

Chiptechnológia a gyógyszerkutatásban

PUSKÁS László G.

MTA, Szegedi Biológiai Központ, Funkcionális Genomika Laboratórium, Szeged, Temesvári krt. 62.

Összefoglalás

A gyógyszerkutatások során olyan gyógyszer-jellegű kismolekulákat próbálnak azonosítani, amelyek specifikus kölcsönhatásba lépnek különböző, betegséget meghatározó célfehérjékkel. A hagyományos megközelítések mellett egyre fontosabbak az olyan új módszerek, amelyek átfogó globális szűrőmódszerekkel dolgoznak, mint amilyen a kismolekula-, DNS- és fehérje-chip technológia. Ezekkel a módszerekkel nem csak a hatóanyagok nagy áteresztőképességű szűrésére nyílik mód, hanem a hatóanyagok mechanizmusának, esetleges mellékhatásainak korai azonosítására is felhasználhatók. Gyógyszerhatóanyagok hatásának felderítésére a DNS- és fehérje-chip technika olyan esetekben lehet nagyon hasznos, amikor a potenciális gyógyszermolekula hatásmechanizmusát vagy molekuláris célpontjait nem ismerjük. A chipmódszereknél nagy előny, hogy néhány kísérletben nem csak néhány, gyanúsítható célmolekula mennyiségi vagy minőségi változása határozható meg, hanem elvileg lehetőség van több ezer fehérje vagy akár a teljes génállomány változásainak detektálása is. Így olyan információ halmazhoz jutunk, amely az eddigi módszerekkel nem volt lehetséges. Ennek a forradalmi technológiának a létrejöttét a miniatürizálás, a robot-technika és az informatika fejlődése tette lehetővé.

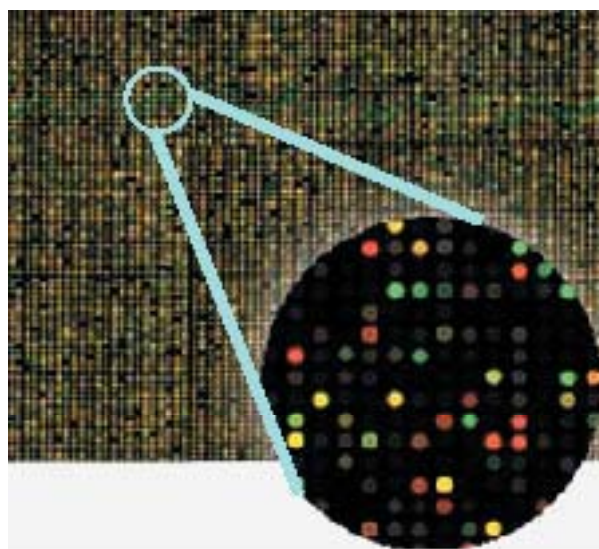
Ebben a cikkben röviden megemlítjük a DNS- és fehérje-chip technológia lényegi elemeit. Az egyik legmodernebb módszerről, a kémiai-chiptechnológiáról is beszámolunk, elsősorban a gyógyszerkutatásban betöltött és a jövőben betöltendő szerepéről.

I. DNS-chip technológia

A humán genom projekt keretében ma már korlátlan hozzáférési lehetőség van a gének szekvenciáit és lokalizációját tartalmazó adatbázisokhoz, nagyban segítve ezzel a kromoszóma rendellenességek felderítését, a génexpressziós mintázat szisztematikus meghatározását, mely nemcsak a sejtek normális működésének megértése szempontjából nagyon fontos, hanem hozzájárul olyan új gének azonosításához, melyek adott betegségszoptra markerként jellemzőek és terápiás szempontból potenciális gyógyszer-célpontok lehetnek. A huszadik század második feléig a gének funkciójának és szabályozásának tanulmányozása egyedi gének lépésről lépésre történő vizsgálatán alapult. Tekintve, hogy egyre több organizmus genomjának szekvenciája vált és válik teljesen vagy részlegesen ismertté, számos új technika fejlődött ki, melyek a génfunkciók szisztematikus analizisét teszik lehetővé. A technikák közül egyik nagykapacitású, könnyen automatizálható módszere a DNS-chip technológia, mely forradalmasította a molekuláris biológiát, a funkcionális

genomikát és napjainkban a klinikai diagnosztikai módszereket is [1-3].

