

**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

Ph.D. program: Gyógyszeranalitika
Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit
Intézet: Orvosi Vegytani Intézet
Témavezetők: Prof. Dr. Martinek Tamás
Dr. Szakonyi Gerda

Tököli Attila

**Tervezési stratégiák fehérje-fehérje interakció inhibitorok előállítására nem
természetes aminosavak felhasználásával**

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Dombi György
Tagok: Dr. Tóth András
Dr. Lipinszki Zoltán

Védési Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Zupkó István
Bírálok: Prof. Dr. Perczel András
Prof. Dr. Borbás Anikó
Tagok: Dr. Jójártné Dr. Laczkovich Orsolya
Dr. Márki Árpád

A. Bevezetés és célkitűzések

A fehérjék az élet nélkülözhetetlen biomolekulái. A fehérjék a sejtek funkcióinak szabályozása és biokémiai reakcióik katalízise mellett sok egyéb változatos feladatot látnak el. Az élő szervezetek alapvető folyamatainak szabályozásában a fehérje-fehérje interakciók kulcsfontosságú szerepet töltenek be. A fehérjék komplex kölcsönhatási felszínei változatosak a kiterjedésük, geometriájuk és kémiai jellemzőiknek köszönhetően. A fehérje-fehérje interakciós felszínek különböznek a klasszikus kis molekulás kötőzsebtől, így klasszikus gyógyszerkémiai megközelítésekkel nehezen támadhatók. A felszínen található speciális aminosavak, úgynevezett forrópontok befolyásolása nyújthat megoldást. Olyan hatóanyagok, amelyek képesek megfelelő kontaktfelületet biztosítani (peptidek, peptidomimetikumok és fehérjék) szerkezetileg jobban megfelelnek a fehérje-fehérje interakciós felületek gátlására. Skolnick és munkatársai egy tanulmányukban megállapították, hogy egy fehérje interakciós felszíne független a fehérje magasabb rendű szerkezetétől. Ez a felfedezés felveti a következő kérdést: létrehozható-e egy olyan molekula, amely rövid, szerkezettel rendelkezik és aminosav oldalláncait biomimetikus módon prezentálja, így felszín mimetikumként funkcionálhat? Egy olyan felszín fragmens könyvtár, amely a fehérjealkotó oldalláncot megfelelően nagy szegmensét lefedi alkalmas lehet erre a célra. A fehérje felszínének feltérképezését követően a fragmens alapú hatóanyagtervezés elveit követve fragmensnövesztési, illetve összekapcsolási kísérleteket végezhetünk a felszín-fragmensek affinitásának növelése érdekében.

A strukturális biológia másik nagy kihívása a rendezetlen fehérjék behatóbb megismerése. Különösen érdekes az olyan fehérjék tanulmányozása, amelyek még a kötőpartnerük jelenlétében is rendezetlenek, és csak egy konformációs sokasággal közelíthető a „bolyhos” szerkezetük. Gyógyszerfejlesztési szempontból ez különösen nagy kihívást jelent: a rendezetlen partner erősen hidrofil és a fehérje-fehérje interakciókra jellemző forrópontok is kisebb számban található meg rajtuk. Az ilyen interakciós felületek befolyásolására megoldást nyújthat nem természetes aminosavak alkalmazása.

Célunk volt bebizonyítani, hogy felszín fragmensek alkalmazásával a fehérje-fehérje interakciós forrópontok felismerhetők, utat nyitva az eddig nehezen támadható fehérje felszín befolyásolására.

Rövid, β -peptid foldamer hexamerek alkalmasak lehetnek erre a célra, mivel vízben stabil másodlagos szerkezettel rendelkeznek és felületük elegendően nagy ahhoz, hogy fehérjék forrópontjaival kölcsönhatásba lépjenek. Ezek a molekulák képesek lehetnek a fehérjék lokális felszínéhez adaptálódni, felszín fragmenseként viselkedni.

Végül egy rendezetlen fehérjének, a *E. coli* egyszálú DNS-kötő fehérjének (SSB) interakcióit tanulmányoztuk behatóbban. Az fehérje C-terminálisán lévő nyolc aminosóból álló erősen konzervált és flexibilis peptidszakasz mimetikumait kívántuk elkészíteni nem természetes aminosavak alkalmazásával. A vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy lehetséges-e a konzervált szekvencia módosítása mellett a peptidszakasz affinitásának entalpia vezérelt növelése és egy adott kötőkonformáció fixálása.

