

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

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

Hegedüs Zsófia

**Konformációsan diverz β -redős szerkezetek
utánzása α/β -peptid foldamerek segítségével**

Szigorlati bizottság:

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

Bírálati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Hohmann Judit
Opponensek: Dr. Majer Zsuzsa
Dr. Tömböly Csaba
Tag: Dr. Kupihár Zoltán
Titkár: Dr. Kiss Loránd

A. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A β -redő másodlagos szerkezet gyakran előforduló elem protein-protein kölcsönhatásokban, illetve membránnal kölcsönható peptidok esetén. Gyógyszerészeti szempontból ezek a kölcsönhatási felületek általában nem befolyásolhatók klasszikus kismolekulákkal, a nagy oldószernek kitett felszín vagy a komplex kölcsönhatások miatt. Az alternatív megoldásként alkalmazott makromolekulás gyógyszerek hátrányai a rossz farmakokinetikai tulajdonságaik illetve az alacsony stabilitásuk. Mesterséges β -redőt utánzó szerkezetek alkalmazásával ezek elkerülhetők lennének, viszont ezek tervezése kihívást jelent. A β -redők alkalmazásának további hátránya a nagy aggregációs hajlamuk, mely toxikus vegyületekhez vezethet.

A mesterséges önrendező szerkezetek, azaz foldamerek segítségével, β -redős szerkezetek tervezése illetve előnyös tulajdonságok kialakítása elérhetőek lehetnek. β -Peptid foldamer hélixeket sikeresen alkalmaztak fehérje és membrán célpontokra, azonban mesterséges β -redőt utánzó foldamerek előállítására további vizsgálatokat igényel.

Célul tűztük ki β -redős szerkezetek létrehozását α/β -peptid foldamerek segítségével melyek protein-protein és membrán kölcsönhatásokban is részt vehetnek. Ehhez modellként az antiangiogén és antitumor hatással rendelkező anginexet választottuk. Az anginex rendezetlen szerkezetű oldatban, a bioaktív β -redős szerkezet csak membrán jelenlétében alakul ki. Biológiai aktivitásában szerepet játszik membránnal való kölcsönhatása illetve a tumordajka galektin-1 célfehérjéhez való kötődése.

Az α/β -peptid foldamerek tervezése során szisztematikus aminosav helyettesítéseket hajtottunk végre az anginex β -redőt alkotó régiójában. Az analógok szerkezet kialakító hajlamát cirkuláris dikroizmus (CD) és NMR spektroszkópiás módszerekkel vizsgáltuk. Ezen módszerek segítségével a lokális konformációs tulajdonságokat és a globális feltekeredést is tudtuk vizsgálni, és megállapítani a kedvező aminosav helyettesítéseket. A galektin-1 célfehérjéhez való kötődést izotermális titrációs kalorimetria (ITC) segítségével vizsgáltuk, valamint *in vitro* bioaktivitást mértünk, mely kísérleteket Makra Ildikó végezte el (Limfocita Jelátviteli Csoport, Szegedi Biológiai Kutatóközpont).

B. MÓDSZEREK

NMR spektroszkópia

A β -aminosavak lokális konformációját illetve a másodlagos szerkezeti hajlamot aminosav szinten NMR spektroszkópiás módszerrel vizsgáltuk. A mérési körülmények optimalizálása után a spektrumokat 0,5 mM peptid koncentráció alkalmazásával pH 5,6, 37°C hőmérsékleten vettük fel. A jelhozzárendelést 2D TOCSY, NOESY és ^{13}C HSQC spektrumok alapján végeztük el. A kanyar stabilitására a kanyar szegmens kialakításában részt vevő glicin $\text{H}\alpha$ protonjainak kémiai eltolódás különbségéből következtettünk. A β -aminosavak lokális konformációját csatolási állandók illetve NOE intenzitás arányok alapján állapítottuk meg. A másodlagos szerkezeti hajlamot mutató, úgynevezett SSP pontszámot számoltunk egy referencia rendezetlen szerkezethez tartozó kémiai eltolódásokhoz viszonyítva, mely a hélix illetve a β -redő képződésre adott információt.