A DNS-chip egy olyan meghatározott mintázatban felvitt és kihorgonyozott nagy számú (100-1.000.000) kölcsönható DNS mintát tartalmazó szilárd hordozó (legtöbbször üveg, de lehet arany, vagy speciális műanyag felület is), amely a hibridizálás során (az egyszálú DNS komplementer szakaszok specifikus kölcsönhatásából adódó kettős szál képződés) alkalmas adott biológiai mintából kinyert DNS vagy RNS mennyiségi jellemzésére (1. ábra). Minden egyes kölcsönható minta egy génre vagy DNS szakaszra specifikus, amelynek pozícióját ismerjük a szilárd felületen.



1. Ábra. A DNS-chipen több ezer (akár százezer) különböző gén aktivitását is nyomon tudjuk követni. Minden egyes pont egy génre jellemző szekvenciát tartalmaz. A biológiai mintából kinyert, majd fluoreszcensen megjelölt RNS a gén aktivitásával arányos fluoreszcens jelet ad.

Két (gyógyszerrel kezelt illetve kezeletlen kontroll) mintából származó RNS két spektrális tulajdonságaiban eltérő fluoreszcens festékkel jelölhető, amelyeket egy DNS-chipen hibridizálva, majd egy nagyfelbontású lézerszenkeneres leolvasás után meghatározhatók az egyes gének relatív kifejeződése. A gén aktivitása az adott pontban detektálható fluoreszcens jel intenzitásával arányos. Ha egy pontban a kezelt mintából származó fluoreszcens jel erősebb, az azt jelenti, hogy a kezelés hatására az adott gén aktivitása megemelkedett. Ha történetesen az a gén egy olyan májban kifejeződő gén, amely a toxikus anyagok lebontásáért felelős fehérjét kódol, akkor nagy valószínűség szerint a gyógyszerhatóanyag toxikus mellékhatású is.

II. Fehérje-chip technológia

Az emberi genomot alkotó mintegy 30.000 fehérjét expresszáló gén közül csak egy relatíve kisebb alcsoport jöhet számításba terápiás alkalmazás céljából. A hatóanyagokkal megcélozható géntermékek számos esetben nem várt és kivételes lehetőséget nyújtanak a kutatóknak betegségek kiváltó okainak tanulmányozására. Ebbe az alcsoportba kb. 3000 olyan fehérje tartozik, amelyek gyógyszerhatóanyagszerű kismolekulákkal (molekulatömeg < 500, közepesen lipofil) kölcsönhatásba képesek lépni. Másfelől, nagyszámú "knock-out" egereken végzett kísérletek alapján jelenleg kb. 3000-re becsüljük az olyan gének számát, amelyek valamilyen káros folyamat kialakulásával hozhatók kapcsolatba [4]. A két csoport közös része képviseli azt a körülbelül 600-1500 fehérjéből álló csoportot, amely gyógyszerhatóanyagok számára célpont lehet, azaz célfehérjének (targetnek) tekinthető. Egy közelmúltban közölt felmérés szerint a mostanáig azonosított célfehérjék száma mindössze 500-ra tehető [5].

A DNS-chip technológiával hasonló módon készülnek el a fehérje-chipek, azzal a különbséggel, hogy a lecseppentett pontokban nem kölcsönható DNS molekulák, hanem fehérjékkel specifikus kölcsönhatásba lépő (általában) antitestek vannak kihorgonyozva. A biológiai mintából nem RNS-t vagy DNS-t vonunk ki, hanem fehérjét, amelyet szintén fluoreszcens festékkel jelölünk, majd a fehérje-chip felületén inkubáljuk a jelölt fehérjék elegyét. A detektálás szintén a DNS-chipeknél már említett lézerszkenneres leolvasás, amelyet az intenzitásértékek meghatározása és kezelt és kezeltlen minták relatív fehérje mennyiségének meghatározása követ. Ezzel a módszerrel egy kísérletben több száz vagy akár ezer fehérje mennyisége határozható meg, így azonosíthatók olyan fehérjék, amelyeknek mennyisége egy gyógyszeres kezelés során megváltozott.

III. Genomikai farmakológia, kémiai genomika

Amíg a megfejtett génszekvenciák száma évek során gyorsan nőtt, addig funkcióik legtöbb esetben ismeretlenek maradtak. E nem várt mennyiségű információ kezelése a posztgenomika korszakának egyik legfőbb kihívása.

