Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

PhD program: Gyógyszerkémia, gyógyszerkutatás

Programvezető: Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Intézet: Orvosi Vegytani Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Martinek Tamás

Bartus Éva Karolina

Foldamerek bottom-up tervezése fehérjefelszínek felismerésére

Szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Tagok: Prof. Dr. Dombi György

Dr. Szabó Pál

Bírálói bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Kiss Loránd

Opponensek: Dr. Kele Péter

Dr. Kardos József

Tag: Dr. Ötvös Ferenc

Titkár: Dr. Hunyadi Attila

A. Bevezetés és célkitűzések

A molekuláris felismerés folyamata az egymással kölcsönható partnerek fizikai kapcsolatán túlmenően számos esetben tölt be kommunikációs szerepet biológiai folyamatokban. A molekulák között kialakuló nemkovalens kölcsönhatásokat a kötőfelszínek alakjának és elektrosztatikus tulajdonságának komplementaritása határozza meg. A nagy területű oldószernek kitett kölcsönható felszíneken gyakran nincsenek klasszikus értelembe vett mély kötőzsebek, ami jelentősen megnehezíti annak kismolekulás hatóanyaggal történő támadását. Ahhoz, hogy ilyen fehérjekomplexek funkcióját befolyásoljuk, olyan nagy térkitöltésű ligandumra, ún. felszín mimetikumra van szükség, amely a farmakofór csoportokat egy jól definiált térbeli elrendeződésben tartalmazza. A molekuláris felismerés szempontjából különös jelentőséggel bírnak a foldamerek, hiszen képesek biomolekulák szerkezeti és funkcionális tulajdonságait utánozni, a 3D szerkezetük előre tervezhető már a monomer szintjén. Kedvező szerkezeti és farmakokinetikai tulajdonságaik miatt a foldamerek alkalmasak lehetnek terápiás szempontból releváns fehérje kölcsönhatások gátlására, ami a kötőfelszín nagy affinitású, specifikus felismerésén keresztül valósul meg. Habár néhány speciális esetben már megvalósították foldamer építőelemek riboszomális beépítését, a foldamerek alapvetően evolúciómentes kémiai entitások. Emiatt *de novo* és bottom-up tervezési stratégiák alkalmazása meglehetősen nehéz olyan foldamer szekvenciák esetén, ahol limitált szerkezeti információ áll rendelkezésünkre a támadni kívánt fehérjefelszínről.

Ilyen nehezen támadható célpont az Alzheimer-kór patofiziológiájában fontos szerepet játszó β-amiloid oligomer. Habár az oligomer szintjének követése diagnosztikus értékű lehet az Alzheimer-kór korai felismerésében, az asszociátum szerkezeti polimorfizmusa megnehezíti az azt felismerő molekula racionális tervezését. A fragmens-alapú hatóanyagtervezés lépéseit követve kutatócsoportunkban korábban már előállítottak a β-amiloid oligomerhez nagy affinitással kötődő multivalens foldamer ligandumot.

Moduláris bottom-up tervezési stratégiát igényel olyan fehérje funkciójának gátlása, ahol a kötőfelszín térben elkülönülő horgonypontokból áll, hiszen ekkor a két vagy több kötőhely egyidejű felismerésére van szükség.

Célul tűztük ki nagy affinitású foldamer-alapú ligandumok *de novo* előállítását és alkalmazását a fent említett nehezen támadható fehérjecélpontok felismerésére. A korábban vizsgált foldamer-amiloid kölcsönhatást alapul véve célunk volt olyan szendvics-típusú affinitás teszt optimalizálása, amely multivalens foldamer ligandumot használ az elfogó antitest helyettesítésére. A specifikus és szelektív módszer kifejlesztéséhez szükséges volt az elkapó

molekula szerkezetének optimalizálása, valamint a detektáló rendszer hatékonyságának növelése.

