

Exendin-4 analóg minifehérjék stabilitás és amiloid aggregáció vizsgálata

Doktori értekezés

Horváth Dániel

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Perczel András, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Tőke Orsolya, Ph.D., laborvezető MTA TTK

Dr. Smeller László, az MTA doktora, Dr. Habil.

A Bírálóbizottság elnöke:

Dr. Zelkó Romána, egyetemi tanár, az MTA doktora

A Bírálóbizottság tagjai:

Dr. Tóth Gergő, egyetemi adjunktus, PhD

Dr. Fizil Ádám, R&D kutató, PhD

Budapest, 2020

1. Bevezetés

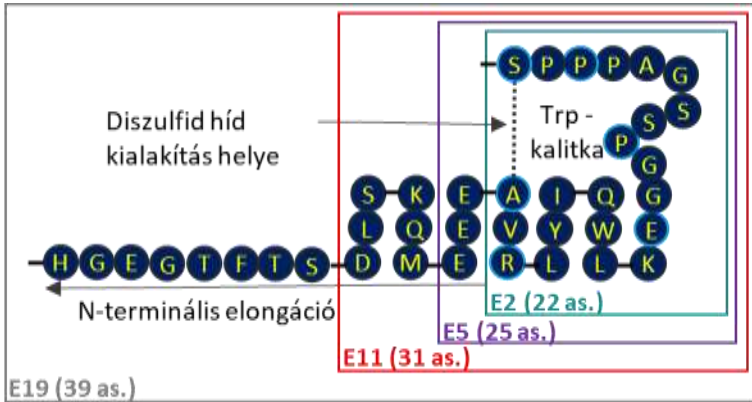
A peptid és fehérjealapú gyógyszerek egyre nagyobb szerepet játszanak a modern terápiás gyakorlatban. Méretükből és szerkezeti komplexitásukból adódóan az előállításuk, analitikájuk, formulálásuk összetett, és szemléletmódban jelentősen eltér a kismolekulás hatóanyagoktól. Kémiai természetükből fakadóan stabilitásuk, valamint biohasznosulásuk korlátozott a felszívódás és a metabolizmus oldaláról egyaránt. Azonban bizonyos innovatív technológiákat alkalmazva, mint pl.: racionálisan tervezett pontmutációkkal, nem-természetes aminosavak beépítésével, zsírsavlánc konjugációval, poszt-transzlációs módosításokkal, segédanyagok alkalmazásával növelhető a hatóanyag oldhatósága, stabilitása, valamint kiterjeszhető az eltarthatósága és a keringési felezési ideje egyaránt.

Az elmúlt 20 évben a diagnosztizált cukorbetegek száma megháromszorozódott, amelynek 90%-a a 2-es típusú cukorbetegséghez köthető. Az elhízás mellett korunk egy másik nagy kihívása az az elöregedő társadalomban gyakori neurodegeneratív betegségek kezelése és megelőzése. Ezen kórképekben kialakuló fehérje-aggregátum amiloid plakkok szerkezetének, kialakulásának feltérképezése és megértése kulcsfontosságú a további terápiás stratégiák kidolgozásához.

Az inkretin mimetikum GLP-1 analógokat sikerrel alkalmazták már a 2-es típusú cukorbetegség kezelésében. Terápiás hatásuk mellett a 39 aminosav hosszú Exenatideból (exendin-4) származtatott minifehérjék kis méretük ellenére harmadlagos térszerkezettel rendelkeznek, így az alapvető fehérje fel/letekeredési folyamatok mellett a pontmutációk térszerkezetre gyakorolt hatása is atomi szinten vizsgálható. Mindemellett egyes származékok amiloid aggregációs hajlammal bírnak, ezáltal az aggregációs

folyamatok során bekövetkező konformációs változások is nyomon követhetőek és karakterizálhatók.

Doktori kutatómunkám során az Exenatide származék E5 minifehérje 25 aminosav hosszú szekvenciáját vettem a kiindulási referenciának. (**ábra 1.**)



Ábra 1. Az Exenatide-ből származtatott különböző hosszúságú minifehérje család szekvenciája. A világos kék szegélyű aminosavak esetében történt szubsztitúció a szekvenciában.

2. Célkitűzés

- A) Különböző pontmutációk alkalmazásával vizsgálni kívántam a fluoroprolinok, egyes másodlagos kölcsönhatások, valamint egy diszulfidhíd beépítésének hatását az E5 térszerkezetére, hőstabilitására. (**ábra 2.**) Célom volt továbbá a hőmérsékletfüggő ECD és NMR-spektroszkópai adatsorozatok összehasonlítása a minifehérjék atomi felbontású térszerkezet-sokaságainak tükrében.
- B) Vizsgálni tervezem a diszulfidhíd (SS) beépítésnek térszerkezetre gyakorolt hatását a különböző α -hélix hosszúságú (E2→E5→E11→E19 - **ábra 1.**) Exenatide származékokban. Jellemezni szeretném a diszulfidhíddal ciklizált vegyületek redukált formáit is (2SH), így a redukció során tanulmányozhatom. különböző redukciós körülmények között a variánsok redukciókinetikáját. Ennek jellemzését spektroszkópai módszerekkel kívánom megvalósítani
- C) Vizsgálom a diszulfidhíddal megerősített, teljes 39 aminosav hosszúságú E19_SS biológiai aktivitását emlős INS-1 sejteken.
- D) Célul tűztem ki az E5 minifehérje amiloid aggregációjának spektroszkópai jellemzését. Emellett célom meghatározni az aggregációra hajlamos monomer konformációját az oligomerek és jellemezni az elongáció során kialakult amiloid rost morfológiáját.