B. Módszerek

Kötődéses-leszorításos kísérlet

Az 512 (H14 és H12) tagú fragmenskönyvtár szűrését az öt célfehérjén kötődéses-leszorításos kísérlettel végeztük. A fehérjéket immobilizáltuk és ekvimoláris ($n_{\text{foldamer}}:n_{\text{protein}} = 1:1$) foldamer könyvtárral együtt inkubáltuk. A nem kötődő foldamereket lemostuk és HPLC-MS segítségével kvantifikáltuk.

Fluoreszcencia anizotrópia kísérletek

A módosított SSB-Ct peptidek kötődési tulajdonságait fluoreszcens anizotrópia kísérletekben cégeztük CLARIOstar® Plus Multi-Mode Microplate Reader spektrofotométerrel. Közvetlen és kompetíciós titrálásokat is végeztünk, az előbbit karboxifluoreszcinnel jelölt peptidek használatával. Három párhuzamos mérést hajtottunk végre, az átlagos fluoreszcencia polarizációs értékeket az Origin Pro 9.5-ben elemeztük. Az IC_{50}/EC_{50} illesztéseket a Logistics Nonlinear fit function segítségével határoztuk meg.

Izotermális titrációs kalorimetria

Az izotermális titrációs kalorimetriás (ITC) kísérleteket MicroCal VP-ITC mikrokaloriméterrel végeztük 30 °C-on. 300 ford./perc keverést alkalmaztunk. A ligandumoldatot 20 µL-enként titráltuk a fehérjét tartalmazó cellába, 300 másodperces injektálási idő alatt. A nyers adatokat NITPIC segítségével integráltuk. A kötési paramétereket, az asszociációs egyensúlyi állandót (K_A), a kötési entalpiát (ΔH) és a kötési entrópiát (ΔS) a SEDPHAT program segítségével, $A + B = C$ modell illesztésével kaptuk meg. A sztöchiometriát 1:1 arányban rögzítettük.

C. Eredmények és diszkusszió

1. Lokális felszín mimetikumok

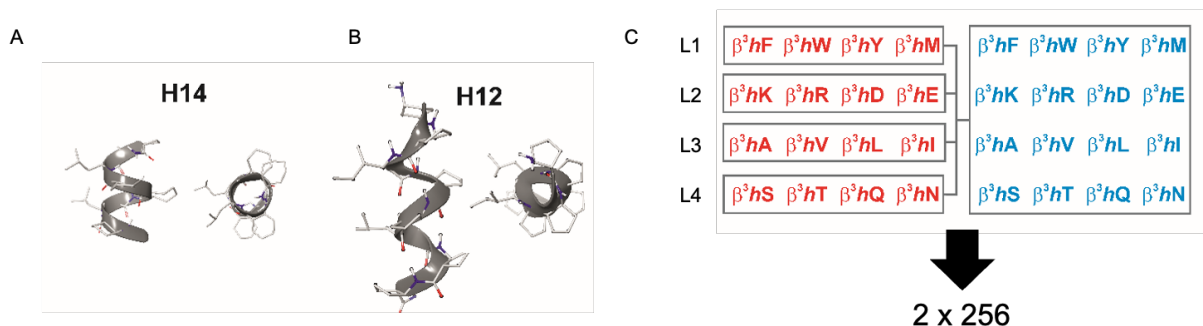
Bebizonyítottuk, hogy a foldamerek lokális felszín mimetikumként viselkednek (LFM), elég nagy felülettel rendelkeznek ahhoz, hogy 1-500 μM affinitással kötődjenek, képesek felismerni az ortosztérikus és nem ortosztérikus forró pontokat és nagyfokú szekvenciális homológia ellenére is képesek különbséget tenni a fehérjék natív kötőhelyei között. A fehérjékhez kötődő foldamerek kötött frakciója korrelál a fehérjék fehérje-fehérje kölcsönhatási partnereinek számával. Az kiválasztott foldamer oldalláncok hasonlóak a fehérjékkel természetesen kölcsönható partnerek oldalláncaihoz. A foldamer-fehérje határfelületek oldallánc-dúsulása hasonló az irodalomban található fehérje-fehérje határfelületek oldallánc dúsulásához.