A fehérjén egymástól távoleső kötőhelyek modellezésére a calmodulint (CaM) választottuk és célul tűztük ki hozzá nagy affinitással kötődő foldamer-alapú inhibitor moduláris bottom-up tervezését. A ligandum keresést két lépésben kívántuk megvalósítani, elsőként a fehérje kötőfelszínének foldamer fragmensekkel történő feltérképezésével, majd ezt követően az egyes fragmensek célfehérje jelenlétében végzett ligációjával.

B. Módszerek

Enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (ELISA)

A β-amiloid oligomer mennyiségének meghatározására szendvics-típusú ELISA tesztet optimalizáltunk. A foldamer-alapú elkapó molekulát egy 96- lyukú avidinnel fedett ELISA plate felszínén immobilizáltuk. Az amiloid minták alkalmazott koncentrációja 10^{-6}-1μM között változott. A detektáló antitest monoklonális anti-β-amiloid 6E10 antitest volt, másodlagos antitestként HRP enzimmel konjugált Histols-M és anti-egér IgG antitesteket alkalmaztunk. Az előhívás 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) oldat alkalmazásával történt, az abszorbancia értékeket plate reader segítségével határoztuk meg 370 nm hullámhosszon (NOVOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Németország). A foldamer-alapú teszt validálására Innotest® β-amyloid (1-42) (Innogenetics, Gent, Belgium) kit-et alkalmaztunk a gyártó előírásainak megfelelően.

Kikötéses-leszorításos kísérlet és dinamikus kombinatorikus könyvtárak

A 256-tagú fragmens könyvtár szűrését a CaM-al kikötéses-leszorításos kísérletben végeztük el. A fehérje affinitás gyantára történő immobilizálását követően a megfelelő koncentrációjú könyvtár oldattal inkubáltuk (pH 7.4). A nem kötődő fragmensek mennyiségét a felülúszóból a minták HPLC-MS kromatogramjának kvantitatív kiértékelésével határoztuk meg.

A dinamikus kombinatorikus könyvtár előállítását diszulfid cserereakción keresztül valósítottuk meg 12 tiollal funkcionalizált foldamer fragmens glutation redox-pufferben történő feloldásával. A kialakuló termékek eloszlását meghatároztunk 4 napos 37°C-on történő inkubációt követően a fehérje jelenlétében és a fehérje nélkül vizsgált elegyben. A dúsulási tényezőt minden könyvtártag esetén meghatároztuk a fehérjével és a fehérje nélkül inkubált mintákban mért koncentrációk arányából.

Izotermális titráló kalorimetria (ITC)

