

**PhD Tézis**

**Oldószernek kitett kötőhellyel rendelkező célfehérjék  
fehérje-ligandum kölcsönhatásainak vizsgálata**

**Wéber Edit**



Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszerkémiai Intézet

2012

## A. Bevezetés és célkitűzések

A gyógyszerkutatás célja, hogy a betegségekben szerepet játszó nagymolekulás célpontokat specifikusan és hatékonyan befolyásolja. Ez általában megvalósítható olyan kismolekulákkal, amelyek nagy affinitással képesek kötődni a makromolekulákhoz. Továbbra is kihívást jelent azonban azoknak a kölcsönhatásoknak a gátlása, ahol nagy felületek vagy oldószernek kitett felszínek játszanak szerepet a folyamatokban. Azokat a makromolekulákat, amelyeket gyógyszerszerű kismolekulákkal nem lehet befolyásolni, "nem gyógyszerelhető" fehérjéknek nevezzük. Ezeknek a célpontoknak a gátlására adhat lehetőséget a mesterséges önrendező polimerek, azaz foldamerek alkalmazása, melyek ígéretes vegyületsoportnak bizonyultak a biomolekulák felismerésére.

Két gyógyszerészeti szempontból jelentős fehérjét vizsgáltunk: az immunosuppresszáns és angiogenezist elősegítő tumordajka fehérjét, a Galektin-1 (Gal-1) homodimert, melynek blokkolása angiogenezist és tumor metasztázist gátló gyógyszereket szolgáltathat; és a szinaptotoxikus Amyloid  $\beta$ 1-42 ( $A\beta$ 1-42) fibrillumokat és oligomereket, melyeket az Alzheimer-kór legfőbb előidézői között tartanak számon. A Gal-1 és a különböző  $A\beta$ 1-42 aggregátumok gátlása nem egyszerű feladat, mivel kötőhelyük csupán egy oldószernek kitett felszín, és nem rendelkeznek külön kötőzsebbel.

A fehérje-ligandum rendszerek vizsgálatához elsősorban mágneses magrezonancia spektroszkópiát (NMR) alkalmaztunk, amely igen hatékony és sokoldalú technika a biomolekulák jellemzésére és a molekuláris kölcsönhatások felderítésére. Az NMR alkalmazható a preklinikai gyógyszerkutatás folyamatában: screenelésre ad lehetőséget, segítheti a vezérmolekulák optimalizálását, a fragmens-alapú hatóanyag tervezést és a hatás-szerkezet összefüggések kialakítását. A röntgenkristallográfiával ellentétben az NMR spektroszkópia biológiai szempontból fontos közegben, oldatban vizsgálja a fehérje-ligandum rendszereket és ily módon a molekuláris mozgások is feltérképezhetők. A biomolekulákról és komplexeikről nyert atomi szintű szerkezeti és dinamikai információk segítenek abban, hogy megértsük a funkciójukat és hatásmechanizmusukat, és a szerkezet alapú gyógyszerkutatásban a ligandumok továbbfejlesztését is szolgálhatják.

Elsődleges célunk az volt, hogy NMR spektroszkópiai módszerekkel olyan információkat nyerjünk a célmolekuláinkról, melyek elősegíthetik új Gal-1 és  $A\beta$ 1-42 gátló molekulák szerkezet alapú tervezését. Ehhez kötődési teszteket kívántunk optimalni, validálni és továbbfejleszteni, melyeket alkalmazhatunk az új ligandumok



screenelésében. A Gal-1 esetében célul tűztük ki a  $^{15}\text{N}$  és  $^{13}\text{C}$  izotóppal jelzett fehérje gerincének jelhozzárendelését, amely a további kísérletek előfeltétele volt. A fehérjét első lépésként természetes és/vagy irodalmi, peptid típusú ligandumuk jelenlétében kívántuk megvizsgálni, hogy jellemezzük a kölcsönhatásokat, és megismerjük a ligandumok hatásának molekuláris mechanizmusát. A technikákat és a nyert szerkezeti-dinamikai ismereteket a hatóanyagtervezésben, elsődlegesen fehérjénk foldamer típusú gátlószereinek létrehozásában kívántuk hasznosítani. Az NMR eredményeket egyéb biofizikai módszerekkel és biológiai kísérletekkel is kiegészítettük, mint például titrációs kalorimetria, részecskeméret meghatározás és ELISA tesztek.

