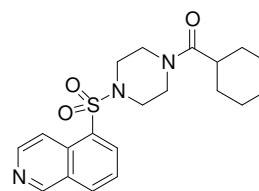
A tesztelést követően 3 vegyületet választottunk ki további hatóanyagfejlesztésre, melyek szetkezetét az **55. ábra** mutatja.

**VIC-9376**

7-Bróm-2-metil-5-nitro-
-3-fenilquinoxalin

**VIC-18469**

2-(3-Brómbenzil)-3-
-(2-tienil)benzo[g]quinoxalin

**VIC-7777**

5-{{4-(Ciklohexilcarbonil)piperazin-1-
-il]szulfonil}izoquinolin

55. ábra Nem mutagén, nem citotoxikus, *M. tuberculosis* növekedést gátló vegyületek szerkezete és elnevezése

5.2.1 VIC-9376 és származékai

A kiválasztott szerkezetek közül nagy figyelmet szenteltünk a nitroquinoxalin vegyületek szintézisére, mert ez a vegyület család még nem védett szabadalommal.

Az előállított származékok közül számos vegyület gátolta a *M. tuberculosis* növekedését (**21. táblázat**), melyek közül a VIC-22484-es vegyület bizonyult a leghatékonyabbnak a teljes sejtes tesztelés során (MIC=0,8 μ M).

21. táblázat Tuberkulózis bacilluson hatásos VIC- 9376 származékok

Vegyület	Szerkezet	MIC (μM)	mutagén
VIC-9376		3,75	nem
VIC-9379		12,5	nem
VIC-9380		50	nem
VIC-9383		12,5	nem
VIC-22482		6,25	nem
VIC-22484		0,8	nem
VIC-22651		3,1	nem
VIC-22653		3,1	nem
VIC-22650		3,1	nem
VIC-22760		29,9	nem
VIC-22761		4,4	nem

2009 márciusában a Science folyóiratban megjelent egy közlemény, melyben egy új, tuberkulózis ellenes vegyület a BTZ043 szerkezetét és hatását mutatták be [77]. Az általunk fejlesztett nitroquinoxalin vegyületek és a benzotiazinon (BTZ) vegyületek

közti hasonlóság alapján szeretnénk volna megbizonyosodni arról, hogy a nitroquinoxalin vegyületek is ugyanazon célfehérjén hatnak-e mint a BTZ043 molekula. Ezért a kiválasztott VIC-9376 vegyületet hatását különböző vad típusú és BTZ rezisztens törzseken teszteltük. A **22. táblázat** alapján látható, hogy habár a BTZ043 vegyület sokkal hatékonyabb, mint a VIC-9376, mindkét vegyület elveszti hatását, ha BTZ rezisztens törzsön teszteljük. Ebből arra következtetünk, hogy az általunk fejlesztett VIC-9376 vegyület (és származékai) részben legalább is a DprE1 fehérjén keresztül gátolja a mikobaktérium növekedését. A hatás mediálásában résztvevő eseteleges további fehérjéket a KinaTor™ technikával szeretnénk a jövőben beazonosítani.

22. táblázat VIC-9376 és BTZ 043 hatása különböző baktérium törzsön és rezisztens változatán (^a *M. tuberculosis* H37Rv DprE1 szekvencia alapján)

Baktérium törzs	aminósav 387 ^a	aminósav 347 ^a	VIC-9376 MIC (µM)	BTZ043 MIC (µM)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	Cys	Phe	3,1	0,009
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MN47	Gly	Phe	>100	9,2
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MN84	Ser	Phe	>100	37,1
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Cys	Phe	3,1	0,005
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG BN2	Ser	Phe	50	37,1
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	Cys	Phe	3,1	0,144
<i>Corynebacterium glutamicum</i> PS1	Cys	Ser	12,5	0,58

A hatóanyagfejlesztés során elengedhetetlen megbizonyosodni arról, hogy a kiválasztott vegyület olyan fehérjén is hat-e, mely az emberi szervezet működéséhez elengedhetetlen. A VIC-9376 vegyület szelektivitását a **23. táblázat** mutatja. A méréseket a Proteros biostructures GmbH végezte. A táblázatban szereplő fehérjék megválogatásánál lényeges szempont volt, hogy a humán kinom fa minden ága reprezentálva legyen. Látható, hogy a *M. tuberculosis* baktériumon ható vegyület a táblázatban szereplő fehérjék egyikét sem gátolja jelentősen.

23. táblázat VIC-9376 inhibitor szelektivitása humán fehérjéken

fehérje	Inh % (10 µM)	fehérje	Inh % (10 µM)
ABL	-3,11	JAK3	7,17
AKT1	7,49	JNK1	6,49
AurA	7,15	MAPK-ERK1	16,64
AXL	4,09	mTOR	10,45
B-RAF	9,97	PAK1	1,26
CDK2/CYCA	9,36	PAK4	26,28
CDK4/CycD1	8,22	PDGFRbeta	7,09
CDK9/CYCT1	-49,03	PIM1	3,69
CHK1	9,75	PKCa	24,41
cKIT	3,41	PLK3	-8,95
c-MET	5,96	RET	10,76
CSK	10,69	ROCK 2	4,85
DDR1	-13,12	SRC	18,38
ERBB2	9,66	SYK	4,88
FGFR3	-0,14	TIE2	4,94
FLT3	6,36	TrkA	-15,65
IKKbeta	9,32	VEGFR2	3,03
INSR	4,04	ZIPK (DABK3)	-4,51
IRAK4	13,67		

A VIC-9376 anyavegyület antibakteriális hatását számos Gram-pozitív illetve Gram-negatív baktérium törzsön is megvizsgáltuk (**24. táblázat**).

24. táblázat Antibakteriális érzékenység meghatározás

baktérium törzs	inhibíció átmérő (mm)
	VIC-9376
<i>Bacillus subtilis</i>	9
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	0
<i>Mycobacterium abscessus 08-311</i>	0
<i>Mycobacterium abscessus 08-345</i>	6,5
<i>Mycobacterium boletti 1999-0885</i>	0
<i>Mycobacterium marinum M</i>	18
<i>Mycobacterium massiliense 2005-1216</i>	7
<i>Mycobacterium massiliense 2004-0507</i>	0
<i>Mycobacterium smegmatis mc²155</i>	ND
<i>Pseudomonas putida</i>	0

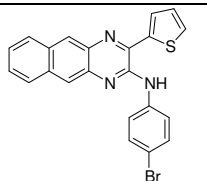
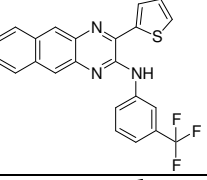
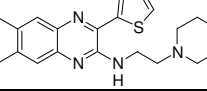
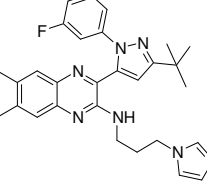
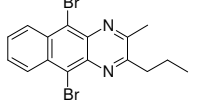
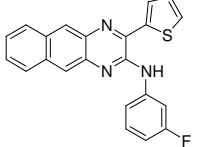
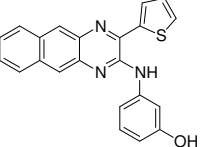
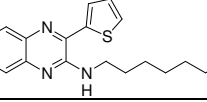
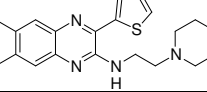
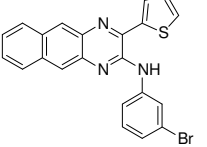
5.2.2 VIC-18469 és származékai

Több mint 600 benzoquinoxalin vegyület hatását teszteltük le *M. tuberculosis* H37Rv törzsön, miután a korábbi tesztelesek során a VIC-18469 hatékony vegyületnek bizonyult.

A gátálást mutató vegyületek MIC értékét a **25. táblázat** foglalja össze.

25. táblázat VIC-18469 benzoquinoxalin származékainak hatása *M. tuberculosis* baktériumon

Vegyület	Szerkezet	MIC (μM)
VIC-12799		3,1
VIC-12983		6,2
VIC-13001		6,2
VIC-13176		6,2
VIC-13177		6,2
VIC-13178		50
VIC-13181		6,2
VIC-13186		6,2

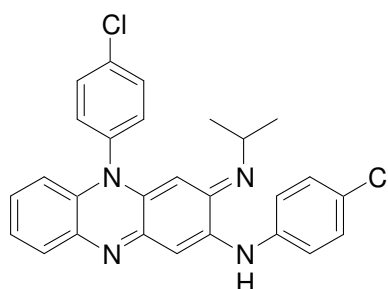
VIC-13187		6,2
VIC-13198		6,2
VIC-13202		1,6
VIC-13215		50
VIC-13991		12,5
VIC-13182		3,1
VIC-13183		12,5
VIC-14385		6,2
VIC-13199		8
VIC-18469		6,2

A VIC-18469 anyavegyület antibakteriális hatását számos Gram-pozitív illetve Gram-negatív baktérium törzsön is megvizsgáltuk (26. táblázat).

