

**Szegedi Tudományegyetem**  
**Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

Ph.D. program: Gyógyszerkémia, gyógyszerkutató  
Programvezető: Prof. Dr. Fülöp Ferenc  
Intézet: Gyógyszeranalitikai Intézet  
Témavezető: Prof. Dr. Martinek Tamás

**Olajos Gábor**

**$\beta$ -aminosav helyettesítések  $\beta$ -szendvics  
modellfehérjékben**

**Szigorlati bizottság:**

Elnök: Prof. Dr. Fülöp Ferenc  
Tagok: Prof. Dr. Tóth Gábor  
Dr. Szakonyi Gerda

**Bírálati bizottság:**

Elnök: Prof. Dr. Dombi György  
Opponensek: Prof. Dr. Batta Gyula  
Dr. Farkas Viktor  
Tag: Prof. Dr. Kiss Lóránt  
Titkár: Dr. Csupor Dezső

## A. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A biológiai makromolekulák – DNS, RNS, fehérjék – működése azon képességükön alapszik, hogy képesek kinetikusan kontrollált, termodinamikailag stabil konformáció felvételére. Ez a folyamat, melyet betekeredésnek (*foldíng*) nevezünk, biztosítja a funkciók csoportok precíz térbeli elhelyezkedését, amely a molekuláris felismeréshez, katalízishez és egyéb feladatokhoz elengedhetetlen. A fehérjék változatos szerkezeteinek és funkcióinak utánzásához olyan mesterséges molekulákra van szükség, amelyek hasonló önrendeződő képességgel bírnak. A „foldamer” kifejezést alkalmazzuk ilyen molekulák leírására: mesterséges polimerek, amelyen kompakt konformáció kialakítására hajlamosak, (*foldíng polymers*)

Az első lépés összetett fehérje szerkezetek utánzásához stabil másodlagos szerkezeti elemek, mint hélixek,  $\beta$ -redők és hajtúk tervezése. Számos foldamer hélixet, hajtút valamint néhány önálló  $\beta$ -redőt létrehozott, ám a harmadlagos szerkezetté való kooperatív szerveződés tervezése kihívást jelent. A vízzoldékony, stabil  $\beta$ -redők és  $\beta$ -szendvicsek kialakítását különösen hátráltatja aggregálódási hajlamuk.  $\beta$ -redős szerkezetek tervezése ugyanakkor nagyon kívánatos, hiszen számos fehérjefunkció ilyen magas  $\beta$ -redő tartalmú domaineken keresztül valósul meg; ilyenek például az antitestek variábilis régiói és fehérje-fehérje kölcsönhatási felszínek jelentős része is.

A gyógyszerészet is igényt tart ilyen fehérje-utánzó foldamerekre, hiszen a fehérje hatóanyaggal rendelkező gyógyszerek száma egyre nő, azonban alkalmazhatóságukat erősen korlátozza, hogy jellemzően rossz farmakokinetikai és stabilitási tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint immunogének. Ezen kedvezőtlen tulajdonságok azonban mesterséges aminosavak beépítésével részben vagy akár teljesen kiküszöbölhetőek.

A célunk az volt, hogy  $\beta$ -aminosav helyettesítések lehetőségét derítsük fel összetett, fehérje méretű  $\beta$ -szendvics modellrendszerekben. Modellként a betabellin modellfehérje családot választottuk, amelynek tagjai *de novo* tervezett, 64 aminosavból álló  $\beta$ -szendvics fehérjék, melyeket két egyforma monomer lánc dimerizációja stabilizál.

Először a  $\beta$ -szendvics hidrofób magjában végeztünk  $\beta$ -aminosav helyettesítéseket. Homológ  $\beta^3$ - és konformációsán gátolt gyűrűs  $\beta$ -aminosavakat alkalmaztunk, hogy vizsgálhassuk a különböző oldalláncok hatását és tolerálhatóságát. Ezen kívül vizsgáltuk gyűrűs  $\beta$ -aminosav helyettesítések hatását a modellfehérjék külső szálaiban a szerkezeti stabilitás több szempontjából: termodinamikai stabilitás (a kitekeredés szabadenergiája), hőmérsékleti stabilitás (meleg és hideg denaturáció), valamint a kontrollálatlan aggregációval szembeni stabilitás.

