

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. Tóke Orsolya, Ph.D., laborvezető MTA TTK
Dr. Smeller László, az MTA doktora, Dr. Habil.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, az MTA tagja, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Batta Gyula, az MTA tagja, D.Sc.
Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés – irodalmi háttér.....	8
1.1	Az inkretin rendszer és a GLP-1	8
2.1.1	Az inkretin rendszer és a GLP-1 felfedezése.....	8
2.1.2	G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) – GLP-1 receptor	11
2.1.3	Szövetspecifikus GLP-1 hatások.....	15
2.1.4	Inkretin mimetikumok besorolása és terápiás alkalmazásai.....	17
2.1.5	GLP-1 mimetikumok szerkezete	18
2.1.6	A triptofán-kalitka modell-rendszer és az abból származtatott variánsok.....	21
2.1.7	A Tc5b-ből származtatott Elongated/Hosszabított peptidcsalád	22
2.2	Fluoroprolinok	24
2.2.1	Fluoroprolinok sztereokémiája	24
2.2.2	Fluoroprolin szubsztitúciók térszerkezeti hatásai fehérjék esetében	26
2.3	Diszulfidhidas peptidek	27
2.3.1	A diszulfidhidas keresztkötések alapkoncepciója	27
2.3.2	Diszulfidhidak szerkezeti biológiája	28
2.3.3	Diszulfidhíd stabilizált GLP-1 mimetikumok	30
2.4	Fehérjék aggregációja és amiloid szerkezete	31
2.4.1	Fehérje aggregációs folyamatok.....	31
2.4.2	Az aggregációt befolyásoló tényezők.....	33
2.4.3	Az amiloid aggregáció.....	34
2.4.4	Az amilóma	35
2.4.5	Az amiloid térszerkezet	36
2.4.6	Inkretin mimetikumok aggregációja.....	40
2.5	E5 minifehérje.....	41
3.	Célkitűzések.....	43
4.	Módszerek.....	46
4.1	Peptidek előállítása és tisztítása	46
4.1.1	Bakteriális expresszió	46
4.1.2	Szilárd fázisú peptid szintézis	46
4.1.3	A minták HPLC-s tisztítás.....	47
4.1.4	Amiloid aggregációs kísérletek	47
4.2	Oldatfázisú fehérje NMR-spektroszkópia és szerkezet számolás.....	48
4.2.1	1D ¹ H-NMR-spektrumok jelentősége	49
4.2.2	Alkalmazott 2D ¹ H- ¹ H homonukleáris NMR-technikák	51
4.2.3	Oldat fázisú NMR-minták és mérések.....	54
4.2.4	Diszulfidhidas minifehérjék redukciója.....	55

4.2.5	Oldatfázisú NMR-technikák az aggregáció monitorozása során.....	55
4.2.6	Szerkezetszámolás NOE-kényszerfeltételek alapján.....	56
4.2.7	Fehérjék térszerkezetének jellemzése kémiai eltolódások alapján.....	59
4.3	ECD-spektroszkópia	61
4.3.1	Közeli UV-tartományú (NUV) ECD-spektroszkópia.....	61
4.3.2	Távoli UV-tartományú (FUV) ECD-spektroszkópia	62
4.3.3	Dekonvolúciós módszerek.....	63
4.3.4	ECD-spektroszkópiai mérések	64
4.4	Redukciókinetika modellezése.....	66
4.5	Az E19_SS fehérje inzulin szekréción vizsgálata	67
4.6	Monomer E5 fehérjék molekuladinamika szimulációja	68
4.7	Egyéb biofizikai és molekuladinamikai módszerek.....	69
5.	Eredmények	71
5.1	Szintetizált peptidek jelölése és szekvenciája.....	71
5.2	25 aminosav hosszúságú E5 variánsok térszerkezetének kombinált spektroszkópiai módszerekkel történő jellemzése	73
5.2.1	NOESY-kényszerfeltételek alapján meghatározott térszerkezetek és jellemzésük.....	73
5.2.2	Az E5 variánsok szerkezetének jellemzése spektroszkópiai módszerek által meghatározott paraméterek alapján.....	79
5.2.3	Tyr-Trp térállás jellemzése az E5 minifehérje származékokban.....	86
5.3	Diszulfidhíd stabilizált minifehérjék szerkezetének, redukciójának és biológiai aktivitásának jellemzése.....	87
5.3.1	Diszulfidhíd stabilizált minifehérjék és azok redukált variánsának szerkezeti jellemzése összehasonlításban az egyező hosszúságú E2/E5/E11/E19 variánsokkal	88
5.3.2	Redukciókinetika monitorozása spektroszkópiai módszerekkel	90
5.3.3	E19_SS biológiai aktivitásának mérése INS-1 emlős-sejttenyészeteken	95
5.4	E5 minifehérje amiloid aggregációjának vizsgálata	96
5.4.1	Az aggregáció vizsgálata FUV ECD-spektroszkópiával.....	96
5.4.2	Az aggregáció vizsgálata NUV ECD-spektroszkópiával	99
5.4.3	Az aggregációra hajlamos monomer térszerkezetének jellemzése NMR-spektroszkópiával.	100
5.4.4	Az E5 különböző protonáltsági mikroállapotai és azok molekuladinamikai modellezése	101
5.4.5	Az aggregáció követése NMR-spektroszkópiával és más biofizikai módszerekkel. Az oligomerizációs folyamat jellemzése.....	104
5.5	Az E5 amiloid modellek és az LYIQWL peptidkristály atomi felbontású térszerkezete.....	107

6.	Megbeszélés.....	109
6.1	Az E5 származékok termális denaturációjának vizsgálata ECD és NMR-spektroszkópiával.....	109
6.1.1	A helikális jelleg jellemzése (CSD _{hélix 2-13} , $\Theta_{222\text{nm}}$, F% _{FUV}).....	109
6.1.2	A harmadlagos térszerkezet - Trp-kalitka jellemzése (CSD _{cage} , $\Theta_{276\text{nm}}$, $\Theta_{280\text{nm}}$, $\Theta_{287\text{nm}}$, $\Theta_{293\text{nm}}$, F% _{NUV} , 8Tyr-11Trp térállás).....	111
6.2	Az egyes aminosav szubsztitúciók térszerkezetre gyakorolt hatása	114
6.2.1	A 14X-21R sóhíd finomhangolása: E5, E5_E14D, E5_E14Q	114
6.2.2	R6N szubsztitúció hatása.....	116
6.2.3	A fluor szubsztituált variánsok	116
6.2.4	Diszulfidhíd beépítésének hatása.....	118
6.3	Az <i>in vitro</i> kísérletek eredményei	120
6.4	A Redukciókinetikai eredmények tárgyalása.....	121
6.4.1	A redoxi rendszer jellemzése spektroszkópiai módszerekkel	121
6.4.2	A redukciós kinetikai eredmények összehasonlítása.....	122
6.5	E5 minifehérjék aggregációja	126
6.5.1	Az aggregáció jellemzése FUV ECD-spektroszkópiával	126
6.5.2	Az E5 minifehérje denaturációja	129
6.5.3	Az E5 aggregációra hajlamos állapotának meghatározása kombinált molekuladinamikai szimulációk és az NMR által meghatározott térszerkezetek alapján.....	131
6.5.4	Az oligomerizációs folyamat és az aggregátumok morfológiájának jellemzése..	132
6.5.5	Az E5 amiloidszál.....	134
7.	Következtetések	138
8.	Összefoglalás	144
9.	Summary.....	145
10.	Irodalomjegyzék	146
11.	Publikációk	179
12.	Köszönetnyilvánítás.....	180

Rövidítések jegyzéke

Aminosavak rövidítése:

Ala – A: alanin

Arg – R: arginin

Asn – N: aszparagin

Asp – D: aszparaginsav

Cys – C: cisztein

Gln – Q: glutamin

Gly – G: glicin

Glu – E: glutaminsav

His – H: hisztidin

Ile – I: izoleucin

Leu – L: leucin

Lys – K: lizin

Met – M: metionin

Phe – F: fenil-alanin

Pro – P: prolin

Ser – S: szerin

Thr – T: treonin

Trp – W: triptofán

Tyr – Y: tirozin

Val – V: valin

ADP/ATP: adenzin difoszfát/trifoszfát

AFM: atomic force microscopy – atomerő mikroszkópia

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

COSY: correlation spectroscopy – korrelációs spektroszkópia

cryo-EM: kriogén elektronmikroszkóp

CSD: chemical shift deviation – kémiai eltolódás különbség

DAG: diacil-glicerol

DCM: diklór-metán

DIC: diizopropil-karbodiimid

DLS: dynamic light scattering – dinamikus fényszórás

DMAP: dimetilamino-piridin

DMF: N,N-dimeil-formamid

DOSY: diffusion ordered spectroscopy - translációs diffúziós mérések

DPP-IV: dipeptil peptidase-IV – dipeptil petidáz-IV

DQF-COSY: double quantum-filtered COSY – dupla kvantumszűrt COSY

DSS: 3-(trimetilszilil)propán-1-szulfonát nátrium sója

DTT: dithiothreitol

ECD: electronic circular dichroism spectroscopy – elektronikus cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

ECD: extracelluláris domén

ECL: extracellular loop – extracelluláris hurok

EDT: etán-ditiol

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay – enzimhez kötött immunoszorbens analízis

ERO: endoplasmic reticulum oxidoreductin – endoplazmás retikulum oxidoreduktin

ERV: Essential for respiration and viability – légzéshez és életképességhez elengedhetetlen

Ex-4: exendin-4, Exenatide

FDA: Food and Drug Administration – Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer-engedélyeztetési Hivatal

FUV: far-UV – távoli UV-tartomány az ECD-spektroszkópiában (190nm-250nm)

GIP: gastric inhibitory polypeptide / glucose-depend insulinotrop polypeptide – gasztrin gátló peptid/glüköz-függő inzulinotrop polipeptid