1.1. LFM-ek segítségével feltérképezett fehérjék

Öt fehérjét választottunk ki szerkezeti homológiájuk, a kölcsönhatásaik típusai és a velük kölcsönhatásba lépő fehérjepartnerek száma alapján. A referenciafehérje a calmodulin volt, amely létfontosságú szerepet játszik az eukarióta sejtekben. Két másik EF-hand fehérjét, az S100A4-et és az S100B-t is fel kívántuk térképezni, mivel nagyfokú szekvenciális homológiák mutatnak a calmodulinnal. A galektin-1-et (Gal-1) és a RecQ helikáz szárnyas hélix doménjét (RecQ-WH) az alacsony kölcsönhatási hajlandósága miatt választottuk.

1.2. Lokális felszín mimetikus könyvtár tervezése

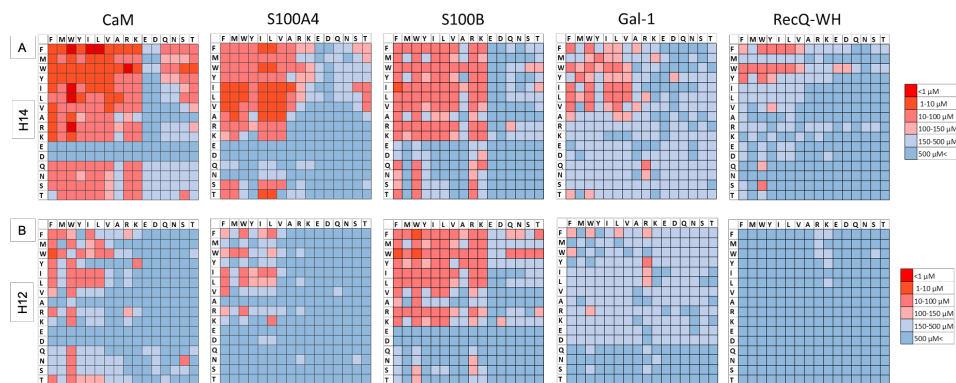
A β -aminosavakból álló peptidszekvenciák kontrollálható sztereokémiájának köszönhetően vízben stabil hélixekké tekerednek fel. Kísérleteinkben H14 és H12 hélixeket használtunk, amelyek proteogén oldalláncaikat a hélix ugyanazon oldalára projektálják, oldallánctávolságaik a natív interakciós felületekhez hasonlóak. A könyvtárak megalkotásához tizenhat különböző β^3 -aminosavat használtunk két pozícióban (1. ábra, R1 és R2 oldalláncok), így összesen 512 felszín mimetikumot hoztunk létre, amelyeket alkönyvtáranként szintetizáltunk és szűrtünk (L1-L4). Az LFM-ek elnevezése az R1 és R2 pozíciókban lévő betűkódok használatával történik.



1. ábra. Lokális felszín mimetikus fragmens könyvtárak designja. A H14 (A) és H12 hélixek (B) szerkezete, valamint a felszín mimetikus könyvtári összetétele (C).

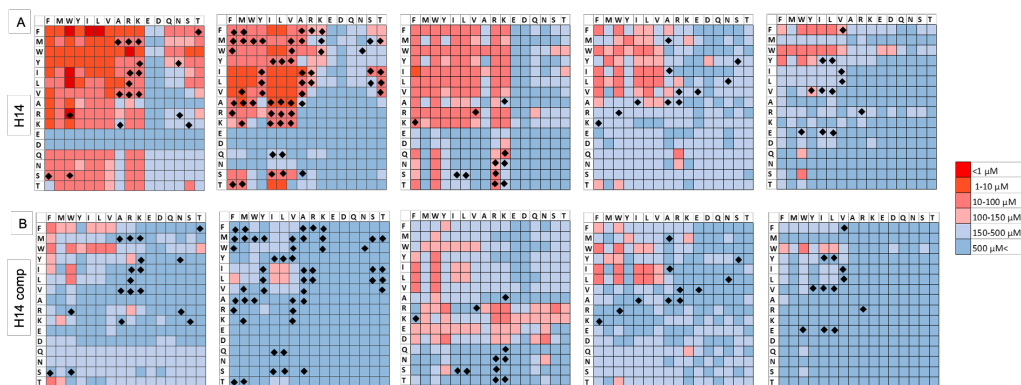
1.3. A foldamer LFM-ek kötődési mintázata szerkezeti kompatibilitásra utal