Cirkuláris dikroizmus

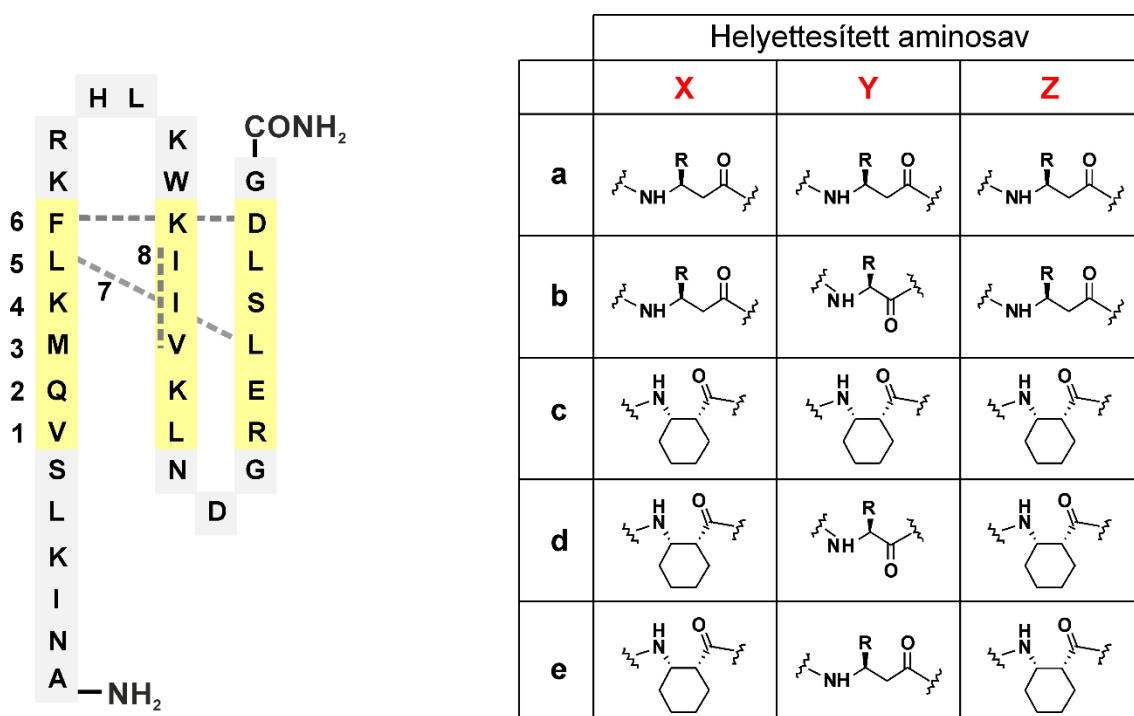
A szerkezetek inherens és indukálható feltekeredését CD spektroszkópiás módszerrel vizsgáltuk önmagukban illetve egy membránt utánzó foszfolipid hozzáadása után. A spektrumokat 100 μM peptid koncentrációval vettük fel, melyhez a membránt utánzó dodecylfoszfokolint (DPC) 2,5 mM koncentrációban adtuk. A spektrumokat három alap komponensre bontottuk a CCA+ szoftver segítségével, mely eredményeként a másodlagos szerkezeti tartalom kvantitatív közelítését kaptuk. Hőmérséklet-függő CD mérések elvégzésével a hidrofób kölcsönhatások jelenlétét vizsgáltuk 5 - 75°C tartományban felvéve a spektrumokat.

Izotermális titrációs kalorimetria

Az angineks-galektin-1 kölcsönhatás vizsgálatára izotermális titrációs kalorimetriát alkalmaztunk, Microcal VP ITC készülék segítségével. A mérési körülmények optimalizálása után, a cellában levő galektin-1 fehérjét titráltuk az anginekszel és analógjaival pH 7,4, 35°C hőmérsékleten 15 μM fehérje koncentráció mellett.