GLP-1: glucagon-like peptide 1 – glükagon-szerű peptid 1

GLP-1R: glucagon-like peptide 1 receptor – glükagon-szerű peptid 1 receptor

GLP-2: glucagon-like peptide 2 – glükagon-szerű peptid 2

GPCR: G-protein coupled receptor – G-fehérje kapcsolt receptor

GRPP: glicentin-related polypeptide – glicentinnel kapcsolatban álló polipeptid

HOBT: hidroxibenzotriazol

HSQC: hetronuclear single quantum coherence spectroscopy – heteronukleáris egy kvantum koherencia spektroszkópia

ICL: intracellular loop – intracelluláris hurok

IHC: immunohistochemical – immunohisztokémiai
IHS: *in situ* hybridization – *in situ* hibridizáció
IP1-2: intervening peptid 1-2 – közbeékelődő peptid 1-2
IP₃: inozitol-trifoszfát
IPTG: Izopropil β-D-1-tiogalactopiranozid
ISBL: *in situ* ligand binding – *in situ* ligandum kötő
KRBH: Krebs-Ringer bikarbonát puffer
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
MPGF: major glucagon fragment – fő glükagon fragmens
mRNS: messenger/hírvívő ribonukleinsav
NMP: N-metil-pirrolidon
NMR: nuclear magnetic resonance – mágneses-magrezonancia spektroszkópia
NOE: nuclear Overhauser-effect – mag Overhauser-hatás
NOESY: nuclear overhauser effect spectroscopy– mag Overhauser-hatás spektroszkópia
NTD: N-terminális domén
NUV: near-UV – közeli-UV tartomány az ECD-spektroszkópiában (240nm-320nm)
PDI: protein disulfide-isomerase – fehérje diszulfid izomeráz
PI3: phosphoinositol 3-kinase – foszfoinozitol 3-kináz
RMSD: root mean standard deviation – négyzetes középérték eltérés
ROESY: rotating frame overhauser effect spectroscopy – fogó koordinátarendszerű overhauser effektus spektroszkópia
SCS: secondary chemical shift – másodlagos kémiai eltolódás
SNAC: nátrium N-(8-[2-hydroxylbenzoyl]-amino) kaprilát
Tc: triptophan-cage – triptofán-kalitka
TCEP: tris(2-karboxietil)foszfin
TEM: transmission electron microscopoy – transzmissziós elektron-mikroszkópia
TIS: tri-izopropil szilán
TFE: trifluor-etanol
TFA: trifluoric-acetic acid – trifluor-ecetsav
TM: transzmembrán
TOCSY: total correlation spectroscopy – teljes korrelációs spektroszkópia
VCD: vibrációs cirkuláris dikroizmus

1. Bevezetés – irodalmi háttér

Doktori munkám során a GLP-1 receptor endogén ligandumával és annak variánsaival foglalkoztam, melyek a 2-es típusú cukorbetegség gyógyításában játszanak szerepet.

A cukorbetegség és a szövődményeinek kezelése az egyik legnagyobb egészségügyi kihívás a 21. században. Az elmúlt 20 évben a diagnosztizált cukorbetegséggel együtt élők száma megháromszorozódott. Ez 2019-ben körülbelül 230 millió felnőttet jelent, azonban a becslések szerint további 230 millió embernek lehet még diagnosztizálatlan cukorbetegsége [1]. A betegek 75%-a ráadásul szegény vagy fejlődő országokban él, ahol a fejletlen egészségügyi rendszer nem teszi lehetővé sem a diagnózis felállítását, sem a betegség kezelését. Az éves globális egészségügyi kiadások 10%-át a cukorbetegség és szövődményeinek a kezelésére fordítják, azonban a cukorbetegség így is a betegség általi halálozások listáján az elsők között van [2].

Az 1-es típusú cukorbetegség autoimmun eredetű, emiatt csak inzulin analógok jöhetnek számításba a kialakult inzulin deficiencia kezelésére. Főként a túlsúlyból, valamint a nem egészséges táplálkozásból, életmódból adódó inzulin rezisztencia miatt kialakuló 2-es típusú cukorbetegségben több lehetőség adott a terápia szempontjából. A 2-es típusú cukorbetegség az esetek kb. 90%-át adja. Ha az elsődlegesen javasolt egészségesebb életmódra való átállás [3] nem elégséges, akkor különböző kombinációs terápiaiban alkalmazhatóak a szulfonil-urea típusú vegyületek, dipeptil peptidáz-IV gátlók, valamint a továbbiakban részletezett inkretin analógok is. Végző soron, ha a felsorolt lehetőségek sem elégségesek a normoglikémia fenntartására, további inzulin adagolása (is) szükségessé válik.

1.1 Az inkretin rendszer és a GLP-1

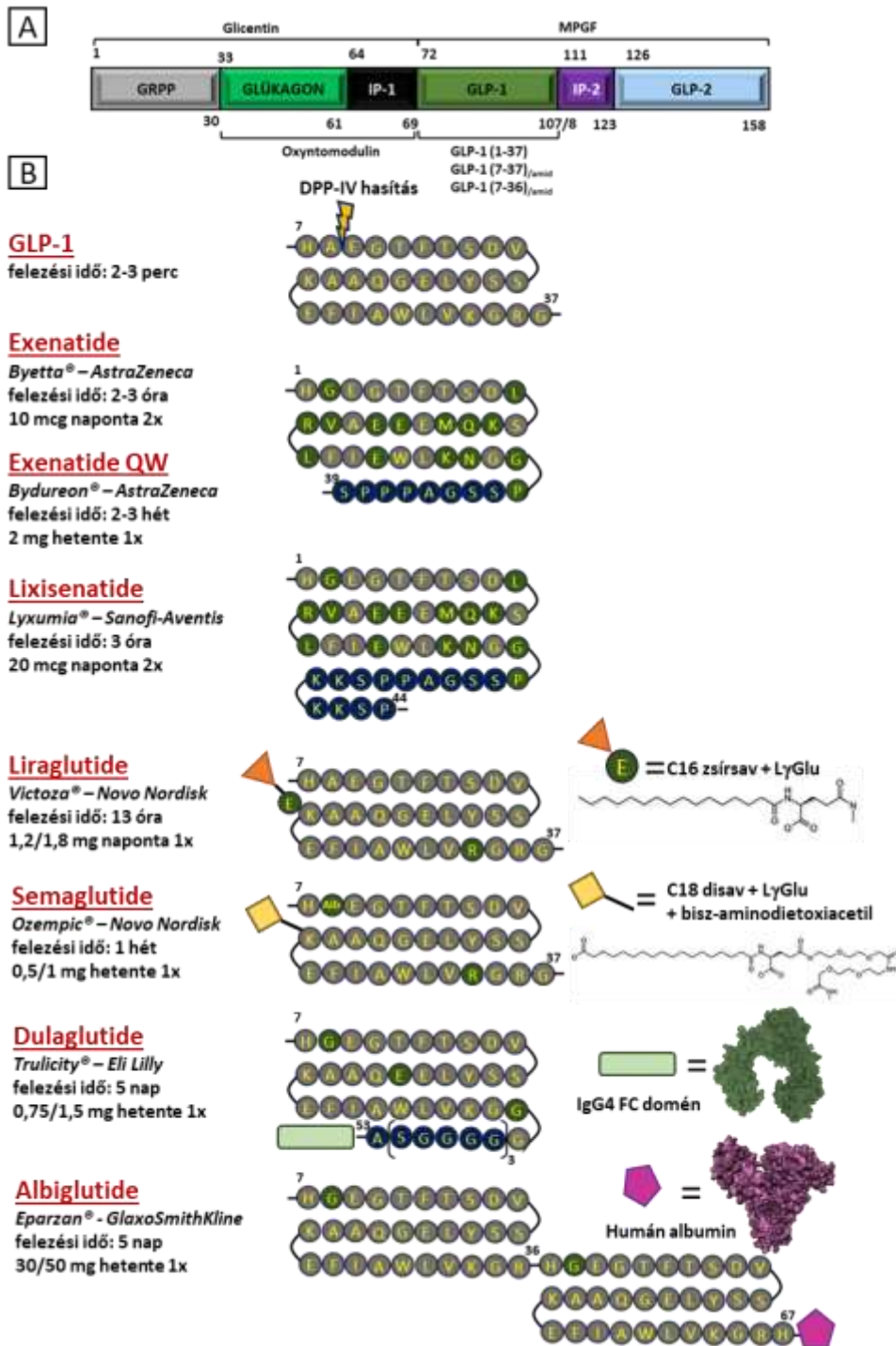
2.1.1 Az inkretin rendszer és a GLP-1 felfedezése

Az inkretinek olyan intesztinális hormonok, amelyek orális glükóz adagolása során a vékonybelek - főként az ileum - endokrin L sejtjeiből felszabadulva serkentik a hasnyálmirigy inzulin szekrécióját. A jelenséget már az 1930-as években Barre [4] megfigyelte, megalkotva az inkretinek fogalmát. Felismerve a lehetőséget, javasolta az akkor még ismeretlen karakterű inkretinek alkalmazását cukorbetegségeken. A hatvanas

években bizonyították, hogy a fenti „inkretin hatás” csak táplálék szájon át történő felvétele során valósul meg, intravénás táplálásnál/glukóz adagolásnál azonban nem [5]. Az első inkretint, a GIP-et John Brown [6-7] a hetvenes években karakterizálta és eleinte *gastric-inhibitory polypeptide*-ként írták le, mivel gátolta a gyomorsav termelését. Később derült csak ki, hogy hyperglükémiában serkenti az inzulin elválasztását, euglykémiában viszont nem [8]. A hatásmechanizmusa alapján illik rá az inkretin definíció, emiatt átkeresztelték glukóz-függő inzulinotrop polipeptidnek, megtartva a GIP rövidítést.