A lokális felszín mimetikumokat (LFM-eket) kötődéses leszorításos teszt segítségével szűrtük. Megállapítható, hogy az LFM-próbák célpontjaikhoz való kötődését nem a hidrofób váz hajtja, mivel különböző kötődési mintázatokat figyelhettünk meg. A kísérleteinkben kapott kötött frakciót K_D értékke alakítottuk. A nagyszámú találat arra enged következtetni, hogy a felszín fragmensek képesek adaptálódni a kiválasztott fehérjék felszíneire. A H14es felszín próbák általánosan jobban voltak képesek a forrópontok felismerésére, mint a H12es felszín próbák.



2. ábra. A fehérjék felszínének feltérképezésének eredményei hőterképként (K_D értékekből) ábrázolva.

1.4. A foldamer LFM-ek megkülönböztetnek ortoszerikus és nem ortoszerikus forrópontokat
A célfehérjék natív ligandjainak jelenlétében a H14 LFM-ekkel újabb kötődéses-leszorításos vizsgálatokat végeztünk. A natív ligandumok hatására megváltozott az LFM affinitási mintázatokat azon fehérjék esetében, amelyeknek sok kötőpartnere van. Az ortoszerikusan kötött foldamereket kiszorította a natív ligandum a kötőhelyükről. A kiszorításos jelenség komplexitásának egyszerűsége érdekében kiszorítási százalékokat számoltunk, amelyeket a 3. ábrán fekete színnel jeleztünk.

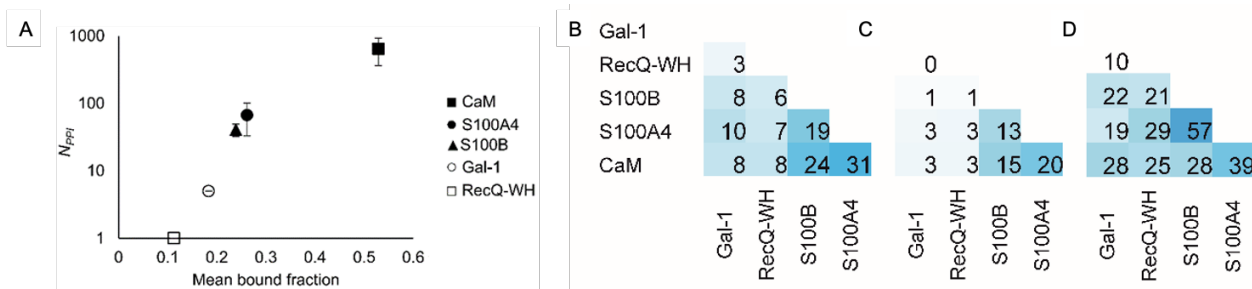


3. ábra. Kompetitív kötődéses-leszorításos kísérletek eredménye a H14 LFM könyvtárral. A K_D hőterképek a H14 hélixek oldallánc dúsulásait mutatják a natív ligand jelenlétében (B) és anélkül (A).

1.5. A foldamer LFM-ek affinitási mintázata célfehérje-függő

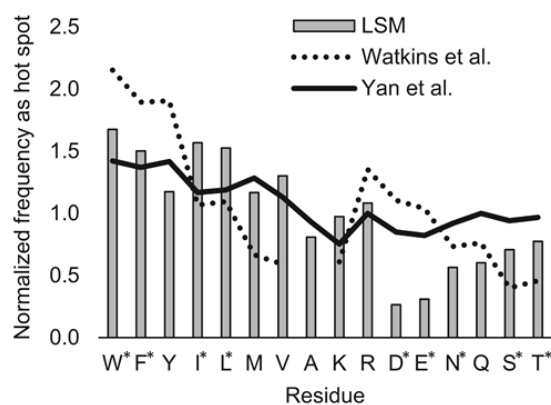
Az átlagos H14 kötött frakciók korrelálnak az adott fehérje interaktómájának méretével (4. ábra, A panel). Fehérjénkénti összefüggés van az átlagos kötött frakció és a PPI adatbázisokból kinyert interakciók száma között. A kötött frakciók és a kiszorítási százalékok segítségével minden fehérjepárra skálázott páronkénti kovarianciát számoltunk. Megállapítható, hogy nagy szerkezeti

homológiát mutató fehérjék esetén is alacsony kovariancia értékeket kaptunk, amely alacsony kötőfelszín-hasonlóságra utal. Tehát kimondható, hogy a foldamer LFM-ek képesek a fehérje kölcsönhatási felszínek funkcionális megkülönböztetésére.



