

# Fehérjeaggregátumok termodinamikai és szerkezeti vizsgálata

MICSONAI ANDRÁS

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Témavezető:

DR. KARDOS JÓZSEF

adjunktus

ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: PROF. ERDEI ANNA

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: DR. NYITRAY LÁSZLÓ

Budapest, 2015

## Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a fehérjék aggregációjáról alkotott képünk jelentősen megváltozott. Ma már nem csupán a rekombináns fehérjetechnika vagy a fehérjeminták tárolása során fellépő melléktermékek és problémák kapcsán kerülnek említésre. Az élőlények, illetve vírusok szinte minden életfolyamatában részt vesznek fehérjék, melyek a funkciójuk ellátásához evolválódott, jól definiált térszerkezettel rendelkeznek. Mindez csak addig igaz, amíg a fehérjehomeosztázis fennáll. Mutációk, a környezet megváltozása vagy a sejt minőségellenőrző rendszerének hiányos működése miatt nem-natív szerkezetű fehérjék halmozódhatnak fel a szervezetben. Ez egyfelől funkcióvesztéssel jár, másrészt az alternatív konformációk általában aggregációra hajlamosak.

Az utóbbi évekig az amiloid szálak – melyek hosszú, fibrilláris szerkezetű homopolimer fehérjeaggregátumok – jelentették az aggregációkutatás egyik fő célpontját. Ennek oka az volt, hogy több mint 30 humán és még több, állatokat érintő betegség esetén találtak kapcsolatot a kórkép és a szervezetben jelenlévő amiloid lerakódások között. A legismertebbek közé tartozik az Alzheimer-kór, Parkinson-kór és a II. típusú diabetes mellitus. Régóta ismert, hogy az amiloid szálak képződése nukleációfüggő folyamat, és a folyamat korai szakaszában – értelemszerűen – kisebb méretű aggregátumok is jelen vannak, azonban csak az utóbbi időben kezdték vizsgálni a korai aggregátumok, oligomerek élettani hatásait. Számos betegség esetén figyeltek meg szoros összefüggést az oligomerek jelenléte és a kórképek között. Ezek alapján elképzelhető, hogy az amiloid szálak jelenléte nem oka néhány betegségnek, hanem okozata, abban az értelemben, hogy a szervezetben a toxikus oligomerekből kevésbé káros amiloid szálak képződnek.

A képet tovább árnyalja, hogy a 2000-es évek eleje óta számos élőlényben (köztük emberben is) leírtak olyan életfolyamatokat, melyekben ún. funkcionális amiloidok vesznek részt. A Pmel17 fehérje amiloid formája például nélkülözhetetlen az ember melanintermelésben, peptihormonjaink pedig amiloid formában tárolódnak a szekréción vezikulákban. Az amiloidoknak tehát nem csupán toxikus hatásuk lehet, hanem az élet számára esszenciális folyamatokban is szerepet játszhatnak.

A gyógyszeripar egyre hatásosabb peptid- és fehérjealapú gyógyszereket fejleszt különböző betegségek kezelésére. Ezek szervezetbe juttatásának helyén (pl. *subcutan*) lokálisan nagy fehérjekoncentráció léphet fel, amely az aggregáció veszélyét hordozza magában. Cukorbeteg szervezetében az inzulin injekció helyén amiloid szálakat figyeltek meg. További példa a gyógykezelés mellékhatásaként kialakuló konformációs betegségekre a vesedialízishez

kapcsolt amiloidózis: veseelégtelen betegekben a dialíziskezelés következtében 5-10 éven belül amiloidlerakódások képződnek a vázrendszer mentén.

Mindezek fényében különösen fontos minél pontosabb információkkal rendelkezni az aggregációs betegségeken szerepet játszó fehérjékről: Milyen szerkezete van (morfológia és atomi szerkezet) az azonosított élettani hatásért felelős aggregátumoknak? Milyen biokémiai folyamatok során képződnek az aggregátumok? Ezek a folyamatok miként jellemezhetőek kinetikai és termodinamikai szempontból?