A következő mérföldkő az inkretinek leírásában a glukagon gén klónozása és szekvenálása volt [9]. A preproglukagon gén az emberi kettes kromoszóma nagy karján lokalizálódik (2q36-q37), 6 exont és 5 intront tartalmaz, amelyből a transzkripció és a transláció során a proglukagon prekursor szintetizálódik. Szövetspecifikusan különböző prohormon-konvertáz enzimek posztranszlációs hasítása termékeként a glukagonon kívül az alábbi peptidek/peptid-fragmensek vágódhatnak ki a prekurból: GLP-1, GLP-2, oxyntomodulin, glicentin, glicentinnel kapcsoltban álló polipeptid (GRPP), fő glukagon fragmens (MPGF) és két közbeékelődő polipeptid (IP 1-2). [10-11] GLP-1 (1-37) szekvenciából további posztranszlációs módosítás során az N-terminálisról kivágódik az első hat aminosav (HDEFER szekvencia) így alakítva ki az aktív származékokat: GLP-1 (7-37) és a GLP-1 (7-36), illetve ezek C-terminálison amidált variánsait [12]. **(1. ábra/a)**

Mindkét glukagon-szerű peptid az emésztőrendszerben szintetizálódik, azonban, csak a GLP-1 bír inkretin hatással [13] és serkenti a glukóz függő inzulin szekréciót a hasnyálmirigyből [14]. GLP-1 mindemellett késlelteti az emésztett táplálék távozását a gyomorból és csökkenti az étvágy érzetet is. Néhány perccel az étkezés után a plazma GLP-1 szintje a bazális koncentráció 3-5-szörösére emelkedik. A keringési GLP-1 koncentráció növekedése még azelőtt megindul, mielőtt a táplálék elérné a beleket, bizonyítva, hogy az inkretin rendszer aktiválása főként idegrendszeri stimulációra történik [15]. A keringésben a GLP-1 néhány perc alatt inaktiválódik, ugyanis a dipeptid-peptidáz IV az N-terminális His-Ala- dipeptidet lehasítva alacsony receptor affinitású GLP-1 (9-36) metabolittá alakítja [16-17]. **(1. ábra)**



1. ábra. A) Proglucagon és az abból származtatható hormonok és peptidek sematikus rajza. B) GLP-1, Exenatide és ezek forgalomban lévő származékjainak az összefoglalása (hatóanyag név, gyári név, felezési idő és adagolás). Az egyes szekvenciákon a GLP-1-hez képest zölddel a szubsztitúciók, kékkel a szekvencia-hosszabítások vannak jelölve. A kovalens változtatásokat a piktogramok jelzik. A sárga villám a DPP-IV hasítás helyét jelzi a szekvenciában.

2.1.2 G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) – GLP-1 receptor

A G-fehérje-kapcsolt receptorok membránba ágyazott fehérjék, amelyek az extracelluláris ingert alakítják át intracelluláris jellé. A humán genom legnagyobb membrán fehérje családját alkotják, több mint 800 különböző tagot számlálnak [18]. A jelként szolgáló ingerek természete kémiai és fizikailag is nagyon változatos: fotonok; ionok (H^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+}); vitaminok; hormonok (ösztrogén, angiotenzin); fehérjék (kemokinek); neurotranszmitterek (dopamin, szerotonin); különböző metabolitok (ATP, ADP, zsírsav, epesav) [19]. A receptorok átalakító szerepe konvergens, ugyanis a sokfajta ingert általában két nagyobb jelátviteli úttal kapcsolja össze. Az egyik esetben az aktiváció hatására a heterotrimer G-fehérje komplex (G_s , G_i , G_q , $G_{12/13}$) disszociál, amelynek eredményeként $G\alpha$ egység által közvetítve megnő az intracelluláris cAMP, Ca^{2+} , IP_3 , DAG koncentrációja, míg a $G\beta$ és a $G\gamma$ alegységek a különböző ion csatornák, foszfolipázok és kinázok működését befolyásolják. A másik receptorhoz asszociált alegység, a β -arresztinek, amelyek a receptor szenzitizációjában, internalizációjában [20], transzkripciójában, illetve a MAPK [21] jelátvitelben játszanak szerepet.

Annak ellenére, hogy szekvenciális homológiájuk csekély, a GPCR-ok általános szerkezeti felépítése hasonló sémát mutat. Szerkezetük, illetve a kapcsolódó ligandumjaik alapján 5 különböző receptor család különíthető el (IUPHAR: International Union of Pharmacology alapján): rodopszin család (A osztály), szekretin család (B osztály); glutamát család (C osztály); „frizzled” család (F osztály); adhézios család [22]. Élettani szerepük, szöveti expressziójuk, a jelátvitelben betöltött fontosságuk miatt illetve az évek során feltérképezett térszerkezetük alapján [23] a G-fehérje-kapcsolt receptorok (főként az A-C osztály) az egyik leggyümölcsözőbb célpontjai a racionális hatóanyag tervezésnek és fejlesztéseknek [24]. A receptorok szerkezeti homológiája miatt, azonban számos esetben egy ígéretes farmakofór, illetve annak metabolitja más GPCR-hoz is kötődhet nem kívánt mellékhatásokat okozva [25-26].

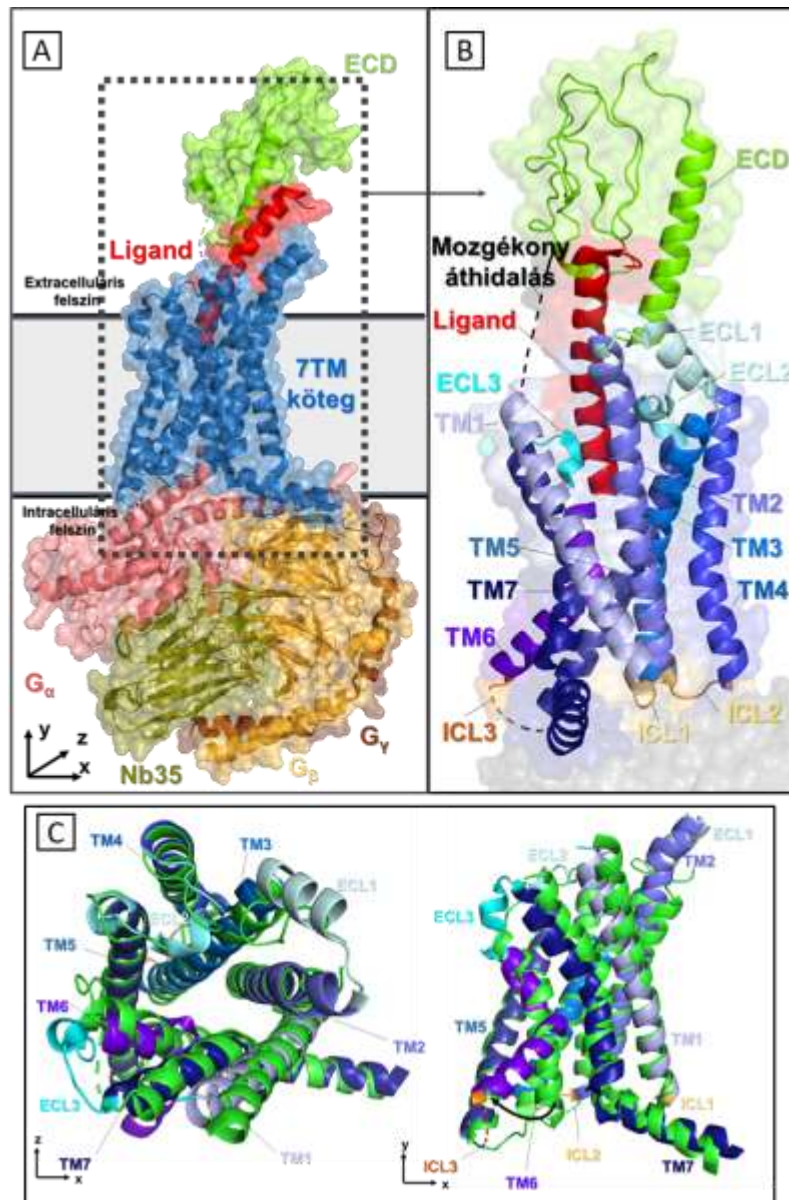
GPCR-ok esetében a ligandum hiányában is megfigyelhető egy konstitutív vagy alapszintű aktivitás. A maximális intenzitású hatást - néhány kivételtől eltekintve - azonban csak az exogén ligandum jelenlétében, a kialakuló stabil konformációjú ligandum-receptor komplex megléte mellett tudják generálni. A ligandum ilyenkor teljes-agonista hatással bír, míg olyan esetekben, ahol a maximális jelintenzitás csak egy bizonyos hányada érhető el, a ligandum parcionális agonistának nevezhető. Az

ligandumok lehetnek inverz agonista hatásúak, amely azt jelenti, hogy a kötődés az agonista válasszal ellentétben a bazális aktivációt gátolja. A kompetitív antagonisták esetében a ligandum csak kötődik a receptorhoz, elfoglalva ezzel a kötőhelyet egyéb agonisták elől. Megemlítendő, hogy a különböző farmakológiai hatású ligandumok a GPCR ortoszerikus (v. fő) kötőhelyére kapcsolódnak, azonban számos kismolekulás ligandum a receptor specifikus allosztérikus [27] kötőhelyein befolyásolhatja annak konformációját és funkcióját.

Az utóbbi évtizedek robbanásszerű fejlődése a nagy atomi felbontást biztosító különféle biofizikai módszerek terén (mint például a röntgen krisztallográfia, a magmágneses rezonancia (NMR) vagy a kriogén elektronmikroszkópia (cryo-EM)) hozzájárult ahhoz, hogy mára teljesebb képet kapjunk a GPCR fehérjék különböző aktiváltságú térszerkezeteiről, a kötődés hatására lezajló szerkezeti átrendeződésekről, valamint a kapcsolt jelátviteli útvonalakról. A GPCR hasonló felépítéséből és működéséből fakadóan a továbbiakban a receptorok B osztályára, azon belül is a GLP-1R receptor térszerkezetére és aktiválási mechanizmusára fogok fókuszálni, kiemelve bizonyos unikális tulajdonságokat, amelyek megkülönböztetik a GLP-1R receptort a többi osztálytól.