4. ábra. A H14 LFM könyvtár átlagos kötött frakció értékei a PPI adatbázisokban található átlagos interktoom számhoz viszonyítva (A). A teljes (B) és az ortosztérikus (C) kötött frakció értékekre számolt páronkénti skálázott kovariancia értékek (%), maximális hasonlóság: 100%, nulla kovariancia: 0%). A fehérjék szekvencia-hasonlóságát a (D) panel tartalmazza.

1.6. A foldamer-fehérje oldallánc dúsulás értékek a természetes oldalláncdúsuláshoz hasonlóak. Ahhoz, hogy összehasonlítsuk a foldamer-fehérje és természetes fehérje-fehérje felületeken lévő oldallánc-dúsulásokat, oldallánconkénti normált dúsulási frekvenciát számoltunk. Megállapítható, hogy nagyfokú hasonlóság található a foldamer-fehérje oldallánc dúsulások és a szakirodalomban található természetes fehérje-fehérje interakciós felszínek oldallánc dúsulásai között. Mindezen felül, a kapott affinitási mintázatok szorosan illeszkednek az egyes vizsgált fehérjék természetes oldallánc preferenciáihoz. Így azt a következtetést vonhattuk le, hogy a foldamer felszín próbák biomimetikusak, és felszín mimetikus fragmensként gyógyszertervezési eszközként használhatóak.



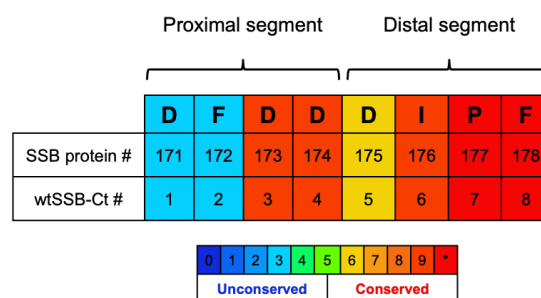
5. ábra. A normált dúsulási frekvenciák a H14 LSM könyvtár esetében, illetve a Watkins és munkatársai, valamint a Yan és mtsai által leközölt alanin-szken számítások esetében.

2. Bakteriális egyszálú DNS-kötő fehérje (SSB) mimetikus peptidok tervezése DNS-t metabolizáló enzimekkel való kölcsönhatásának gátlására

A SSB-Ct, egy erősen konzervált és flexibilis szekvencia, melynek módosításával növelni tudtuk a peptid affinitását egyes kötőpartnerekhez. A módosítások kombinálásával nagy affinitású peptidokat hoztunk létre, amelyek az ExoI-hez és a RecO-hoz kötődnek. Molekula dinamikai szimulációkban kimutatható a módosított peptidok csökkent konformációs flexibilitása. A két fehérje partner peptid-kötőmódja alapján a két hot spot kötődési modell jól magyarázza a peptid kötőmódját, amely további SSB mimetikus antibiotikumok tervezését könnyítheti meg.