## B. Módszerek

### Ligandum-detektált NMR kísérletek

A Gal-1, az asialofetuin (ASF) és az A $\beta$ 1-42 fehérjék és ligandumaik kölcsönhatását a következő ligandum-detektált NMR technikákkal jellemeztük: szaturáció transzfer differencia (STD), transzfer nukleáris Overhauser effektus (trNOE) és a jelintenzitás-csökkenés kvantitatív vizsgálata. A hagyományos  $^1\text{H}$  STD esetében a fehérje szelektív gerjesztését Gauss-pulzusokkal végeztük. A trNOE kísérleteknél, 2D NOESY spektrumokat vettünk fel a fehérje nélkül és a fehérje jelenlétében. A következő mintákat vizsgáltuk:

- (i) Gal-1 vagy ASF irodalmi Tyr-Xxx-Tyr típusú peptid ligandumokkal (TYDYF-NH<sub>2</sub>, WYKYW-NH<sub>2</sub>, TYDYFR-NH<sub>2</sub> és TYPYFR-NH<sub>2</sub>) vagy laktózzal,
- (ii) fibrilláris A $\beta$ 1-42 neuroprotektív pentapeptidek (LPFFD, LPYFD-NH<sub>2</sub>, FRHDS-NH<sub>2</sub> és RIIGL-NH<sub>2</sub>) és/vagy Thioflavin T (ThT) jelenlétében,
- (iii) A $\beta$ 1-42 oligomerek foldamer peptidekkel.

A csoportszelektív STD-t (group-selective, azaz GS-STD) módszerfejlesztés céljából különböző gerjesztésekkel teszteltünk. A minták laktózzal telített,  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -jelzett Gal-1-et tartalmaztak. A fehérje szelektív gerjesztéséhez BIRD<sup>d</sup> pulzusok sorozatát alkalmaztuk. A  $^{13}\text{C}$  alifás, illetve aromás GS-STD spektrumoknál a szén inverzióját 256 ms hosszúságú Q3 Gauss kaszkád pulzussal oldottuk meg a BIRD<sup>d</sup> cikluson belül.

### Fehérje-detektált NMR kísérletek

A fehérje-detektált technikákat a  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -jelzett Gal-1 vizsgálatára alkalmaztuk. A fehérje jelhozzárendeléséhez háromdimenziós HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CO, CBCA(CO)NH, HBHA(CO)NH és  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC spektrumokat

vettünk fel és értékeltünk. A  $^{15}\text{N}$  heteronukleáris egyszeres-kvantum koherencia (HSQC) titrálások során a  $^{15}\text{N}$ -jelzett Gal-1  $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumait vettük fel önmagában, illetve növekvő ligandum (laktóz vagy Tyr-Xxx-Tyr peptidek) koncentrációkkal. A szabad és a laktóz-kötött Gal-1 dinamikus viselkedésének feltérképezéséhez  $T_1$ ,  $T_2$  relaxációs és heteronukleáris NOE méréseket és “Model-free” analízist végeztünk.

### **A $\beta$ 1-42 oligomerek és foldamerek vizsgálata izotermál titrációs kalorimetriával**

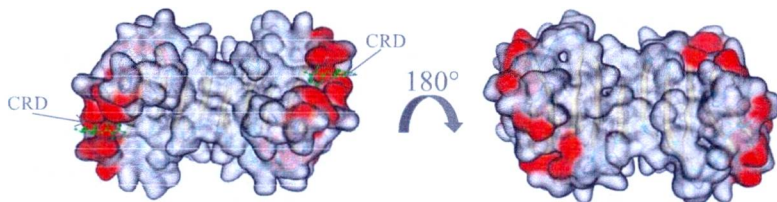
Titrációs kalorimetria méréseket végeztünk az A $\beta$ 1-42 oligomerek és a foldamerek kölcsönhatásának jellemzésére Microcal VP-ITC készülékkel. A kísérleti adatokat két független kötőhelyet feltételezve illesztettük.

### **Egyéb módszerek**

A Tyr-Xxx-Tyr peptidek Gal-1-hez való kötődését vizsgáltuk kompetitív ELISA teszttel, amelyben a Gal-1 ASF-hez való kötődését mértük a peptidek jelenlétében; és áramlási citometriával, amely a Gal-1 sejtekhez való kötődését mutatta. Az A $\beta$ 1-42 fibrillumok időfüggő jelintenzitás-csökkenését fényszórás, transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) és  $\zeta$ -potenciál mérések egészítették ki. A foldamerek és A $\beta$ 1-42 oligomerek kölcsönhatását egyéb biofizikai és biológiai módszerekkel is jellemeztük.

