

Biokompatibilis nano- és mezorendszerek tervezése és fejlesztése amiloid-szálképzés alapján

VEKOP-2.3.2-16-2017-00014

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Szerves Kémia Tanszék
1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/a

Tárgy: Biokompatibilis nano- és mezorendszerek tervezése és fejlesztése amiloid-szálképzés alapján kutatás I. szakmai beszámoló

1. Eredmény megnevezése

Előállítottunk izotópjelölt és jelöletlen formában minifehérjéket, melyek közül néhányat (pl. E5, Almut.) racionális megfontolások mentén, kontrolált körülmények között amiloiddá alakítottunk. Alacsony aggregációs szintű formák kiroptikai (pl. ECD, VCD) tanulmányozása és valósídejű jellemzése megtörtént. Bioaktív peptidek sejtmembránnal való kölcsönhatásának jellemzése során összefüggést találtunk a kémiai szerkezet, térszerkezet, amfililitás és a lipidrétegbe való penetráló képességek között. Fágkönyvtárak tervezése megkezdődött. Autoklónozó rendszert fejlesztettünk DNS konstrukciók létrehozásához. Az „öregedés” elsődleges genetikai faktorának feltárását vizsgáltuk. Neuroprotektív és antitumor hatású új gyógyszercélpontokat határoztunk meg. Automatikusan frissülő amiloid és amiloid prekursor lista *in silico* letöltése készült el. Alagúthatást vizsgálatunk egyszerű, de releváns kémiai rendszerekben. Számításokat végeztünk az amiloidképzés miatt fontos gyenge kölcsönhatásokra.

2. Eredmény leírása

Az aggregációs állapotok racionális tervezése érdekében *in silico* munkáink eredményei: 1) ion-aromás gyűrűk gyenge kölcsönhatásainak tanulmányozása. A rezgési dinamika újszerű, gráfelméleti megközelítésének megkezdése. A vinil gyök és deuterált származékai rezgési-forgási mozgásainak vizsgálata az alagúthatás bekapcsolási jelenségének megértése céljából. Kísérleti spektroszkópai adatok elemzésére, valamint a polipeptidek és fehérjék természetes közegének, a víznek, az eddigi legpontosabb empirikus rezgési-forgási energiaszintjeit határozása. Új, minden eddiginél pontosabb potenciális energia hiperfelületeket definiálása a metán-metán, metán-víz és víz-víz dimerekre, mint a peptidek hidrofób-hidrofób, hidrofób-hidrofil és hidrofil-hidrofil modelljei. 2) Adatelemzés céljából a 130 ezer fehérjét tartalmazó PDB naponta bővülő rendszerének amiloid-struktúra fókuszú kigyűjtő,

felismerő programjának elkészítése (<https://pitgroup.org/amyloid>): „frissülő” amiloid listák készítése, melyek a további munkáink alapját képezik.

In vitro eredményünk az olyan polipeptidek és minifehérjék tervezése és előállítása amelyek kontrolált körülmények között amiloidot képeznek. Nagyfelbontású (NMR) téralkataik meghatározását követően a kritikus amiloidképző régiók meghatározására fókuszáltunk. Vizsgáltuk egy 7 tagú peptid-család fluoreszcenncel konjugált változatainak membránaffinitását. Semleges és töltéssel rendelkező modell membránnal végzett és *in vitro* sejtfelevéti eredményeket hasonlítottunk össze. Kifejlesztettünk egy olyan Cas9 fehérjén alapuló autoklónozó módszert, amely enzimek használata nélkül a baktérium sejt endogén rekombinációs rendszerét felhasználva hatékonyan képes klónozendó DNS fragmentumokat vektor DNS-be (plazmid) beépíteni. A rendszert szabadalommal levédjük.