2.1. Az SSB proximális szegmensének szerepe

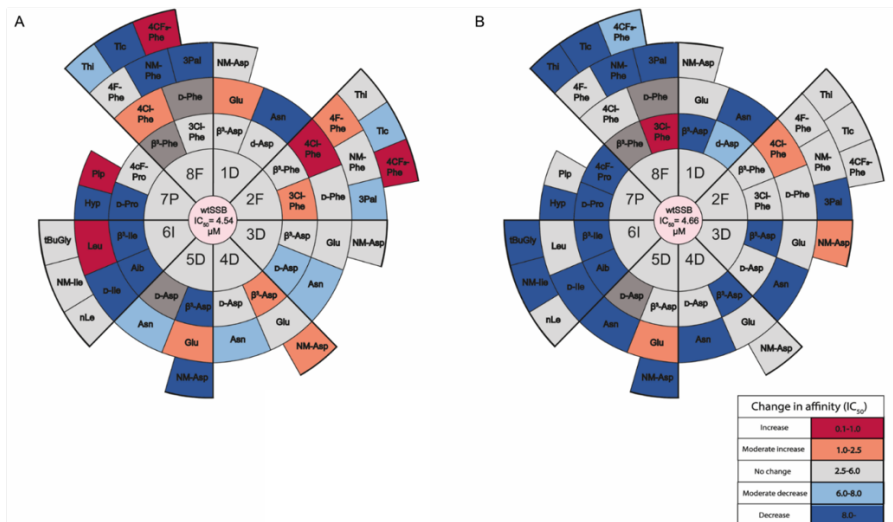
Az SSB-Ct oktapeptid (DFDDDIPF) kölcsönható fehérjékkel alkotott kristályszerkezeteiben csak a 3-4 C-terminális aminosavat (proximális szegmenst) tartalmazzák. Az irodalmi adatok azonban azt támasztják alá, hogy a peptid többi részének, a proximális szegmensnek is fontos szerepe van a kötődésben. Összhangban az irodalommal, molekuláris dinamikai szimulációink az SSB-Ct proximális részének megnövekedett flexibilitását mutatták, mivel a peptid C-terminális erősebben kötődik, illetve jobban rögzített, mint a proximális vége. Kompetitív fluoreszcens anizotrópia vizsgálatokat végeztünk szintetikus féloktapeptidekkel, hogy meghatározzuk az SSB-Ct különböző szegmenseinek fontosságát a kötődésben. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az SSB-Ct proximális szegmense átmeneti stabilizálódhat az ExoI és RecO másodlagos hot spotjain keresztül, és mindkét szegmens fontos az SSB-Ct kötődésében.



6. ábra. SSB-Ct szekvenciája és konzerváltsági foka.

2.2. A mutáns SSB-Ct (mSSB-Ct) könyvtár szintézise és szűrése

Létrehoztunk egy 68 tagú könyvtárat módosított SSB-Ct peptidokból, hogy megvizsgáljuk a kémiai módosítások hatását az affinitásra. A nem természetes aminosavak használata lehetővé tette az oldallánc-kémia jelentőségének tanulmányozását. A könyvtár tagjait fluoreszcens anizotrópián alapuló kompetíciós vizsgálattal szűrtük. Kedvező, tolerált és káros nem-természetes aminosavhelyettesítéseket tudtunk azonosítani.



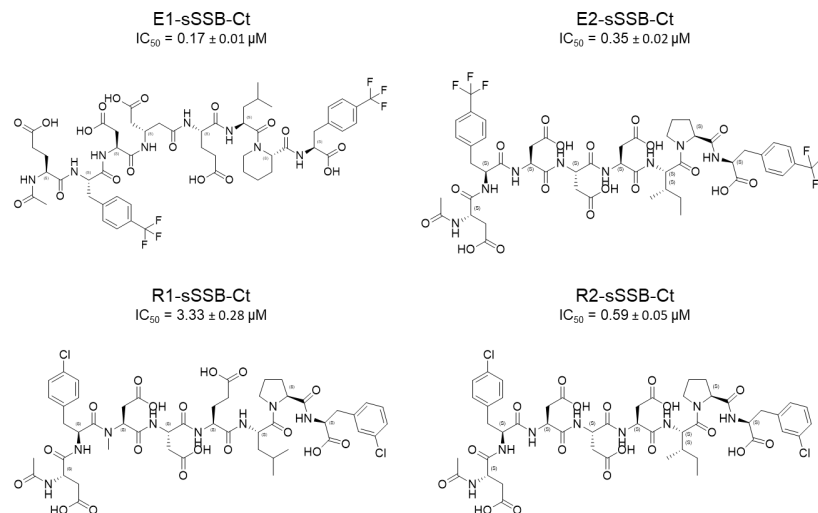
7. ábra. Az mSSB-Ct könyvtár szűrése és tervezése. A radiális hő térképek, amely az mSSB-k kompetitív fluoreszcens anizotrópia szűrési adatait mutatja az A) ExoI-n és a B) RecO-n. Az 1 μ M-nál kisebb IC_{50} értékek piros színnel vannak kiemelve. Az IC_{50} mérsékelt csökkenése (1.0 – 2.5 μ M) narancssárga színnel látható. Kék színnel a vad típusú SSBnél (2.5-6.0 μ M) gyengébben kötődő, magasabb IC_{50} értékkel rendelkező peptidok találhatók.