A GPCR B osztálya 18 receptort tartalmaz, amelyek peptid szerkezetű hormonok hatására aktiválódnak. Ezek a receptorok számos kardiovaszkuláris és pszichiátriai betegség kezelésének a célpontjai [28]. A hatóanyag fejlesztést jelentősen hátráltatta, hogy az utóbbi évekig kevés információval rendelkezünk a receptorok teljes térszerkezetéről és a lehetséges allosztérikus kötőhelyekről, [29] mostanra azonban több aktivált, illetve gátlás alatt álló receptor térszerkezetére is fény derült [30-34].

Szerkezeti szempontból a B osztályú receptorokat az N-terminális végen található kiterjedt extracelluláris domén (ECD v. NTD) különbözteti meg a többi GPCR családtól, amely a peptid ligandum megkötésében játszik szerepet. **(2. ábra/a)** Az eddig felderített térszerkezetek alapján minden esetben az NTD domén egy α - β - β - α motívumból áll, ahol az α egy alfa-hélixet jelöl míg a β egy 2 rétegből álló béta-redőt. Az egymást követő szerkezeti elemek 1-1 diszulfidhíddal (összesen 3) vannak páronként összekötve, amelyeknek megléte a funkcionalitás egyik alapfeltétele. Kötődéskor az NTD konzervált módon, a peptid ligandum C-terminálisán, illetve az α -hélix apoláros felszínén lévő aminosavakat ismeri fel és köti meg hidrofób kölcsönhatások révén. A GLP-1 számozása



2. ábra. A) Cryo-EM által meghatározott emlős GLP-1R komplexe a GLP-1 ligandjával, a kis G_s fehérjével (G_α - G_β - G_γ alegységek) és a nanobody 35-tel (Nb35). PDB ID: 5VAI. A sejtmembrán sematikusán szürke sávként van jelölve. B) A GLP-1 ligand, az EC domén, valamint a 7 transzmembrán hélix (TM 1-7) és az azokat összekötő 3-3 extracelluláris (ECL 1-3) és intracelluláris (ICL 1-3) kanyar nagyítva, kihangsúlyozva, hogy a ligand N terminálisa miként illeszkedik a TM hélixek által alkotott ortoszterikus kötőhelyre. C) A transzmembrán régió aktivált (kék-árnyalatok – PDB ID: 6B3J) és apo/gátolt (zöld – PDB ID: 5VEW) szerkezete felül és oldalnézetből. 5VEW esetében az antagonistá kismolekula egy allosztérikus kötőhelyhez kapcsolódik.

alapján analóg módon a kötődésben résztvevő hidrofób aminosavak az Exenatide ligandum esetében: Ala18^L; Val19^L; Phe22^L; Ile23^L; Trp25^L; Leu26^L és az NTD esetében: Leu32^R; Thr35^R; Val36^R; Trp39^R; Tyr69^R; Tyr88-Trp91^R; Leu123^R. A

ligandum-NTD komplexet tovább stabilizálják a ligandum hidrofíli oldalán kialakuló további ionos és hidrogénhidás kötések: Glu15^L-Leu32^R; Arg20^L-Glu128^R; Lys27^L-Glu128^R. A TM domén és az NTD egy flexibilis 10 aminosav hosszúságú szekvenciával van összekötve, amely az NTD-ligandum komplexet a TM hélixek által alkotott ortoszterikus kötőzseb felé irányítja. **(2. ábra/b)**

A TM régió szerkezeti felépítése és elrendezése az összes családra általánosan jellemző sémát mutatja, függetlenül a szekvenciális diverzitástól. A B osztályon belüli 20-45%-os szekvenciális homológia alacsony volta ellenére, az inaktív/apo receptor szerkezetek közötti főlánci RMSD csupán csak 1.1-1.7 Å! [35]! A domén 7 transzmembrán (TM1-7) α-hélixből épül fel, amelyek hozzávetőlegesen merőlegesen helyezkedik el a membrán síkjára. A TM1-2-3-5-6-7 hélixek kb. 25°-ban megdőlvén egy megcsavart köteget alkotva alakítják ki a centrális, V alakú kötőzsebet. A TM4 hélix a kötegen kívül helyezkedik el. A hélixeket mind az intracelluláris mind az extracelluláris felszínen egyenként 3-3 loop (ICL 1-3; ECL 1-3) köti egymás utáni füzérekbe. **(2. ábra/b)**

A ligandok és a GPCR receptorok közti kölcsönhatás kialakulásának manapság általánosan elfogadott modellje az úgynevezett két doménes kötődési mód. Az első lépésben a ligandum és az NTD asszociációja történik meg, majd a második lépésben a ligandum N-terminálisa a TM domén centrális V-alakú üregébe merül. A GLP-1R és a GLP-1 asszociáció esetében His1^L-R299^{R-ECL2}, Trp5^L-Lys197^{R-TM2} között H-hidak; a Glu3^L-Leu338/Ser392^{R-TM7} között van der Waals kölcsönhatások; Ser9/Ser11^L-W297/R299^{R-ECL2} között poláris kölcsönhatások alakulnak ki. Inaktív állapotban a TM1, TM2, TM7 hélixek által alkotott ún. központi poláris hálózat [36] stabilizálja H-hidakkal az apo konformert. A kötődés során ez a hidrogénhid-hálózat átrendeződik, TM1, TM2, TM7 domének extracelluláris felszíne a TM köteg középpontja felé közelít, míg a rendezetlen extracelluláris kötegek (ECL1-3) alfa-hélixé rendeződnek, elősegítve ezzel a ligandum dokkolódását a TM régióhoz. A TM6 hélix közepén található PLLG szekvencia motívum kitüntetett „kapcsoló” szerepet játszik. Inaktív állapotban hidrofób kölcsönhatások révén TM6 hélix egy kinyújtott bot alakú konformációban van rögzítve [37], de a centrális hálózat átrendeződése során az újonnan kialakuló H-hidak egy kvázi L-alakú megtört konformációban stabilizálják a TM6-ot. Az átrendeződés a TM5, TM6 és az ICL3 intracelluláris régiójának a membrántól való eltávolodásához vezet egy kitüremkedést hozva létre, amelyhez a G-fehérje komplex kapcsolódhat [38]. **(2. ábra/c)**

Mivel a B osztályú GPCR-ok esetében a ligandum nagyobb méretű mozgékony peptid, így a TM centrális kötőzsebe is nagyobb kiterjedésű és jobban megközelíthető a ligandum számára, mint a többi osztályba tartozó receptorok hasonló zsebei.

2.1.3 Szövetspecifikus GLP-1 hatások

GLP-1 receptorok agyi [39] illetve hasnyálmirigyi [40] lokalizációjának első leírása már a 80-as években megtörtént. Ahhoz, azonban hogy átfogó képet kapjunk a sokszor komplex intracelluláris jelátvitel kialakulásával kapcsolatban, és megérthessük a kapcsolódó metabolikus választ, a receptorok teljes szervezetre kiterjedő lokalizációját kell felderíteni. Ilyen típusú feladatkhoz az egyik leggyakrabban használt stratégia specifikus antitestek tervezése a receptor térszerkezetének ismeretében [41]. A GPCR család nagyfokú szerkezeti homológiájából adódóan, az antitestes módszer is adhat hamis pozitív eredményt [42], ezért érdemes további párhuzamos immunohisztokémiai (IHC), *in situ* hibridizációs (IHS) vagy *in situ* ligandum kötő (ISBL) módszereket is alkalmazni. Számos esetben máig nem pontosan feltérképezett, hogy az adott sejtválasz a GLP-1 receptor által direkt közvetített jelátviteli úton vagy közvetve, más jelátviteli út perturbálásával, indirekt módon, valósul-e meg [43-45]. Az alábbiakban a GLP-1R néhány már felderített, szövetspecifikus funkcióját mutatom be.

Hasnyálmirigy: A pankreasz β sejteiben a GLP-1 kötődése a GLP-1R-hez serkenti az inzulin glükóz függő felszabadulást [46], valamint serkenti mind az inzulin, mind a glükokináz enzimek és a glükóz transzporterek termelődését. Mindeztáig nem sikerült egyértelműen tisztázni a GLP-1 gátló hatását a hasnyálmirigy α -sejtjeiből történő glükagon felszabadulására. Közvetlen hatásról biztosan nem beszélhetünk, ugyanis az α sejteken nem találhatóak GLP-1R-ok [47]. Valószínűleg ATP-függő K^+ -csatornák közvetítésével történhet a gátlás. [48] **Gasztrointesztinális rendszer:** GLP-1R-ok a bélrendszer mentén a mienterikus idegfonat [49] neuronjaiban helyezkednek el befolyásolva a gasztrointesztinális rendszer motilitását [50]. A duodenum Brunner mirigyeiben serkentik az intesztinális falat síkosító váladék kiválasztását, amely elengedhetetlen a megfelelő működésű bélrendszeri barrier funkciókhoz. **Kardiovaszkuláris rendszer:** egyes tanulmányok a GLP-1-nek kardioprotektív hatást tulajdonítanak, amely a kardiomiociták antiapoptotikus mechanizmusainak közvetlen aktiválásával lehetséges [51]. A klinikai gyakorlatban ezt a hatást érvényesíteni is lehetne