A. EREDMÉNYEK

1. Húsz különböző β -aminosav tartalmú α/β -peptidet terveztünk a β -redő kialakulásának vizsgálatára, melyhez egy antiangiogén hatású peptidet az anginexet használtuk modell vegyületként (1. ábra). A szekvenciák tervezése során térben egymáshoz közeli aminosav-hármasokat helyettesítettünk nyílt láncú β^3 - és rögzített konformációjú, 1*R*,2*S*-aminociklohexán karbonsav (1*R*,2*S*-ACHC) alkalmazásával, melyet sztereokémiai megfontolások alapján választottunk. A szintézis optimalizálása után a peptideket sikeresen előállítottuk.



anginex-Gly ANIKLSVQMKLFRHLKWKIIVKLNLDGRELSLDG-NH₂

1a-e ANIKLSXQMQLFRHLKWKIIVKYNDGZELSLDG-NH₂

2a ANIKLSVXMQLFRHLKWKIIVYLNLDGRZLSLDG-NH₂

3a-e ANIKLSVQXKQLFRHLKWKIIVKLNLDGREZSLDG-NH₂

4a ANIKLSVQMQLFRHLKWKIIVKLNLDGRELZLDG-NH₂

5a-e ANIKLSVQMKXFRHLKWKIIVKLNLDGRELSZDG-NH₂

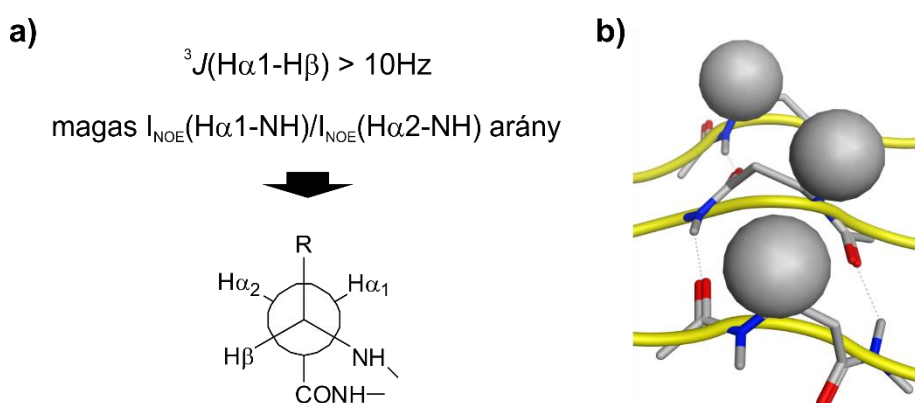
6a ANIKLSVQMKLXKRHLKWKIIVKLNLDGRELSLZ-NH₂

7a ANIKLSVQMKXFRHLKWKIIVKLNLDGREZSLDG-NH₂

8a ANIKLSVQMKLFRHLKWKXYZKLNLDGRELSLDG-NH₂

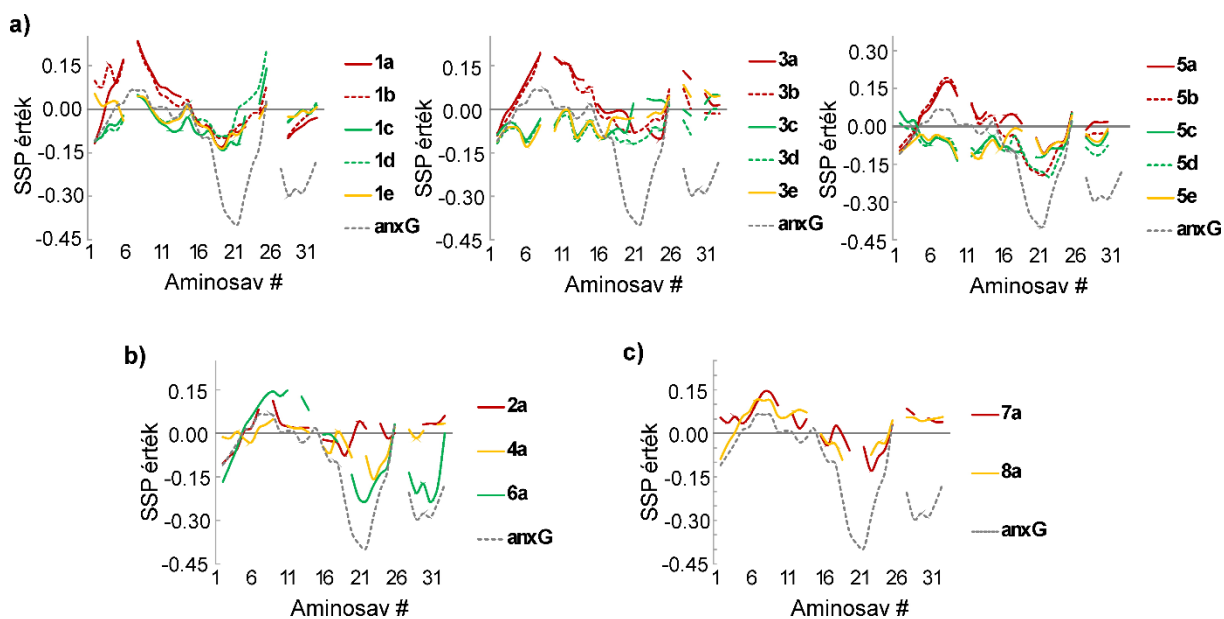
1. Ábra. A tervezett anginex analógok. A szubsztitúció helye számmal jelzett, az első aminosav hármastól kezdve (Val⁷-Leu²⁴-Arg²⁸). A szubsztitúciós mintázatot szaggatott vonal jelzi: **1-6** térben közeli aminosav hármastól kezdve, **7** – átlós, **8**- szekvenciális helyettesítések. A szubsztitúciós pozíciókban (X, Y, Z) alkalmazott aminosav mintázatokat betűk jelzik.