A posztgenomikai farmakológiában az olyan több irányú megközelítést amelyekben kismolekula kezeléssel kiváltott sejtválaszt mérünk genomikai (génexpressziós mintázat) illetve proteomikai (fehérje expressziós változások) módszerekkel összefoglaló néven kémiai genomikának nevezzük. A kémiai genomika többnyire azokat a kölcsönhatásokat vizsgálja, amely egy változatos kismolekulasúlyú kémiai molekulakönyvtár és a humán genom összes génterméke között fennállhat. Szűkebb értelemben a kémiai genomika gyógyszer-jellegű kismolekulák tesztelését jelenti, annak érdekében, hogy a kevésbé jellemzett, betegséggel kapcsolatos fehérjék felhasználhatóságát a gyógyszerfejlesztés szempontjából meghatározza.

Kisméretű molekulákkal azonosíthatjuk a gyógyszerkölcsönhatásra és -fejlesztésre alkalmas célfehérjéket és igazolhatjuk első szinten a sejt szintű funkcióikat, ugyanakkor a fehérjeszintű kölcsönhatásból

visszakövetkeztethetünk a kismolekulák biológiai aktivitására, aminek ismerete a hatóanyag-tervezéshez nyújt segítséget. Így pl. az első szűrővizsgálat alkalmával kiválasztott hatást mutató molekulákkal (un. "hit"-vegyületekkel) nyert sejt ill. genom-szintű ismeretanyag lehetővé teszi a gyógyszeripar számára új hatóanyagok hatékonyabb kifejlesztését.

Laboratóriumunkban egy olyan új megközelítést fejlesztettünk ki, mely egy változatos molekulakönyvtár egyes elemeiből adott fehérjével történő kölcsönhatást kémiai-chip felhasználásával oldja meg [6]. A kémiai-chip segítségével több ezer kémiai vegyület gyors, egy lépésben történő tesztelését tudjuk megvalósítani, így egy előszelektált kisebb könyvtár szolgálhat további szűrésre vagy kémiai genomikai alkalmazásra [7-9].

A sejt állapotának változásait gyakran komplex hatások sora idézi elő. A sejteken végzett kémiai genomikai vizsgálatokkal a kismolekula kölcsönhatásait több ponton (valójában egy adott jelátviteli útvonalhoz a membrántól a sejtmagig tartozó összes fehérjén) teszteljük, amely nem korlátozódik egyetlen sejt felszíni receptor vagy rekombináns géntermék kötődéséhez, mint a tisztán fehérje szintű biológiai szűrés esetén [8, 9]. Itt valójában sejtválaszt mérünk a jelátviteli útvonal kismolekula által kiváltott gátlása vagy aktiválása révén. A sejtválasztok fenotípusos, funkcionális vagy génexpressziós (génkifejeződéses) változások szintjén jönnek létre.

A kémiai genetikával ellentétben, amely egyedi gének megfigyelését célozza, a kémiai genomika a teljes genomot tanulmányozza gyakran felhasználva a funkcionális genomika eszköztárát is [7].

IV. Kismolekula v. Kémiai chipek

A kémiai chipek létrehozása valójában gyógyszer illetve gyógyszerjelölt vegyületek felületi immobilizálását jelenti oly módon, hogy azok a biológiai aktivitásukat és a kötőhely szelektivitásukat megtartsák.