3. Módszerek

A peptidek és minifehérjék bakteriális expresszióval vagy szilárd fázisú peptid szintézissel állítottuk elő, majd C18-as fordított fázisú HPLC oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottuk. (ábra 2.)

A diszulfidhidas minifehérjék redukciója során TCEP és DTT redukálószerket alkalmaztam pH = 7-es körülmények között változó kondíciók mellett. A redukció kinetikai paraméterek becsléséhez a COPASI 4.16 szoftvert használtuk.

Távoli UV-tartományú (FUV) ECD-spektroszkópiával a hőmérsékletfüggő (5-85°C) natív (F) → rendezetlen (U), valamint az időfüggő natív (F) → amiloid (Amy) konformációs átalakulást monitoroztuk. 222 nm-en mért ellipticitás ($\Theta_{222\text{nm}}$) értékekkel az egyes variánsok helikális jellegét jellemzem. A spektrumsorozatok két (F/U%_{FUV}), illetve háromkomponensű (F/U/Amy %_{FUV}) felbontásával a térszerkezeti átalakulások számszerűsíthetők a tiszta komponensek aránya alapján. Az amiloid aggregáció során a háromkomponensű felbontás értékeket az idő függvényében baricentrikus koordinátarendszerben ábrázolva leírhatók és összehasonlíthatók az E5 variánsok aggregációs folyamatai különböző körülmények között.

Közeli UV-tartományú (NUV) ECD-spektroszkópiával a központi hidrofób Trp-kalitikában elhelyezkedő Tyr-Trp aromás oldalláncok kölcsönhatását vizsgáltuk a hőmérsékletfüggő denaturáció ($\Theta_{276\text{nm}}$, $\Theta_{287\text{nm}}$, $\Theta_{280\text{nm}}$, $\Theta_{293\text{nm}}$, F%_{FUV}), az amiloid aggregáció és a diszulfidhíd redukciója során.

A 2D-s homonukleáris ¹H-¹H COSY, TOCSY, NOESY-spektrumok alapján az alábbi szoftverek segítségével (Topspin 3.5 – 4.0.7, CCPNMR

analysis V2.5, Aria 2.0) végeztem el a minifehérjék asszignációját és a térszerkezet sokaságok meghatározását.

Az oligomerizációs folyamat jellemzésére molekuladinamikai szimulációkat (MD), dinamikus fényszórást (DLS), transzmissziós elektronmikroszkópiát (TEM), atomerő mikroszkópiát (AFM) és röntgen-diffrakciós technikákat (X-ray) alkalmaztunk.

A biológiai aktivitás meghatározására emlős INS-1E sejt kultúrákon vizsgáltuk a minifehérjék inzulin szekréciót serkentő hatását. Az elválasztott inzulin koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg.

Az ECD, MD, TEM, AFM, röntgendiffrakciós mérések kivitelezését kooperációs-partnereim végezték. Az adatokat közösen dolgoztuk fel, míg az eredmények értelmezését és összefoglalását magam végeztem.