26. táblázat Antibakteriális érzékenység meghatározás

baktérium törzs	inhibíció átmérő (mm)
	VIC-18469
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0
<i>Mycobacterium abscessus</i> 08-311	8
<i>Mycobacterium abscessus</i> 08-345	8
<i>Mycobacterium boletti</i> 1999-0888	9
<i>Mycobacterium boletti</i> 1999-0885	8
<i>Mycobacterium marinum</i> M	10
<i>Mycobacterium massiliense</i> 2005-1216	9
<i>Mycobacterium massiliense</i> 2004-0507	8
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	0
<i>Pseudomonas putida</i>	0

A benzoquinoxalin némi szerkezeti hasonlóságot mutat a klofaziminnel (**56. ábra**), melyet a rifampicinnel és a dapsonnal kombinációban a lepra kezelésénél használnak. Kísérleti szinten bizonyított, hogy *M. avium*-mal fertőzött AIDS betegeknél ill. *M. avium paratuberculosis* fertőzés esetén a klofazimin más antimikrobiális hatóanyaggal kombinációban terápiás céllal alkalmazható [124]. Együttműködő partnerek biokémiai kísérleteiben a klofazimin gátolta a *M. tuberculosis* NDH-2 fehérjét [125].

**56. ábra** Klofazimin szerkezete

A szerkezeti hasonlóság miatt megvizsgáltuk néhány benzoquinoxalin NDH-2 gátló hatását biokémiai rendszerben. A *M. tuberculosis*-NDH-2 közös inhibitorok hatását a **27. táblázat** mutatja. A táblázatból kivehető, hogy a VIC-12955 és VIC-13202 vegyületek kiemelkedő gátlást mutattak a fent említett *in vitro* rendszerben.

27. táblázat Benzoquinoxalin vegyületek hatása tuberkulózis bacilluson és NDH-2 biokémiai tesztelés során

Vegyület	MIC (μM)	IC ₅₀ (μM)
VIC-12955	6,2	0,54
VIC-13202	1,6	4,14
VIC-13215	50	>80
VIC-18469	6,2	>80

5.3 Célfehérje azonosítás

A teljes sejtes tesztelés egyik hátránya az, hogy a sejt életműködését gátló vegyület hatásmechanizmusa, az általa gátolt célfehérje kiléte nem tisztázott. Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása gyakran igen bonyolult feladat, mely sokszor jelentős kihívást jelent a kutatók számára.

5.3.1 Biokémiai tesztrendszerek

A teljes sejtes tesztelés után logikusan következett az a lépés, hogy a *M. tuberculosis* növekedését bizonyítottan gátló molekulák hatását megvizsgáljuk az általunk már beállított és alkalmazott biokémiai tesztrendszerekben. Hátha így azonosíthatjuk a célfehérjét.

5.3.1.1 PknA, PknB, PknG, NADK, NADS és PimA célfehérjék

A **28. táblázatban** felsorolt célfehérjék közül a PimA tesztelést a pozsonyi Comenius Egyetemen Dr. Katarína Mikušová laborjában végezték [126].

Néhány vegyület az adott mérési módszerrel interferált, így nem sikerült a Inh% értéket meghatározni, ezeket ND (non-determined) rövidítéssel jelöltem. A táblázatban szereplő értékek közül látszik, hogy bizonyos vegyületek (VIC-13292, VIC-9502) majdnem mindegyik célfehérjét gátolták. Ezek guanidin vegyületek, melyeknél a tapasztalat azt

mutatja, hogy szinte kivétel nélkül minden biokémiai tesztelés során kimagasló gátlással rendelkeznek, gyakori hit vegyületek, ezért ezeket nem vettem figyelembe.

A táblázatban felsorolt vegyületek közül öt 90 % feletti PimA gátlást mutat, habár az 50 μ M elég magas koncentráció. Ezen vegyületek további vizsgálata folyamatban van a pozsonyi partner által.

28. táblázat *M. tuberculosis* növekedést gátló vegyületek *in vitro* hatása PknA, PknB, PknG, NADK, NADS, PimA célfehérjéken

Vegyület	Inh% PknA (50 μ M)	Inh% PknB (10 μ M)	Inh% PknG (10 μ M)	Inh% NADK (100 μ M)	Inh% NADS (100 μ M)	Inh % PimA (50 μ M)
VIC-3521	-38,95	-7,31	-10,50	-19,62	24,34	33,97
VIC-3992	ND	ND	ND	ND	ND	93,77
VIC-6378	24,03	11,40	-9,20	-126,70	76,78	73,72
VIC-7777	-24,36	19,80	-4,20	-23,36	4,60	41,03
VIC-9376	-13,11	20,60	-22,70	-58,24	35,65	47,71
VIC-9502	91,57	115,10	54,10	139,70	124,54	96,37
VIC-11955	ND	ND	ND	ND	ND	90,78
VIC-12029	-23,43	-38,00	-35,50	-26,25	-46,54	-14,82
VIC-12121	-27,54	12,90	29,00	-29,19	-30,42	91,4
VIC-12955	-9,41	64,40	-10,70	-80,22	38,15	88,33
VIC-13292	90,02	74,03	9,00	104,55	105,39	98,34
VIC-14072	-16,27	14,20	1,90	-34,24	ND	31,98
VIC-17416	ND	41,60	-10,50	ND	ND	ND
VIC-17918	11,02	56,00	11,70	-5,52	58,07	96,18
VIC-18469	-15,47	-6,90	16,20	-16,44	12,89	70,1
VIC-18678	10,23	34,74	22,16	-80,17	42,29	55,09
VIC-18679	-14,16	-11,19	5,48	-30,07	35,64	50,24

5.3.2 KinaTor™

A KinaTor™ technológiát korábban humán kinázok azonosítására számos esetben alkalmazták kutatócsoportunkban is [96, 127, 128]. Erre az elméletre alapozva, *M. tuberculosis* célfehérje azonosításra szerettem volna ugyanezt az elvet alkalmazni.

A **25. táblázat**ban feltüntetett hatékony benzoquinoxalin vegyületek között található egy, már korábban KinaTorhoz alkalmazott vegyület (VIC-14385), melynek MIC értéke ugyan nem a legjobb, de megközelíti a leghatékonyabb benzoquinoxalin vegyület MIC

értékét, ezért a továbbiakban ezt a vegyületet használtam lehetséges célfehérjék azonosítására.

A VIC-14385 kötött gyanta mellett inhibitor mentes (blank) töltettel is elvégeztem az affinitás kromatográfiát, hogy kiszűrjem az aspecifikusan kötődő fehérjéket. A lizátum kromatografálása után az eluált fehérje mintákat 16-BAC/SDS-PAGE 2D elektroforézissel analizáltam.

Sajnálatos módon, a fehérje mennyisége nem volt elegendő, ezért a blank minta 2D képén nem fedeztem fel foltokat, míg az inhibitor esetében csupán 2 foltot sikerült kivágni, és ESI-QTOF rendszeren elemezni (**29. táblázat**).

29. táblázat VIC-14385 kötött gyantán eluált, 16-BAC/SDS-PAGE 2D elektroforézissel elválasztott fehérjék ESI-QTOF rendszeren elemezve

Rendszertani besorolás	Gén	PAN (Protein accession number)	Molekulatömeg (Da)	Egyedi peptidek száma	Szekvencia átfedés (%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	cfp30B	P0A5N8,P0A5N9	27324.5	4	0.299
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	hsaC	P96850	33564.4	6	0.21

Mivel a 2D elválasztás nem vezetett túl sok információhoz a célfehérjéket illetően, ezért az eluátum oldatokat közvetlenül ESI-QTOF rendszeren is elemeztük (**30. táblázat, 31. táblázat**).