Az aggregáció folyamatának és az aggregátumok szerkezetének tanulmányozására számos, betegségben részt vevő, illetve betegséget nem okozó modellpeptidet és fehérjét használnak. A biokémiában és biofizikában általánosan alkalmazott módszerek legtöbbje pedig jól adaptálható az fehérjeaggregáció vizsgálatára.

Jelen értekezésben igyekszem összefoglalni a téma irodalmát, majd a kitűzött célok ismertetése után bemutatni és értelmezni az új tudományos eredményeket. Megjegyzendő, hogy a dolgozat alapjául szolgáló egyik közlemény módszertani jellege miatt eredményeim egy része – a könnyebb érthetőség kedvéért – az Anyagok és módszerek részben szerepel. A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia részletesebb irodalmi áttekintése szintén a jól érthetőséget szolgálja. Ezen felül célom volt egy magyar nyelvű segédletet adni a téma iránt érdeklődőknek, bízva abban, hogy az ott említett hibaforrások szem előtt tartásával eredményesen tudják majd alkalmazni a cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia módszerét a fehérjék szerkezetének tanulmányozására.

## **Célkitűzések**

Munkánk fő célja a fehérjeaggregátumok termodinamikai és szerkezeti jellemzése, valamint az ilyen irányú vizsgálatok elvégzésére alkalmas módszerek fejlesztése és tökéletesítése volt. A kutatás három téma köré csoportosul, melyekkel kapcsolatban a következő kérdésekre kerestük a választ:

### **1. A $\beta_2$ -mikroglobulin amiloid szálainak hőstabilitás-vizsgálata**

- Reverzibilis folyamat-e a  $\beta_2$ -mikroglobulin amiloid szálak hődenaturációja?
- Elérhető-e a szálak teljes depolimerizációja magas hőmérsékleten?
- Az átmeneti hőmérsékleteken kezelt minták repolimerizációja milyen kinetikát mutat?
- Alkalmazható-e a hőkezelés más fehérjék amiloid szálainak vizsgálatára is?

- Jellemezhetőek-e különböző kísérleti körülmények hatásai a hődenaturációs profil segítségével?

## 2. A Trp-kalitka peptid D9S(P) variánsának aggregációja

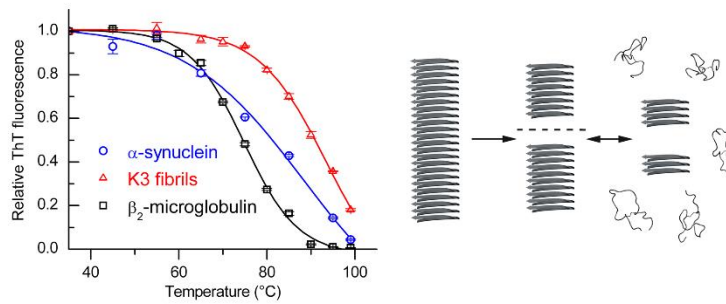
- Milyen szerkezeti következménye van az oldallánc-módosításnak?
- A D9S(P) aggregátumai milyen morfológiai tulajdonságokkal és másodlagos szerkezettel jellemezhetők?
- A kollagén hármas hélixét kiindulópontként véve építhető-e stabil szerkezeti modell?
- A modellben azonosított intermolekuláris kölcsönhatások igazolhatóak-e kísérletesen?

## 3. Fehérjék másodlagos szerkezetének vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával

- Mérhető-e az amiloid szálak CD spektruma?
- Az eddigi szerkezetbecslő módszerek használhatóak-e az aggregátumok szerkezetének becslésére?
- Kimutatható-e összefüggés a  $\beta$ -lemezek orientációja és csavarodása, valamint a CD spektrumok között?
- A csavarodás hatásának figyelembevétele mellett hogyan dolgozható ki egy eredményes szerkezetbecslő algoritmus?
- A becslésből származó információk alapján adható-e becslés a fehérje foldjáról?
- A kidolgozott módszer milyen eredményeket szolgáltat fehérjeaggregátumok, illetve globuláris fehérjék vizsgálata esetén?