3. Az eredmény nem számszerűsíthető, egyéb tulajdonságai

Az átalakulások klasszikus kinetikai menete mellett az alagúthatás is fontos lehet biológiai rendszerekben. Új, általános módszereket vezetünk be az alagúthatás jelenségének jobb megértése céljából, a belső mozgások és az alagúthatás szétválasztása érdekében (pl. szénhidrogén klatrátok szerkezetvizsgálatának érdekében). Együtműködés alakult ki az amszterdami és a delaware-i egyetemekkel e kutatás témájában. A PDB-ben elhelyezett fehérje-tér szerkezetek számos módon annotálva vannak, azonban ezen annotációk nem megbízhatóak és ezért nem használnak szoros, jól definiált szabályrendszerek felállítása érdekében. Ezért a <https://pitgroup.org/amyloid> webszerver fejlesztésénél nem az annotációkból, hanem a molekulák háromdimenziós, geometriai tulajdonságaiból következtettünk az amiloid-, illetve amiloid-prekursor tulajdonság jelenlétére. Az élő, automatikusan frissülő, *on-line* lista segítségével sok (jelenleg 500-nál is több) amiloid-szerű struktúrát vizsgálhatunk, amely eddig még senkinek sem sikerült. Ezen halmaz alapján kezdtük meg az amiloiddává válást megakadályozó strukturális elemeket azonosítását. Lokálisan ugyan amiloid-szerű de az egész fehérjemolekulára nézve amiloiddává nem alakuló fehérjéket kerestünk.

Spektroszkópia (CD és NMR) módszereket használtunk és applikációkat dolgoztunk az amiloid állapot kinetikai és termodinamikai jellemzésére. Ezek segítségével önszerveződő, kontrolálható és reprodukálható nanorendszereket fejlesztettünk aminosav és polipeptidek mellett alkalmasan átalakított cukormolekulákra. Az amiloid mint a fehérjeöregedés önrendeződésének fontos formája egyszerre rejt anyagtudományi lehetőségeket és értékeket, valamint egészségügyi problémák (Alzheimer-kór) megoldásának molekuláris lehetőségeit. Feltártuk az öregedési folyamat elsődleges genetikai faktorát (mechanizmusát): az eukarióta genomok jelentős részét alkotó mobilis genetikai elemek (MGE-k) életkorral növekvő aktivitása okozza elsődlegesen a sejtek öregedését és a különböző öregkori degeneratív (pl. neurodegeneratív) elváltozások kialakulását. A potenciálisan halhatatlan sejt típusokban (pl. rákos őssejtek) a MGE-k aktivitását a PIWI fehérje gátolja. Öregedő sejtekben a PIWI expressziója tumorfejlődést indukál, rákos sejtvonalakban a PIWI blokkolása sejtosztódást gátol. PIWI blokkoló antitumor hatású kismolekulák szűrését kezdtük meg. Kimutattuk a kóros fehérje-aggregációk eltávolításában alapvető szerepet játszó autofágia (sejtes önmegsejtés) életkor-függő hanyatlását és a jelenség mechanizmusát neuronokban.

4. Összefoglalás

A VEKOP project vállalásaihoz szorosan kapcsolódó kutatómunkánk eredményei nagyrészt kis molekulákra jellemző alagúthatások megfigyelésére és értelmezésére, az alagúthatást mutató molekulák dinamikájának leírására, valamint gyenge (pl. diszperziós) kölcsönhatások által kötött molekuláris rendszerek vizsgálatára irányultak. A magas szintű kvantumkémiai alkalmazások mellett a módszerfejlesztésre is nagy hangsúlyt helyeztünk. Létrehoztuk a PDB amiloid- és potenciálisan amiloid prekursor molekulákat tartalmazó élő (azaz rendszeresen frissülő) listáját: <https://pitgroup.org/amyloid>. A lista alapot nyújt ahhoz, hogy a – jelenleg mintegy 500 molekulastruktúrát tartalmazó halmaz segítségével – szisztematikus vizsgálatokat végezzünk annak megállapítására, hogy mely atomi molekuláris tulajdonságok vezetnek az amiloid képződéshez, és melyek akadályozzák ezt meg. Bioaktív sejtpenetráló, 15-30 aminosavból álló peptidek, valamint E5 minifehérje amfilitásának, és membrán affinitásának jellemzését végeztük el. A peptidek konformációs változását és az amifil jelleg hatását vizsgáltuk a fluid határfelületi adszorpcióra és a lipidrétegbe való penetrációra. A felületaktivitási, emulzió stabilizálási és CD-spektroszkópiai mérések segítségével a molekuláris környezet hatását tanulmányoztuk. A kísérletekhez szükséges eszközállomány első egysége a napokban érkezett meg. A kísérletek tervezéséhez szükséges elméleti háttér feltárását, az irodalom megértését végeztük el. Ennek során 80 nemzetközi közlemény kiválasztására, elolvasására és lényegi kiértékelésére került sor. Ezek alapján világossá vált, miként lehet létrejönni amiloid szálakat, illetve oligomereket célpontként felkínálni annak érdekében, hogy ezekhez kötődő peptideket / fehérjéket evolváljunk. Feltártuk az öregedési folyamat mechanizmusát; mobilis genetikai elemek („ugráló gének”) mutagén hatása által okozott genomi instabilitás tehető felelőssé az öregedésért. Megértettük azt a fehérjét (PIWI), amely biztosítja a rákos őssejtek korlátlan osztódási potenciálját. Eme fehérje potens antitumor hatású gyógyszer-célpont. Kimutattuk az autofágia életkor-függő hanyatlásának mechanizmusát.