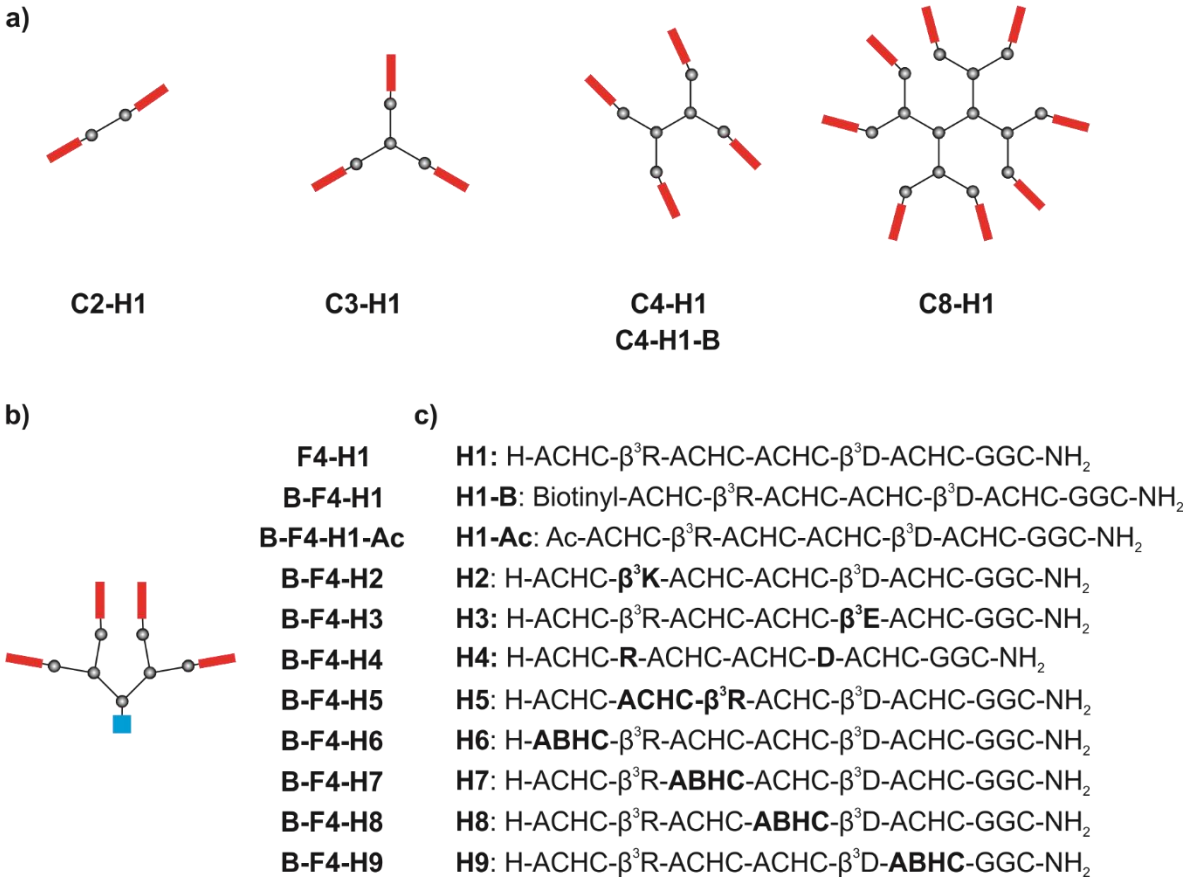
ITC méréseket végeztük a foldamer ligandumok és a célfehérjék (β-amiloid és CaM) kötődésének vizsgálatára Microcal VP-ITC kaloriméter segítségével. A megfelelő foldamer ligandummal titráltuk az előaggregált β-amiloid mintát pH 7.4, 285 K-en, ahol az amiloid koncentrációja 100 μM volt a cellában. A CaM titrálását a ligandumokkal pH 7.0, 298 K-en végeztük el, a fehérje koncentrációja a cellában 3-7 μM között változott.

C. Eredmények és értékelésük

1. Foldamer-alapú szendvics ELISA teszt fejlesztése

Szendvics-típusú analitikai módszert fejlesztettünk alacsony nanomólos koncentrációjú β-amiloid detektálására. Ennek alapjául a korábban már vizsgált antitest mimetikus foldamer-dendrimer konjugátum és a β-amiloid közötti kölcsönhatás szolgált.

1.1. 16 különböző konjugátumot terveztünk és állítottunk elő a foldamer ligandumok szerkezetének és amiloidhoz való kötődési affinitásuk kapcsolatának tanulmányozására.

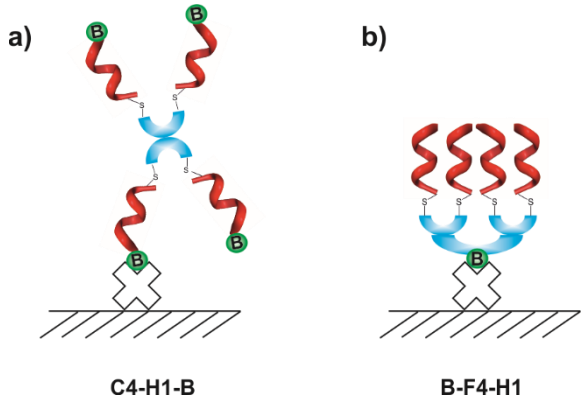


1. ábra. Tervezett foldamer konjugátumok. **a)** a centrális szimmetriájú di-, tri-, tetra- and oktavalens konjugátumok sematikus reprezentációja **b)** a fokális szimmetriájú tetravalens konjugátum sematikus