## Tézisek

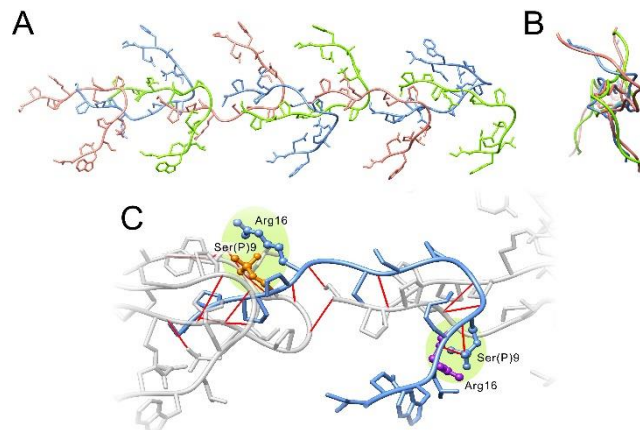
1. *A  $\beta_2$ -mikroglobulin amiloid szálainak reverzibilis hődenaturációja a monomerek szálvégekről történő disszociációjával és a szálak törésével valósul meg.*  
A 37°C-on képződő  $\beta_2$ -mikroglobulin amiloid szálak 5-10 perces 99°C-os hőkezelés hatására monomerekre esnek szét. 37°C-ra visszahűtve az oldatot, a repolimerizáció teljesen végbe megy. A 65-85°C-on történő hőkezelést követő repolimerizáció nagyobb sebességgel megy végbe, mint a kiindulási oldatban 37°C-on tapasztalt polimerizáció. A sebességnövekedést a szálak hő(mozgás) hatására történő darabolódásával keletkező új polimerizációs magok keletkezése magyarázza.
2. *A  $\beta_2$ -mikroglobulin aggregációja során alkalmazott körülmények stabilitásra gyakorolt hatása a hődenaturációs profillal reprodukálhatóan vizsgálható.*  
A magasabb kezdeti magkoncentráció, az inkubálás ideje és hőmérséklete, valamint az oldatban lévő ionok hatása a hődenaturációs kísérletekben reprodukálhatóan nyomon követhető. A hőstabilitásra tanulmányozására kidolgozott vizsgálati módszer általánosan használható aggregátumok stabilitásának jellemzésére.



1. ábra: A  $\beta_2$ -mikroglobulin, a K3, valamint az  $\alpha$ -szinuklein amiloid szálainak hődenaturációs profilja (balra), illetve a (1) szálvégi monomer-disszociációval és a (2) szálak törésével megvalósuló hődenaturációs modell sematikus ábrája (jobbra).

3. *A Trp-kalitka minifehérje D9S(P) variánsa 4°C-on poliprolin II-hélix szerkezetű aggregátumokat képez*

A D9S(P) aggregátumai a kollagénnel jellemző CD spektrumot mutatják, nem kötik a tioflavin-T amiloid-specifikus festéket. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján hosszú, vékony hajlékony szálakat formáznak, melyek különböznek az amiloid szálaktól. Mivel a molekula C-terminális fele prolinban gazdag, valószínűsíthető, hogy poliprolin II hélix (PPII) konformáció alakul ki. Ezt megerősíti, hogy a kollagén hélix térszerkezetére fel tudtuk építeni a Trp-kalitka molekulákból álló polimer szálakat. A modell energiaminimalizálása során kialakult az 16Arg-9Ser(P) intermolekuláris sóhíd, melyek kísérletesen is igazolni tudtunk. Megállapíthatjuk tehát, hogy a Ser9 foszforilációja a szerkezetet destabilizálja és 4°C-on PPII-szerkezetű aggregátumok kialakulásához vezet.