a miokardiális funkciók támogatására szívinfarktuson vagy miokardiális ischemián átesett páciensek esetében [52-53]. Azonban GLP-1 analógokkal végzett további vizsgálatok [54-55] során ezek a jótékony kardiovaszkuláris hatások nem voltak teljes bizonyossággal megállapíthatók, amely megerősíti további, nagyobb populáción elvégzett tanulmányok szükségét. Az sem tisztázott, hogy e hatások jelátvittele a konvencionális GLP-1R receptor útvonalon, vagy esetleg más receptoron történik. Mindenesetre a GLP-1R mRNS-e megtalálható a szívben és a receptort lokalizálták mind a pitvarban [56] mind a szinuszcsomó miocitáiban [57], azonban a kamra szívizomzatában nem. **Endotél sejtekre gyakorolt hatás:** GLP-1 és analógjai a kardiovaszkuláris rendszerben előnyösen hozzájárulhatnak a mikrovaszkuláris endotéliumok oxidatív stressz okozta károsodása elleni védelemben. A hiperglikémia által indukált apoptotikus folyamatokat (mint pl.: a mitokondriális fragmentációt [58], reaktív oxigén gyökök termelődését [59], endotél sejtek gyulladását [60]) gátolják, míg az endotél NO szintézist serkenthetik [61-62]. **Központi idegrendszeri hatások:** GLP-1 analógok képesek átjutni a vér-agy gáton perifériás adagolás mellett is [63] és hipotalamusz egyes magjaiban befolyásolják az étvágyat [64]. Elnyomják a magas zsírtartalmú, nagy kalóriájú táplálék iránti sóvárgást [65]. Egyes tanulmányok szerint a GLP-1 akár a neuronok vitalitásában és ezzel a megfelelő kognitív funkciók megtartásában is szerepet játszik [66-68]. **Máj:** Bár a májban GLP-1 receptorokat még nem mutattak ki, de közvetve a GLP-1 a májban nem csak az inzulin érzékeny hepatikus glükóz felvételt indukálja, hanem a májban történő glikoneogenezist, a glikogén szintézist, a glikolízist, [69] valamint gátolja a glükagon indukált glikogenolízist is [70]. Nem alkoholos zsírmáj szindróma, illetve steatohepatitis esetén egyes GLP-1 analógok [71-72] pozitív hatással bírnak indirekt, még nem tisztázott módon, csökkentve a gyulladást [73]. **Csontok:** Preklinikai vizsgálatok azt feltételezik, hogy az inkretin alapú terápiák szerepet játszhatnak a csont szerkezeti átépülésében [74]. GLP-1R gén kiütött egerekben a kortikális csontvastagság és a csontok külső kerülete jelentősen lecsökkent [75]. **Zsírszövetek:** GLP-1R agonisták szignifikánsan csökkentik a zsírszövetek nagyságát, ezzel fogyást eredményezve [76-77]. Azonban még nem teljesen tisztázott, hogy az inkretin mimetikumok közvetlenül a zsírszöveteken fejtik ki a hatást, vagy maga a súlyvesztés csak járulékos hatása a korábban említett étvágyat csökkentő hatásnak. Egér adipocitákban kimutatták, hogy egyes inkretin mimetikumok serkentik az inzulin mediált

glükóz felvételt, úgy, hogy fokozzák a GLUT-4 transzporterek expresszióját, valamint az inzulin receptorok foszforilációját, [78] inzulin-szerű hatással aktiválva számos kinázt (PI3, p44/42 MAPK) stimulálva ezzel a lipogenezist [79].

2.1.4 Inkretin mimetikumok besorolása és terápiás alkalmazásai

Az amerikai és az európai diabetológiai társaságok iránymutatása szerint a GLP-1 analógok önmagukban vagy Metforminnal kombinálva az elsődlegesen választandó lehetőségek 2-es típusú cukorbetegség esetében, ha a $HbA_{1c} > 7,5\%$ [80] (vér glikolizáltsági szintje, amely hosszútávon indikálja az átlagos vércukorszint állapotát). A 2-es típusú cukorbetegség egyik legfőbb oka az elhízás, amely a legtöbb esetben együtt jár további kardiovaszkuláris megbetegedésekkel. Ezért az inkretin mimetikumok hatékony HbA_{1c} csökkentő hatásán túl előnyös a túlsúlyos cukorbetegéken a testtömeg csökkentése is [81] perifériás és centrális oldalról egyaránt [82]. Az inkretin mimetikumok nagy előnye, hogy csak glükóz jelenlétében növelik az inzulin elválasztást, így helytelen vagy rosszul beállított adagolás mellett sem okoznak hipoglikémiát.

A forgalomban lévő inkretin mimetikumokat jellemzően farmakológiai szempontból a hatástartamuk [83] alapján szokták kategóriákba sorolni. Napi szubkután adagolású az Exenatide (2x naponta), Lixisenatide (1x naponta) és a Liraglutide (1x naponta). Hosszú hatástartalmú inkretin mimetikumok az Albiglutide, Dulaglutide, Exenatide QW és a Semaglutide. Ezek heti egyszeri adagolás mellett nagyobb kényelmet biztosítanak a betegeknek, amely növeli az együttműködést és a terápiahűséget is. A két csoportba tartozó gyógyszerek különböző indikációval és eltérő mellékhatásspektrummal rendelkeznek. A rövid hatástartamúak elsődlegesen a gyomorürülést lassítják csökkentve az étkezés utáni glükóz szintet. A hosszan tartó inkretin mimetikumok az éhomi glükóz szintet is csökkentik a glükóz-függő inzulin szekréció növelésével és a glükagon szekréció folyamatos gátlásával. A hosszú hatástartamú készítmények szignifikánsan jobban csökkentik emiatt a HbA_{1c} szintet és a testsúlyt is [84]. A kardiovaszkuláris hatásokat bizonyító kohorsz-vizsgálatok kimenetele nem egyértelmű. Míg a Lixisenatide esetében nem bizonyítottak előnyös kardiovaszkuláris hatást [85], addig a Liraglutide [86] a Semaglutide [87] és az Exenatide [88] esetében szignifikánsan csökkent a nem halálos miokardiális infarktus és a sztrók az előfordulása olyan 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegekben, akiknél a kardiovaszkuláris

rizikó faktor nagy. A fő mellékhatások megjelenése, intenzitása és tolerálhatósága is függ a dózis mellett a hatástartalomtól. A leggyakoribb mellékhatások általában a gasztrointesztinális panaszok, mint a hányás, hasmenés, puffadás, hasi diszkomfort érzet. Vesebetegek és májbetegség esetében, a betegség súlyosságától függően kell megválasztani a beteg számára a megfelelő inkretin mimetikumot.

2.1.5 GLP-1 mimetikumok szerkezete

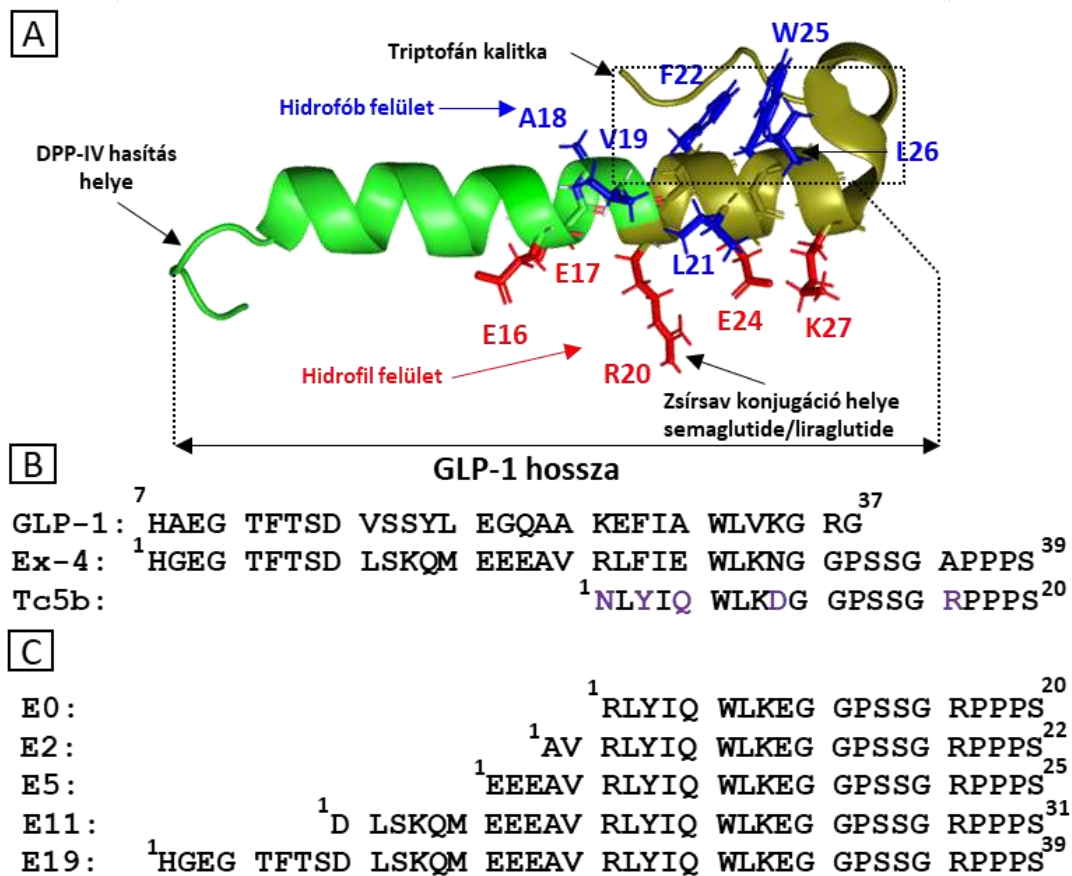
Az endogén GLP-1 31 aminosavból álló peptid, amely - bár rendezetlen - a glukagonhoz hasonló naszcens helikális jelleggel bír vizes oldatban [89], de TFE jelenlétében, illetve a receptorhoz kötött állapotban a szerkezet rendeződik az oldott állapothoz képes. A GLP-1 és analógjai az NTD dokkolás hatására a C-terminálison rendezett α -hélixé rendeződnek, majd ezt követően a centrális kötőzsebbe történő elmozdulás során az oldat fázisban rendezetlen N-terminális is további 1,5-2 helikális kanyarulatot ölt. A gyors endogén hatástalanítás kiküszöbölésére a DPP-IV enzim hasítóhelyén az alanint vagy más aminosavra szubsztituálták, vagy konjugátumokkal árnyékolták, meggátolva így a szinte azonnali inaktiválást a keringésben [83]. GLP-1 szerkezetét alapul véve dolgoztak ki különféle stratégiákat, hogy növeljék a hatóanyagok keringési félélet idejét [90]. **(1. ábra/b)**