reprezentációja és az előállított különböző felismerő egységet tartalmazó ligandumok **c)** a különböző felismerő egységek szekvenciája. (ACHC: (1*S*,2*S*) -2-aminociklohexánkarbonsav, ABHC: (1*S*,2*S*,3*S*,5*R*)-3-amino-6,6-dimetilbiciklo [3.1.1] heptán-2-karbonsav)

1.2. A multivalens ligandum karjai számának növelésével hatékonyan növeltük a konjugátum amiloidhoz való kötődési affinitását. A tetravalens ligandum alacsony nanomolós disszociáció állandója azonban nem volt tovább fokozható a karok számának nyolcra történő emelésével.

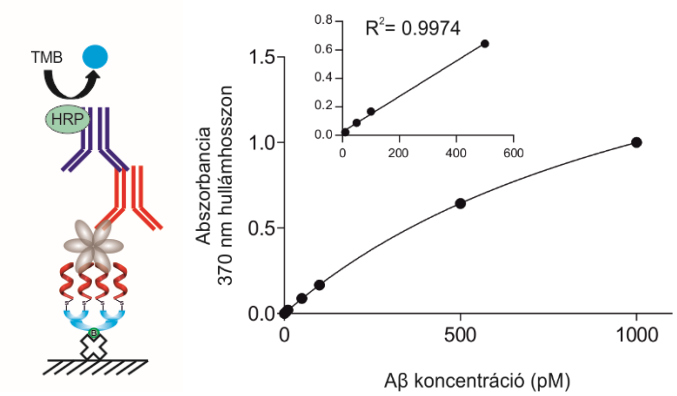
1.3. A foldamer-dendrimerhez hasonló elágazó konjugátumot hoztunk létre a 14-hélix szegmensek (1c. ábra) tetravalens oligo-L-lizin dendron alapvázra történő kapcsolásával. Az új foldamer ligandum mindamellett, hogy képes hasonlóan nagy affinitással kötődni a β-amiloidhoz, az immobilizálás szempontjából kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezik (2b. ábra).



2. ábra. Az elágazó alapvázak sematikus reprezentációja: **a)** a centrális szimmetriájú **C4-H1-B** konjugátum immobilizálva a felszínen, **b)** a hélixek elrendeződése az immobilizált fokális szimmetriájú dendron alapvázon (**B-F4-H1)**.

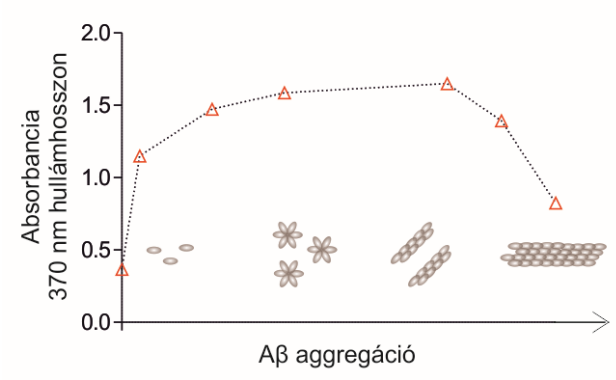
1.4. A tetravalens dendron alapvázra kapcsolt **H1** (H-ACHC-β^3R-ACHC-ACHC-β^3D-ACHC-GGC-NH_2) felismerő szegmens bizonyult a leghatékonyabbnak az amiloid felismerésében, amit sikeresen alkalmaztunk szendvics ELISA kísérletben az elfogó antitest funkcionális mimetikumaként.