2. ábra: A D9S(P) poliprolin II hélix konformációjú polimer-modellje.

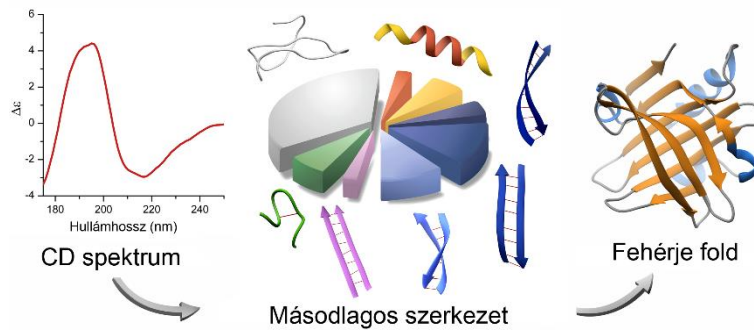
4. *A  $\beta$ -lemezek CD spektruma nagymértékben függ a lemezek orientációjától és csavarodásától*

A CD spektroszkópia a fehérjék másodlagos szerkezetének vizsgálatára használt módszer, azonban eddig korlátozottan volt alkalmas  $\beta$ -szerkezetben gazdag fehérjék és fehérjeaggregátumok tanulmányozására. Megmutattuk, hogy a  $\beta$ -szerkezetű fehérjék CD spektrumainak változatosságáért a  $\beta$ -lemezek orientációja (parallel és antiparallel) és csavardósa áll.

5. A  $\beta$ -lemezek csavarodásának figyelembevételével jelentősen javítható a CD spektrumokból történő másodlagosszerkezet-becslés pontossága. Beta Structure Selection (BeStSel) módszerünk az eddigi algoritmusokhoz képest bármilyen típusú fehérje szerkezetét pontosabban becsli.

6. A BeStSel által szolgáltatott szerkezeti információk alapján becsülhető a fehérjék foldja.

A korábbi módszerekhez képest a BeStSel többletinformációt szolgáltat a  $\beta$ -szerkezetek konformációjáról, mely alkalmassá teszi a foldbecslésre. A módszer a Protein Data Bankban található térszerkezetek vizsgálatán alapul.



3. ábra: a BeStSel algoritmus a  $\beta$ -lemezek orientációját és csavarodását figyelembe véve ad többlet információt, mely alapján a fold becsülhető.

7. A cirkuláris dikroizmus alkalmas módszer fehérjeaggregátumok vizsgálatára és másodlagos szerkezetének becslésére.

Gondosan kivitelezett CD vagy SRCD mérésekkel lehetséges a fehérjeaggregátumok, amiloid szálak vizsgálata. Új kiértékelő módszerünk használható másodlagos szerkezeti információkat szolgáltat ezen – más módszerekkel nehezen tanulmányozható – fehérjeformák esetén.

## Összefoglalás

A fehérjék szerkezet-funkció paradigmája az utóbbi évtizedekben jelentősen formálódott. A *natív – rendezetlen – aggregálódott*, illetve *funkcionális – aberrált* kifejezések korábban egyértelmű kapcsolatait mára egy sokkal komplexebb szemléletmód kezdi felváltani. Egy adott szekvenciájú polipeptidlánc számos stabil konformációt képes felvenni, amelyek más-más kölcsönhatásokat tesznek lehetővé, ezáltal igen eltérő élettani folyamatokat indíthatnak be. A tanulmányozni vagy befolyásolni kívánt hatást kiváltó szerkezetekről szerzett ismeretek elengedhetetlenek a mechanizmusok eredményes vizsgálatához.