## **C. Eredmények**

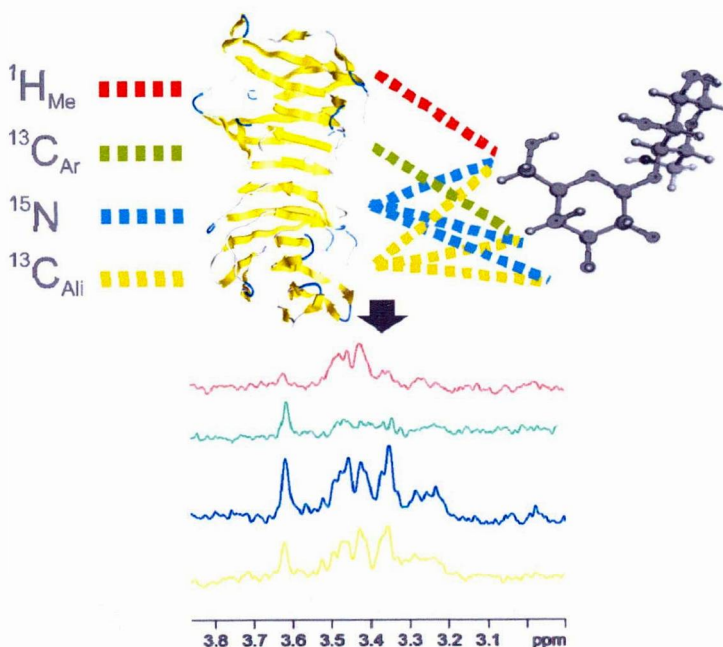
- I. A Gal-1 oldatfázisú viselkedését NMR spektroszkópai módszerekkel jellemeztük önmagában, illetve természetes ligandumával, a laktózzal.
  - 1.1. A  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -jelzett Gal-1 gerincének jeleit és a CB és HB jelek nagy részét is hozzárendeltük fiziológiai pH-n (pH 7.4).
  - 1.2.  $^{15}\text{N}$  HSQC titrálások azt támasztották alá, hogy a laktóz kötődése a Gal-1 szerkezetét a kötőhelytől távol, a szénhidrátkötő régióval ellentétes oldalon is befolyásolja.



**1. ábra.** A Gal-1  $^{15}\text{N}$  HSQC titrálása laktózzal. A 15 legnagyobb mértékben tolódott aminosav Gal-1 homodimer felszínén jelölve (piros).

1.3. A relaxációs mérések és „Model-free analízis” rámutatott, hogy a laktóz kötődése nemcsak a szénhidrátkötő régió dinamikáját befolyásolja, hanem onnan tovaterjedve az egész fehérjét érintik a változások. Kiemelkedően flexibilisnek találtuk a laktóz kötésében is szerepet játszó hurkot.

1.4. A GS-STD  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  variánsai hatékonyan bizonyultak a laktóz kötődési epitópjának felderítésében. A négy különböző kísérleti beállítással felvett STD spektrum (szelektív  $^1\text{H}$  STD,  $^{15}\text{N}$  GS-STD,  $^{13}\text{C}_{\text{Ar}}$  és  $^{13}\text{C}_{\text{Ali}}$  GS-STD) azt mutatta, hogy a különbségi spektrumok jelintenzitásának mintázata a gerjesztett „közvetítő” atomok típusától és térbeli elrendeződésétől is függ, valamint a spin-diffúzió által közvetített mágnesezettség transzfer hatékonysága is befolyásolja (2. ábra).



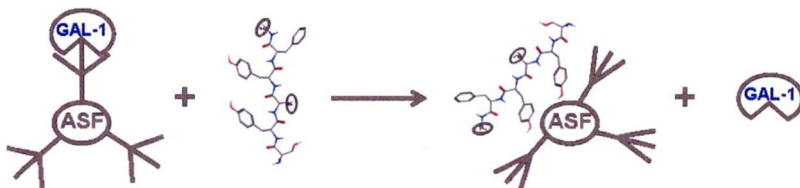
2. ábra. A  $^{15}\text{N}$  és  $^{13}\text{C}$  GS-STD kísérletek módozatai (különböző színekkel jelölve) segítségével gyenge fehérje–ligandum kölcsönhatások is kimutathatók, akár flexibilis, oldószernek kitett kötőhely esetén is. A gerjesztési profilok különböző térbeli és kémiai szelektivitásának köszönhetően a kötőhely egyes atomcsoportjaihoz közeli ligandum protonok feltérképezhetők.