2.3. Mind a proximális DFDD, mind a disztális DIPF szegmensben alkalmazott módosítások növelik az affinitást

Méréseinkből látható, hogy a peptid 2. és 8. pozíciójában végrehajtott bizonyos módosítások szignifikánsan növelték az ExoI és RecO iránti affinitást. Azt is megfigyeltük, hogy a két vizsgált fehérje Phe2-vel való kölcsönhatása különböző. Az eredmények arra utalnak, hogy a Phe2 oldalláncának megfelelő kémiai módosításai növelhetik az affinitást a célpontokhoz még akkor is, ha az SSB-Ct natív kötődési módja nem függ közvetlenül a Phe2 jelenlététől.

2.4. A kombinált módosítások nagy affinitású ligandumokat eredményeznek

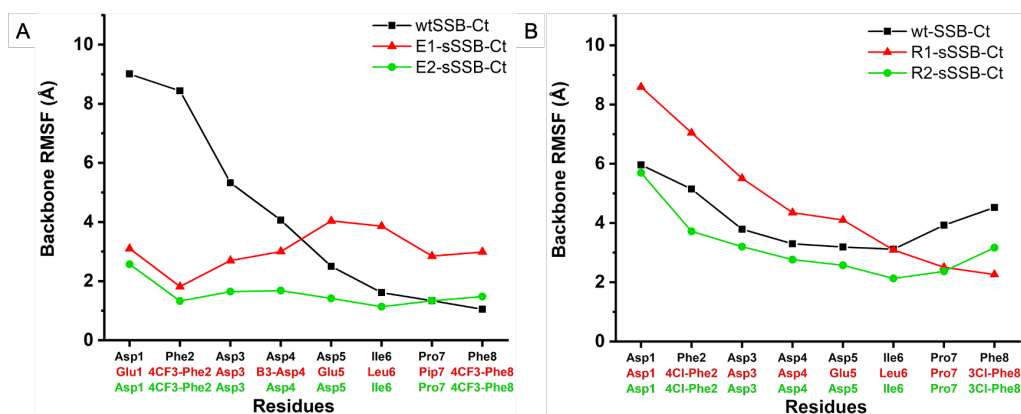
Következő lépésként teszteltük a kedvező, célspecifikus egyedi mutációk kombinációját az affinitás növelése érdekében. A módosított E1-sSSB-Ct és E2-sSSB-Ct peptidok további javulást eredményeztek az ExoI-hez való kötődésben. Az izotermikus titrálási kalorimetriás mérések azt mutatták, hogy a fő entalpia-növekedés a 2. és 8. pozícióban alkalmazott 4-CF3-PhePhe cseréknek köszönhető, ami összhangban van a feltételezett két forrópont hipotézissel. Az E1-sSSB-Ct további módosításai azonban csak kis mértékben tudták javítani a kötési affinitást. A RecO esetében csak az R2-sSSB-Ct-nél tapasztaltunk affinitás növekedést. Az összes, több kedvező módosítást tartalmazó peptid esetében az affinitásnövekedés entalpiavezérelt jelenség, jelentős entalpia-entrópia kompenzációs hatással.



8. ábra. Az SSB-Ct kombinált módosításai. Az E1-sSSB-Ct és az E2-sSSB-Ct ExoI-en teszteltük. Az R1-sSSB-Ct és az R2-sSSB-Ct RecO-n teszteltük. Az IC₅₀ értéket kompetitív fluoreszcens anizotrópia vizsgálatban mértük.