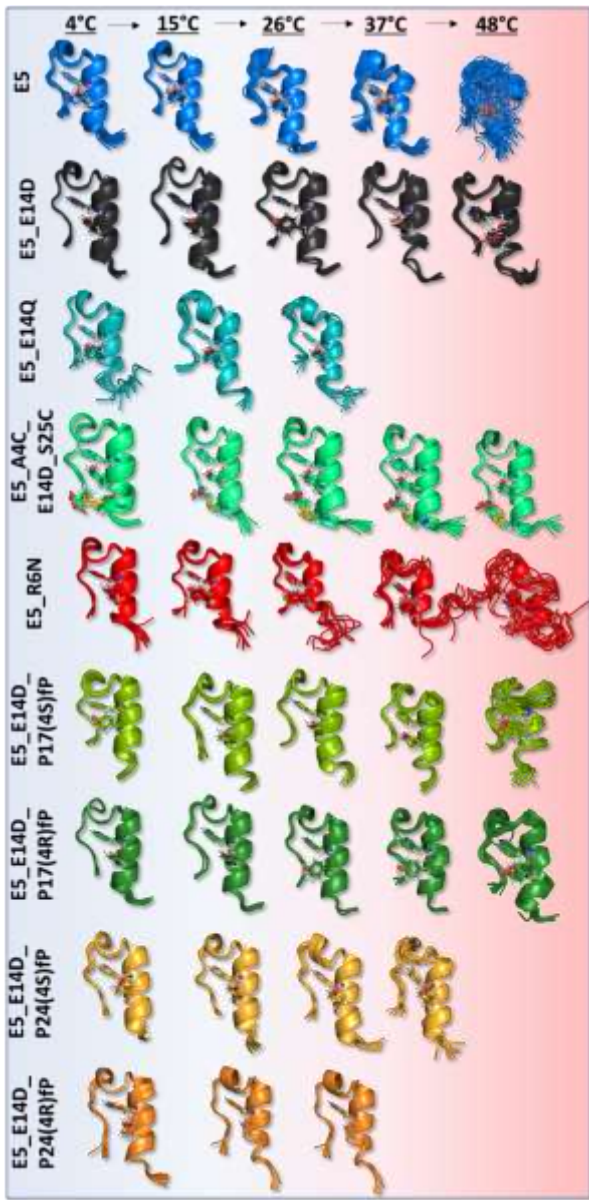
Exenatide	HGEG TPTSD LSKQM EEEAV RLFIE WLKNG GPSSG APPPS
E5	EEEAV RLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
E5_E14D	EEEAV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS
E5_E14Q	EEEAV RLYIQ WLKQG GPSSG RPPPS
E5_A4C_E14D_S25C	EEECV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC
E5_R6N	EEEAV NLYIQ WLKEG GPSSG RPPPS
E5_E14D_P17(4S)FP	EEEAV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS
E5_E14D_P17(4R)FP	EEEAV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS
E5_E14D_P24(4S)FP	EEEAV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS
E5_E14D_P24(4R)FP	EEEAV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS
E2_S5/E2_25H	CV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC
E5_S5/E5_25H	EEECV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC
E11_S5/E11_25H	D LSKQM EEECV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC
E19_S5/E19_25H	HGEG TPTSD LSKQM EEECV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC

Ábra 2. A szintetizált peptidek nevezéktana és szekvenciája. A szekvenciákban **vastag betűvel** az aminosav szubsztitúciókat jelöltem, míg aláhúzással az diszulfidkötést kialakító ciszteineket emeltem ki.

4. Eredmények

A) Kilencfajta 25 aminosav hosszúságú minifehérje variáns (**ábra 2.**) teljes ^1H asszignációját végeztem el a 2D-s homonukleáris spektrumok alapján semleges pH-n, 5 gyógyszerészi szempontból releváns hőmérsékleten. (4/15/26/37/48°C) A NOESY típusú keresztcsúcsok alapján meghatároztam a szerkezetsokaságok atomi felbontású térszerkezetét. (**ábra 3.**) Az egyes variánsok hődenaturációs folyamatát az asszignált keresztcsúcsok számával, a szerkezetsokaság gerincatomjainak RMSD értékeivel, a szekvencia mentén az összes atomot magába foglaló RMSD értékekkel jellemeztem. A kémiai eltolódásokból számolt másodlagos kémiai eltolódásokkal az egyes variánsok α -hélixének és a Trp-kalitikájának rendezettségét számszerűsítettem. Ezeket az NMR-spektroszkópia alapján származtatott értékeket hasonlítom össze a hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrumok egyes hullámhosszain meghatározott ellipticitás értékeikkel, és a spektrumsorozatok dekonvolúciója alapján meghatározott rendezett komponens arányával. (**táblázat 1.**) A minifehérje rendezettségét leíró spektrális paramétereket párosítom az atomi felbontású térszerkezetekkel, így számszerűsíthető az elvégzett szubsztitúció térszerkezetre és hőstabilitásra gyakorolt hatása.

B) A 25 aminosav hosszú E5_A4C_E14D_S25C diszulfidhíddal ciklizált peptid analógiáján megvizsgáltam három másik N-terminálison különböző mértékben csonkított Exenatide származékot. Mind az oxidált (SS), mind ezek redukált (2SH) állapotainak meghatároztam és jellemeztem a térszerkezetét a 4/A-es pontban leírt metodikák alapján semleges pH-n, 15°C-on. (**ábra 4.**)

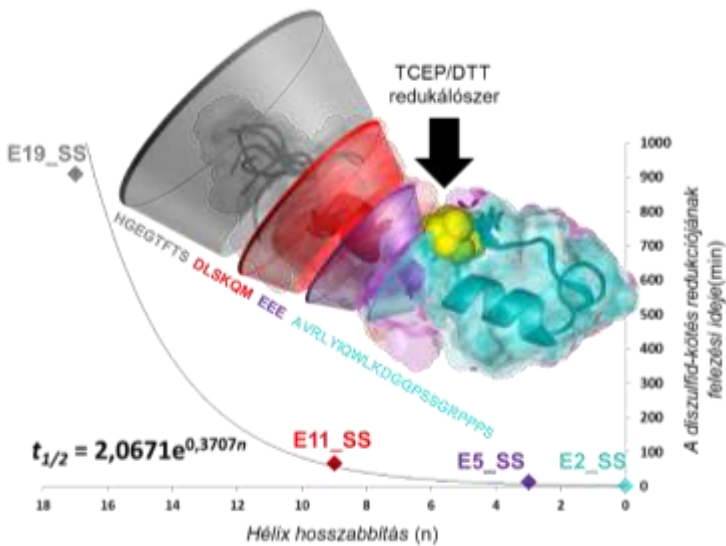


Ábra 3. A vizsgált minifehérijék NMR-spektroszkópiai módszerek alapján meghatározott 10-tagú szerkezetsokaságai a hőmérséklet függvényében.