2. A korábbi irodalmakban a Tyr-Xxx-Tyr peptid motívumot glikomimetikus szekvenciaként írták le, mivel gátolja a Gal-1–ASF kölcsönhatást. NMR kísérleteink azonban a következőket igazolták:

2.1. Az STD, trNOE mérések és a  $^{15}\text{N}$ -jelzett Gal-1-gyel végzett  $^{15}\text{N}$  HSQC titrálások is kizárták a Gal-1–peptid kölcsönhatásokat, vagyis a vizsgált Tyr-Xxx-Tyr peptidek nem kötődnek a Gal-1-hez.

2.2. A Tyr-Xxx-Tyr peptidek kötődését ASF-hez egyértelműen bizonyították STD és trNOE kísérleteink.

2.3. A Tyr-Xxx-Tyr peptidek nem azért bizonyultak hatékonyak a kompetitív tesztekben, mert a Gal-1-hez kötődnek és leszorítják róla a Gal-1-et, hanem az ASF-nal való kölcsönhatásukból kifolyólag (3. ábra). Eredményeink arra utaltak, hogy a vizsgált Tyr-Xxx-Tyr peptidek nem glikomimetikusak, mivel az ASF-nal hatnak kölcsön.



3. ábra. A Gal-1–ASF kölcsönhatás Tyr-Xxx-Tyr típusú peptidekkel történő gátlásának feltételezett mechanizmusa.

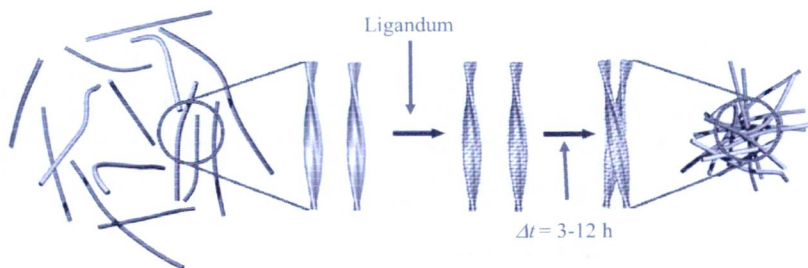
3. A neuroprotektív pentapeptid LPFFD és a fluoreszcens festék ThT A $\beta$ 1-42 fibrillumokhoz való kötődése az NMR jelintenzitásuk csökkenése alapján a következőket mutatta:

3.1. A ThT nem szorította le rögtön az LPFFD-t az A $\beta$ -ról, és nem tudta megakadályozni annak gyenge kötődését. LPFFD nem csökkentette, hanem növelte az NMR-rel detektálható ThT kötés mértékét.

3.2. A spektrumokban a vizsgált ligandumok csúcsai mellett nem jelentek meg olyan, oldat fázisú NMR-rel mérhető jelek, amelyek a monomer vagy oligomer méretű A $\beta$ 1-42 jelenlétére utalnának.

3.3. A neuroprotektív peptidek dezaggregációs mechanizmusa kevésbé valószínű, ligandum-indukált flokkuláció és szedimentáció feltételezhető (4. ábra), amit fényszórás és TEM mérések is megerősítettek.



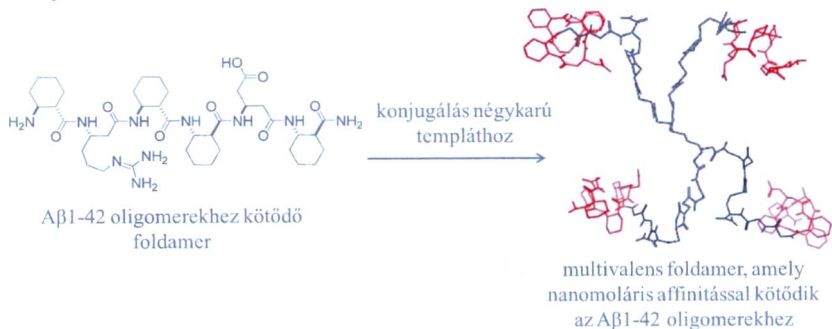


4. ábra. Aβ1-42 fibrillumok ligandum-indukált flokkulálása keresztkötéseken keresztül.