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás módszerekkel vizsgáltuk az általános és hőmérsékletfüggő rendeződési hajlamot, NMR kémiai eltolódás analízist végeztünk az aminosav

szintű szerkezeti információk kinyerésére, valamint molekuladinamikai számításokat végeztünk modellezés és az oldalláncfüggő viselkedés megértése céljából. Az aggregálódási hajlamot NMR jelszintek és transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek segítségével vizsgáltuk.

## **B. MÓDSZEREK**

### **Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia**

A molekulák általános rendezettségét CD kísérletekkel vizsgáltuk. A spektrumokat 100  $\mu\text{M}$  illetve 50  $\mu\text{M}$  peptidkoncentráció mellett vettük fel a monomer illetve dimer szekvenciák esetén. A spektrumokat három alapkomponeusra bontottuk a CCA+ szoftver segítségével, amelynek eredményeképp a másodlagos szerkezeti tartalom kvantitatív közelítését kaptuk. Hőmérsékletfüggő CD-méréseket végeztük a kooperatív rendeződés és stabilitás vizsgálatára. Ezeket az eredményeket alkalmaztuk a peptidok termodinamikai jellemzéséhez.

### **NMR spektroszkópia**

NMR módszereket alkalmaztuk az aminosav szintű konformációs viselkedés vizsgálatához. A spektrumokat 500  $\mu\text{M}$  illetve 250  $\mu\text{M}$  peptidkoncentráció mellett vettük fel a monomer illetve dimer szekvenciák esetén. A jelhozzárendelést 2D TOCSY, NOESY,  $^{13}\text{C}$ - és  $^{15}\text{N}$ -HSQC kísérletek segítségével végeztük el. A másodlagos szerkezetképzési hajlamot mutató úgynevezett SSP pontszámot számoltunk egy referencia rendezetlen szerkezethez tartozó kémiai eltolódásokhoz viszonyítva. NMR méréseket alkalmaztunk a növekvő sókoncentráció melletti aggregációs hajlam követésére.

### **Molekulamodellezés**

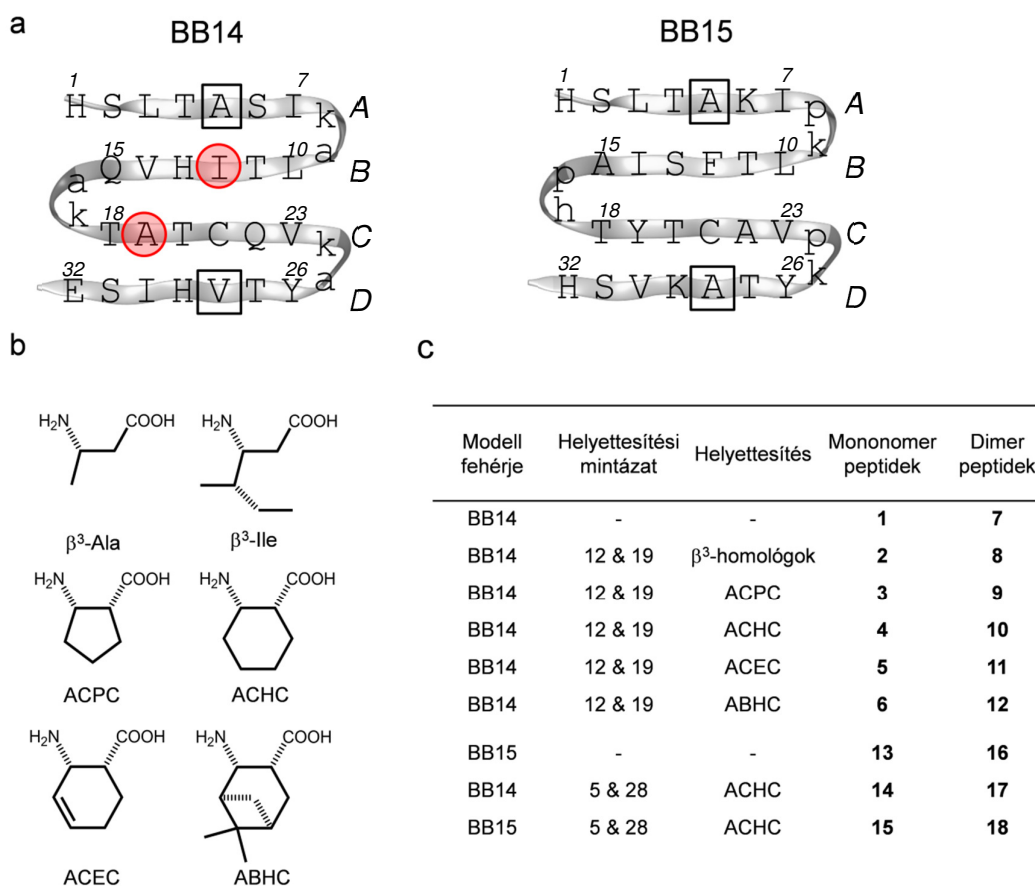
A molekulaszervezeteket a betabellin-14 irodalmi adatai alapján építettük és igazítottuk. A molekuladinamikai számításokat a GROMACS szoftverrel végeztük AMBER ff03 – TIP3P erőterben. 150 ns hosszúságú futások alapján értékeltük a szerkezetek flexibilitását és rendezettségét. A  $\beta$ -redő képzési hajlamot az oldószer által hozzáférhető felszín valamint a gerinc hidrogénkötéseinek száma alapján jellemeztük.