Táblázat 1. A minifehérjék rendezettségét leíró spektrális paraméterek

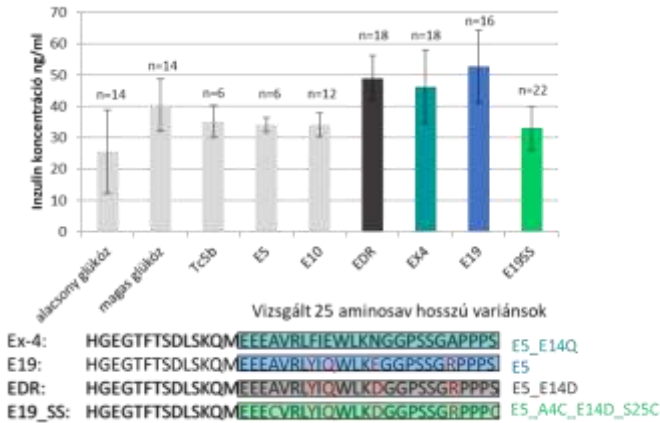
		Mért spektroszkópos paraméterek									
		Helicitás jellemzői			Triptofán-kalifornia jellemzői						
		CSD _{max 242}	Θ _{222nm}	F% ₂₂₂	CSD _{avg}	Θ _{276nm}	Θ _{207nm}	Θ _{208nm}	Θ _{209nm}	F% _{avg}	
ES	4/5°C	3,37	17,90	76,20	9,14	4,79	1,60	4,43	-1,22	91,70	
	10/11°C	3,47	16,80	73,10	8,74	4,64	1,68	4,45	-0,95	85,40	
	25/26°C	3,39	15,25	67,90	8,12	4,29	1,71	4,41	-0,83	77,50	
	37°C	3,15	13,49	58,15	7,13	3,71	1,78	3,72	-0,47	64,60	
	48°C	2,67	11,81	48,70	5,74	2,72	1,23	2,78	-0,34	49,55	
	85°C	n.a.	6,01	19,10	n.a.	0,10	-0,28	0,31	-0,54	6,60	
ES_E14D	4/5°C	3,59	18,99	87,20	9,65	2,43	-0,08	1,95	-2,20	66,60	
	10/11°C	3,63	18,25	82,10	9,35	2,55	0,29	2,38	-1,89	65,00	
	25/26°C	3,58	16,71	76,00	8,83	2,50	0,40	2,25	-1,57	62,50	
	37°C	3,35	14,34	63,10	7,90	1,98	0,35	1,90	-1,25	53,60	
	48°C	2,87	11,79	49,25	6,41	1,55	0,38	1,34	-1,14	42,55	
	85°C	n.a.	4,99	8,60	n.a.	-0,36	-0,80	-0,90	-0,92	3,30	
ES_E14Q	4/5°C	3,19	15,64	67,20	8,23	4,18	1,34	3,95	-1,21	71,30	
	10/11°C	3,19	14,51	62,20	7,70	3,89	1,56	4,00	-0,91	65,00	
	25/26°C	3,06	12,20	54,80	6,95	3,46	1,33	3,33	-0,56	53,20	
	37°C	2,74	10,77	43,60	6,01	2,49	1,12	2,52	-0,64	45,60	
	48°C	n.a.	9,17	35,70	n.a.	2,00	0,99	2,09	-0,27	37,05	
	85°C	n.a.	4,62	13,00	n.a.	0,15	-0,19	0,07	-0,38	2,60	
ES_AMC_E14D_S25C	4/5°C	3,45	21,61	100,00	9,70	-2,03	-2,72	-1,91	-2,92	*	
	10/11°C	3,58	20,81	97,50	9,60	-1,91	-2,61	-1,75	-2,73	*	
	25/26°C	3,61	20,46	95,70	9,49	-1,91	-2,29	-1,72	-2,57	*	
	37°C	3,65	19,46	92,30	9,33	-1,83	-2,00	-1,62	-2,33	*	
	48°C	3,64	18,86	88,95	9,14	-1,70	-1,69	-1,47	-2,07	*	
	85°C	n.a.	15,80	74,10	n.a.	-1,52	-1,09	-1,10	-1,40	*	
ES_R6N	4/5°C	2,89	15,04	60,90	9,03	4,38	1,52	3,94	-0,93	84,00	
	10/11°C	2,93	14,63	57,90	8,69	4,04	1,38	3,71	-0,82	79,10	
	25/26°C	2,87	13,48	52,00	8,00	3,77	1,47	3,41	-0,48	71,50	
	37°C	2,62	12,17	44,10	6,92	2,99	1,36	2,85	-0,37	64,05	
	48°C	2,26	10,34	35,65	5,53	2,20	0,97	2,13	-0,31	46,15	
	85°C	n.a.	6,26	10,90	n.a.	-0,33	-0,61	-0,55	-0,85	10,40	
ES_E14D_P17(4S)FP	4/5°C	3,61	14,59	70,80	9,65	2,69	0,09	2,24	-1,51	98,60	
	10/11°C	3,64	13,67	65,80	9,32	2,84	0,54	2,76	-1,30	93,70	
	25/26°C	3,55	12,69	60,10	8,72	3,03	0,71	2,58	-0,92	82,90	
	37°C	3,25	10,70	49,40	7,61	2,58	0,86	2,40	-0,56	68,80	
	48°C	2,75	8,47	37,60	5,98	1,92	0,87	1,96	-0,36	52,05	
	85°C	n.a.	3,92	8,10	n.a.	0,00	-0,06	0,14	-0,12	10,50	
ES_E14D_P17(4R)FP	4/5°C	3,67	17,69	85,70	9,93	2,91	-0,24	2,26	-2,19	100,00	
	10/11°C	3,73	17,43	81,40	9,69	2,93	-0,05	2,66	-1,90	95,70	
	25/26°C	3,65	15,64	74,60	9,24	2,85	0,19	2,50	-1,47	88,80	
	37°C	3,44	13,79	62,30	8,39	2,38	0,38	2,13	-1,11	76,10	
	48°C	2,94	11,11	49,15	6,77	1,88	0,53	1,79	-0,77	60,60	
	85°C	n.a.	4,36	8,70	n.a.	0,06	-0,30	-0,22	-0,53	13,10	
ES_E14D_P24(4S)FP	4/5°C	3,43	16,11	76,50	9,48	4,51	1,24	4,00	-1,41	92,10	
	10/11°C	3,53	14,92	69,20	9,21	4,58	1,54	4,35	-0,96	88,20	
	25/26°C	3,45	13,55	63,20	8,71	4,44	1,55	4,11	-0,86	79,90	
	37°C	3,23	11,39	51,05	7,80	3,59	1,53	3,45	-0,47	65,60	
	48°C	n.a.	9,46	40,85	n.a.	2,92	1,33	2,64	-0,35	52,00	
	85°C	n.a.	4,25	10,30	n.a.	0,21	-0,08	0,10	-0,26	8,20	
ES_E14D_P24(4R)FP	4/5°C	3,48	13,88	66,80	9,21	1,92	-0,75	1,37	-2,81	68,90	
	10/11°C	3,50	12,66	61,70	8,75	1,46	-0,50	1,63	-2,30	64,40	
	25/26°C	3,35	10,99	53,70	7,93	1,54	-0,13	1,57	-1,71	58,00	
	37°C	n.a.	8,80	41,40	n.a.	1,45	0,02	1,23	-1,07	46,00	
	48°C	n.a.	6,54	30,80	n.a.	1,00	0,22	1,27	-0,78	33,20	
	85°C	n.a.	2,46	10,00	n.a.	-0,17	-0,11	-0,19	-0,24	0,00	