Albiglutide esetében tandem módon kapcsoltak kettő DPP-IV rezisztens GLP-1 szekvenciát egymás után, amelyet egy humán albuminhoz fuzionáltak. Az albumin, mint plazmafehérje előnyös választás mivel a keringésben nagy koncentrációban megtalálható (0,6 mM) és néhány hetes a plazma felezési ideje. Az albumin degradációja lassítva van azáltal, hogy az endothélium savas pH-jú endoszómáiban pH-függően kötődik a neonatális FC receptorhoz, emiatt az albumin recirkulálódik a véráramba, ahol semleges pH-n disszociál az FC receptortól. A fuzionált albumin mérete lassítja a vesén történő filtrációt, de egyben akadályozza a vér-agy-gáton történő átjutást csökkentve a centrális inkretin hatásokat is. Dulaglutide esetében a GLP-1-hez 90%-ban homológ szekvenciához egy humán IgG4-FC szegmenst kovalensen konjugáltak egy rövid peptid linkerrel keresztül. Az elért farmakológiai hatás azonos az Albiglutiddal, azonban a plazma felezési ideje 5 napra növekedett. **(1. ábra/b)**

Liraglutide [91] és a Semaglutide [92] hasonló szerkezeti sémát követnek. A peptid lánc Lys26 aminosav oldalláncához egy *spaceren* (távartó szegmens) keresztül

hosszú szénláncú zsírsavat kötöttek. Liraglutide esetében a *spacer* egy L-gamma-glutaminsav, a zsírsav pedig egy C16 hosszúságú zsírlánc, amellyel a féléletidőt kb. 13 órára növelték, elérve így a naponta egyszeri adagolást. A Semaglutide esetében a *spacer* egy bis-aminodietoxiacetil és L-gamma-glutamát, míg a zsírsav egy 18 szénatom hosszúságú dikarbonsav. Ezzel a konjugáció kombinációval a féléletidő 1 hétre hosszabbodott, így a heti egyszeri szubkután adagolás is elegendő. A zsírsavláncnak több funkciója van. Egyrészt a zsírsavláncok oligomerizálódnak [93] ezzel késleltetve a felszívódást a szubkután területekről, másrészt az albuminhoz kötődve lassítják a GLP-1 mimetikum eliminációt [94] és árnyékolják a DPP-IV hasító helyét [95]. **(1. ábra/b)**

Az exendin-4 (Heloderma Suspectum gyík nyálából izolált 39 aminosav hosszúságú peptid) származékok alkotják az inkretin mimetikum másik nagy szerkezeti osztályát. Az Exenatide (szintetikus név) 53% szekvenciális homológiát mutat a GLP-1 peptiddel, azonban hatékonyabban kötődik a receptor extracelluláris doménjéhez [96]. Térszerkezete abban különbözik a GLP-1-től, hogy a C-terminálisán egy 3_{10} -hélix, illetve egy ezt követő poliprolin-hélix szegmens található, amely hajtú-szerű elrendeződésben egy hidrofób magot képez az α -hélix hidrofób felszínével (lásd részletesen később). A hatékonyabb kötődésnek két oka van. Az egyik az Exenatide központi α hélix szakaszán a hidrofil és hidrofób aminosavak elrendeződése a hélix átellenes felszínén optimálisabb a kötődés szempontjából. **(3. ábra)** A másik, hogy a hajtúszerű térszerkezetben a C-terminális – amelynek közvetlenül nincs szerepe a kötődésben – stabilizálja a szemközti α -hélixet. A koncepció az, hogyha a kötődésért felelős α -hélix már oldatban is nagyobb helicitással rendelkezik, akkor a kötődés termodinamikai szempontból is kedvezőbb [97]. Az Exenatide kétfajta formulálási technológiával hozzáférhető a piacon. Az originális rövid-hatású készítmény mellett egy mikroszférába ágyazott készítmény (Exenatide QW) is jelen van, amely elnyújtott hatóanyag felszabadulást tesz lehetővé. A Lixisenatide [98] szekvenciája megegyezik az Exenatidével, azonban a C-terminálisra egy polilizin farok ún. „structure-inducing probe” (SIP) [99] lett fuzionálva, amely hidrogénhidakon keresztül stabilizálja a szerkezetet, növeli az oldhatóságot, gátolja a proteolitikus degradációt. A GLP-1 szekvenciájával nagyobb homológiát mutató származékoknak kisebb az immunogenitása, mint az Exenatide szerkezetű származékoknak, ugyanis az utóbbi esetben a szerkezet az „idegen” szekvencia ellen antitest képzéssel védekezik.



3. ábra. A) Az exendin-4 térszerkezete 30%-os TFE vizes oldatában (PDB ID: 1JRJ) Az ábrán az ECD kötődés során szerepet játszó hélix régió hidrofíli aminosav oldalláncai pirossal, a hidrofókok kékkel vannak jelölve. A Tc5b-vel azonos szerkezeti szegmens olívaöld színnel jelölt. B) GLP-1, exendin-4 és a Tc5b szekvenciája a homológ szakaszok egymásra illesztésével. Lilával a Tc5b-n elvégzett rendezettséget növelő szekvenciális változtatások vannak feltüntetve. C) Az E0-E19 hosszabbított fehérjecsald legfőbb képviselői.

Azonban ez nem befolyásolja jelentősen a hatékonyságot és a biztonságot, de bőrpírt, fokozott allergiás reakciót okozhat a beadás helyén [100].

2019 szeptemberében az FDA engedélyezte a 2-es típusú diabétesz kezelésére [101] az első orális GLP-1 mimetikumot Rybelsus® [102] néven. Hatóanyaga a Semaglutide és a formulálás során nátrium N-(8-[2-hydroxylbenzoyl]-amino) kaprilátot (SNAC) [103-104] adnak hozzá, amely serkenti a gyomorból való transzcelluláris felszívódást, a lokális pH növelésével pedig gátolja a hatóanyag proteolitikus degradációját a pepszin inaktiválásával [105]. Mivel a tablettának a gyomor falon kell diszpergálnia kis kiterjedésben, ezért éhgyomorral, csak minimális folyadék mennyiséggel szabad bevenni és utána 30 percig tilos táplálkozni. A GLP-1 analógok

orális alkalmazása, az eddigi szubkután adagolás helyett, nagymértékben növeli a betegek kényelmét és együttműködését. A gyomorból felszívódó hatóanyag végső soron a portális keringésbe kerül és a májban *first pass* metabolizálódik. Ez magyarázatot ad arra, hogy orális adagolásnál a napi egyszeri dózis hatóanyagtartalma jóval nagyobb, mint más. napi szubkután adagolású analógnál.

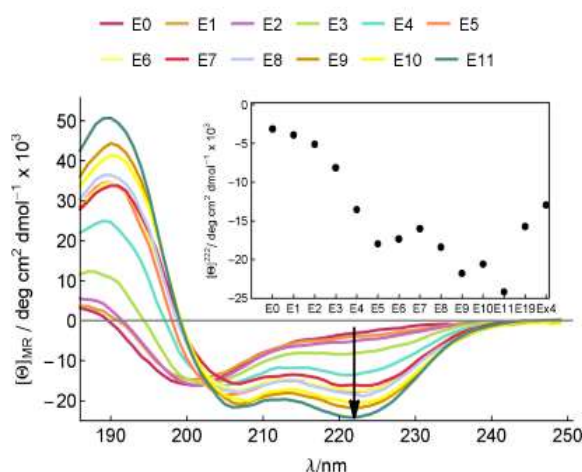
2.1.6 A triptofán-kalitka modell-rendszer és az abból származtatott variánsok

Az Exenatide fehérjének a gyógyászati szempontokon túlmenően kiemelkedő szerepe van az alapvető fehérje fel/leterkedést [106-107] befolyásoló, illetve szerkezet-stabilizáló kölcsönhatások vizsgálatában is. Az Exenatide szekvenciát alapul véve az egyik első racionálisan tervezett modell-fehérje az ún. Tc5b (NLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS) polipeptid [108-109] volt. **(3. ábra)** A mindössze 20 aminosavas szekvencia hossza ellenére a globuláris fehérjékre jellemző fizika-kémiai és harmadlagos szerkezeti tulajdonságokkal rendelkezik ezért minifehérjéknek is nevezhetjük. A jellegzetes triptofán-kalitka (Tc) motívumban a központi triptofán köré szerveződő másodlagos szerkezeti elemek: a) α -hélikális szegmens (Leu2-Asp9), b) 3_{10} -hélix (Gly10-Gly15), c) és a C-terminális poliprolin II szegmens (Arg16-Ser20) rendeződését hidrofób kölcsönhatások (Y3, L7, P12, P18) illetve H-hidak (W6-NE1 \rightarrow R16-CO, G11-NH \rightarrow W6-CO and S14-OH \rightarrow D9-CO) irányítják. Az Exenatide szekvenciájához képest egy további sóhidat is építettek a szekvenciába egy N9D és egy A16R szubsztitúcióval. D9-R16 oldalláncok között így kialakított anion (aszpartát karboxil csoport) - kation (arginin guanidino csoport) - kölcsönhatás stabilizálja a szerkezetet. A kölcsönhatás létrejötte függ a karboxil oldallánc protonáltságától vagyis a közeg pH-jától is. Más lehetséges sóhíd párok és ezek pH függését is vizsgálták már, hogy megállapítsák melyik az az optimális oldallánc hossz (aszparagin vagy glutamát, lizin, ornitin, arginin vagy homoarginin) illetve szekvencián belüli lokalizáció [110-111], amely a legnagyobb mértékben stabilizálja a Trp-kalitka motívumot. Megállapították, hogy 16-os pozícióban az arginin oldallánca és a központi triptofán indol gyűrűje közötti H-híd kölcsönhatás meglete jelnetősebben hozzájárul a stabilizáláshoz, mint az, hogy a kilences pozícióban sóhíd kialakítására alkalmas Glu/Asp vagy alkalmatlan Gln/Asn aminosav van. Kis mérete és globuláris tulajdonságai alapján egy szinte egyedülálló rendszert szolgáltat a fehérjeszerkezet alapkérdéseinek tanulmányozásához. Emiatt az elméleti módszerek

mellett a Tc minifehérjék szerkezete és a feltekeredése oldat fázisú NMR-spektroszkópiával nem izotópjelölt minták esetében is vizsgálható.