Doktori munkám első részében a vesedialízishez kötött amiloidózisért felelős  $\beta_2$ -mikroglobulin amiloid szálainak hőstabilitását vizsgáltam. Megállapítottam, hogy az amiloid

szálak reverzibilis hődenaturációja a monomerek szálvégekről történő disszociációjával és a szálak törésével valósul meg. A  $\beta_2$ -mikroglobulin aggregációja során alkalmazott körülmények stabilitásra gyakorolt hatása a hődenaturációs profillal reprodukálhatóan vizsgálhatónak bizonyult. A K3 és az  $\alpha$ -szinuklein amiloid szálainak hőstabilitását vizsgálva megállapítható, hogy a  $\beta_2m$  amiloid szálak magasabb hőmérsékleten tapasztalt csökkent stabilitása és disszociációja nem egyedi jelenség, és a hődenaturációs módszer általánosan alkalmazható fehérjeaggregátumok stabilitásának vizsgálatára.

A 20 aminosav hosszú Trp-kalitka peptidet, mint modellrendszert használva vizsgáltam a foszforiláció szerkezetre gyakorolt hatását. Megállapítottam, hogy a D9S(P) variáns 4°C-on poliprolin II-hélix szerkezetű aggregátumokat képez. A kísérletes eredményekkel összhangban lévő hármashélix modellben *in silico* azonosított Arg16-9S(P) só-híd kialakulását kísérletesen is sikerült alátámasztani.

A fehérjék CD spektrumokból történő szerkezetbecslésére korábban kidolgozott algoritmusok alkalmatlannak bizonyultak fehérjeaggregátumok vizsgálatára. A  $\beta$ -lemezes szerkezetek geometriai és spektrális diverzitása korlátot szabott a becslések pontosságának. Sikerült kimutatnunk, hogy szoros összefüggés van a  $\beta$ -lemezek orientációja és csavarodása, valamint CD spektruma között. Kidolgoztunk egy, a csavarodást is figyelembe vevő új algoritmust, amely minden eddiginél pontosabb becslést ad a fehérjék másodlagos szerkezetére. Megfigyeléseink alapján a módszerünk által megkülönböztetett másodlagos szerkezeti elemek jól jellemzik a fehérjék harmadlagos szerkezetét, ezáltal a CD spektrumból a foldra vonatkozó becslések is tehetők.

Szerkezetbecslő módszerünket (BeStSel – Beta Structure Selection) eredményesen alkalmaztuk különféle, többek között degeneratív betegségekben szerepet játszó fehérjék és peptidok aggregátumainak szerkezetvizsgálatára.

A BeStSel globuláris és membránfehérjék valamint aggregátumok és ritka szerkezetű fehérjék esetén is kimagasló eredményeket adott. Megállapíthatjuk, hogy általánosan alkalmazható bármilyen fehérjemolekula szerkezetének tanulmányozására. Megalkottunk egy szabadon elérhető online webszervert, amivel spektrumok vagy spektrumsorozatok értékelhetőek ki egyszerűen és gyorsan.

## **Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények**

Kardos J, Micsonai A, Pál-Gábor H, Petrik É, Gráf L, Kovács J, Lee YH, Naiki N, Goto Y (2011) Reversible heat-induced dissociation of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils. *Biochemistry* 50(15):3211-3220.

Kardos J, Kiss B, Micsonai A, Rovó P, Menyhárd DK, Kovács J, Váradi G, Tóth GK, Perczel A (2015) Phosphorylation as conformational switch from the native to amyloid state: Trp-cage as a protein aggregation model. *J Phys Chem B* 119(7):2946-2955.

Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, Kardos J (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(24):E3095-E3103.

## **További saját közlemények**

Pál-Gábor H, Gombos L, Micsonai A, Kovács E, Petrik É, Kovács J, Gráf L, Fidy J, Naiki H, Goto Y, Liliom K, Kardos J (2009) Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of  $\beta$ 2-microglobulin in vitro under physiological conditions. *Biochemistry* 48(24):5689-99.