4. Foldamerek Aβ1-42 oligomerekhez való kötődését screeneltük STD és trNOE technikákkal.

4.1. Egy hexapeptid foldamer kötődést mutatott az Aβ-hoz. A multivalens ligandumok elvét követve, a peptidet egy tetravalens poliamidoamin templáthoz konjugáltuk, így a gyenge kölcsönhatást megsokszorozva egy erősen kötődő vegyületet kaptunk (5. ábra). A négykarú ligandum kétlépcsős kötődést mutatott egy nanomoláris és egy szubmikromoláris látszólagos disszociációs konstanssal.

4.2. A hatás-szerkezet összefüggések felderítését szolgáló első kísérletek azt mutatták, hogy a más oldalláncokat tartalmazó vagy csak kétkarú vegyületek csupán gyenge kölcsönhatásra képesek, amely arra utal, hogy a farmakofór specifikus.



5. ábra. A multivalens ligandumok elvét foldamerekre alkalmazva olyan anyagot nyertünk, amely az Aβ1-42 oligomerekhez nanomoláris affinitással kötődik.

## D. Közlemények és előadások

### Az értekezés anyagául szolgáló közlemények

- I. A. Hetényi, L. Fülöp, T. A. Martinek, **E. Wéber**, K. Soós, B. Penke  
Ligand-induced flocculation of neurotoxic fibrillar A $\beta$ (1–42) by noncovalent crosslinking.  
*ChemBioChem* **2008**, 9, 748–757. IF: 3.945\*
- II. **E. Wéber**, A. Hetényi, B. Váczi, É. Szolnoki, R. Fajka-Boja, V. Tubak, É. Monostori, T. A. Martinek  
Galectin-1–Asialofetuin interaction is inhibited by peptides containing the Tyr-Xxx-Tyr motif acting on the glycoprotein.  
*ChemBioChem* **2010**, 11, 228–234. IF: 3.945
- III. K. E. Kövér, **E. Wéber**, T. A. Martinek, É. Monostori, G. Batta  
<sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C group-selective techniques extend the scope of STD NMR detection of weak host–guest interactions and ligand screening.  
*ChemBioChem* **2010**, 11, 2182–2187. IF: 3.945
- IV. L. Fülöp, I. M. Mándity, G. Juhász, V. Szegedi, A. Hetényi, **E. Wéber**, Z. Bozsó, D. Simon, M. Benkő, Z. Király, T. A. Martinek  
A foldamer-dendrimer conjugate neutralizes synaptotoxic  $\beta$ -amyloid oligomers.  
*PLoS ONE* **2012** közlésre beküldve

### Egyéb közlemények

1. E. Háznagy-Radnai, B. Réthy, S. Czige, I. Zupkó, **E. Wéber**, T. Martinek, G. Falkay, I. Máthé  
Cytotoxic activities of Stachys species.  
*Fitoterapia* **2008**, 79, 595–597. IF: 1.899
2. G. Benedek, M. Palkó, **E. Wéber**, T. A. Martinek, E. Forró, F. Fülöp  
Efficient synthesis of hydroxy-substituted cispentacin derivatives.  
*Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 20, 3724–3730. IF: 3.206
3. I. M. Mándity, **E. Wéber**, T. A. Martinek, G. Olajos, G. Tóth, E. Vass, F. Fülöp  
Design of peptidic foldamer helices: A stereochemical patterning approach.  
*Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2171–2175. IF: 12.730
4. G. Benedek, M. Palkó, **E. Wéber**, T. A. Martinek, E. Forró, F. Fülöp  
Efficient synthesis of 3,4- and 4,5-dihydroxy-2-amino-cyclohexanecarboxylic acid enantiomers.  
*Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 2220–2225. IF: 2.484



