

REZUMAT

Această teză, intitulată *Aplicații biofizice în cercetarea și dezvoltarea farmaceutică*, rezumă rezultatele activității mele de cercetare după obținerea titlului de Doctor în Chimie la *Case Western Reserve University*- Statele Unite ale Americii în anul 2004.

Prima parte a tezei (capitolele 1-3) continuă cercetările începute în perioada stagiului doctoral, care au furnizat pentru prima dată dovezi pentru acumularea unui intermediar în procesul de pliere a proteinelor prion. Măsurătorile în flux continuu cu o rezoluție în timp de $\sim 100 \mu\text{s}$, au oferit dovezi clare privind acumularea rapidă a unui intermediar timpuriu (cu o constantă de timp de $\sim 50 \mu\text{s}$), urmată de o etapă de pliere care limitează viteza (cu o constantă de timp de $\sim 700 \mu\text{s}$). Studiul a demonstrat de asemenea în mod clar creșterea populației intermediarului în condițiile care favorizează agregarea.

Un comportament similar de pliere de trei stări a fost observat pentru mutantul F198S asociat bolii Gerstmann-Straussler-Scheinker, caz în care populația intermediarului a fost mult crescută în comparație cu cea a proteinei native, sugerând cu tărie că această conformație parțial structurată poate fi un precursor monomeric direct al oligomerului PrPSc pliat greșit. Ulterior, studiile s-au concentrat pe determinarea proprietăților biofizice ale prionilor umane recombinante (huPrP90-231) corespunzătoare variantelor polimorfe D178N/M129 și D178N/V129 asociate cu două boli prionice distincte, și anume insomnia familială fatală și afecțiunile Creutzfeldt-Jakob. În comparație cu proteina nativă, ambele forme polimorfe ale D178N huPrP prezintă o predispoziție mult crescută pentru o conversie la oligomeri bogăți în segmente de β -foi pliate (la pH acid) și respectiv segmente fibrilare amiloidice încărcate pozitiv la tioflavina T (la pH neutru). Foarte important, pentru varianta D178N, tendința de transformare depinde puternic de polimorfismul M/V la poziția 129, în timp ce pentru proteina nativă în condiții experimentale identice nu se observă o astfel de dependență. Diferențele de polimorfism au fost observate de asemenea în morfologia structurilor fibrilare generate, sugerând că variabilitatea fenotipică dependentă de polimorfism a bolilor prionice familiale poate fi legată de diferențele în proprietățile biofizice ale diferitelor variantele prioni. Studiile de etichetare de spin situs-direcționată dezvăluit că aceste structuri fibrilare posedă o un nucleu de β -foi, pliate indiferent de modul de pliere a precursorului monomeric inițial. Similitudinea structurală a structurilor fibrilare formate în condiții diferite sugerează cu tărie că arhitectura comună de β -foi pliate în regiunea centrală a secvenței $\sim 160-220$, reprezintă un minim energetic global în conversia PrP. Mai mult, regiunea N-terminală a structurilor fibrilare ale PrP prezintă plasticitate conformațională, trecând printr-o tranziție structurală reversibilă cu un pKa aparent de $\sim 5,3$. Acest profil al stabilității dependente de pH amintește de comportamentul PrPSc derivat din creier, ceea ce sugerează un grad ridicat de similitudine structurală în regiunea de nucleu β al acestor aggregate de PrP.

Capitolul 4 este axat pe studiile efectuate pentru a elucida rolul sistemului chaperonină GroEL-GroES în plierea proteinelor. Experimentele originale de reconstituire a plierii proteinelor mediate de GroEL-GroES au fost efectuate în condiții „nepermissive”, în care complexul de chaperonină era absolut necesar și proteinele substrat nu puteau atinge starea nativă dacă erau diluate direct în soluție din denaturant. Totuși, în condiții „permissive”, utilizând o concentrație mai scăzută a substratului și o temperatură mai redusă, unele proteine pot fi repliate atât de complexul GroEL-GroES, cât și în soluție. Aparent, pentru câteva dintre acestea proteina ar putea să se replieze mai repede în interiorul camerei cis formată de GroEL-GroES decât liberă în soluție, ceea ce sugerează că acest compartiment poate avea un rol activ, de asistare a plierii proteinelor. Se observă că diferența este cauzată de asocierea multimoleculară reversibilă în timpul plierii în soluție, o cale de partiție cinetică care încetinește viteza reacției de renaturare în raport cu compartimentul chaperoninei, unde nu pot apărea astfel de asocieri. Pe baza experimentelor de repliere „în soluție” și asistată de chaperonină folosind Rubisco, proteina de legare a maltozei (DM-MBP) și dihidrofolat reductază ca substrat, am ajuns la concluzia că compartimentul GroEL-GroES se comportă ca o „cușcă Anfinsen” pasivă al cărei rol principal este de a preveni asocierea multimoleculară în timpul plierii. Aceste observații au deschis o nouă perspectivă asupra posibilului rol jucat de chaperoni în procesele biologice, în care acestia ar putea avea în principal un rol protector și nu neapărat în promovarea proceselor de pliere a proteinelor.