## **Nemzetközi konferenciákon bemutatott eredmények**

Kardos J, Pál-Gábor H, Micsonai A, Szabó E, Gyimesi G, Goto Y, Liliom K. Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of  $\beta$ 2-microglobulin. Conference on "Amyloid Fibrils, Prions and Precursors: Molecules for Targeted Intervention", Halle (an der Saale), Germany, 25-28 August, 2011

Micsonai A, Wien F, Kardos J. Improved secondary structure determination of proteins with SRCD: distinguishing parallel and antiparallel beta-structure. 8th European Biophysical Congress, Budapest, Hungary, 23-27 August, 2011

Kardos J, Kiss B, Micsonai A, Tóth G, Perczel A. Trp-cage miniprotein as a model of real proteins: From the native,  $\alpha$ -helical state to polyproline helix and amyloid fibrils. 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Budapest, Hungary, 31 August – 3 September, 2011

Kardos J, Szabó E, Wien F, Micsonai A. Improved secondary structure determination of proteins with SRCD: distinguishing parallel and antiparallel beta-structure, 7th Soleil User's Meeting 2012, Gif-sur-Yvette–Palaiseau, France, 18-29 January, 2012

Kardos J, Szabó E, Wien F, Micsonai A. Accurate antiparallel and parallel  $\beta$ -sheet decomposition and fold prediction from srcd spectroscopy, The 12th



Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan, Nagoya, Japan, 20-22 June, 2012

Kardos J, Wien F, Micsonai A. Accurate antiparallel and parallel  $\beta$ -sheet decomposition and fold prediction from srCD spectroscopy. Institute for Protein Research Seminar on Impacts of Supersaturation on Protein Science, Osaka, Japan, 18-19 June 2012

Kardos J, Wien F, Micsonai A. Secondary structure determination of beta-sheet rich proteins. protein aggregates and amyloid fibrils by circular dichroism spectroscopy. Minazuki Forum, Osaka, Japan, 11 June, 2012

Micsonai A, Szabó E, Wien F, Réfrégiers M, Kardos J. Improved secondary structure determination and fold prediction by circular dichroism spectroscopy. Biophysical Society 57th Annual Meeting, Philadelphia, USA, 2-6 February, 2013

Kardos J, Szabó E, Wien F, Réfrégiers M, Micsonai A. Improved secondary structure determination and fold prediction by circular dichroism spectroscopy. Institute for Protein Research Seminar on Exploring the New Horizons of Protein Folding and Misfolding Studies, Osaka, Japan, 19-20 June, 2013

Micsonai A, Wien F, Réfrégiers M, Kardos J. Investigation of the protein fold by SRCD spectroscopy. ECCB '14 13th European Conference on Computational Biology, Stasbourg, France, 7-10 September, 2014

Micsonai A, Kernya L, Wien F, Kardos J. Development of a new algorithm for protein secondary structure determination and fold recognition by SRCD spectroscopy. 18th Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation, Hiroshima, Japan, 6-7 March, 2014

Micsonai A, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Wien F, Kardos J. Secondary structure determination of beta-sheet rich proteins, protein aggregates and amyloid fibrils by circular dichroism spectroscopy. 18th Hiroshima International Workshop on Circular Dichroism Spectroscopy, Hiroshima, Japan, 4 March, 2014

Kardos J, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, Micsonai A. Structural diversity of protein aggregates. JSPS Japan-Hungary Joint Seminar on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation, Osaka, Japan 17-20 November, 2014

Micsonai A, Wien F, Réfrégiers M, Kardos J. Investigation of the protein fold by SRCD spectroscopy. 590. WE-Heraeus-Seminar on Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy, Bad Honnef, Germany 17–20 May, 2015

Micsonai A, Wien F, Kele Zs, Réfrégiers M, Kardos J. 3D2CD: Calculation of the CD spectra of proteins from their X-ray structures, 15th International Conference on Chiroptical Spectroscopy, Sapporo, Japan, 30 August – 3 September, 2015

Kardos J, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, Micsonai A.  $\beta$ -Sheet-twist as a clue for the secondary structure determination and fold recognition from the CD spectra of proteins. 15th International Conference on Chiroptical Spectroscopy, Sapporo, Japan, 30 August – 3 September, 2015