### **Transzmissziós elektronmikroszkópia**

Az aggregátumok kialakulását elektronmikroszkópiás (TEM) módszerrel vizsgáltuk. A peptidok 250  $\mu\text{M}$  töménységű oldatát szénbevonatú rácsra vittük fel és uranil-acetáttal festettük. Az aggregátumokat 120 kV feszültségen működő JEOL JEM-1400 elektronmikroszkóp segítségével jellemeztük. A felvételek rutinszerűen  $\times 25000$  nagyítással készültek.

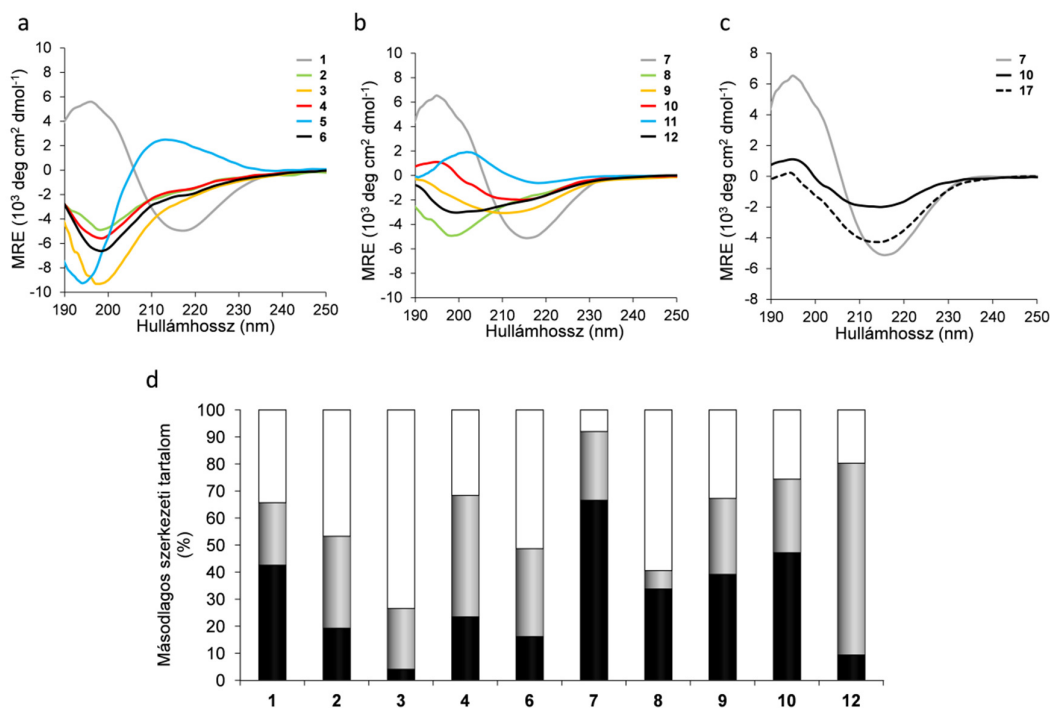
## C. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. Annak érdekében, hogy vizsgáljuk a  $\beta$ -aminosav helyettesítések lehetőségét illetve szabályozását fehérjeméretű  $\beta$ -szendvics rendszerben, két modellfehérje, a betabellin-14 (BB-14) illetve a betabellin-15 (BB-15) hét  $\beta$ -aminosav tartalmú foldamer analógját terveztük és szintetizáltuk, 32-aminosavas monomer illetve 64-aminosavas dimer formában. Ez első tervezési stratégia szerint a BB-14 magjában cseréltünk hidrofób aminosavakat homológ  $\beta^3$ - valamint különböző konformációsán gátolt gyűrűs  $\beta$ -aminosavakra. A munka második részében a BB-14 és a BB-15 külső szálaiban végeztünk gyűrűs  $\beta$ -aminosav helyettesítéseket, hogy vizsgáljuk ezek hatását a stabilitásra és az aggregációra (1. ábra)