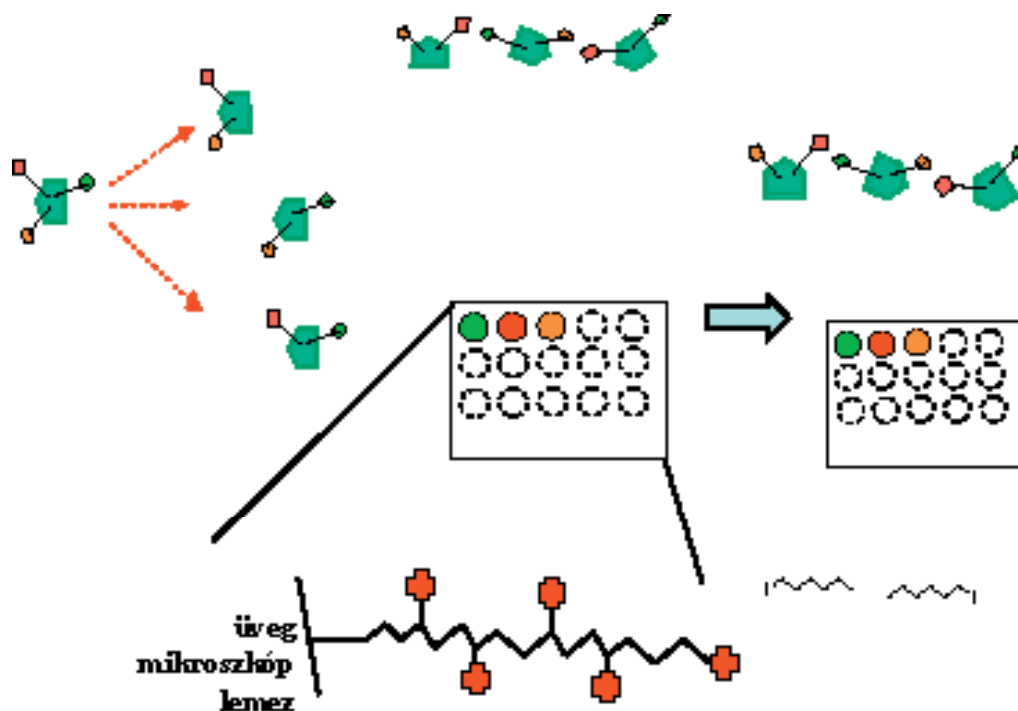
A kémiai-chip egy általunk szabadalmaztatott kémiailag módosított üveg felületre nagy sűrűségben felcseppentett és felkötött molekulakönyvtárat tartalmaz [7, 9]. A minták felcseppentése előtt mind a molekulakönyvtárat alkotó vegyületeket mind az alkalmazott üveg felületet módosítani kell az állandó felületi mintamennyiség biztosítása érdekében. A minták módosítása a szintézis után hozzájuk kapcsolt távtartó kar (linker) létrehozásával jár, amely egyben tartalmazza a módosított üvegfelülettel kovalens kapcsolatot létrehozó funkciós csoportot is (amino csoport). Kémiai chipek létrehozására szilárd hordozóként üveg mikroszkóp lemezek alkalmazhatók. Az általunk alkalmazott üveg felületeket több lépéses kémiai reakciók során módosítottuk. Így a felületen egy elágazó láncú, fa-szerű rendszert alakítottunk ki, melyen a láncok végén aktivált funkciós csoportok találhatóak, melyek a kikötni kívánt molekulák megfelelő részeivel kémiai kötéseket hozhatnak létre. Az ilyen típusú szerkezetek előnye, hogy az elágazások következtében nő a felület kapacitása (nagyobb mennyiségű minta köthető a felületre), illetve megfelelő távolságot képez a felvitt molekula és az üveg felülete között, ami a molekulák hozzáférhetőségét biztosítja.

Az általunk módosított felületre 500 linkerrel ellátott kismolekulatömegű vegyületet vittünk fel egy nagy pontosságú chip készítő robot segítségével. (Az 500 linkerrel előállított vegyület CMT [10] nagykapacitású párhuzamos szintézistechnológiával a ComGenex laboratóriumában készült egy 240,000 vegyületből álló molekulatár felhasználásával) (2. ábra).

A kémiai-chip segítségével kémiai vegyületek gyors, egy lépésben történő tesztelését tudjuk megvalósítani, ahol meghatározhatjuk adott fluoreszcensen jelölt fehérjékkel kölcsönható molekulákat.

Laboratóriumunkban az általunk gyártott kémiai-chipeket

melanómából és melanocitákból nyert jelölt fehérjék vizsgálatára használtuk fel. A jelölt fehérjék a kémiai-chipen történő inkubálása után intenzív fehérje specifikus fluoreszcens jeleket kaptunk a megfelelő felületre kötött kölcsönható molekulák helyén. Azokra a pontokra összpontosítottunk (és így azokra a kémiai anyagokra), amelyek erősebb jelet adtak a melanóma mintával, mint a melanocita esetében. Ezek közül egy anyagot melanóma sejtvonalon (A375) is kipróbáltunk, ahol erős citotoxikus hatást tapasztaltunk. Humán májkarcinóma sejtvonalakon specifikus fenotípust és sejtelhalást detektáltunk. További kísérleteinkben a molekula fehérjecélpontját kívánjuk meghatározni és további in vitro és in vivo kísérleteket tervezünk.



2. **Ábra** Kémiai-chip létrehozása előre megszintetizált linkerrel ellátott molekulakönyvtárból. A vegyületek egyenként kis foltokban vannak kihorgonyozva egy speciálisan aktivált üveg felületen.