1.5. Kihasználva a foldamer konjugátum alacsony nanomólos kötődési affinitását, érzékeny ELISA tesztet fejlesztettünk a β-amiloid oligomer koncentrációjának meghatározására. A tesztrendszer alkalmazásával 5 pM-os kimutatási határt értünk el, ahol a mért jelintenzitás lineáris koncentrációfüggését tapasztaltuk a 10-500 pM tartományban (Figure 3.).



3. ábra. A szendvics ELISA teszt elrendezésének sematikus reprezentációja és a módszer érzékenységének bemutatása.

1.6. Az optimalizált tesztrendszer képes volt különbséget tenni a β-amiloid monomerek és az asszociált formák között, nagy érzékenységet mutatva a szolubilis β-amiloid oligomer iránt, ami potenciális biomarker az Alzheimer-kór korai diagnózisában.

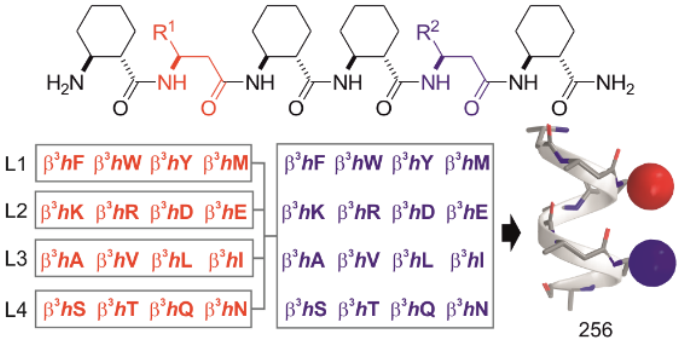


4. ábra. Az ELISA teszt oligomer szelektivitásának reprezentációja a β-amiloid időfüggő aggregációjának követésén keresztül.

2. Nagy affinitású foldamer ligandum *de novo* fejlesztése

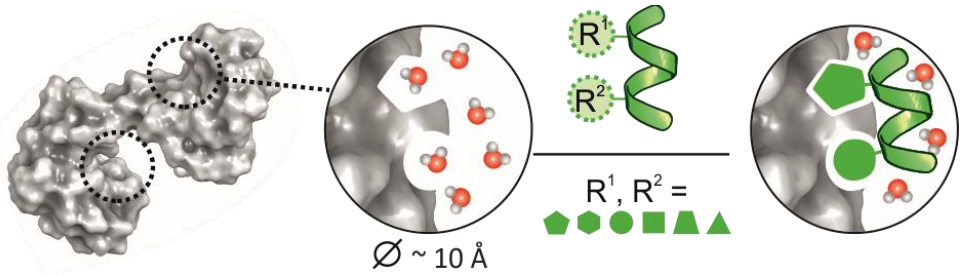
Foldamer-alapú inhibitort hoztunk létre moduláris bottom-up megközelítéssel, egymástól távoleső „forró pontok” felismerésére.

2.1. 256-tagú kombinatorikus foldamer könyvtárat terveztünk és állítottunk elő, melynek tagjai proteinogén oldallánc párokat tartalmaznak egy 14-hélix alapváz azonos oldalán (5. ábra). A hexamer 2. pozíciójában lévő aminosav tulajdonsága alapján 4 foldamer alkönyvtárat hoztunk létre: aromás (L1), töltött (L2), alifás (L3), poláris (L4).



5.ábra. A rendezett foldamer fragmensek általános szerkezeti képlete és sematikus reprezentációja, valamint a könyvtártagok elrendezése az egyes alkönyvtárakban.