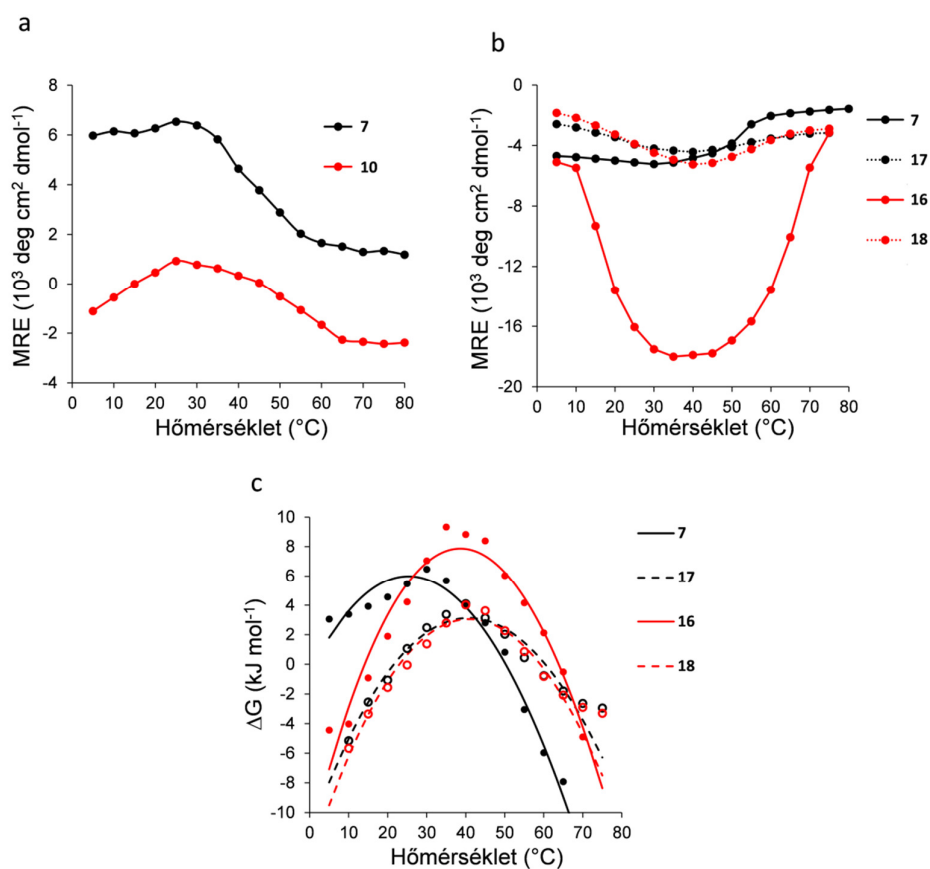
**1. ábra.** A betabellinek aminosav-szekvenciája és szerkezetük reprezentációja (a). Az aminosavak egybetűs kóddal jelölve, a kisbetűk D- $\alpha$ -aminosavakat jelölnek. Körrel a magban, négyzettel a külső szálaban történt helyettesítések pozíciói vannak jelölve. A vizsgáltban alkalmazott  $\beta$ -aminosavak (b). A vizsgált szekvenciák helyettesítési mintázatai (c).