2. NMR spektroszkópiás mérések alapján különböző viselkedést tapasztaltunk a kanyar stabilitására illetve a lokális konformációs viszonyokra vonatkozóan, mely a szubsztitúció helyétől és az alkalmazott aminosavtól is függött. A β -redő második kanyarjához közeli szubsztitúciók növelték annak flexibilitását. Azok a β^3 -aminosavak, melyek oldalláncukban elágazást tartalmaztak a kívánt *gauche* konformációt vették fel, mely illeszkedik a β -redő hidrogénkötés mintázatába. Ez azonban kisebb mértékű oldallánc átlapolódáshoz vezethet az extra szénatomnak köszönhetően (2. ábra).



2. Ábra a) A megfigyelt csatolási állandók és NOE intenzitás arányok a *gauche* konformáció kialakulására utaltak $\beta^3\text{Ile}$ és $\beta^3\text{Val}$ aminosavak esetén. **b)** Modellezett oldallánc átlapolódás, térben egymáshoz közeli *gauche* konformációjú aminosav hármasok helyettesítése esetén.

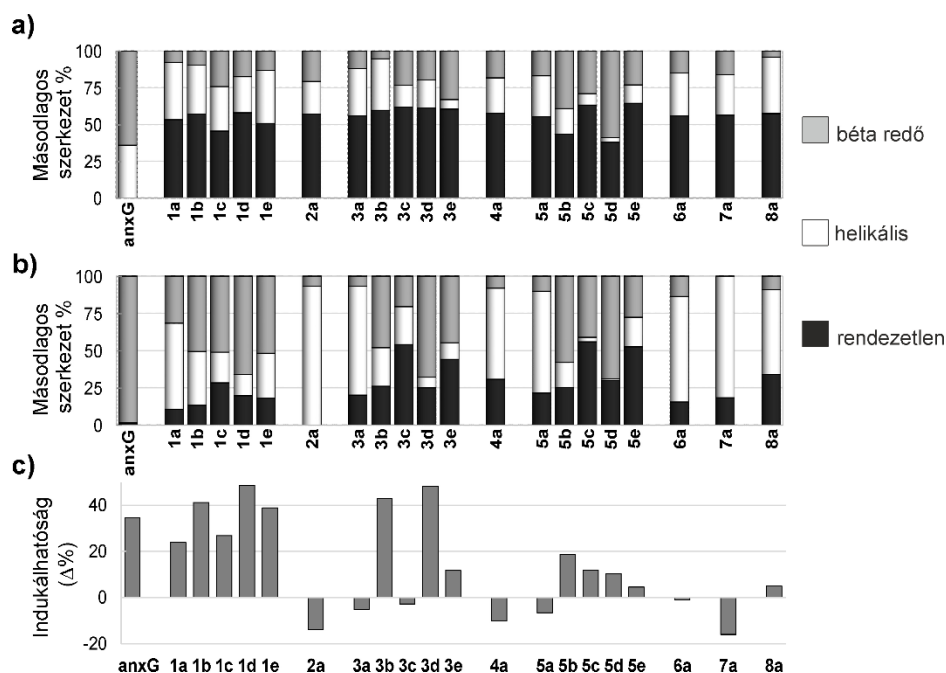
3. A másodlagos szerkezeti hajlamot, aminosav szinten másodlagos kémiai eltolódások segítségével térképeztük fel, melyből úgynevezett SSP pontszámot számítottunk (3. ábra). A β^3 -aminosav helyettesítések nem kívánt hélix képződést indukáltak a szekvencia N terminális részében, mely az anginex legflexibilisebb része. Konformációsan kötött ciklusos aminosavak alkalmazásával ez kivédhető volt, mely arra utalt, hogy a kötött konformációjú aminosav alkalmazása előnyösebb a szál képződés szempontjából. A szubsztitúciók leginkább a kanyar közeli helyeken, illetve a periférián voltak tolerálhatók (3. ábra). A membránt utánzó foszfolipid hozzáadására az ${}^1\text{H}$ NMR spektrumban alacsonyabb térerő irányába tolódott jeleket figyeltünk meg, melyek β -redős szerkezet kialakulására utaltak, azonban a jelhozrendelést a jelkiszélesedés miatt nem lehetett elvégezni.