Megjelent cikkek, PUBLIKÁCIÓK

<http://amyloid.life/publications/>

D. Papp, P. Rovó, I. Jákli, A. G. Császár, and A. Perczel, Four Faces of the Interaction between Ions and Aromatic Rings, *J. Comp. Chem.* **2017**, *38*, 1762-1773.

C. Fábri and A. G. Császár, Vibrational Quantum Graphs and Their Application to the Quantum Dynamics of CH_5^+ , *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 16913-16917.

J. Šmydke, C. Fábri, J. Sarka, and A. G. Császár, Rovibrational Quantum Dynamics of the Vinyl Radical and its Deuterated Isotopologues, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, közlés alatt.

R. Tóbiás, T. Furtenbacher, J. Tennyson, and A. G. Császár, Accurate Empirical Rovibrational Energies and Transitions of H_2^{16}O , *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2018**, közlés alatt.

M. P. Metz, K. Szalewicz, J. Sarka, A. G. Császár, and E. Mátyus, Molecular Dimers of Methane Clathrates: Ab Initio Potential Energy Surfaces and Variational (Ro)vibrational States, *J. Chem. Theory Comput.* **2018** (beküldés előtt álló kézirat)

T. Furtenbacher, R. Tóbiás, J. Tennyson, O. V. Naumenko, O. L. Polyansky, N. F. Zobov, A. G. Császár, The 2018 Update of the IUPAC Database of Water Transitions and Energy Levels, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **2019** (beküldés előtt álló kézirat)

É. Kiss et al., Membrane affinity and fluorescent labelling: comparative study of monolayer interaction, cellular uptake and cytotoxicity profile of carboxyfluorescein-conjugated cationic peptides, *Amino Acids*

<https://doi.org/10.1007/s00726-018-2630-7>

Published online: 11 Aug 2018

Kosztelnik M, Kurucz A, Papp D, Jones E, Sigmond T, Barna J, Traka MH, Lorincz T, Szarka A, Bánhegyi G, **Vellai T**, Korcsmaros T, Kapuy O. Suppression of AMPK/aak-2 by NRF2/SKN-1 downregulates autophagy during prolonged oxidative stress. *FASEB J.* In press. 2018 (IF: 5.595)

Sturm Á, Saskoi É, Tibor K, Weinhardt N, **Vellai T**. [Highly efficient RNAi and Cas9-based auto-cloning systems for C. elegans research](#). *Nucleic Acids Res.* 2018 Jun 19. doi: 10.1093/nar/gky516. [Epub ahead of print]. PMID: 29924347 (IF: 11.561)

Barna J, Csermely P, **Vellai T**. [Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response](#). *Cell Mol Life Sci.* 2018 Aug;75(16):2897-2916. doi: 10.1007/s00018-018-2836-6. Epub 2018 May 17. PMID: 29774376 (IF: 6.721)

Kerepesi C, Daróczy B, **Sturm Á**, **Vellai T**, Benczúr A. [Prediction and characterization of human ageing-related proteins by using machine learning](#). *Sci Rep.* 2018 Mar 6;8(1):4094. doi: 10.1038/s41598-018-22240-w. PMID: 29511309 (IF: 4,122)

Kapuy O, Papp D, **Vellai T**, Bánhegyi G, Korcsmáros T. [Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response](#). *Antioxidants* (Basel). 2018 Mar 5;7(3). pii: E39. doi: 10.3390/antiox7030039. PMID: 29510589 (IF: 3,42)



Hotzi B, Kosztelnik M, Hargitai B, Takács-Vellai K, Barna J, Bördén K, Málnási-Csizmadia A, Lippai M, Ortutay C, Bacquet C, Pasparaki A, Arányi T, Tavernarakis N, **Vellai T.** [Sex-specific regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*](#). *Aging Cell*. 2018 Jun;17(3):e12724. doi: 10.1111/accel.12724. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29493066 (IF: 7.627)

Sturm Á, Perczel A, Ivics Z, Vellai T. [The Piwi-piRNA pathway: road to immortality](#). *Aging Cell*. 2017 Oct;16(5):906-911. doi: 10.1111/accel.12630. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28653810 (IF: 7.627)