2.5. A molekuláris dinamikai szimulációk betekintést nyújtanak az E-sSSB-Cts és R-sSSB-Ct kötési módjaiba

Az E-sSSB-Ct és R-sSSB-Ct flexibilitásában bekövetkezett változások tesztelésére Replica Exchange Solute Tempering (REST) szimulációkat alkalmaztunk. Mindkét fehérje esetében csökkent flexibilitás mutatható ki kötött állapotban. Az E-sSSB-Ct-k esetében mért alacsonyabb RMSF (root mean square fluctuation) értéket 4CF₃-Phe2-kön keresztül, az ExoI-en található A és B kötőhelyekhez való horgonyzás eredményeképp jöhetett létre. Az R-sSSB-Ct-k esetén is tapasztalunk RMSF érték csökkenést, a peptid a 4Cl-Phe2-n, illetve 3Cl-Phe8-on keresztül horgonyozható a RecO A és B kötőhelyeihez. Az R-sSSB-Cts központi szegmense kevésbé rugalmas a terminálokhoz képest, az RMSF értékek összességében lefelé mozdultak el.



9. ábra. A wtSSB-Ct (vad típusú peptid, fekete négyzetek), E1-sSSB-Ct (piros háromszögek) és E2-sSSB-Ct (zöld körök) gerinc atomkoordinátáinak RMSF értékei az ExoI-vel kölcsönhatásban (A). A gerinc atom koordinátáinak RMSF-értékei a wtSSB-Ct (fekete négyzetek), az R1-sSSB-Ct (piros háromszögek) és az R2-sSSB-Ct (zöld körök) kölcsönhatásban a RecO-val (B).

A tézisben megtalálható publikációk

- I. A. Tököli, B. Mag, É. Bartus, E. Wéber, G. Szakonyi, M. A. Simon, Á. Czibula, É. Monostori, L. Nyitray, T. A. Martinek (2020). Proteomimetic surface fragments distinguish proteins by function. *Chemical Science*, 11, 10390-10398
- II. A. Tököli, B. Bodnár, F. Bogár, G. Paragi, A. Hetényi, É. Bartus, E. Wéber, Z. Hegedüs, Z. Szabó, G. Kecskeméti, G. Szakonyi, T. A. Martinek (2023). Structural adaptation of the single-stranded DNA-binding protein C-terminal to DNA metabolizing partners guides inhibitor design. *Pharmaceutics*, 15(4), 1032

Egyéb publikációk

- III. A. Hetenyi, E. Szabo, N. Imre, K. N. Bhaumik, A. Tököli, T. Füzési, R. Hollandi, P. Horvath, Á. Czibula, É. Monostori, M. A. Deli, T. A. Martinek (2022). α/β -Peptides as Nanomolar Triggers of Lipid Raft-Mediated Endocytosis through GM1 Ganglioside Recognition. *Pharmaceutics*, 14(3), 580
- IV. É. Bartus, A. Tököli, B. Mag, Á. Bajcsi, G. Kecskeméti, E. Wéber, Z. Kele, G. Fenteany, T. A. Martinek (2022). Light-fuelled primitive replication and selection in evolvable biomimetic chemical networks. *ChemRxiv*, under major revision, 10.26434/chemrxiv-2021-3dnjt-v4

A tézishez kapcsolódó tudományos előadások

1. A. Tököli, G. Szakonyi, T. Martinek. A bakteriális RecQ helikáz szárnyas doménjének karakterizálása, egy lehetséges antibakteriális célpont.
MTA Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés 2017. Balatonszemes – 2017. 05. 29.
2. A. Tököli, É. Bartus, G. Szakonyi, T. Martinek. Characterization of the bacterial winged-helix domain of RecQ helicase. A novel antibacterial target.
7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences – Balatonfüred – 2017. 10. 06.
3. A. Tököli, B. Mag, É. Bartus, E. Wéber, G. Szakonyi, M. A. Simon, Á. Czibula, É. Monostori, L. Nyitray, Tamás A. Martinek. Protein affinity patterns of foldameric local surface mimetics: druggability and promiscuity.
Department of Medicinal Chemistry, Institute Seminar. Szeged – 2020.11.27.
4. A. Tököli, B. Bodnár, F. Bogár², G. Paragi, A. Hetényi, É. Kovács-Bartus, E. Wéber, Z. Hegedüs, G. Szakonyi and T. A. Martinek Two anchor point-binding of the SSB C-terminal to DNA metabolizing proteins facilitates the development of enhanced inhibitors.
Peptide Chemistry and Chemical Biology Working Committees of the Hungarian Academy of Sciences – Symposium 2022. Balatonszemes – 2022. 05. 30.