2. A foldamerek általános rendezettségét cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával vizsgáltuk. A szülőszekvenciához hasonló, dimerizáció indukált rendeződést figyeltünk meg minden analóg esetén, a nagy térkitöltésű ABHC aminosavat tartalmazó 12 kivételével (2a-b ábra). A CD spektrumok felbontása lehetővé tette a másodlagos szerkezeti tartalom kvantitatív becslését, amely különbségeket mutatott az analógok indukált  $\beta$ -redő tartalmában (2d ábra). A szülőszekvenciához képest valamennyi foldamer kevésbé volt rendezett, A legnagyobb  $\beta$ -redő tartalmat az 1*R*,2*S*-aminociklohexánkarbonsav (ACHC) helyettesítéssel sikerült elérni. A redő szélén végzett helyettesítések a maghoz képest nagyobb  $\beta$ -redő tartalmat eredményeztek (2c ábra).



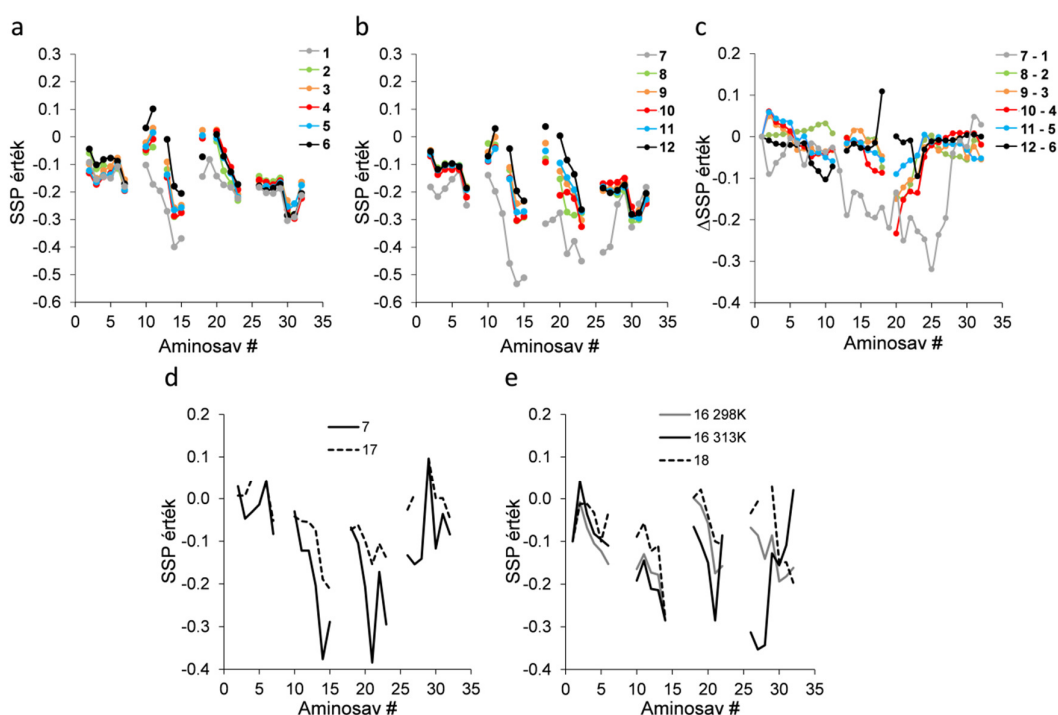
**2. ábra.** A magban helyettesített monomer (a) és dimer (b) szekvenciák CD-spektrumai. A magban illetve külső szálon helyettesített BB-14 CD spektrumai (c). Másodlagos szerkezeti tartalom a BB-14-ben valamint a magban helyettesített származékaiban.

3. Hőmérsékletfüggő CD-méréseket végeztünk a kooperatív rendeződés és a stabilitás vizsgálatára. Fehérjeszerű hideg és termikus denaturációt figyeltünk meg a szülőszekvenciánál valamint az ACHC-t tartalmazó analógok esetén (3a-b ábra). A CD adatokból kiszámítottuk a periférián helyettesített molekulák stabilitási görbéjét, amely a szülőszekvenciákkal összehasonlítva csökkenést mutatott a termodinamikai stabilitásban, ám a legnagyobb stabilitáshoz tartozó hőmérsékletében nem (3c ábra).