C) A minifehérjék SS→SH redukcióját közeli UV tartományban ECD-spektroszkópiával, és ¹H NMR-spektroszkópiával követtem. Az 1D-s NMR-spektrumok oxidált és redukált állapotának jelintegráljai alapján, paraméterbecslés segítségével meghatároztam különböző kísérleti körülmény között az egyes redoxi-rendszerek redukciós (k_1), oxidációs (k_2) és aggregációs (k_3) sebességi együtthatóját. A különböző hosszúságú α -hélixek esetében tapasztalt jelentősen eltérő redukciós felezési időkre a redukció reakció mechanizmusát megvizsgálva, sztérikus és elektrosztatikus magyarázatot adtam. (ábra 4.)



Ábra 4. A diszulfidkötés redukciójának felezési ideje az N-terminális α -hélix hosszának a függvényében. A számolt 10-tagú térszerkezetekben a hengerpalástok az α -hélix diszulfidhidat (sárga gömbök) sztérikus árnyékoló hatását szemléltetik.

D) Az E19_SS diszulfidkötéssel stabilizált Exenatide analóg kivételes hőstabilitása ellenére kompetitív antagonistá hatásának bizonyult a biológiai tesztek alapján. (ábra 5.)



Ábra 5. Exenatide analógok biológiai aktivitásának összefoglalója. Az egyes szekvenciákon kiemeltem a hőmérsékletfüggések esetében vizsgált 25-aminosavas származékokat.