3. Ábra. Számított SSP értékek az anginex analógokra a) a hidrofób oldalon, b) a hidrofil oldalon és c) a nem egyező pozíciókban helyettesített analógok esetén. A pozitív SSP értékek hélix képződésre, míg a negatív értékek β -redő képződési hajlamra utalnak.

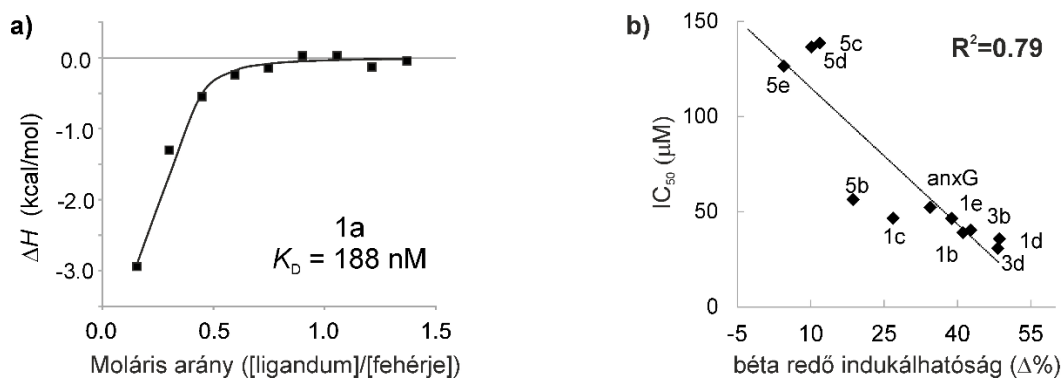
4. Az analógok globális feltekeredését CD spektroszkópiával vizsgáltuk. Indukálás nélkül, a peptidek magas rendezetlen szerkezeti tartalmat mutattak. A membránt utánzó DPC hozzáadására a CD görbék egyértelmű rendeződés jeleit mutatták. A CD görbékét a CCA+ program segítségével 3 komponensre bontottuk, melyek alapján kvantitatív becslést hajtottunk végre az egyes analógok másodlagos szerkezeti tartalmára, mely különböző mértékű β -redő tartalomra és indukálhatóságra utalt (4. ábra). A másodlagos szerkezeti tartalom alapján a kanyar közeli és a periférián helyettesített analógok mutatták a legmagasabb β -redő tartalmat, mely egybevágott az NMR eredményekkel.

Hőmérséklet-függő CD mérésekből a hidrofób kölcsönhatások feltekeredésben játszott szerepére következtettünk. A hidrofób kölcsönhatások jelentősen csökkentek β -aminosav helyettesítés esetén, mely így meghatározó szerepet játszhat ezen aminosavak szerkezetromboló hatásában. A hidrofób kölcsönhatások azoknál az analógoknál voltak a legkifejezettebbek, melyeknél a kanyar stabilitása csökkent a közeli szubsztitúciók miatt, így egy kompenzáló stabilizáló erőként lépett fel. A szubsztitúciók nem növelték az aggregációs hajlamot, a DOSY NMR spektroszkópiás méréssel mért hidrodinamikai átmérők közeli értékeket mutattak az anginexhez.