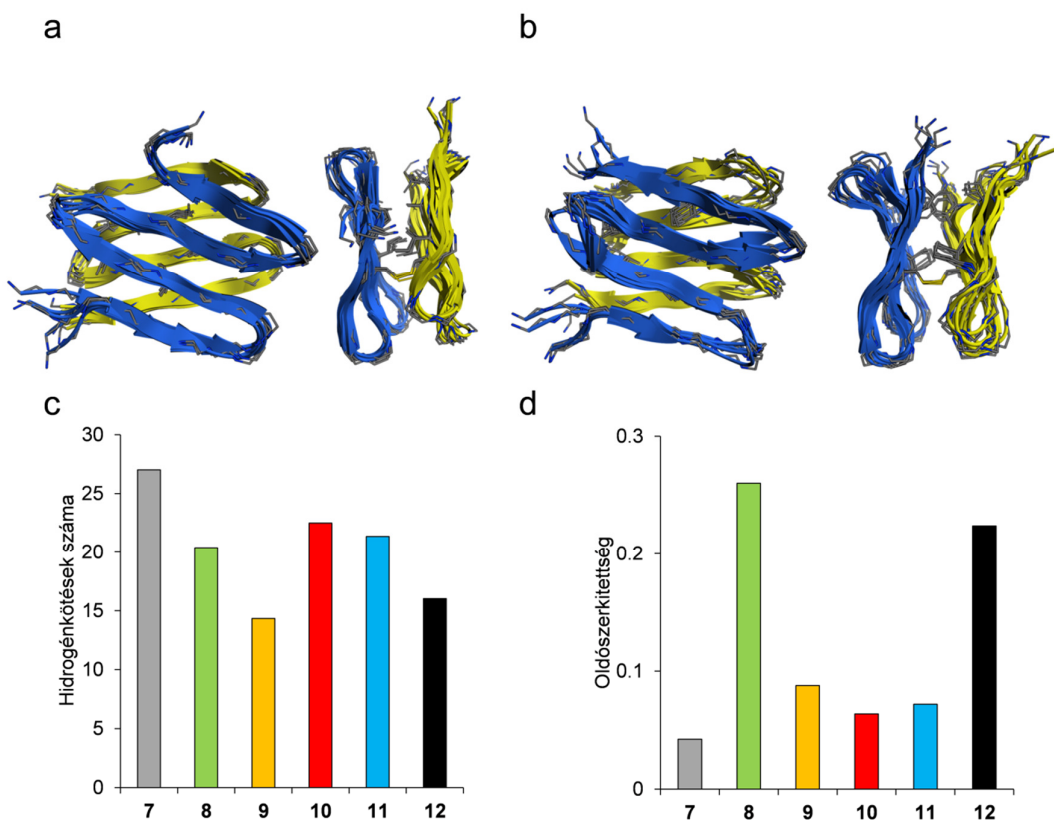
**3. ábra.** Hideg és termikus denaturáció a hőmérsékletfüggő CD-mérések alapján. 195 nm-en mért fajlagos ellipticitás 7 és 10 esetén (a). 216 nm-en mért fajlagos ellipticitás a betabelleinek és külső szálban helyettesített analógok esetén. (b). Kísérletes és illesztett fehérjestabilitási görbék (a kitekeredés szabadenergiája) (c).

4. NMR spektroszkópiás méréseket követően másodlagos kémiai eltolódás analízist végeztünk el az aminosav szintű szerkezeti adatok kinyerése érdekében. A jelhozzárendelést valamennyi vegyület esetében elvégeztük és ezekből SSP pontokat számoltunk. A  $\beta$ -aminosavak környékén a szerkezet eltorzulását figyeltük meg. A dimerizáció leginkább a ciszteint tartalmazó szálaban növelte a  $\beta$ -redő tartalmát, ami részben átterjedt a szomszédos szálakra is. A legnagyobb indukált  $\beta$ -redő tartalom **10** esetén volt megfigyelhető, a többi analóg változatos viselkedést mutatott valamint szerkezetük kevésbé volt indukálható. (4a-c ábra) A külső szálaban történő helyettesítések a  $\beta$ -redő belső szálaiban is jelentősen befolyásolták a rendezettséget, amely a belső és külső szálak közti árnyékoló kölcsönhatások jelenlétére utal. (4d-e ábra)



**4. ábra.** A monomer (a) valamint dimer (b) BB-14, illetve magban helyettesített analógok részére aminosav szinten megállapított másodlagos szerkezeti hajlam (SSP) értékek. A D- $\alpha$ -aminosavakat is tartalmazó SSP érték különbségek.