Összefoglalva, az emberi géntérkép befejezésével, egy kérdéses betegség megértéséhez és gyógyításához szükség van a genomika, proteomika, és újabban a kis molekulákból álló könyvtárak korai alkalmazásának integrálására abból a célból, hogy sokkal hatásosabb hatóanyag-felfedezési megközelítést építsünk fel. A posztgenomikai felfedezés fő feladata a célfehérjék növekvő száma és a kis molekulák közötti szinergizmus számos szempont figyelembevételével történő megalapozása. Az új célpontok a hagyományos és az újabban felmerülő betegségekre specifikusabb, hatékonyabb és biztonságosabb kismolekulákkal történő, új terápiás beavatkozásokat biztosítanak, míg a hatóanyag-felfedezésre fordított idő jelentősen lecsökken és megnövekszik a felfedezési folyamat valószínűségének sikere.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény P.L.G. az MTA Kémiai Tudományok Osztálya 2005. évi májusi közgyűléshez kapcsolódó tudományos ülésen elhangzott előadás anyagából állt össze (Budapest, 2005. május 4). A cikkben bemutatott saját eredmények

az Oktatásügyi Minisztérium Biotechnológia 2002 pályázat (BIO-0006/2002) és a GVOP (3.1.1-2004-05-0280/3.0) támogatásával valósultak meg. Köszönettel tartozok a Funkcionális Genomikai Laboratóriumában dolgozó dr. Hackler Lászlónak és Fehér Liliánának, a ComGenex vezetőinek, dr. Darvas Ferencnek és dr. Úrge Lászlónak a pályázat létrehozása és végrehajtása során nyújtott támogatásukért, dr. Dormán György tudományos igazgatónak, valamint a Pharmatest munkatársai által nyújtott szakmai segítségért.

Irodalomjegyzék

1. Nguyen, D.V.; Arpat, A.B.; Wang, N.; Carroll, R.J. DNA microarray experiments: biological and technological aspects. *Biometrics* **2002**, *58*, 701-717.
2. Zvara, A.; Hackler L.Jr.; Nagy, Z.B.; Micsik, T.; Puskas, L.G. New molecular methods for classification, diagnosis and therapy prediction of hematological malignancies. *Pathol Oncol Res.* **2003**, *8*, 231-240.
3. Raetz, E.A., Moos, P.J. Impact of microarray technology in clinical oncology. *Cancer Invest.* **2004**, *22*, 312-320.

4. Hopkins, A.L.; Groom, C.R. The druggable genome. *Nature Reviews Drug Disc.* **2002**, *1*, 727.
5. Terstappen, G.C.; Reggiani, A. In silico research in drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 23.
6. Hackler, L.Jr.; Dormán, G.; Kele, Z.; Ürge, L.; Darvas, F.; Puskás, L.G. Development of chemically modified glass surfaces for nucleic acid, protein and small molecule microarrays. *Mol. Divers.* **2004**, *7*, 25-36.
7. Darvas, F.; Dormán, G.; Krajcsi, P.; Puskás, L.G.; Kovári, Z.; Ambrus G.; Ürge, L. Recent Advances in Chemical Genomics. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3119-3145.
8. Stockwell, B.R. Frontiers in chemical genetics. *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 449.
9. Puskás, L.; ifj. Hackler, L.; Dormán, G. Kismolekulachipek a kémiai genomikában. *Biokémia* **2004**, *28*, 61-67.
10. Darvas, F.; Dormán, G.; Ürge, L.; Szabó, I.; Rónai, Z.; Sasváry-Székely, M. Combinatorial Chemistry. Facing the Challenge of Chemical Genomics. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1487-1498.

Chip technology in drug discovery

Identification and selection of disease-specific targets is one of the most critical steps in post-genomic drug-discovery. Altered expression of genes and their protein products is often the best starting point for dissecting the pathways that are responsible for the development of specific diseases. In this article I review those technologies, which enable us to perform global monitoring at the genome, transcriptome and proteome level. Microarray technology is capable of screening the expression of thousands of gene products or proteins in a parallel way. Here I describe the technical background of production and application of DNA- and protein-microarrays. Chemical genomic studies intend to identify small, drug-like molecules, which specifically interact with different

protein targets. By using complex molecular biological tools (like chemical- or DNA-microarrays) it studies those interactions, which are among the specific gene products of the human genome and a diverse chemical library. We used chemical-microarray technology to reveal the mechanisms of action of potential drugs by monitoring protein expression changes caused in melanoma cell cultures. A novel approach by using chemical-microarrays, where a hit molecule (interacting with a specific protein) can be selected from a complex library with one step has been developed. Identification of new compounds by these novel approaches and application of microarrays in pharmacological studies serve for more effective drug development strategies.