30. táblázat VIC-14385 kötött gyantán eluált minta fehérje összetétele ESI-QTOF rendszeren elemezve

Rendszertani besorolás	Gén	PAN (Protein accession number)	Molekulatömeg (Da)	Egyedi peptidek száma	Szekvencia átfedés (%)
<i>Homo sapiens</i>	DSP	P15924	331763,4	3	1,22
<i>Homo sapiens</i>	JUP	P14923	81727,9	4	8,19
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>cfp30B</i>	P0A5N8,P0A5N9	27324,5	6	51,3
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>rv1261c</i>	P64787,P64788	16738,2	3	26,8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>lprA</i>	Q11049,Q7U094	24885,8	3	21,7
<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG / Pasteur 1173P2)	<i>atpD</i>	A1KI98,A1UJY4,A3Q3B1,A5U209,C1AMV4,P63677,P63678,Q1B553	53076,7	3	10,9
<i>Gallus gallus</i>	LYZ	P00698	16221	6	59,2
<i>Bos taurus</i>	ALB	P02769	69276,2	8	14,7
<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG / Pasteur 1173P2)	<i>groLE1</i>	A1KFR2,A5TZG6,P0A520,P0A521	56709,3	9	32,2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>hsaC</i>	P96850	33564,4	5	23
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>acpM</i>	P0A4W6,P0A4W7	12506	3	34,8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>pstS1</i>	P15712	38226	3	19,8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>hspX</i>	P0A5B7,P0A5B8	16209,6	4	31,9

31. táblázat Inhibitor mentes (blank) gyantáról eluált minta fehérje összetétele ESI-QTOF rendszeren elemezve

Rendszertani besorolás	Gén	PAN (Protein accession number)	Molekulatömeg (Da)	Egyedi peptidek száma	Szekvencia átfedés (%)
<i>Homo sapiens</i>	DSP	P15924	331763,4	3	1,25
<i>Homo sapiens</i>	JUP	P14923	81727,9	4	8,46
<i>Homo sapiens</i>	DCD	P81605	11266,1	3	25,5
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (ATCC 700084 / mc(2)155)	<i>groS</i>	A0QSS3,A1KPA9,A5U893,C1AHN1,P09621,P15020	10786,3	4	51
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>hspX</i>	P0A5B7,P0A5B8	16209,6	4	31,9
<i>Gallus gallus</i>	LYZ	P00698	16221	7	60,5

A ESI-QTOF MS elemzés után, az eluátumból azonosított fehérjék közül nem vettem figyelembe azokat, amik a blank eluátumban is benne voltak.

A Cfp30B (Cfp32, Tb27.3) szerepe egyelőre ismeretlen, de feltételezhetően egy bimoduláris glioxaláz, mely a *M. tuberculosis* komplexben konzervált, a tuberkulózis fertőzöttek köpetéből kimutatható. A köpetben jelen lévő Cfp32 mennyisége szoros összefüggést mutat az IL-10 szinttel, mely kapcsolat szerepet játszhat az aktív kórokozó patogenitásában [129].

Az Rv1261c fehérjéről ezidáig azt feltételezték, hogy segítségével a *M. tuberculosis* ellenáll a fagoszóma savas hatásának [130], de 2011 szeptemberében megjelent egy cikk, mely ezt bizonyítottan cáfolja [131].

Az LprA glikozilált lipoprotein TLR2 agonista, mely citokin választ indukál és a dendritikus sejtek illetve makrofágok APC funkcióját szabályozza [132].

A *M. tuberculosis* AcpM egy különleges ACP (acyl carrier protein), melynek fontos szerepe van abban, hogy nagyon hosszú láncú meromikolsavakat helyezzen át a FAS-II enzimrendszer különböző lipogén centrumaiba [133].

A PstS1 foszfát-kötő fehérjét kódoló gén mutációjával a *M. tuberculosis* foszfát felvétele elégtelenné válik és a mikobaktérium kevésbé virulens *in vivo* [134].

A *M. tuberculosis* koleszterint metabolizál a fertőzés során és ez a metabolizmus általában a korai stádiumban következik be. A HsaC vas-függő extradiol dioxigenáz kulcsfontosságú enzim a koleszterin katabolikus útvonalban, katalizálja a 3,4-dihidroxi-9,10-seco-androst-1,3,5(10)-trién-9,17-dion (DHSA) extradiol hasítását [135].

Az *atpD* gén az ATP szintáz β láncot kódolja, mely az ATP szintáz katalitikus egysége.

A *M. tuberculosis*-nak és *M. bovis*-nak is két Cpn60 (Cpn60.1 and Cpn60.2) chaperon fehérjéje van, melyek mennyisége megnő hő sokk [136], oxidatív stressz [137] illetve makrofág infekció [138] alatt. A Cpn60.1 (GroEL1), ellentétben a Cpn60.2 (GroEL2) fehérjével, nélkülözhető a mikobaktérium túléléséhez, viszont elengedhetetlen a sejtfal integritásának kialakításában [139].

Az azonosított fehérjék közül sajnos egyik sem tűnik létfontosságúnak a tuberkulózis baktérium túlélésénél, ezért felmerült bennünk a kérdés, hogy a VIC-14385 megfelelő vegyület-e célfehérjék azonosítására. A molekula hatását megvizsgálva más baktérium törzsön, feltűnt, hogy mindegyik esetben hasonló gátlást mutat, így lehet, hogy valamilyen okból nem szelektív.

A KinaTor™ során egy primer amin funkción keresztül kötődik a molekula a szilárd fázishoz. A teljes sejtes tesztelés során a primer amin bizonyos esetben befolyásolhatja a hatást, ezért megvizsgáltuk a VIC-14385 vegyület védett formáját is. Az acetilezett vegyület (VIC-25057) a teljes sejtes tesztelés eredményeképp veszített a hatásából (MIC=50 µM), ami magyarázhatja a KinaTor™ alkalmazásánál azonosított fehérjék felhozatalát.

6 Megbeszélés és Következtetések

Doktori munkám során főleg a célfehérje alapú hatóanyagfejlesztés során nélkülözhetetlen biokémiai tesztrendszerek fejlesztésével, beállításával foglalkoztam. Öt (PknA, PknB, PknG, NADK, NADS), a *M. tuberculosis* jelátvitelben szerepet játszó célfehérjére összpontosítottam. Az *in vitro* tesztelést a Vichem Kutató Kft közel 12 000 vegyületből álló, főleg eukarióta kinázokra kifejlesztett ATP kötőhelyen ható illetve allosztérikus vegyülettárán végeztem el. A biokémiai rendszerek optimalizálásához, majd a vegyületek teszteléséhez szükséges enzimek expresszálasát, tisztítását magam is elvégeztem.

A PknB radiometriás kináz módszer elsajátítása és alkalmazása során, közel 1 000 vegyületből számos nanomolos IC₅₀ értékkel rendelkező inhibitorot találtam, de sajnos egyik sem gátolta a *M. tuberculosis* baktérium növekedését, feltehetően a baktérium igen összetett és ellenálló sejtfalán való átjutás nehézsége miatt. További, hatékonyabb gátlók keresése céljából QSAR elemzést illetve *in silico* dokkolást is végeztünk. Mivel az eddig alkalmazott radiometriás módszer elég időigényes és speciális körülményeket igényel, ezért megpróbáltam beállítani a nem-radioaktív, MTS/HTS rendszerben is alkalmazható IMAP módszert. Az előállított peptidek közül egyik sem volt alkalmas szubsztrátként, így sajnos ezt a módszert nem tudtam alkalmazni PknB kináz tesztelésre. A virtuális tesztelésekből származtatott, hatékonynak vélt vegyületeket valamint a vegyészek által javasolt molekulákat végül, a rendszer megfelelő optimalizálása után, Transcreener[®] ADP² kináz technológiával teszteltem le. Az így kapott hit molekulák sem hatottak az *in vitro* sejtes vizsgálat során, *M. tuberculosis* patogénezen.

A 19 033 vegyület dokkolását elvégeztük PknG kináz esetében is. A PknB kináznál elszenvedett kudarcokhoz hasonlóan, ebben az esetben sem sikerült megfelelő peptid szubsztrátot találni az IMAP technológia beállításához, így később, a Transcreener[®] ADP² kináz módszer beállításával teszteltem le a vegyületeket. PknG kináz esetében sem sikerült biokémiai rendszerben olyan hatékony vegyületet találni, mely gátolta volna a *M. tuberculosis*-t, de mivel a PknG kináznak szerepet tulajdonítanak a fagoszóma-lizoszóma fúzió gátlásában, megvizsgáltunk néhány PknG gátlót fertőzött

makrofágon. A legeredményesebbnek a VIC-16315 molekula tűnt, mely 48 óra inkubálás után 40%-ban gátolta a telepképződést.

A PknA kináz esetében kristályszerkezet hiányában, nem végeztünk dokkolást, hanem a Vichem Kft. 1 000 diverz szerkezetű vegyületből álló EVL vegyülettárának tesztelésével szerettem volna inhibitorokat találni. A tesztelésnél a HTRF Transcreener ADP illetve a Transcreener[®] ADP² módszert alkalmaztam. Sajnos ebben az esetben sem sikerült olyan hit molekulát találni, mely sikeresen fejtette volna ki hatását a patogénnel szemben.

A NAD kináz és szintetáz célfehérjék esetében a kutatási munkát a dokkolással kezdtük. A hatékonyak vélt vegyületeket spektrofotometriás módszerrel tesztelték le a Piemontei Egyetemen. NAD kináz esetében egyik vegyület sem mutatott gátlást, míg a NAD szintetáznál számos inhibitor közül a VIC-15108 (IC₅₀=73 µM, MIC=50 µM) bizonyult a legjobbnak. A hit vegyületekre alapozva még 100 illetve 30 vegyületet teszteltek le NAD szintetázon a piemontei egyetem munkatársai, melyek közül a VIC-13268 (IC₅₀=3,5 µM, MIC=33 µM) és a VIC-12990 (IC₅₀=4 µM, MIC=26 µM) vegyületek bizonyultak a leghatékonyabbnak. Ezzel párhuzamosan megkezdtem a Transcreener NAD kináz illetve NAD szintetáz mérési módszerek beállítását, majd leteszteltem az EVL (~ 1 000 vegyület) vegyülettárat. NAD kináz esetén a molekulák még 98 µM koncentrációban sem gátolták az enzimet. Ezt magyarázza az a publikáció is, mely azt állítja, hogy NAD kináz esetében nem az ATP kötőhelyen ható vegyületek a sikeresek, hanem a NAD analógok. A cikkben közölt VIC-23779 NAD analóg előállításával, referencia vegyülettel is tudtam igazolni, hogy az általam beállított NADK Transcreener[®] ADP² FP módszer jól működik. A NAD szintetáz esetében számos hit vegyület született, melyek közül sajnos csak néhányat tudtunk *M. tuberculosis*-on is megvizsgálni.