2.1.7 A Tc5b-ből származtatott Elongated/Hosszabított peptidcsalád

Doktori munkámban vizsgált 25 aminosavas E5 minifehérje rendszer tervezése és tanulmányozása során a csoportunk korábbi eredményeit vettem alapul [112]. A kutatás célja az volt, hogy a 20 aminosav hosszúságú Tc5b modell-peptidben található triptofánkalitka kompaktságát növelő változtatások megtartása mellett, az N-terminálison aminosavról-aminosavra visszaillesszék a receptor aktiválásában részt vevő aminosavakat az Exenatide szekvenciájának megfelelő 39 aminosavas teljes-agonista szerkezetiig, hogy ezek jelentőségét a szerkezet fenntartásában és a kötődés hatékonyságában tisztázzák. **(3. ábra/c)** Az egyes változtatások a Tc-motívumon a minifehérjék oldhatóság növelését és a szerkezet stabilizálását szolgálták. Tc5b analógiájára – már az Exenatide számozását használva – egy szerkezet stabilizáló sóhíd került kiépítésre az N28E és A35R aminosavak szubsztitúciójával. A poláros oldalláncok egyrészt növelték a fehérje egyébként gyenge oldhatóságot, másrésztől körülölelve a központi triptofánt csökkentik a hidrofób mag oldószernek kitett felületét. A hosszabbított peptid család (E0-E19) összes tagjában a 28-as pozícióban glutamát található egy korábbi közlemény [113] téves konklúzióját alapul véve. E szerint a 28-as pozícióban az arginin partnereként a glutaminsav előnyösebb a sóhíd szempontjából, mint az ugyanolyan kémiai karakterű, de rövidebb oldalláncú aszparaginsav. (Tc5b minifehérjében arginin-aszpartát sóhíd található.) Ezt az állítást később cáfolták, de pontos atomi szintű magyarázattal nem tudtak szolgálni [111]. **(3. ábra/b-c)** Az F22Y változtatás előnyösebb π - π kölcsönhatást eredményez a térszomszédban levő triptofánnal, illetve a fenolos hidroxicsoprot növeli az oldhatóságot. Ugyan a konzervált F22 a receptorális kötődésben szerepet játszik, azonban az in vitro tesztek alapján tirozinra történő cseréje megengedett és nem befolyásolja a hatékonyságot. Más B osztályú GPCR ligandumok esetében is Tyr található ebben a pozícióban [114]. Az E24Q mutáció elektrosztatikailag előnyösebb az α -hélix oldallánc töltéseloszlás mintázata miatt. Végül



4. ábra. A hosszabbított Exenatide/Tc5b származékok (E0-E11) közeli ECD-spektruma (E0-E11), illetve a 222 nm-en mért moláris ellipticitás értékei. (E0-E19, Ex4) Az ábrát Rovó Petra cikkéből kölcsönöztem.[112]

az N-terminális régióban a Tc5b-szekvenciának megfelelő N16R szubsztitúcióval alakították ki a 20 aminosavas E0 RLYIQWLKEG-GPSSGRPPPS szekvenciát. Az E0 peptid N-terminális vége szolgált kiindulási templátként a további hosszabbításoknál. Ezután egyesével az Exenatide szekvenciájának megfelelő aminosavakkal (E0→E1→E2→stb.) növelve az E0 templátot érhető el a 39 aminosavas E19 minifehérje, amely az Exenatide hosszával már azonos. A

különböző N-terminálison hosszabbított minifehérjék helicitását fiziológiás pH-n, 5°C-on hasonlították össze távoli-UV tartományban felvett ECD-spektrumok alapján. **(4. ábra)** Az egyre hosszabb származékok rendezettsége/helicitása növekedett, azonban nem monoton módon. Míg az E0-ra rendezetlen spektrum volt a jellemző, addig az E11 mutatta a leghelikálisabb tulajdonságokat. A 222 nm-en felvett moláris ellipticitás adatok alapján (minél negatívabb ez az érték annál nagyobb a helicitása a Tc5b variánsnak) az E5 és E9-es peptid ezen értékei lokális minimumot adnak. ($[\theta]_{E5}^{222nm} < [\theta]_{E4}^{222nm} \approx [\theta]_{E6}^{222nm}$; $[\theta]_{E9}^{222nm} < [\theta]_{E8}^{222nm} \approx [\theta]_{E10}^{222nm}$; de $[\theta]_{E9}^{222nm} < [\theta]_{E5}^{222nm}$). Az E19 arányaiban kevésbé helikális mint az E11, ugyanis az első 8 aminosav hosszúságú szekvencia az N-terminálison rendezetlen. Ezen 8 aminosav szerkezeti propenzitása a GLP-1R cryo-EM szerkezet megjelenésig vita tárgyát képezte. Szekvenciálisan homológ B osztályú GPCR ligandum, glükagon esetében a receptorhoz kötött formában az N-terminális szekvencia rendezetlen [115] vagy β -kanyar szerkezetet [116] ölt. 2018-as cryo-EM térszerkezet alapján ma már tudjuk, hogy a GLP-1 mimetikumok esetében a helikális propenzitás a kedvezményezett a receptor aktiválás szempontjából. Az E19 mind vízben, mind 30% TFE – víz elegyben nagyobb mértékű helicitást mutatott az ECD-spektrumok alapján mint az Exenatide. Az E19 inzulin elválasztást stimuláló hatását *in vitro* INS-1 sejteken végzett kísérletekkel igazolták.

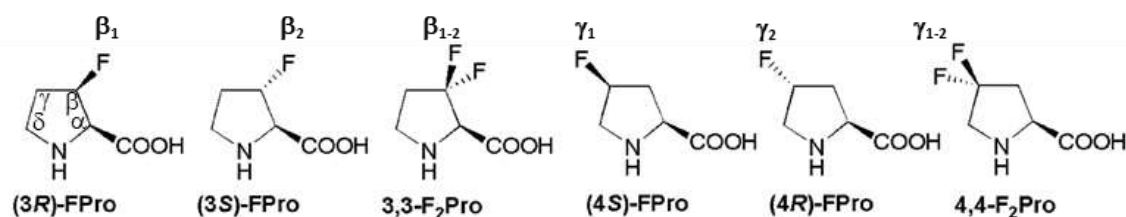
Ezalapján a szekvenciális változtatások ellenére az E19 hasonló hatékonyságúnak bizonyult, mint az Exenatide [112].

2.2 Fluoroprolinok

Munkám során fluor-szubsztituált Pro aminosavakat tartalmazó variánoskat is alkalmaztam ezért a következő fejezetben ezeket a rendszereket mutatom be röviden.

2.2.1 Fluoroprolinok sztereokémiája

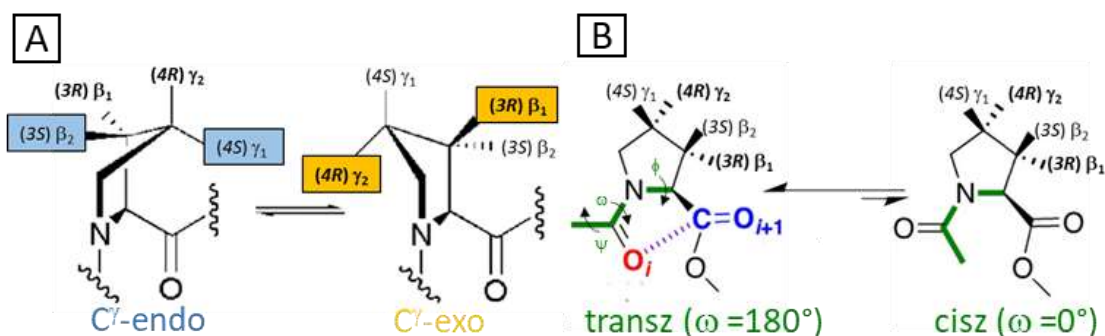
Kis molekulás vegyületek esetében a fluor szubsztitúció már évtizedek óta bevált, általános stratégia az egyes vegyületek kémiai tulajdonságainak (hidrofobicitás, bázicitás, reaktivitás, konformáció) finomhangolására, megváltoztatva a hatóanyag farmakokinetikai és farmakodinámiai profilját. Ezt jól bizonyítja, hogy a terápiás készítmények több mint 20%-a tartalmaz legalább egy fluor atomot [117]. A fluor atomok különlegessége egyedi elektronszerkezetükben rejlik. Kis atomsugaruk, alacsony polarizálhatóságuk, maximális elektronegativitásuk és nem-kötő elektronpárjaikból adódó erős induktív effektusuk révén hidrogén atomok fluor szubsztitúciója esetében jelentősen megváltoztathatóak a lokális funkciós csoportok, vagy akár a teljes molekula elektroneloszlása is. A kis molekulák analógiáját alapul véve peptidek és fehérjék esetében is egyre több információra teszünk szert a fluor-szubsztituált aminosavak a fehérjék térszerkezetét, feltekeredését és receptorhoz való kötődését befolyásoló hatásáról [118]. A fluoroprolin származékok [(3*R*)-FPro, (3*S*)-FPro, 3,3-F₂Pro, (4*R*)-



5. ábra. Különböző fluoroprolin származékok. A görög betűk a szerkezet felett jelzik, hogy melyik protonok lettek fluorra szubsztituálva.