5. M. Palkó, G. Benedek, E. Forró, **E. Wéber**, M. Hänninen, R. Sillanpää, F. Fülöp  
Synthesis of mono- and dihydroxy-substituted 2-aminocyclooctanecarboxylic acid enantiomers.  
*Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 957-961. IF: 2.484
6. Z. Bozsó, B. Penke, D. Simon, I. Laczkó, G. Juhász, V. Szegedi, Á. Kasza, K. Soós, A. Hetényi, **E. Wéber**, H. Tóháti, M. Csete, M. Zarándi, L. Fülöp  
Controlled in situ preparation of A $\beta$ 1-42 oligomers from the isopeptide 'iso-A $\beta$ 1-42', physicochemical and biological characterization.  
*Peptides* **2010**, *31*, 248-256. IF: 2.654
7. S. Patil, L. M. Saleena, K. Yong-Wah, **E. Wéber**, H. von Grafenstein  
Expression and purification of isotopically enriched MHC binding immunogenic peptides for NMR studies.  
*Int. J. Pept. Res. Ther.* **2011**, *17*, 137-145. IF: 1.034
8. A. Lakatos, B. Gyuresik, N. V. Nagy, Z. Csendes, **E. Wéber**, L. Fülöp, T. Kiss  
Histidine-rich branched peptides as Cu(II) and Zn(II) chelators with potential therapeutic application in Alzheimer's disease.  
*Dalton Trans* **2012**, *41*, 1713-1726. IF: 3.647
9. L. Berlicki, L. Pilsl, **E. Wéber**, I. M. Mándity, C. Cabrele, T. A. Martinek, F. Fülöp, O. Reiser  
Unique  $\alpha,\beta$  - and  $\alpha,\alpha,\beta,\beta$  -Peptide Foldamers Based on cis- $\beta$  - Aminocyclopentanecarboxylic Acid.  
*Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, doi: 10.1002/anie.201107702 IF: 12.730

\*A 2010-es impakt faktorokat tüntettem fel.

### Az értekezéssel kapcsolatos előadások

1. **Wéber E.:**  
Amfifil  $\beta$ -peptid hélixek térszerkezete és asszociációs tulajdonságai  
XXVIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Orvostudományi Szekció  
Budapest, 2007. április 3–5.
2. **E. Wéber**, A. Hetényi, T. A. Martinek:  
How not to lose hits in NMR binding tests: comprehensive optimization includes temperature  
The 10th Central European NMR Symposium & Bruker NMR Users Meeting  
September 29-30, 2008, Zagreb, Croatia, Abstr.: P11.

3. **Wéber E.**, Hetényi A.:  
Oldatfázisú szerkezeti biológiai adatok Galektin-1 tumourdajka fehérjéről  
IX. Clauder Ottó Emlékverseny  
Budapest, 2009. április 23-24.
4. **Wéber E.**, Hetényi A., Váczi B., Monostori É., Tóth G., Martinek A. T.:  
Galektin-1 tumourdajka fehérje, ahogy az NMR látja: funkció, dinamika, gátlás:  
MTA Peptidkémiai Munkabizottság Ülése  
Balatonszemes, 2009. május 26-28.
5. **Wéber E.**, Hetényi A., Váczi B., Monostori É., Tóth G., Martinek A. T.:  
Galektin-1 tumourdajka fehérje, ahogy az NMR látja: funkció, dinamika, gátlás  
XIV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus  
Budapest, 2009. november 13-15., Abstr.: P-13.
6. **Wéber E.**, Hetényi A., Fajka-Boja R., Szolnoki É., Batta Gy., Kövér E. K.,  
Monostori É., Martinek A. T.:  
Galektin-1 kölcsönhatása laktózzal és YXY motívumot tartalmazó peptidekkel –  
NMR spektroszkópiás vizsgálatok  
MTA Peptidkémiai Munkabizottság ülése  
Balatonszemes, 2010. május 26-28.
7. K. E. Kövér, **E. Wéber**, T. A. Martinek, É. Monostori, G. Batta:  
<sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C group-selective STD NMR techniques for sensitive binding studies  
Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference  
July 4-9, 2010, Florence, Italy.
8. K. E. Kövér, **E. Wéber**, T. A. Martinek, É. Monostori, G. Batta:  
<sup>15</sup>N- and <sup>13</sup>C group-selective STD NMR techniques for the detection of weak host-  
guest interactions  
The 12th Central European NMR Symposium & Bruker NMR Users Meeting  
September 26-28, 2010, Graz, Austria, Abstr.: page 25.
9. **E. Wéber**, Z. Hegedűs, A. Hetényi, É. Szolnoki, T. A. Martinek:  
Towards foldamer inhibitors of the tumour nursing protein Galectin-1  
COST, Foldamers: design, synthesis and applications  
October 6-8, 2010, Bologna, Italy, Abstr.: PS-21.