A célfehérje alapú tesztelések eredményeképp elmondható, hogy habár számos vegyület kiemelkedő hatást mutatott a biokémiai tesztrendszerekben, egyik sem gátolta érdemleges módon a *M. tuberculosis* patogént teljes sejtes vizsgálatokban. Ez a tény talán azzal magyarázható, hogy a *M. tuberculosis* nehezen átjárható, igen ellenálló sejtfallal rendelkezik – ami egyébként az antituberkulotikus hatóanyagok fejlesztésének egyik legnagyobb problémája.

Erre a sajnálatos megállapításra alapozva úgy döntöttünk, hogy a vegyületek hatását közvetlenül sejtes tesztrendszerben fogjuk vizsgálni, így rögtön azokra a vegyületekre koncentrálva, amelyek képesek átjutni a sejtmembránon.

Doktori munkám második felében lehetőségem nyílt, hogy az svájci EPFL intézetben részt vegyek a *C. glutamicum* alapú teljes sejtes tesztelésben. Az ok, amiért ezt a baktérium törzset alkalmaztuk tesztrendszerként az volt, hogy nem fertőző, gyorsan szaporodik, kisebb a genomja és a *M. tuberculosis*-hoz hasonló sejtfallal rendelkezik. A tesztelés során a Vichem Kft. 12 000 vegyületből álló (NCL) vegyülettárát teszteltük le, és az így kapott hit vegyületek MIC értékét *M. tuberculosis* baktériumon határoztuk meg. Ezzel párhuzamosan a szűkített vegyülettárát (~ 1 000 molekula) közvetlenül a patogén baktériumon is leteszteltük.

Az így kapott 17 hit vegyület citotoxicitás és genotoxicitás vizsgálata után 3 vegyületet tartottunk érdemesnek a továbbfejlesztésre (VIC-9376, VIC-7777, VIC-18469).

Doktori értekezésemben csak a VIC-9376 (nitoquinoxalin) és VIC-18469 (benzoquinoxalin) vegyületekkel kapcsolatos méréseket tüntettem fel. Mindkét vegyület számos származékát leteszteltük. A VIC-9376 szerkezeti hasonlóságot mutat a Science folyóiratban közölt BTZ043 vegyülettel, így megvizsgáltuk, hogy ugyanazon célfehérjét gátolják-e. A különböző vad típusú és mutáns baktérium törzseken végzett vizsgálatok igazolták, hogy a VIC-9376 molekula is a DprE1 fehérjén keresztül fejt ki hatását.

Mind a VIC-9376 vegyület, mind a VIC-18469 molekula antibakteriális hatását vizsgáltuk különböző Gram-pozitív illetve Gram-negatív baktériumon.

A VIC-18469 vegyület távoli rokonságot mutat a malária terápiában alkalmazott klorfaziminnel, mely együttműködő partnerek kísérleteiben NDH-2 gátlóként is bevált. A VIC-18469 benzoquinoxalint és további három analógját NDH-2 biokémiai rendszerben letesztelve a VIC-12955 és a VIC-13202 vegyületek sikeres NDH-2 gátlóknak bizonyultak.

Célfehérje azonosítás céljából minden *M. tuberculosis* baktériumon gátlást mutató vegyületet leteszteltem az általam beállított biokémiai rendszerekben, valamint a Comenius Egyetem munkatársai PimA enzimen. A PimA tesztelés során öt vegyület több mint 90 %-ban gátolta a fehérjét 50 μ M-ban. A vegyületek a PknA, PknB, PknG, NADK és NADS enzimeket érdemlegesen nem gátolták.

M. tuberculosis célfehérje azonosításra alkalmaztam a KinaTor™ módszert is, amit eddig humán fehérjék esetében sikeresen használtak. Az eljárás során 8 említésre méltó fehérjét sikerült beazonosítani, de egyik sem játszik kulcsfontosságú szerepet a *M. tuberculosis* túlélésénél.

A sejtes tesztrendszerben beazonosított, szabadalmazott és gyógyszerfejlesztésre kiválasztott hatóanyagmolekulákat a továbbiakban az EPFL intézettel együttműködve fogjuk fejleszteni.

7 Összefoglalás

Doktori munkám során a *Mycobacterium tuberculosis* jelátvitelt gátló hatóanyagok fejlesztését tűztem ki célul. A célfehérje alapú hit vegyület keresésénél az eukarióta-szerű Ser/Thr PknA, PknB, PknG kinázokra valamint a NAD szintetázra és NAD kinázra összpontosítottam. Sikerült MTS/HTS rendszerben is alkalmazható biokémiai tesztrendszer beállítani a fent említett összes enzimre, melyeket referencia vegyületekkel validáltam. A vegyületeket a Vichem Kutató Kft., főleg eukarióta kinázokra kifejlesztett, ATP kötőhelyen ható, kis molekulákból álló vegyülettárából válogattam. A tesztelés során, a NADK fehérjén kívül, minden esetben hatékony hit vegyületeket azonosítottam, melyek hatását *M. tuberculosis*-on is vizsgáltuk. Sajnos egyik vegyület sem gátolta kiemelkedően a baktérium túlélését, ami azzal magyarázható, hogy a vegyületek nem jutnak át megfelelően a patogén vastag, hidrofób sejtfalán.

A célfehérje alapú hatóanyagfejlesztésnél átélt kudarcok arra ösztökéltek minket, hogy a teljes sejtes tesztelés alapján keressünk *M. tuberculosis* ellenes vegyületeket.

A 12 000 vegyületből álló vegyülettár tesztelését a hasonló sejtfalú, de nem patogén és kisebb genommal rendelkező *C. glutamicum*-on végeztük. A *C. glutamicum* növekedését gátló vegyületeket megvizsgáltuk *M. tuberculosis* bacilluson is. Ezzel párhuzamosan az EVL vegyülettárat leteszteltük közvetlenül *M. tuberculosis*-on. A 17 hit vegyület citotoxicitás és genotoxicitás vizsgálata után három vegyületet tartottunk érdemesnek további hatóanyagfejlesztésre.

A VIC-9376 és VIC-18469 vegyületek bakteriális hatását más Gram-pozitív ill. Gram-negatív törzsön is vizsgáltuk.

Igazoltuk, hogy a VIC-9376 vegyület a DprE1 fehérjét gátolja, hasonló módon, mint a korábban publikált BTZ043 vegyület.

A biokémiai mérésre alapozva igazoltuk, hogy a VIC-18469 két származéka is (VIC-13202, VIC-12955) gátolta a NDH-2 fehérjét.

Célfehérje azonosítás céljából a *M. tuberculosis* bacilluson hatékony vegyületeket az általam korábban beállított biokémiai rendszerekben is leteszteltem, valamint alkalmaztam az eddig humán célfehérje keresésénél használt KinaTor™ módszert is. Az eljárás során 8 említésre méltó fehérjét sikerült beazonosítani.

8 Summary

The aim of my Ph.D. work was the development of agents which inhibit the signaling of *Mycobacterium tuberculosis*. In the target-based drug development part I focused on the eukaryotic Ser/Thr PknA, PknB, PknG kinases and the NAD synthetase and NAD kinase. I achieved to optimize MTS/HTS biochemical assay systems for the previously mentioned enzymes, and those were validated with reference compound. In case of each target, except NADK, several potent inhibitors were identified and their effect was also checked on *M. tuberculosis*. Unfortunately none of the compounds inhibited the bacteria probably due to the complex, thick hydrophobic cell wall of the pathogen.

Looking for potent inhibitors against *M. tuberculosis* we tested the compounds directly in whole cell-based model.

We screened the 12,000 molecules containing NCL library of Vichem Ltd. on *C. glutamicum*, which has smaller genome and it is not pathogen. The MIC of the hit molecules was determined on *M. tuberculosis*. In parallel with this the small, diverse library (EVL) was directly tested on *M. tuberculosis*.

After the mutagenicity and cytotoxicity tests of the 17 inhibitors of the pathogen 3 compounds were selected for further development (VIC-9376, VIC-7777, VIC-18469), from which I only focus on the VIC-9376 (nitoquinoxaline) and VIC-18469 (benzoquinoxaline) molecules in my Ph.D. thesis. The effect of these compounds was also tested on different Gram-positive and negative bacterium strains.