4. Ábra. Másodlagos szerkezeti tartalom százalékban kifejezve minden analógra **a)** önmagában, **b)** 2,5 mM DPC hozzáadása után, indukálva. A fekete oszlopok a rendezetlen szerkezeti tartalmat, a szürkék a β -redőt a fehérek a helikális konformációt jelzik. **c)** β -redő indukálhatósága az analógok esetén, mely a indukált és az indukálatlan β -redő tartalom különbségéből számított százalék.

5. ITC méréseket végeztünk az anginex–galektin-1 kölcsönhatás tanulmányozására. Az irodalmi adatokhoz hasonló nagy affinitású kötődést tapasztaltunk 1:4 sztöchiometriával. Az analógokat vizsgálva egy származék mutatott, hasonló, de kisebb affinitású kötődést a célfehérjéhez (5a ábra), melyet a farmakofór horgonypontok megváltozott helyzetével magyarázható. *In vitro* biológiai kísérletek alapján a hatásmechanizmusban jelentős szerepet játszott a membránnal való kölcsönhatás, mely a β -redő indukálhatóságával mutatott jelentős szerkezet-hatás összefüggést (5b ábra). Ez arra utalt, hogy a rendeződés folyamata feltétele az *in vitro* hatásmechanizmusnak.



5. Ábra. a) ITC entalpogram, galektin-1 titrálása **1a** peptiddel. **b)** Korreláció a β -redő indukálhatóság és IC_{50} értékek között az *in vitro* kísérletek alapján.

Publikációk

- I. Hegedüs, Z., Wéber, E., Kriston-Pál, É., Makra, I., Czibula, Á., Monostori, É., & Martinek, T. A. (2013). Foldameric α/β -peptide analogs of the β -sheet-forming antiangiogenic anginex: structure and bioactivity. *Journal of the American Chemical Society*, **135** (44), 16578-16584.
IF: 11.444
- II. Hegedüs, Z., Wéber, E., Végh, L., Váczi, B., Tubak, V., Kriston-Pál, É., & Martinek, T. A. (2015). Two-stage interaction of the tumor nursing galectin-1 with the antiangiogenic peptide anginex. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **120** (1), 449-456.
IF: 2.042
- III. Hegedüs, Z., Makra, I., Imre, N., Hetényi, A., Mándity, I. M., Monostori, É., & Martinek, T. A. (2016). Foldameric probes for membrane interactions by induced β -sheet folding. *Chemical Communications*, **52** (9), 1891-1894.
IF: 6.567*

Egyéb publikációk

- I. Németh, L. J., Hegedüs, Z., & Martinek, T. A. (2014). Predicting Order and Disorder for β -peptide Foldamers in Water. *Journal of chemical information and modeling*, **54** (10), 2776-2783.
IF: 3.738

*2015 évi impakt faktor.

Előadások

1. Hegedüs Zs., Wéber E., Kriston-Pál É., Makra I., Czibula Á., Monostori É., Martinek T. A.
Antiangiogén foldamer β -szendvics analógok, szerkezet és bioaktivitás
XXXVI. Kémiai Előadói Napok
Szeged, 2013. Október 28 - 30
2. Zs. Hegedüs, E. Wéber, É. Kriston-Pál, I. Makra, É. Monostori, T. A. Martinek
 β -sandwich forming propensity and biological activity of foldameric anginex analogs
Poster presentation
2013 Symposium on Foldamers, Paris, 12. April 2013
3. Hegedüs Zs., Wéber E., Makra I., Czibula Á., Monostori É., Martinek T. A.
 β -redős foldamerek tervezése az angiogenezis gátló anginex analógiájára, szerkezetvizsgálat
MTA Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése
Balatonszemes, 2014. május 28-30.
4. Zs. Hegedüs, E. Wéber, I. Makra, É. Monostori, T. A. Martinek
Redesigning an antiangiogenic β -sheet peptide anginex to α/β peptide foldamers
Poster presentation
7th Central Europe Conference, Chemistry Towards Biology
Katowice, 12. September 2014
5. Hegedüs Zs., Wéber E., Makra I., Monostori É., Martinek T. A.
Membrán kölcsönhatások vizsgálata foldamerekkel, a béta redő képző hajlamuk függvényében
MTA Peptidkémiai Munkabizottság Tudományos Ülése
Balatonszemes, 2015. május 20-22.