E) Az E5 minifehérje esetében az amiloid képzés pH és hőmérsékletfüggést mutatott. Mindemellett kevertetés hiányában csak F→U átalakulás tapasztalható. A növekvő fehérje és NaCl koncentráció mellett az amiloid aggregáció is gyorsabban végbement. Intenzív amiloid aggregációt tapasztaltunk az alábbi paraméterek mellett: $c_{E5} = 250 \mu\text{M}$, $c_{NaCl} = 50 \text{ mM}$, $pH = 4,1$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, kevertetés. Az amiloid képződés pH függése miatt (a hőmérséklet-függés mellett) megvizsgáltam az E5 térszerkezetének pH-függését. (ábra 6.) Reverzibilis aggregációt tapasztaltam az E5 amiloid aggregációs, és az izoelektromos pont környéki pH tartományban ($pH = 4-5$),

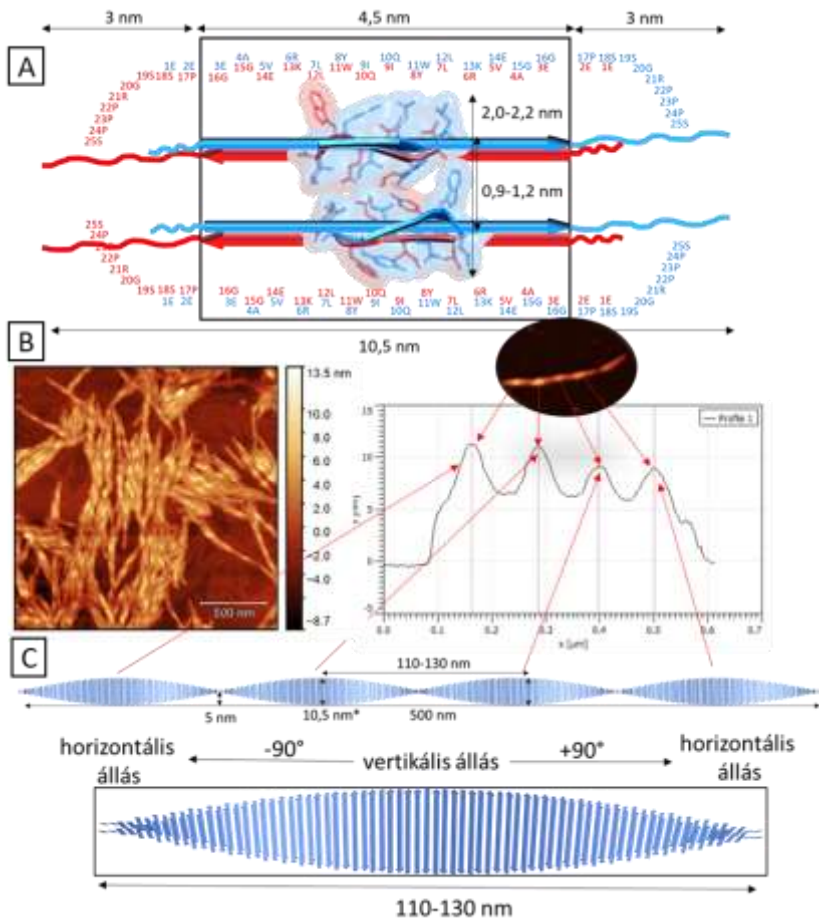
ahol a csökkent oldhatóság ellenére sikerült meghatározni egy *molten-globule* jellegű térszerkezetet. Semleges és erősen savas pH-n a natív Trp-kalitka motívumra jellemző térszerkezet figyelhető meg. (ábra 6.)



Ábra 6. Az E5 pH (bal) és hőmérsékletfüggő (jobb) konformáció változása. Középen az amiloid aggregációt megindító E5 monomer térszerkezete, valamint a felépített amiloid modell. Háttérben a spektroszkópiai módszerek.

F) A számolt térszerkezet sokaságok szerkezeti homogenitása korrelál az adott pH-n lehetséges fő mikroállapotok számával. Az egyes mikroállapotok eltérő töltés mintázatát a peptidszekvenciában megtalálható protonálható/deprotonálható csoportok pKa értéke határozza meg. Molekuladinamikai szimulációk és az NMR-mérések alapján meghatározott térszerkezetekből kiindulva megállapítottuk, hogy $pH = 4,1$ -en az egyik töltésmintázatú mikroállapot eltérő módon viselkedik a többi állapottól és minden bizonnyal felelős az aggregációs oligomerek kialakulásáért. Ezek alapján definiáltam azokat a térszerkezeti motívumokat, amelyek a monomerek asszociációját elősegítik.

G) A heterogén, különböző asszociációs fokú oligomerek tulajdonságainak leírása csak részben sikerült. Az oligomerek mérete miatt az oldatfázisú NMR-technikákkal nem detektálhatóak, de ECD-spektroszkópiával igen. A NUV ECD-spektrumok alapján az aggregációs során jelentős, időben változó intermolekuláris aromás-aromás kölcsönhatás figyelhető meg. Az aggregálódó minta jelentős polidiszperzitása miatt a DLS alapján meghatározott méreteloszlások csak bizonyos megkötésekkel értelmezhetőek. Az AFM felvételek, az LYIQWL aggregációs szekvenciából képzett kristály röntgendiffrakciós térszerkezete és molekuladinamikai szimulációk alapján a kialakult amiloid rost morfológiájára szerkezeti modellt javasoltam. (ábra 7.)