We demonstrated that the VIC-9376 targets the DprE1 protein similarly to the antituberculotic BTZ043.

Based on biochemical assay results we demonstrated that two derivatives of VIC-18469 (VIC-13202, VIC-12955) inhibited the NDH-2 protein.

I tested the *M. tuberculosis* inhibitors in the already optimized biochemical assays to identify the targets and I also applied the KinTor™ method previously used in case of human kinases. Based on this technology I could identify 8 proteins.

9 Irodalomjegyzék

- 1 Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. (2002) Clinical practice. Latent tuberculosis infection, *N Engl J Med*, 347:1860-6.
- 2 <http://www.who.int/tdr/diseases/tb/diseaseinfo.htm> (2008-03-13)
- 3 WHO report 2011 - Global tuberculosis control http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (2011-11-29)
- 4 Strausz J, Csoma Zs, I, Kovács G, Nyári L, Ostoros Gy, Zsarnóczai I. (2011) A pulmonológiai hálózat 2010. évi statisztikai eredményei, *Korányi Bulletin* 2011. 1. <http://www.koranyi.hu/tartalom/bulletin/Evkonyv2010.pdf> (2011-11-30)
- 5 <http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium> (2010-11-25)
- 6 Niemann S, Rüsç-Gerdes S, Joloba ML, Whalen CC, Guwatudde D, Ellner JJ, Eisenach K, Fumokong N, Johnson JL, Aisu T, Mugerwa RD, Okwera A, Schwander SK. (2002) *Mycobacterium africanum* subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda, *J Clin Microbiol*, 40:3398-405.
- 7 Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Cunin P, Thonnon J, Sola C, Rastogi N, Vincent V, Gutierrez MC. (2003) Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon, *J Clin Microbiol*, 41:2547-53.
- 8 Thoen C, Lobue P, de Kantor I. (2006) The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis, *Vet Microbiol*, 112:339-45.
- 9 Pfyffer GE, Auckenthaler R, van Embden JD, van Soolingen D. (1998) *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa, *Emerg Infect Dis*, 4:631-4.
- 10 Niemann S, Richter E, Dalügge-Tamm H, Schlesinger H, Graupner D, Königstein B, Gurath G, Greinert U, Rüsç-Gerdes S. (2000) Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients, *Emerg Infect Dis*, 6:539-42.
- 11 Konstantinos A. (2010) Testing for tuberculosis, *Australian Prescriber*, 33:12-18.

-
- 12 Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Division of Tuberculosis Elimination. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. 4th edition (2000), <http://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/> (2010-03-01)
- 13 *Mycobacterium kansasii*, <http://emedicine.medscape.com/article/223230-overview> (2010-08-16)
- 14 *Mycobacterium avium-intracellulare*, <http://emedicine.medscape.com/article/222664-overview> (2010-08-16)
- 15 Wolinsky E. (1992) Mycobacterial diseases other than tuberculosis, Clin. Inf. Dis, 15:1-12.
- 16 Jindal N, Devi B, Aggarwal A. (2003) Mycobacterial cervical lymphadenitis in childhood, Indian J Med Sci, 57:12-5.
- 17 Maccallum P, Tolhurst JC, Buckle G, Sissons HA. (1948) A new mycobacterial infection in man, J Path Bact, 60:93-122.
- 18 *Mycobacterium fortuitum*, emedicine.medscape.com/article/222918-overview (2010-08-16)
- 19 Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ Jr, Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards LJ, Chakraborti S, Knowles MR. (2003) Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis, Am J Respir Crit Care Med, 167:828-34.
- 20 Ryan KJ, Ray CG. (2004) Sherris Medical Microbiology (4th ed.), McGraw Hill, pp. 451-3.
- 21 Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM, Ong KR, Kilburn JO, Dooley SW, Castro KG, Jarvis WR, Holmberg SD. (1992) An Outbreak of Multidrug-Resistant Tuberculosis among Hospitalized Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome, N Engl J Med, 326:1514-21.
- 22 Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB), 2010 GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE AND RESPONSE, http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf (2010-08-12)
- 23 Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): the facts http://www.stoptb.org/events/world_tb_day/2007/assets/documents/5.5%20XDR%20TB.pdf (2010-08-16)

-
- 24 Shah NS, Wright A, Bai GH, Barrera L, Boulahbal F, Martín-Casabona N, Drobniewski F, Gilpin C, Havelková M, Lepe R, Lumb R, Metchock B, Portaels F, Rodrigues MF, Rüsç-Gerdes S, Van Deun A, Vincent V, Laserson K, Wells C, Cegielski JP. (2007) Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis, *Emerg Infect Dis*, 13:380-7.
- 25 Emergence of XDR-TB, <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2006/np23/en/index.html> (2010-08-17)
- 26 Diagnosztikus és terápiás protokoll. Tüdőgyógyászati Szakmai Kollégium 2007. <http://www.koranyi.hu/modszertan/TBCprotokoll.htm> (2010. 12. 10)
- 27 Frieden, TR. (2005) Tuberculosis control: Critical lessons learnt, *Indian J. Med. Res*, 121:140-142.
- 28 Mascher T, Helmann JD, Uden G. (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases, *Microbiol Mol Biol Rev*, 70:910-38.
- 29 Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria, *Microbiol Rev*, 53:450-90.
- 30 Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. (2000) Two-component signal transduction, *Annu Rev Biochem*, 69:183-215.
- 31 Nixon BT, Ronson CW, Ausubel FM. (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:7850-4.
- 32 Chow KD, Ng D, Stokes R, Johnson P. (1994) Protein tyrosine phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*, *FEMS Microbiol Lett*, 124:203–207.
- 33 Av-Gay Y, and Davies J. (1997) Components of eukaryotic-like signaling pathways in *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbial Comp Genom*, 2:63–73.
- 34 Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature*, 393:537–544

-
- 35 Av-Gay Y, Everett M. (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*, Trends Microbiol, 8:238-44.
- 36 Wehenkel A, Bellinzoni M, Grana M, Duran R, Villarino A, Fernandez P, Andre-Leroux G, England P, Takiff H, Cervenansky C, Cole ST, Alzari PM. (2008) Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential, Biochim Biophys Acta; 1784:193-202.
- 37 Bellinzoni M. személyes közlemény
- 38 Fiuza M, Canova MJ, Zanella-Cléon I, Becchi M, Cozzone AJ, Mateos LM, Kremer L, Gil JA, Molle V. (2008) From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division, J Biol Chem,283:18099-112.
- 39 Schultz C, Niebisch A, Schwaiger A, Viets U, Metzger S, Bramkamp M, Bott M. (2009) Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases, Mol Microbiol, 74:724-41.
- 40 Fernandez P, Saint-Joanis B, Barilone N, Jackson M, Gicquel B, Cole ST, Alzari PM. (2006) The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth, J Bacteriol, 188:7778-84.
- 41 Scherr N, Honnappa S, Kunz G, Mueller P, Jayachandran R, Winkler F, Pieters J, Steinmetz MO. (2007) Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*, Proc Natl Acad Sci U S A, 104:12151-6.
- 42 Kruh NA, Troudt J, Izzo A, Prenni J, Dobos KM. (2010) Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome *in vivo*, PLoS One, 5:e13938.
- 43 Mészáros B, Tóth J, Vértessy BG, Dosztányi Z, Simon I. (2011) Proteins with complex architecture as potential targets for drug design: a case study of *Mycobacterium tuberculosis*, PLoS Comput Biol, 7:e1002118.
- 44 Kang CM, Abbott DW, Park ST, Dascher CC, Cantley LC, Husson RN. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape, Genes Dev, 19:1692-704.

-
- 45 Jani C, Eoh H, Lee JJ, Hamasha K, Sahana MB, Han JS, Nyayapathy S, Lee JY, Suh JW, Lee SH, Rehse SJ, Crick DC, Kang CM. (2010) Regulation of polar peptidoglycan biosynthesis by Wag31 phosphorylation in mycobacteria, *BMC Microbiol*, 10:327.
- 46 Sajid A, Arora G, Gupta M, Upadhyay S, Nandicoori VK, Singh Y. (2011) Phosphorylation of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr phosphatase by PknA and PknB, *PLoS One*, 6(3):e17871.
- 47 Villarino A, Duran R, Wehenkel A, Fernandez P, England P, Brodin P, Cole ST, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Cervenansky C, Alzari PM. (2005) Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions, *J Mol Biol*, 350:953-63.
- 48 O'Hare HM, Duran R, Cervenansky C, Bellinzoni M, Wehenkel AM, Pritsch O, Obal G, Baumgartner J, Vialaret J, Johnsson K, Alzari PM. (2008) Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria, *Mol Microbiol*, 70:1408-23.
- 49 Cowley S, Ko M, Pick N, Chow R, Downing KJ, Gordhan BG, Betts JC, Mizrahi V, Smith DA, Stokes RW, Av-Gay Y. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth *in vivo*, *Mol Microbiol*, 52:1691-702.
- 50 Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, Klebl B, Thompson C, Bacher G, Pieters J. (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages, *Science*, 304:1800-4.
- 51 Scherr N, Muller P, Perisa D, Combaluzier B, Jenö P, Pieters J. (2009) Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G, *J Bacteriol*, 191:4546-54.
- 52 Chaurasiya SK, Srivastava KK. (2009) Downregulation of protein kinase C- α enhances intracellular survival of Mycobacteria: role of PknG, *BMC Microbiol*, 9:271.
- 53 Sasseti ChM, Boyd DH, Rubin EJ. (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis, *Molecular Microbiology*, 48:77-84.
- 54 Gerdes SY, Scholle MD, D'Souza M, Bernal A, Baev MV, Farrell M, Kurnasov OV, Daugherty MD, Mseeh F, Polanuyer BM, Campbell JW, Anantha S, Shatalin KY, Chowdhury SA, Fonstein MY, Osterman AL. (2002) From genetic footprinting to

antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways, *J Bacteriol*, 184:4555–4572.