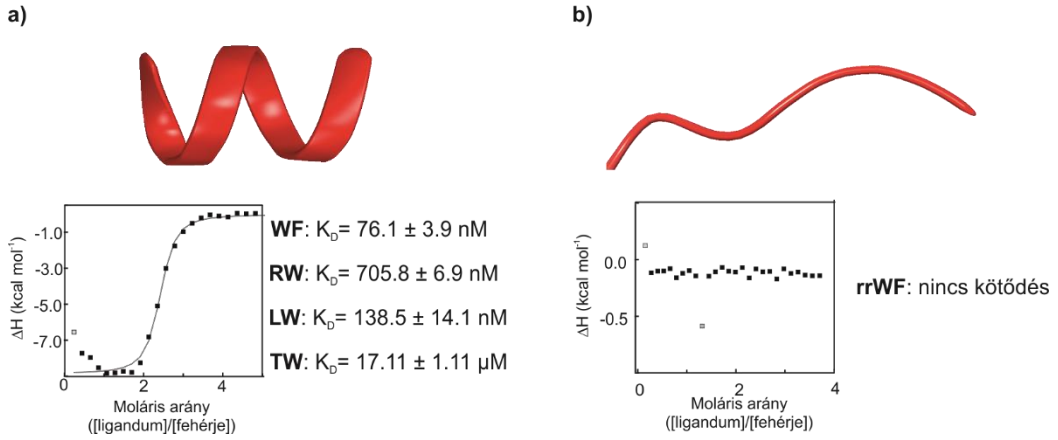
2.2. A könyvtártagok kölcsönhatását a modell fehérjéhez, CaM-al kikötéses-leszorításos kísérletben vizsgáltuk és meghatároztuk a fehérjével komplexet képező fragmenseket.



6. ábra. A fehérje felszínének feltérképezése foldamer fragmensekkel, melyek proteinogén oldalláncot mutatnak a fehérjefelszín fel, a hidrofób molekularész pedig az oldószer árnyékolásáért felelős.

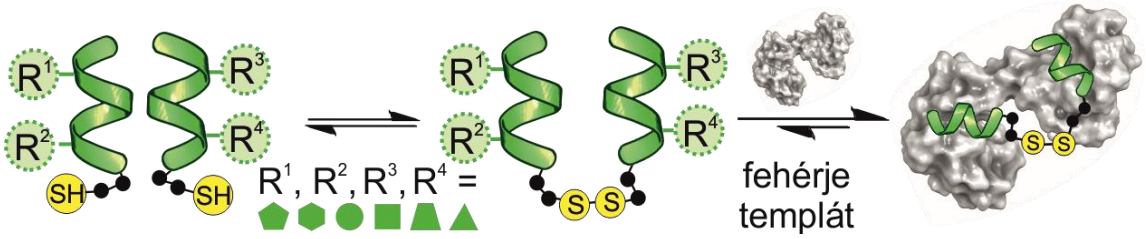
2.3. Vizsgáltuk a foldamer fragmensek rendezett másodlagos szerkezetének szerepét a kölcsönhatásban, ehhez meghatároztuk négy kiválasztott fragmens (**WF, RW, LW, TW**; elnevezésük a 14-hélixen prezentált proteinogén oldallánc párok standard egybetűs kódjának megfelelően) kötődési affinitását. Az egyes fragmensek CaM-hoz való kötődését alacsony micromólos- szubmikromólos disszociációs állandóval jellemeztük (7a. ábra). A **WF** nem helikális származékát (**rrWF**) vizsgálva nem tapasztaltunk kölcsönhatást a

fehérjével, ami megerősítette a rendezett másodlagos szerkezet fontosságát a felismerésben.



7. ábra. Reprezentatív ITC görbe és a számolt disszociációs állandó értékek (K_D) a rendezett másodlagos szerkezettel rendelkező fragmensek CaM-al való kölcsönhatására (**a**), a nem helikális származékkal végzett ITC titrálás eredménye (**b**).