Ábra 7. A feltételezett E5 amiloid struktúra a molekula dinamikai szimulációk, az AFM felvételek és a röntgen kristallográfia alapján. A) A kristályszerkezet alapján feltételezett β -gerinc (keretben) és a rendezetlen C-terminálisok sematikus rajza. B)-C) 72 órás amiloid szálak AFM morfológiájának és a felépített amiloid modellnek a harmonizálása.

5. Következtetések

A másodlagos térszerkezet rendezettségét leíró hőmérsékletfüggő NMR és FUV ECD-paraméterek ($CSD_{\text{hélix } 2-13}$; $[\Theta]_{222\text{nm}}$, $F_{\text{FUV}}\%$) jelentős mértékű korrelációját figyeltem meg. A szekvenciális módosítások térszerkezetre gyakorolt hatása koherens módon tükröződik ezen értékek megváltozásának tendenciáiban. A negyedleges térszerkezetet jellemző paraméterek (CSD_{cage} , $[\Theta]_{276\text{nm}}$, $[\Theta]_{287\text{nm}}$, $[\Theta]_{280\text{nm}}$, $[\Theta]_{293\text{nm}}$, $F_{\text{NUV}}\%$) esetében nem tapasztalható korreláció az NMR és az ECD-adatok értékei között. A másodlagos kémiai eltolódás értékek globálisan a triptofán-kalitka harmadlagos szerkezeti motívum kompaktságával korrelálnak, míg a NUV ECD-adatok inkább csak az aromás oldalláncok térszerkezetére és azok elektronátmeneteire jellemzőek. A térszerkezetek és a spektroszkópiai módszerek alapján elmondható, hogy az E5 variánsokban a letekeredési folyamat hasonló módon megy végbe (függetlenül a pontmutációktól) és a natív térszerkezetek, függően a pontmutációktól csak 37°C-50°C között kezdenek drasztikusan fellazulni. (F-U arány 50-50%) A hőmérséklet és a pH változás okozta denaturáció hatására a Trp-kalitka felnyílik, amely az amiloid aggregáció egyik szükséges, de nem elégséges feltétele.

A szekvenciaspecifikus atomi szintű ^{19}F prolin γ -helyzetében történő szubsztitúciók jelentősen befolyásolják a Trp-kalitka motívum stabilitását és termorezisztenciáját. Az enantiomer szelektív szubsztitúciók a pirrolidin gyűrű endo \leftrightarrow exo térállását befolyásolják, azonban a peptidgerinc *cisz* \leftrightarrow *transz* izomériájának egyensúlyára a vizsgált peptidek esetében nincs megfigyelhető hatása. A 17-es pozícióban a (4*S*) ^{19}F szubsztitúció csökkenti, míg a (4*R*) növeli a rendezettséget. A 24-es pozícióban mind a (4*S*), mind a (4*R*) csökkenti a hőstabilitást, de eltérő mértékben. A megfigyelt különbségekért a fluor eltérő

hidratáltsága, illetve az aromás oldalláncokkal való kölcsönhatása lehet a felelős. A fluor szubsztitúció késlelteti, de nem akadályozza meg az amiloid aggregációt.

Az E5, E5_E14D és E5_E14Q variánsok esetében a jelentős stabilitási különbségek a 3₁₀-hélix eltérő kompaktságára vezethető vissza, amelynek oka az eltérő H-híd hálózat és az oldalláncok (10Q,14X,21R) közötti különböző másodlagos kölcsönhatások. Sem az E14D, sem az E14Q variáns nem képez amiloidot az E5 számára optimális amiloidképződési paraméterek mellett. Ez bizonyítja, hogy egy jól megválasztott szubsztitúcióval adott körülmények között az amiloid aggregáció meggátolható.

Az R6N szubsztitúció az α -hélix destabilizálásával elősegíti a letekeredés folyamatát, míg a diszulfidhíd beépítése teljesen megakadályozza a harmadlagos térszerkezet felbomlását.

A diszulfidhíd beépítése által a natív Trp-kalitikára jellemző térszerkezet irreverzibilisen rögzül széles hőmérséklettartományban. (4-85°C) Ez a tulajdonság gyógyszer stabilitási és technológiai szempontból rendkívül előnyös, mivel szélesebb eltarthatósági körülmények között lehet a peptid-hatóanyagot alkalmazni.

Az E19_SS esetében a kötődés a GLP-1 receptor extracelluláris doménjához megvalósulhat az irodalmi adatok alapján, azonban a megnövekedett inzulin szekréció hiánya alátámasztja a receptor aktiválásának a hiányát. Az E19_SS konstrukció egyúttal bizonyítja, hogy az Exenatide típusú inkretin mimetikumok esetében a ligandum C-terminális régiójának fel kell nyílnia a GLP-1 receptor aktiválása során miközben a ligandum N-terminálisa a transzmembrán hélixek alkotta kötőzsebbe mozdul.