55 Magni G, Di Stefano M, Orsomando G, Raffaelli N, Ruggieri S. (2009) NAD(P) biosynthesis enzymes as potential targets for selective drug design, *Curr Med Chem.*, 16:1372-90. Review.

56 Ziegler M. (2000) New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signalling, *Eur J Biochem.*, 267:1550–1564.

57 Berger F, Ramirez-Hernandez MH, Ziegler M. (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P), *Trends Biochem Sci*, 26:111–118.

58 Denu, JM. (2003) Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases, *Trends Biochem Sci*, 28:41–48.

59 Nessi C, Albertini AM, Speranza ML, Galizzi AJ. (1995) The outB gene of *Bacillus subtilis* codes for NAD synthetase, *Biol Chem*, 270:6181–6185.

60 Foster JW, Moat AG. (1980) Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Pyridine Nucleotide Cycle Metabolism in Microbial Systems, *Microbiol Rev*, 44:83–105.

61 Bekierkunst A. (1966) Nicotinamide-adenine dinucleotide in tubercle bacilli exposed to isoniazid, *Science*, 52:525–526.

62 Magni G, Orsomando G, Raffaelli N. (2006) Structural and functional properties of NAD kinase, a key enzyme in NADP biosynthesis, *Mini Rev Med. Chem*, 6:739–746.

63 Kawai S, Mori S, Mukai T, Suzuki S, Yamada T, Hashimoto W, Murata K. (2000) Inorganic Polyphosphate/ATP-NAD Kinase of *Micrococcus flavus* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Biochem Biophys Res Commun*, 276, 57–63.

64 Raffaelli N, Finaurini L, Mazzola F, Pucci L, Sorci L, Amici A, Magni G. (2004) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* NAD kinase: functional analysis of the full-length enzyme by site-directed mutagenesis, *Biochemistry*, 43:7610–7617.

65 Lerner F, Niere M, Ludwig A, Ziegler M. (2001) Structural and Functional Characterization of Human NAD Kinase, *Biochem Biophys Res Commun*, 288:69–74.

66 Garavaglia S, Raffaelli N, Finaurini L, Magni G, Rizzi M. (2004) A novel fold revealed by *Mycobacterium tuberculosis* NAD kinase, a key allosteric enzyme in NADP biosynthesis, *J Biol Chem*, 279:40980–40986.

-
- 67 Mori S, Yamasakib M, Maruyamaa Y, Mommaa K, Kawaia S, Hashimotoa W, Mikamib B, Murataa K. (2005) NAD-binding mode and the significance of intersubunit contact revealed by the crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* NAD kinase–NAD complex, *Biochem Biophys Res Commun*, 327:500–508.
- 68 Magni G, Di Stefano M, Orsomando G, Raffaelli N, Ruggieri S. (2009) NAD(P) Biosynthesis Enzymes as Potential Targets for Selective Drug Design, *Curr Med Chem*, 16:1672-1390.
- 69 Rizzi M, Schindelin H. (2002) Structural biology of enzymes involved in NAD and molybdenum cofactor biosynthesis, *Curr Opin Struct Biol*, 12:709–720.
- 70 Melo AM, Bandejas TM, Teixeira M. (2004) New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases, *Microbiol Mol Biol Rev*, 68:603-16.
- 71 Rao SP, Alonso S, Rand L, Dick T, Pethe K. (2008) The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:11945-50.
- 72 Teh JS, Yano T, Rubin H. (2007) Type II NADH: menaquinone oxidoreductase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect Disord Drug Targets*, 7:169-81.
- 73 Weinstein EA, Yano T, Li LS, Avarbock D, Avarbock A, Helm D, McColm AA, Duncan K, Lonsdale JT, Rubin H. (2005) Inhibitors of type II NADH:menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:4548-53.
- 74 Boshoff HI, Barry CE 3rd. (2005) Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth, *Nat Rev Microbiol*, 3:70-80.
- 75 Mikusová K, Huang H, Yagi T, Holsters M, Vereecke D, D'Haese W, Scherman MS, Brennan PJ, McNeil MR, Crick DC. (2005) Decaprenylphosphoryl arabinofuranose, the donor of the D-arabinofuranosyl residues of mycobacterial arabinan, is formed via a two-step epimerization of decaprenylphosphoryl ribose, *J Bacteriol*, 187:8020-5.
- 76 Wolucka BA. (2008) Biosynthesis of D-arabinose in mycobacteria - a novel bacterial pathway with implications for antimycobacterial therapy, *FEBS J*, 275:2691-711.
- 77 Makarov V, Manina G, Mikusova K, Mollmann U, Ryabova O, Saint-Joanis B, Dhar N, Pasca MR, Buroni S, Lucarelli AP, Milano A, De Rossi E, Belanova M, Bobovska A, Dianiskova P, Kordulakova J, Sala C, Fullam E, Schneider P, McKinney JD, Brodin P, Christophe T, Waddell S, Butcher P, Albrethsen J, Rosenkrands I, Brosch R, Nandi

V, Bharath S, Gaonkar S, Shandil RK, Balasubramanian V, Balganesht T, Tyagi S, Grosset J, Riccardi G, Cole ST. (2009) Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis, *Science*, 324:801-4.

78 Guerin ME, Kordulakova J, Schaeffer F, Svetlikova Z, Buschiazzo A, Giganti D, Gicquel B, Mikusova K, Jackson M, Alzari PM. (2007) Molecular recognition and interfacial catalysis by the essential phosphatidylinositol mannosyltransferase PimA from mycobacteria, *J Biol Chem*, 282:20705-14.

79 Guerin ME, Korduláková J, Alzari PM, Brennan PJ, Jackson M. (2010) Molecular basis of phosphatidyl-myo-inositol mannoside biosynthesis and regulation in mycobacteria, *J Biol Chem*, 285:33577-83. Review.

80 Guerin ME, Schaeffer F, Chaffotte A, Gest P, Giganti D, Korduláková J, van der Woerd M, Jackson M, Alzari PM. (2009) Substrate-induced Conformational Changes in the Essential Peripheral Membrane-associated Mannosyltransferase PimA from Mycobacteria, *J Biol Chem*, 284:21613-25.

81 Boitel B, Ortiz-Lombardia M, Duran R, Pompeo F, Cole ST, Cervenansky C, Alzari PM. (2003) PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol Microbiol*, 49:1493-508.

82 Bellinzoni M, De Rossi E, Branzoni M, Milano A, Peverali FA, Rizzi M, Riccardi G. (2002) Heterologous expression, purification, and enzymatic activity of *Mycobacterium tuberculosis* NAD(+) synthetase, *Protein Expr Purif*, 25:547-557.

83 Raffaelli N, Finaurini L, Mazzola F, Pucci L, Sorci L, Amici A, Magni G. (2004) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* NAD kinase: functional analysis of the full-length enzyme by site-directed mutagenesis, *Biochemistry*, 43:7610-7617.

84 http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_r0571.pdf

85 Székely R, Wączek F, Szabadkai I, Németh G, Hegymegi-Barakonyi B, Eros D, Szokol B, Pató J, Hafenbradl D, Satchell J, Saint-Joanis B, Cole ST, Orfi L, Klebl BM, Kéri G. (2008) A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signalling, *Immunol Lett*, 116:225-31.

86 http://www.moleculardevices.com/pages/reagents/imap_intro.html

87 http://www.htrf.com/products/kinase_oncology/transcreener/#assay_principle

88 http://www.bellbrooklabs.com/PDFs/Tech%20Man_AD2%20FP%20EZ_

v073009.pdf

89 http://www.bellbrooklabs.com/PDFs/Tech%20Man_AMPGMP_v051908.pdf

90 Szántai-Kis Cs, Kövesdi I, Eros D, Bánhegyi P, Ullrich A, Kéri G, Orfi L. (2006) Prediction oriented QSAR modelling of EGFR inhibition, *Curr Med Chem*, 13:277-87.