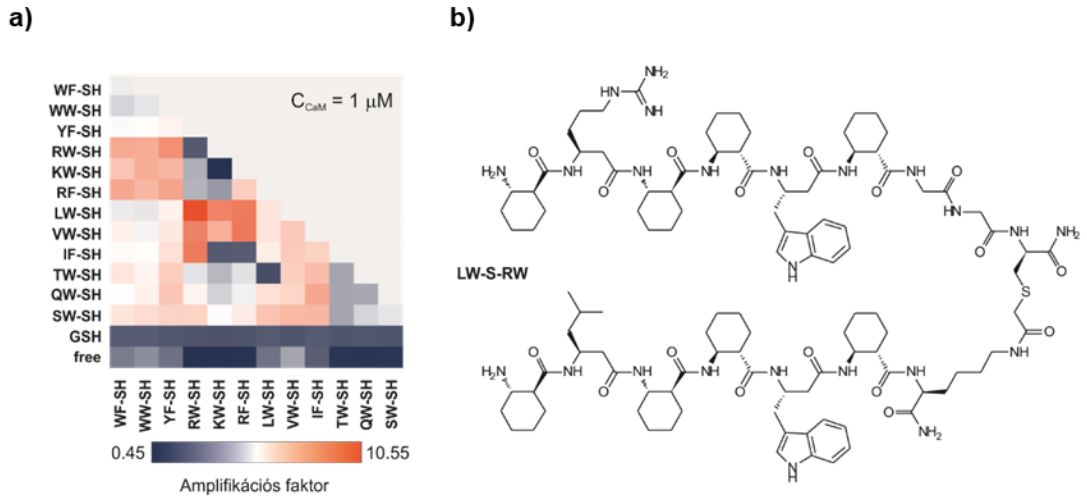
2.4. A kikötéses-leszorításos kísérlet alapján legjobbnak vélt 12 fragmensből dinamikus kombinatorikus könyvtárat hoztunk létre glutation redox-pufferben. A reakció körülményei között a célfehérje jelenlétében a termodinamikailag legkedvezőbb elegyösszetétel alakult ki, az egyensúly eltolódott a fehérjéhez legjobban kötődő ligandumok képződésének irányába.



8. ábra. Célfehérje által vezérelt nagy affinitású ligandum szintézise és szelekciója diszulfid cserén alapuló dinamikus kombinatorikus könyvtárban.

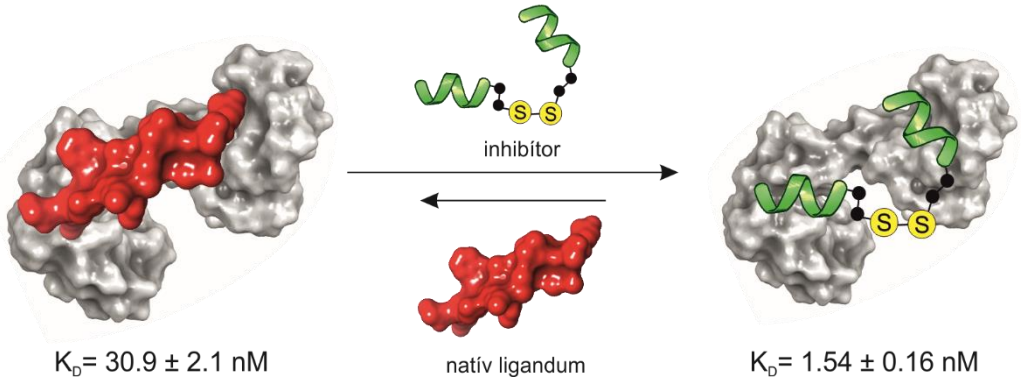
2.5. A 102 tagú dinamikus kombinatorikus könyvtár analízisével minden könyvtártagra amplifikációs faktort határoztunk meg, mely jellemzi az adott ligandum dúsulását a CaM jelenlétében (9. ábra). A kísérletben legnagyobb dúsulást mutató hélix dimert (**LW-SS-RW**) választottuk további karakterizálásra.

2.6. Az **LW-SS-RW** dimert egyedileg is előállítottuk a diszulfid kötést kémiailag stabil tioéter kötésre cserélve (**LW-S-RW,** 9b ábra). ITC-vel igazoltuk, hogy a fragmensek ligációjából nyert foldamer ligandum disszociációs állandója két nagyságrendet javult az azt alkotó monomerekhez képest.