Capitolele 5 și 6 prezintă extinderea cercetării axate pe neurodegenerare prin descoperirea anticorpilor anti-tau, caracterizarea biofizică, biochimică și imunohistochimică, precum și maturarea și testarea funcțională a acestora. Am izolat din celulele B de memorie IgG+ periferice ale donatorilor de sânge asimptomatici un panou larg de anticorpi care se leagă de proteina tau. Acești anticorpi recunosc diferiți epitopi fosforilați și nefosforilați pe tau, sugerând că aceștia pot juca roluri specifice în prevenirea patogenezei tau. CBTAU-7.1 și CBTAU-22.1, doi anticorpi dependenți de fosforilare, care se leagă de regiunile bogate în prolină și C-terminal, recunosc în mod specific forma patologică a tau în țesutul cerebral post-mortem. Alți anticorpi anti-tau recunosc epitopii nefosforilați și prezintă caracteristici interesante. CBTAU-27.1 se leagă de motivul de agregare în domeniul repetitiv R3 și blochează agregarea tau în filamentele elicoidale asociate în perechi (PHF) prin sechestrarea formei monomerică a proteinei tau. Pe de altă parte, CBTAU-28.1 se leagă de regiunea de inserție N-terminală, inhibă răspândirea semințelor de tau și mediază absorbția agregatelor de tau în microglie prin legarea PHF-urilor. Îmbunătățirea afinității a condus la îmbunătățirea funcționalității și a permis identificarea epitopilor ca noi ținte pentru terapia și prevenirea AD. Luate împreună, aceste rezultate sugerează prezența unui răspuns imun în curs de desfășurare condus de antigeni împotriva tau la persoanele sănătoase. În plus, gama largă de specificități pentru tau sugerează că repertoriul imunitar uman poate conține anticorpi care pot servi ca biomarkeri sau pot fi utilizați pentru terapie.

Capitolele 7 și 8 evidențiază rolul și importanța instrumentelor biofizice de ultimă generație în abordarea unor întrebări cheie în cercetarea și dezvoltarea biofarmaceutică. Caracterizarea epitopilor este esențială pentru elucidarea mecanismului de acțiune al medicamentelor aflate în stadiul de dezvoltare. Prin aplicația dezvoltată de noi am evidențiat utilitatea spectrometriei de masă cu schimb de hidrogen-deuteriu (HDX-MS) pentru explorarea impactului conformațional al legării biomoleculilor tip medicamente de hemaglutinină (HA), principalul antigen de suprafață al virusurilor gripale. Am dezvoltat un flux de lucru HDX-MS semi-automat pentru a sonda subtipurile de HA înrudite la distanță în complex cu 4 candidați diferiți de medicamente, de la un anticorp monoclonal până la o peptidă sintetică mică. Aceste rezultate evidențiază potențialul testării bazate pe cartografierea epitopilor HDX-MS pentru identificarea unor candidați împotriva proteinelor antigenice în stadiile incipiente ale dezvoltării medicamentelor.

În plus am exploatat impactul mare al metodei HDX-MS pentru anticiparea evoluției designului de vaccinuri recombinante. Folosind ca metodă de abordare proiectarea rațională am conceput antigeni stem HA stabili („mini-HA”). Prin îmbunătățirea specifică a diverselor situsuri conformaționale în diferite etape de proiectare, am putut prezice funcționalitatea și am utilizat rezultatele experimentale în procesul de proiectare *in silico*. A fost prezis cu succes că cel mai avansat candidat prezintă proprietăți structurale și de legare a bnAb comparabile cu cele ale HA expus pe suprafața virusului. Ulterior predicția noastră a fost validată prin experimente *in vivo* care au arătat că designul final protejează pe deplin șoarecii în modelele de provocare letale heterologe și heterosubtipice și reduce febra după provocarea subletală la maimuțele cynomolgus. Anticorpii generați la șoareci și primat non-umane de acești mini-HA recunosc o varietate largă de HA, prezintă competiție cu bnAbs umani pentru legarea HA stem, neutralizează virusurile H5N1 și mediează activitatea efector dependentă de anticorpi.

Subiectele de cercetare prezentate în această teză de abilitare evidențiază potențialul instrumentelor biofizice de ultimă generație în abordarea unor teme biologice fundamentale. Tehnologiile utilizate în aceste studii includ: instrumentație pentru structura primară (spectrometria de masă, electroforeza capilară), tehnici centrate pe structura secundară (dicroismul circular, FTIR), tehnologii utilizate pentru a sonda interacțiunile și schimbările conformaționale (fluorescența, calorimetria de titrare izotermă, calorimetria de scanare diferențială, interferometria biostrat, ELISA, EPR), biologia structurală (HDX-MS, EPR, difracția cu raze X imunohistochimie), dar și determinarea dimensiunii particulelor și a masei (DLS, SEC-MALS).

Dr. Constantin Adrian APETRI