91 Kövesdi I, Kéri Gy, Órfi L. Method for generating a quantitative structure property activity relationship. US20040199334

92 Hegyemegi-Barakonyi B, Székely R, Varga Z, Kiss R, Borbély G, Németh G, Bánhegyi P, Pató J, Greff Z, Horváth Z, Mészáros G, Marosfalvi J, Erős D, Szántai-Kis C, Breza N, Garavaglia S, Perozzi S, Rizzi M, Hafenbradl D, Ko M, Av-Gay Y, Klebl BM, Orfi L, Kéri G. (2008) Signalling inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*--early days of a new therapeutic concept in tuberculosis, *Curr Med Chem*, 15:2760-70.

93 Makarov V, Manina G, Mikusova K, Mollmann U, Ryabova O, Saint-Joanis B, Dhar N, Pasca MR, Buroni S, Lucarelli AP, Milano A, De Rossi E, Belanova M, Bobovska A, Dianiskova P, Kordulakova J, Sala C, Fullam E, Schneider P, McKinney JD, Brodin P, Christophe T, Waddell S, Butcher P, Albrethsen J, Rosenkrands I, Brosch R, Nandi V, Bharath S, Gaonkar S, Shandil RK, Balasubramanian V, Balganesht T, Tyagi S, Grosset J, Riccardi G, Cole ST. (2009) Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis, *Science*, 324:801-4.

94 Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother*, 46:2720-2.

95 Quillardet P, Huisman O, D'Ari R, Hofnung M. (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79:5971-5.

96 Wissing J, Godl K, Brehmer D, Blencke S, Weber M, Habenberger P, Stein-Gerlach M, Missio A, Cotten M, Müller S, Daub H. (2004) Chemical proteomic analysis reveals alternative modes of action for pyrido[2,3-d]pyrimidine kinase inhibitors, *Mol Cell Proteomics*, 3:1181-93.

97 Wessel D, Flügge UI. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal Biochem*, 138:141-3.

-
- 98 Young TA, Delagoutte B, Endrizzi JA, Falick AM, Alber T. (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases, *Nat Struct Biol*, 10:168-74.
- 99 Wehenkel A, Fernandez P, Bellinzoni M, Catherinot V, Barilone N, Labesse G, Jackson M, Alzari PM. (2006) The structure of PknB in complex with mitoxantrone, an ATP-competitive inhibitor, suggests a mode of protein kinase regulation in mycobacteria, *FEBS Lett*, 580:3018-22.
- 100 Ortiz-Lombardía M, Pompeo F, Boitel B, Alzari PM. (2003) Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J Biol Chem*, 278:13094-100.
- 101 Zhang J-H, Chung TDY, Oledenburg KR. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*, 4: 67-73
- 102 Kang CM, Abbott DW, Park ST, Dascher CC, Cantley LC, Husson RN. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape, *Genes Dev*, 19:1692-704.
- 103 Wehenkel A, Fernandez P, Bellinzoni M, Catherinot V, Barilone N, Labesse G, Jackson M, Alzari PM. (2006) The structure of PknB in complex with mitoxantrone, an ATP-competitive inhibitor, suggests a mode of protein kinase regulation in mycobacteria, *FEBS Lett*, 580:3018-22.
- 104 Scherr N, Honnappa S, Kunz G, Mueller P, Jayachandran R, Winkler F, Pieters J, Steinmetz MO. (2007) Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:12151-6.
- 105 Klebl B. személyes közlemény
- 106 Scherr N, Müller P, Perisa D, Combaluzier B, Jenö P, Pieters J. (2009) Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G, *J Bacteriol*, 191:4546-54.
- 107 Niebisch A, Kabus A, Schultz C, Weil B, Bott M. (2006) Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein, *J Biol Chem*, 281:12300–12307.

108 Székely R, Wączek F, Szabadkai I, Németh G, Hegymegi-Barakonyi B, Eros D, Szokol B, Pató J, Hafenbradl D, Satchell J, Saint-Joanis B, Cole ST, Orfi L, Klebl BM, Kéri G. (2008) A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signalling, *Immunol Lett*, 116:225-31.

109 Mori S, Yamasaki M, Maruyama Y, Momma K, Kawai S, Hashimoto W, Mikami B, Murata K. (2005) NAD-binding mode and the significance of intersubunit contact revealed by the crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* NAD kinase-NAD complex, *Biochem Biophys Res Commun*, 327:500-8.

110 Petrelli R, Sham YY, Chen L, Felczak K, Bennett E, Wilson D, Aldrich C, Yu JS, Cappellacci L, Franchetti P, Grifantini M, Mazzola F, Di Stefano M, Magni G, Pankiewicz KW. (2009) Selective inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide kinases by dinucleoside disulfide mimics of nicotinamide adenine dinucleotide analogues, *Bioorg Med Chem*, 17:5656-64.

111 Rizzi M, Nessi C, Mattevi A, Coda A, Bolognesi M, Galizzi A. (1996) Crystal structure of NH₃-dependent NAD⁺ synthetase from *Bacillus subtilis*, *EMBO J*, 15:5125-34.

112 Velu SE, Cristofoli WA, Garcia GJ, Brouillette CG, Pierson MC, Luan CH, DeLucas LJ, Brouillette WJ. (2003) Tethered dimers as NAD synthetase inhibitors with antibacterial activity, *J Med Chem*, 46:3371-81.

113 Moro WB, Yang Z, Kane TA, Brouillette CG, Brouillette WJ. (2009) Virtual screening to identify lead inhibitors for bacterial NAD synthetase (NADs), *Bioorg Med Chem Lett*, 19:2001-5.

114 Moro WB, Yang Z, Kane TA, Zhou Q, Harville S, Brouillette CG, Brouillette WJ. (2009) SAR studies for a new class of antibacterial NAD biosynthesis inhibitors, *J Comb Chem*, 11:617-25.

115 Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery, *Nat Rev Drug Discov*, 6:29-40.

116 Balganesh TS, Alzari PM, Cole ST. (2008) Rising standards for tuberculosis drug development, *Trends Pharmacol Sci*, 29:576-81.

117 Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, Kawasaki M, Tsubouchi H, Sasaki H, Shimokawa Y, Komatsu M. (2006) OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole

derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice, PLoS Med, 3:e466.

118 Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Gohlmann HW, Neefs JM, Winkler H, Van Gestel J, Timmerman P, Zhu M, Lee E, Williams P, de Chaffoy D, Huitric E, Hoffner S, Cambau E,

Truffot-Pernot C, Lounis N, Jarlier V. (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*, Science, 307:223-7.

119 Stover CK, Warrener P, VanDevanter DR, Sherman DR, Arain TM, Langhorne MH, Anderson SW, Towell JA, Yuan Y, McMurray DN, Kreiswirth BN, Barry CE, Baker WR. (200) A small molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis, Nature, 405:962-6.

120 Protopopova M, Hanrahan C, Nikonenko B, Samala R, Chen P, Gearhart J, Einck L, Nancy CA. (2005) Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines, J Antimicrob Chemother, 56:968-74.

121 Rivers EC, Mancera RL. (2008) New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action, Drug Discov Today, 13:1090-8.

122 Ananthan S, Faaleolea ER, Goldman RC, Hobrath JV, Kwong CD, Laughon BE, Maddry JA, Mehta A, Rasmussen L, Reynolds RC, Secrist JA, 3rd, Shindo N, Showe DN, Sosa MI, Suling WJ, White EL. (2009) High-throughput screening for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, Tuberculosis (Edinb), 89:334-53.

123 Dover LG, Cerdeno-Tarraga AM, Pallen MJ, Parkhill J, Besra GS. (2004) Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*, FEMS Microbiol Rev, 28:225-50.

124 http://en.wikipedia.org/wiki/Clofazimine#cite_note-ReferenceA-0 (2011-02-22)

125 Paul B. személyes közlemény

126 Svetlíková Z. személyes közlemény

127 Godl K, Gruss OJ, Eickhoff J, Wissing J, Blencke S, Weber M, Degen H, Brehmer D, Orfi L, Horváth Z, Kéri G, Müller S, Cotten M, Ullrich A, Daub H. (2005) Proteomic characterization of the angiogenesis inhibitor SU6668 reveals multiple impacts on cellular kinase signaling, Cancer Res, 65:6919-26.

128 Wissing J, Jansch L, Nimtz M, Dieterich G, Hornberger R, Kéri G, Wehland J, Daub H. (2007) Proteomics analysis of protein kinases by target class-selective prefractionation and tandem mass spectrometry, *Mol Cell Proteomics*, 6:537-47.

129 Huard RC, Chitale S, Leung M, Lazzarini LC, Zhu H, Shashkina E, Laal S, Conde MB, Kritski AL, Belisle JT, Kreiswirth BN, Lapa e Silva JR, Ho JL. (2003) The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene *cfp32* encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10, *Infect Immun*, 71:6871-83.