9. ábra. A dinamikus kombinatorikus könyvtár tagjainak dúsulási tényezője (**a**). A diszulfidokat alkotó monomerek a függőleges és a vízszintes tengelyen, elnevezésük a proteinogén oldalláncok egybetűs kódjának megfelelően történt. A színskála kéktől piros színig jelöli a dúsulási tényezőket a legkisebbtől a legnagyobb értékig, **b**) a tioéter kötéssel összekapcsolt dimer szerkezete, mely legnagyobb dúsulást mutatta a CaM jelenlétében.

2.7. Kompetitív kísérletekben igazoltuk továbbá, hogy az előállított foldamer-alapú ligandum a fehérje natív ligandum (vanilloid receptor C-terminális peptid, $TRPV1_{784-798}$) kötőhelyét ismeri fel és képes a fehérje-fehérje kölcsönhatás gátlására.



10. ábra. Az **LW-S-RW** fehérje-fehérje kölcsönhatást gátló hatásának sematikus reprezentációja és az ITC titrálással kapott K_D értékek a foldamer ligandumra és a natív kölcsönható partnerre (vanilloid receptor C-terminális fragmense; $TRPV1_{784-798}$).

Értekezés alapjául szolgáló publikációk

I. É. Bartus, G. Olajos, I. Schuster, Zs. Bozsó, M. A. Deli, Sz.Veszelka, F. R. Walter, Zs. Datki, Zs. Szakonyi, T. A. Martinek, L. Fülöp (2018). Structural Optimization of Foldamer-Dendrimer Conjugates as Multivalent Agents against the Toxic Effects of Amyloid Beta Oligomers. *Molecules,* 23(10), 2523.

IF: 3.098

II. G. Olajos, É. Bartus, I. Schuster, G. Lautner, R. E. Gyurcsányi, T. Szögi, L. Fülöp, T. A. Martinek (2017). Multivalent foldamer-based affinity assay for selective recognition of Aβ oligomers. *Analytica Chimica Acta,* **960**, 131-137.
IF: 5.123

III. É. Bartus, Zs. Hegedüs, E. Wéber, B. Csipak, G. Szakony, T. A. Martinek (2017). De Novo Modular Development of a Foldameric Protein–Protein Interaction Inhibitor for Separate Hot Spots: A Dynamic Covalent Assembly Approach. *ChemistryOpen,* **6** (2), 236-241.
IF: 2.801

Egyéb publikációk

IV. A. Hetényi, L. Németh, E. Wéber, G. Szakonyi, Z. Winter, K. Jósvay, É. Bartus, Z. Oláh, T. A. Martinek. (2016). Competitive inhibition of TRPV1–calmodulin interaction by vanilloids. *FEBS letters* **590**(16): 2768-2775.
IF: 2.999

Értekezéshez kapcsolódó előadások

1. Bartus É., Hegedüs Zs., Wéber E., Csipak B., Szakonyi G., Martinek T.
   Célfehérje által vezérelt ligandum tervezés rendezett fragmensek segítségével - Affinitás-növelés
   MTA Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése
   Balatonszemes, 2016. május 30- június 1.

2. Bartus É., Hegedüs Zs., Wéber E., Csipak B., Szakonyi G., Martinek T.
   Célfehérje által vezérelt ligandum tervezés rendezett fragmensek segítségével
   Magyar Tudomány Ünnepe Előadóülés
   Szeged, 2016. november 8.

3. É. Bartus, Zs. Hegedüs, E. Wéber, B. Csipak, G. Szakonyi, T.A.Martinek
   Target directed synthesis of foldameric protein-protein interaction inhibitors
   Poster presentation
   Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry Conference
   Linz, August 30-September 2, 2017.

4. Bartus É., Mag B, Csipak B., Ecsédi P. Nyitray L. Martinek T. Proteinek felismerési mintázata a foldamer térben
   MTA Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése
   Balatonszemes, 2018. május 28-30.