A biológiai teszt alapján az EDR variáns agonista hatásának bizonyult és a 25 aminosav hosszúságú E5_E14D származékának hőstabilitása alapján kijelenthető, hogy potenciális hatóanyagjelölt molekula lehet.

A kisméretű minifehérjék redukciója meglehetősen komplex folyamatnak bizonyult. A redukció mellett a fehérje visszaoxidációjával és aggregációjával is számolni kellett, amely folyamatok a kísérleti paraméterek mellett függenek az adott molekula rendezettségétől, a diszulfidhíd környezetének elektrosztatikájától, valamint az α -hélix diszulfidhidat árnyékoló hatásától is. A NUV ECD-spektroszkópia bizonyos korlátok mellett alkalmas fehérjék diszulfidhíd redukciójának nyomon követésére. Amennyiben a diszulfidhídhez térközben található Tyr/Trp, akkor a redukció előrehaladása a 287 nm-en mért intenzitás változás alapján követhető, míg az oxidált és redukált forma időfüggő ^1H jelintegráljai alapján a teljes redoxi-rendszer kinetikája megadható NMR-spektroszkópiával. A különböző kísérleti körülmények között elvégzett redukciós kísérletek rávilágítanak a gyakorlati laboratóriumi munka során általánosan változtatott kísérleti paraméterek redukció kinetikára gyakorolt hatására.

Az E5 pH-függő térszerkezeti alapján bizonyítható, hogy az egyes pH értékeken megtalálható mikroállapotok száma korrelál a térszerkezet sokaságok heterogenitásával, amely a megnövekedett RMSD értékekben is tükröződik. Az amiloid aggregáció során a hidrofób oldalláncok felszínre kerülése mellett (Trp-kalitka felnyílása) a szekvencia megfelelő töltéseloszlása is szükséges a nukleációs folyamatok megindításához. Ezt támasztják alá a különböző töltés mintázatú mikroállapotok molekula dinamikai szimulációi is. Az oligomerizáció, illetve az azt követő elongációs folyamatok során tapasztalható rendezett α -hélix (F) \rightarrow rendezetlen (U) \rightarrow β -redős (Amy)

amiloid átalakulás követhető és számszerűsíthető a FUV ECD-spektrum sorozatok dekonvolúciójával. A baricentrikus koordináta-rendszerben az egyes komponensek összetételének időfüggő ábrázolásával a különböző variánsok, illetve az eltérő körülmények ($C_{\text{fehérje}}$, C_{NaCl} , pH , T , kevertetés) között végrehajtott kísérletek összehasonlíthatóak. Az oldatfázisú NMR technikákkal csak a monomerben történő konformációs változások detektálhatóak, az oligomerek méretükből és heterogenitásukból fakadóan láthatatlanok maradnak. A párhuzamosan alkalmazott biofizikai módszerek alapján szerzett részinformációk csak közelítő képet nyújtanak az aggregáció kezdeti szakaszáról és az oligomerek méreteloszlásáról.

Az E5 minifehérje LYIQWL szekvenciájából növesztett amiloid-szerű kristályban a β -redők antiparallel állásúak és a redők által alkotott rétegek ekvifaciális típusúak, így az Eisenberg-féle osztályozás alapján a 8. osztályba sorolhatóak. Az amiloid szál hossz tengelyére merőleges szemközti β -redők páronként paralelek és azonos felszínükkel (és aminosavakkal) alkotnak közös felületet. Az E5 amiloid modellben a 3. Glu-tól a 16. Gly-ig feltehetőleg az egész szekvencia egy lineáris β -redőt alkot hasonlóan, mint a szekvenciálisan homológ glukagon amiloid térszerkezetében. Az amiloid szál hossz tengelye mentén sorakozó antiparallel redők egymással $0,75^\circ$ -os szöveget zárnak be, amely egy csavart morfológiát eredményez.

6. Publikációk

A doktori értekezés témájában megjelent közlemények

- 1) Horváth, D., Taricska, N., Keszei, E., Stráner, P., Farkas, V., Tóth, G. K., & Perczel, A. (2020). Compactness of Protein Folds Alters Disulfide-Bond Reducibility by Three Orders of Magnitude: A Comprehensive Kinetic Case Study on the Reduction of Differently Sized Tryptophan Cage Model Proteins. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 21(5), 681–695.
- 2) Taricska, N., Horváth, D., Menyhárd, D. K., Ákontz-Kiss, H., Noji, M., So, M., Goto, Y., Fujiwara, T., & Perczel, A. (2020). The Route from the Folded to the Amyloid State: Exploring the Potential Energy Surface of a Drug-Like Miniprotein. *Chemistry*, 26(9), 1968–1978.
- 3) Horváth, D., Menyhárd, D. K., & Perczel, A. (2019). Protein Aggregation in a Nutshell: The Splendid Molecular Architecture of the Dreaded Amyloid Fibrils. *Current protein & peptide science*, 20(11), 1077–1088.