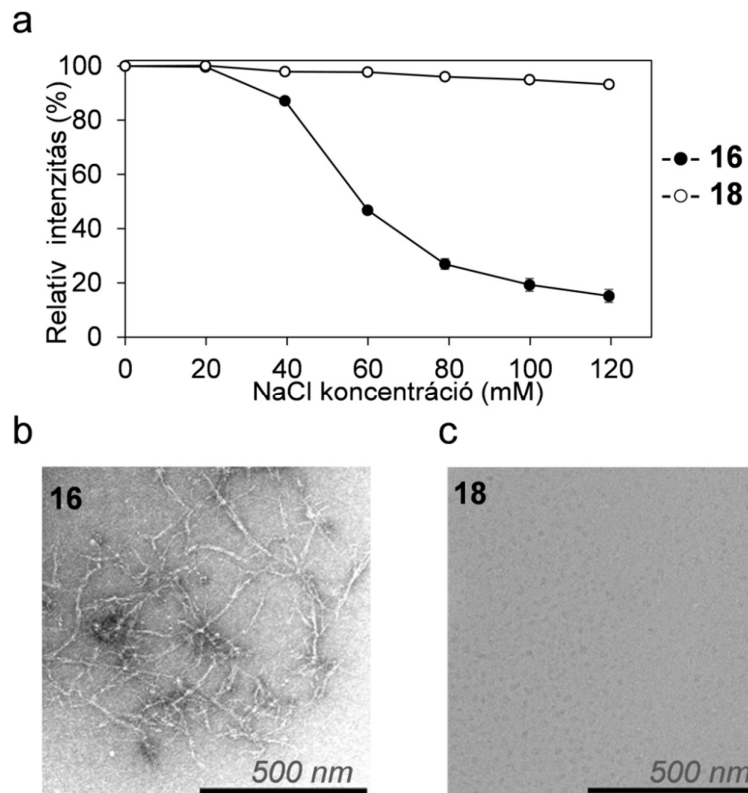
5. Az oldalláncfüggő rendeződési hajlam megértése érdekében molekuladinamikai számításokat végeztünk. A kísérletes eredményekkel összhangban az  $\alpha/\beta$  analógok közül **10** mutatta a legnagyobb fokú rendezettséget valamint a legkisebb eltérést a szülőszekvencia szerkezetétől (5a-b ábra). A kompakt rendeződés jellemzéséhez kiszámítottuk a hidrofób mag oldószer által hozzáférhető felszínét valamint a hidrogénkötések számát a gerincben, és a BB-14-hez legközelebbi értékeket szintén a **10** foldamernél figyeltük meg (5c-d ábra). A többi analóg esetén a kooperatív rendeződés hiányát tapasztaltuk, amely vagy a hidrofób magba való elégtelen illeszkedéssel (**8** és **12**), vagy a nem megfelelő konformáció által megbontott H-kötési hálózattal (**9** és **11**) magyarázható.



**5. ábra.** **7 (a)** és **10 (b)** molekuladinamikai szimulációk során nyert öt legalacsonyabb energiájú szerkezete. A magban található hidrofób aminosav átlagos oldószerkitettsége (c). A megfigyelt hidrogénkötések száma a  $\beta$ -redőkben (elméleti maximum: 36) (d).



6. NMR és TEM módszereket alkalmaztunk a magas sótartalom mellett kialakuló aggregáció vizsgálatához. A BB-15 szülőszekvenciánál fibrillumok kialakulását figyeltük meg, míg **18** esetén aggregációt nem tapasztaltunk. Ez alapján az ACHC-helyettesítés a külső szálakban hatékony módszer lehet az élek mentén történő aggregáció kivédésére.