130 Vandal OH, Roberts JA, Odaira T, Schnappinger D, Nathan CF, Ehrt S. (2009) Acid-susceptible mutants of *Mycobacterium tuberculosis* share hypersusceptibility to cell wall and oxidative stress and to the host environment, *J Bacteriol*, 191:625-31.

131 Darby CM, Venugopal A, Ehrt S, Nathan CF. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* gene *Rv2136c* is dispensable for acid resistance and virulence in mice, *Tuberculosis*, 91:343-7.

132 Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. (2006) *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function, *J Immunol*, 177:422-9.

133 Kremer L, Nampoothiri KM, Lesjean S, Dover LG, Graham S, Betts J, Brennan PJ, Minnikin DE, Locht C, Besra GS. (2001) Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonyl-CoA:AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II, *J Biol Chem*, 276:27967-74.

134 Peirs P, Lefèvre P, Boarbi S, Wang XM, Denis O, Braibant M, Pethe K, Locht C, Huygen K, Content J. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced *in vivo* virulence, *Infect Immun*, 73:1898-902.

135 Yam KC, D'Angelo I, Kalscheuer R, Zhu H, Wang JX, Snieckus V, Ly LH, Converse PJ, Jacobs WR Jr, Strynadka N, Eltis LD. (2009) Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS Pathog*, 5:e1000344.

-
- 136 Stewart GR, Wernisch L, Stabler R, Mangan JA, Hinds J, Laing KG, Young DB, Butcher PD. (2002) Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays, *Microbiology*, 148:3129-38.
- 137 Dosanjh NS, Rawat M, Chung JH, Av-Gay Y. (2005) Thiol specific oxidative stress response in Mycobacteria, *FEMS Microbiol Lett*, 249:87-94.
- 138 Monahan IM, Betts J, Banerjee DK, Butcher PD. (2001) Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages, *Microbiology*, 147:459-71.
- 139 Wang XM, Lu C, Soetaert K, S'heeren C, Peirs P, Lanéelle MA, Lefèvre P, Bifani P, Content J, Daffé M, Huygen K, De Bruyn J, Wattiez R. (2011) Biochemical and immunological characterization of a *cpn60.1* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* BCG, *Microbiology*, 157:1205-19.

10 Saját publikációk jegyzéke

Tudományos közlemények:

- Székely R, Wácsek F, Szabadkai I, Németh G, Hegymegi-Barakonyi B, Erős D, Szokol B, Pató J, Hafenbradl D, Satchell J, Saint-Joanis B, Cole ST, Órfi L, Klebl BM, Kéri G. A Novel Drug Discovery Concept for Tuberculosis: Inhibition of Bacterial and Host cell Signalling. *Immunology Letters* 116:225–231, (2008) (IF: 2,858; független hivatkozás: 19)
- B. Hegymegi-Barakonyi, R. Székely, Z. Varga, R. Kiss, G. Borbély, G. Németh, P. Bánhegyi, J. Pató, Z. Greff, Z. Horváth, G. Mészáros, J. Marosfalvi, D. Erős, C. Szántai-Kis, S. Garavaglia, S. Perozzi, M. Rizzi, D. Hafenbradl, M. Ko, Y. Av-Gay, B.M. Klebl, L. Órfi, G. Kéri. Signalling inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* – early days of a new therapeutic concept in tuberculosis. *Curr. Med. Chem.*, 15:2760-2770, (2008) (IF: 4,823; független hivatkozás: 19)
- Magnet S*, Hartkoorn RC*, Székely R*, Pató J, Triccas JA, Schneider P, Szántai-Kis C, Órfi L, Chambon M, Banfi D, Bueno M, Turcatti G, Kéri G, Cole ST. Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens. *Tuberculosis.*, 90:354-60. (2010) (*első szerzők; IF: 2,65, független hivatkozás: 2)

Szabadalom:

- S. Cole, R. Hartkoorn, S. Magnet, J. Pató, Gy. Kéri, L. Órfi, P. Bánhegyi, R. Székely. Quinoxaline derivatives and their use for the treatment of mycobacterial infections (2010) P1000356

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Kéri Györgynek, amiért lehetőséget adott, hogy doktori tanulmányaimat a Vichem Kutató Kft.-ben végezhessem, valamint munkám során hasznos tanácsokkal látott el. Hálás vagyok, amiért lehetővé tette, hogy két nemzetközi pályázat keretében is külföldi szakmai tapasztalattal bővíthessem tudásomat.

Köszönöm Dr. Órfi Lászlónak a gyógyszerkémia területén nyújtott segítséget és tanácsokat.

Köszönettel tartozom Szántai-Kis Csabának, hogy a közösen eltöltött évek során bevezetett a hatóanyagtesztelés rejtjelmeibe és bármikor kérdeztem, mindig segítségemre volt.

Köszönöm a Vichem Kutató Kft. összes dolgozójának a segítséget, kiváltképp Dr. Pató Jánosnak és Dr. Erős Dánielnek a kémiában nyújtott eredményes munkát, és Hegyemegi Barakonyi Bálintnak valamint Dr. Szegedi Zsoltnak a QSAR vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Breza Nórának, Sipos Annának, Borbély Gábornak, Bránné Németh Beatrixnek és dr. Benzce Gyulának az évek alatt biztosított vidám hangulatot.

Szeretném megköszönni az MTA Pathobiokémiai Kutatócsoport munkatársainak, hogy doktori tanulmányaim első éveiben szakmailag és emberileg is mellettem álltak és azóta is a csoport tagjaként tekintenek rám.

Köszönöm az NM4TB pályázat keretében:

- Prof. Pedro Alzari-nak, Dr. Ricardo Biondi-nak, Dr. Marco Bellinzoni-nak és Dr. Jacquelin Satchell-nek, hogy a Pasteur Intézetben töltött 6 hét alatt eltanulhattam a radiometriás PknB kináz mérési módszert és segítségemre voltak a vegyületek tesztelése során.
- Prof. Kai Johnson-nak, Dr. Helen O'Hare-nak és Dr. Simone Schmidt-nek, amiért lehetővé tették, hogy elsajátítsam a PknB, PknG és GarA fehérjék előállítását az École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) intézetben.
- az EPFL intézet professzorának és a Global Health Institute igazgatójának, Stewart Cole-nak, amiért két alkalommal is vendégül látott laboratóriumában és így részt vehettem a PknA kináz tesztelésben és a *C. glutamicum* teljes sejtes vizsgálatban. Valamint munkatársainak, Dr. Sophie Magnet-nek, Dr. James Anthony Triccas-nak, Dr. Ruben Hartkoorn-nak és Patricia Schneider-nek a teljes sejtes tesztelésben, citotoxicitás és genotoxicitás meghatározásban nyújtott munkát.

- Katarína Mikusová-nak és Zuzana Svetlíková-nak (Comenius University) a PimA tesztelés eredményeit, valamint Prof. Balganesh Tanjore-nak és Dr. Beena Paul-nak az NDH-2 tesztelés eredményeit.

Köszönöm a TB-DRUG pályázat keretében:

- Prof. Menico Rizzi-nek és Dr. Silvia Garavaglia-nak, a piemontei egyetemen, hogy a NADK és NADS spekrofotometriás tesztelés eredményeivel, valamint a NADK és NADS enzimekkel hozzájárultak doktori munkámhoz.
- Prof. Peter Sander-nek (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Zürich) a teljes sejtes tesztelés eredményét.

Köszönöm Dr. Lengyel Józsefnek a SOTE NET Központi Izotóp Labor vezetőjének, hogy radiometriás kísérleteimet laborjában végezhettem.

Köszönöm Prof. Vértessy Beátának, hogy az Enzimológiai Intézetben helyet adott, hogy a fehérjék expresszálasát és tisztítását itthon is elvégezhessem, melynél Zagyva Imre és Sipos Anna nagy segítségemre volt.

Köszönöm Dr. Kiss Róbertnek a dokkolásban nyújtott munkát.

Köszönettel tartozom Prof. Yossef Av-Gay-nak (University of British Columbia) a fertőzött makrofág tesztelésért.

Köszönöm a Proteros biostructures GmbH-nak a szelektivitás vizsgálat eredményeit.

Köszönöm a KÉKI dolgozóinak, kiemelten Dr. Szamos Jenőnek és Háderné Sólyom Katalinnak, valamint Dr. Janáky Tamásnak (SZTE, Orvosi Vegytani Intézet) a 2D gélelektroforézis során nyújtott segítséget, valamint az ESI-QTOF elemzés eredményeit.

Köszönöm az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoporton belül, Dr. Mező Gábornak, Dr. Bai Katalinnak és Dr. Szabó Ildikónak a peptid szubsztrátok szintézisét.

Külön köszönöm családomnak és barátaimnak azt a felbecsülhetetlen türelmet, biztatást, és támogatást, mellyel mindvégig mellettem álltak és biztosították a kiegyensúlyozott háttérrel, hogy ez a munka létrejöjjön.