**6. ábra.** **18** csökkent aggregációs hajlama **16**-hoz képest. A peptidok NMR-látható frakciója az  $^1\text{H}$  NMR jelek integráljai alapján, növekvő sókoncentráció mellett (a). **16** (b) és **18** (c) szekvenciákról készült TEM felvételek.

## Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

- I. Olajos, G., Hetényi, A., Wéber, E., Németh, L. J., Szakonyi, Z., Fülöp, F., Martinek, T. A. (2015). Induced folding of protein-sized foldameric  $\beta$ -sandwich models with core  $\beta$ -amino acid residues. *Chemistry – a European Journal*, **21** (16), 6173-6180.  
IF: 5.160
- II. Olajos, G., Hetényi, A., Wéber, E., Szögi, T., Fülöp, L., Martinek, T. A. (2018). Peripheral cyclic  $\beta$ -amino acids balance the stability and edge-protection of  $\beta$ -sandwiches. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **16**, 5492-5499  
IF: 3.423

## Egyéb publikációk

- I. Mándity, I. M., Wéber, E., Martinek T. A., Olajos, G., Tóth G., Vass, E., Fülöp, F. (2009). Design of Peptidic Foldamer Helices: A Stereochemical Patterning Approach. *Angewandte Chemie International Edition*, **48** (12), 2171-2175  
IF: 12.102
- II. Olajos, G., Bartus, É., Schuster, I., Lautner, G., Gyurcsányi, R. E., Szögi, T., Fülöp, L., Martinek, T. A. (2017). Multivalent foldamer-based affinity assay for selective recognition of A $\beta$  oligomers. *Analytica Chimica Acta*, **960**, 131-137  
IF: 5.123
- III. Lázár, V., Martins, A., Spohn, R., Daruka, L., Grézal, G., Fekete, G., Számel, M., Jangir, P. K., Kintses, B., Csörgő, B., Nyerges, Á., Györkei, Á., Kincses, A., Dér, A., Walter, F., Deli, M. A., Urbán, E., Hegedűs, Z., Olajos, G., Méhi, O., Bálint, B., Nagy, I., Martinek, T. A., Papp, B., Pál, C., (2018). Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nature Microbiology*, **3**, 718-731  
IF: 14.174
- IV. Bartus, É., Olajos, G., Schuster, I., Bozsó Z., Deli M. A., Veszélka, S., Fruzsina R. Walter, F. R., Datki, Z. Szakonyi, Z., Martinek, T. A., Fülöp, L., (2018). Structural Optimization of Foldamer-Dendrimer Conjugates as Multivalent Agents against the Toxic Effects of Amyloid Beta Oligomers. *Molecules*, **23** (10), 2523-2536  
IF: 3.098

## **Az értekezéshez kapcsolódó előadások**

1. G. Olajos, A. Hetényi, T.A. Martinek  
Tervezett  $\beta$ -szendvics foldamerek: egy protein méretű modell  
2014. május 28-30., Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes
2. G. Olajos, A. Hetényi, E. Wéber, J. L. Németh, T. A. Martinek  
 $\beta$ -sandwich foldamers: A protein sized model  
poster presentation  
7th Central Europe Conference, Chemistry Towards Biology, Katowice  
12-14. September 2014
3. T. A. Martinek, G. Olajos, Z. Hegedüs  
Foldamerek sötét oldala. Béta-redők és szendvicsek  
2018. május 28-30, Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes

## **Egyéb előadások**

1. G. Olajos, E. Wéber, J. L. Németh, T. A. Martinek  
Designig  $\beta$ -solenoid foldamers: stereochemistry, chain length and hydrophobic packing  
Symposium on Foldamers, Paris,  
12-14. April, 2013
2. R. Nagy, G. Olajos., V. Hárslalvi, Ü. Murvai, R- H. Pires, G. Ferenczy, L. Fülöp, B. Penke,  
T. A. Martinek, M. S. Kellermayer  
Highly Oriented, Epitaxially Generated Beta-amyloid-based Nanoarray for  
Nanobiotechnological Applications  
Polymers and Self-assembly: From Biology to Nanomaterials, Rio de Janeiro  
25-30. October 2015
3. G. Olajos, R. Spohn, C. Pál, T. A. Martinek  
Rationally designed antimicrobial foldamers against antibiotic resistance  
9th Central Europe Conference, Chemistry Towards Biology, Budapest  
24-27. September 2018