FPro, (4*S*)-FPro, 4,4-F₂Pro] (5. ábra) sztereokémiai szempontból kitüntetett szerepet játszanak, amelynek a szelektív fluor szubsztitúción felül a természetes prolin gyűrűbe zárt oldallánc az alapja. A prolin ciklikus oldallánca korlátozza a peptidgerinc szabad rotációját. Emiatt a sajátos szterikus gátlás miatt a prolinok ritkábban figyelhetőek meg a másodlagos szerkezeti jellegzetességeket hordozó szekvenciákban [119], azonban

nagyobb az előfordulásuk hurok/kanyar régiókban, illetve képesek speciális helikális motívumokat, ún. poliprolin-héliceket alkotni (PPI, PPII). A prolin pirrolidin gyűrűjének két kitüntetett konformációja van: C^γ -*exo*, C^γ -*endo*, amelyek konformációs egyensúlyát a fluor szubsztituensek a sztereokémiájától függően (R/S) az egyik vagy másik irányba eltolhatják így befolyásolva a térszerkezetet. (6. ábra/a) A preferencia alapját a gauche



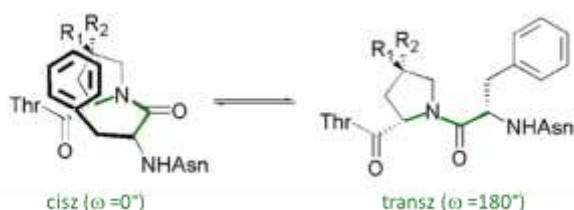
6. ábra. A) A prolin C^γ -*endo* és C^γ -*exo* konformációja közötti egyensúly. A nomenklatura abból ered, hogy a C^γ a prolin karbonilja felé vagy attól elfelé hajlik. C3-C4 (R) fluor szubsztitúció esetében az *exo* forma, míg (S) fluor szubsztitúció esetén az *endo* konformáció a kedvezményezett. B) Prolinok *cisz/transz* amid konformációja peptidkötésben. A *cisz/transz* izomerizáció aktiválási energiája szobahőmérsékleten ≈ 20 kcal mol⁻¹ míg az *exo/endo* átalakulásé ≈ 2 -5 kcal mol⁻¹.

effektussal lehet magyarázni. Az Ac-(4S)-FPro-OMe példájában a C4-C5 kötés mentén mind a C4-hez kapcsolt fluor és a C5-höz kapcsolt amid kötés jelentősen elektronnegatív. Sztérikus okokból a gauche elrendeződés a preferált, így C^γ -*endo* elrendeződés valósul meg ebben a konkrét esetben. Prolin C3, C4 fluor szubsztitúciója esetében R-kiralitásnál C^γ -*exo*, S-kiralitásnál C^γ -*endo* konformáció a kedvezményezett. A prolinok gyűrűs szerkezete befolyásolja a peptidgerinc torziós szögeit (ϕ , ψ , ω), így a Xaa-Pro peptidkötés *cisz/transz* konfigurációja függ az *exo/endo* konfigurációtól. Peptidkötésekre általánosságban, az eddig meghatározott fehérje szerkezetek alapján a *transz* térállás jellemző sztérikus okokból (99,97%). Xaa-Pro peptidkötés esetében azonban ez az érték 94,8%-ra csökken [120]. Molekuladinamikai számítások és NMR kísérletek alapján az *exo* konformáció az előnyös ugyanis az amid oxigén és a prolin karboxil csoport $O_i \rightarrow C=O_{i+1}$ között kialakuló $n \rightarrow \pi^*$ interakció tovább stabilizálja az egyébként is sztérikusan előnyösebb *transz* állású peptidkötést [121]. A C^γ -*endo* konformáció esetében a *cisz-transz* izomerizációs energiagát csökken [122], így a *cisz*-térállás nagyobb valószínűséggel alakulhat ki. (6. ábra/b)

2.2.2 Fluoroprolin szubsztitúciók térszerkezeti hatásai fehérjék esetében

Fehérjék/peptidek esetében számos esetben vizsgálták már prolin fluoroprolinra való cseréjét, amely nemcsak a fehérje feltekeredését és stabilitását befolyásolta, hanem az enzimátikus működést is. Meg lehet különböztetni egyszeri, specifikus és globális, az összes prolint érintő, szubsztitúciós változtatásokat. Fluor szubsztituált prolinok szubsztrátként történő alkalmazása befolyásolhatja a prolil-4-hidroxiláz (P4H) enzim működését, amely a prolinok C4 pozíciójában poszttranszlációs módosításként hidroxilál, katalizálva a kollagén egyik építőelemének, a 4-hidroxi-prolinnak a képződését [123-124]. Fluor szubsztitúcióval elérhető, hogy a peptidil-prolil *cisz-transz* izomeráz kevésbé hatékonyan katalizálja a *cisz*→*transz* izomerizációt, amely egyébként sebesség meghatározó lépése a fehérje feltekeredésnek [125].

Mivel a prolinok speciális gyűrűs szerkezetük miatt nagyobb eséllyel fordulnak elő a hurok, kanyar régiókban, így a fluoroprolinok alkalmasak arra, hogy ezeknek a régióknak finomhangoljuk az térszerkezetét, stabilizálva vagy destabilizálva ezzel akár a teljes fehérjét. Az egyik lehetséges kémiai magyarázat a fluor szubsztitúció hatására megváltozó $\text{ProCH}^{\gamma}\text{---}\pi$ interakció megváltozása lehet. Thomas és munkatársai [126] egy Asn – Aromás (Phe/Trp) – FPro (4*R*/4*S*) – Thr modell tetrapeptiden vizsgálták a kölcsönhatást és mérték a *cisz/transz* izomerek arányát. A *cisz* konformer kanyar szerű szerkezet, míg a *transz* állás inkább lineáris elrendeződésű. (7. ábra)



7. ábra. Thomas és munkatársai által vizsgált tetrapeptid. (4*S*)-FPro esetében $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{F}$; (4*R*)-FPro esetében $R_1 = \text{F}$, $R_2 = \text{H}$. Az ábra a [126] hivatkozásból lett átszerkeztve.

előnyös $\text{ProCH}^{\gamma}\text{---}\pi$ kölcsönhatás. (4*R*)-FPro szubsztitúciónál triptofán esetében azonban a *transz* állás az előnyösebb. Tirozin esetében pont az előbbi helyzet fordítottja áll fent. (4*R*)-FPro szubsztitúció esetében a *cisz*, míg (4*S*)-FPro esetében a *transz* térállás a kedvezőbb. Nem csak az atom-atom közötti kölcsönhatások, hanem C-F kötés

oldallánc elektronokban gazdag, mint a triptofán esetében, akkor (4*S*)-FPro szubsztitúció esetében a *cisz* térállás a preferált. Ilyenkor a triptofán indol oldalláncának síkjához közelebb az R_1 pozícióban proton található, míg az ugyancsak elektrongazdag fluor távolabb az R_2 pozícióban helyezkedik el, így kialakulhat az

szolvatáltsága is befolyásolhatja a szerkezet stabilitását. Előnyösebb, ha hidrofób C-F kötés eltemetett, hidrofób közegben van, mintha a fehérje felszínén, a víznek kitett környezetben lenne [127].

A Tc5b minifehérje Pro12-es pozíciójában is vizsgálták a fluor szubsztitúció hatását a térszerkezetre [128]. Ez a prolin a triptofán-kalitka motívumban a C és N-terminálist összekötő 3_{10} -hélixben helyezkedik el, és NMR-mérések alapján *C^γ-exo* konformációt vesz fel. CD mérések alapján a 4(R)-FPro szubsztitúció tovább stabilizálja a natív *exo* konformációt, míg a 4(S)-FPro szubsztitúció előnyösebb a kevésbé stabilizáló *C^γ-endo* konformáció számára. Ennek megfelelően a 4*R* fluor szubsztitúció esetében a helicitás növekedését tapasztalták, míg 4*S* szubsztitúciónál kisebb helicitást mértek, mint a natív értékek. Ez azért meglepő, mivel a 3_{10} -hélixben végrehajtott szerkezeti finomhangolás az α -hélixre is kiterjedt a CD spektrumok alapján. NMR-mérések alapján nem találtak a 4*S* konfigurációjú peptidek esetében *cisz-transz* izomériát, valamint a karakterisztikus triptofán-kalitka *fold* sem változott meg jelentősen sem a Pro12 4*R*, sem a 4*S* szubsztituált Tc5b variánsoknál. Azonban a hőmérsékletfüggő CD mérések alapján a térszerkezetiileg hasonló variánsok különböző mértékben denaturálódtak a növekvő hőmérséklettel. 4(R)-FPro variáns szerkezete rezisztensebb volt hődenaturációval szemben, míg 4(S)-FPro származék gyorsabban elvesztette térszerkezetét, mint a natív Tc5b *fold*. A szerzők pontos szerkezeti magyarázatot nem adtak a megfigyelt jelenségekre, valamint nem vizsgálták a poliprolin-hélix részben található másik három prolin fluor szubsztitúcióját sem.

2.3 Diszulfidhidas peptidek

A fluoro-prolinok alkalmazása mellett vizsgáltam diszulfidhiddal ciklizált Trp-kalitka származékokat és azok redukcióját is, emiatt röviden értekezem ebben a témában is.

2.3.1 A diszulfidhidas keresztkötések alapkonceptiója

Peptidek, fehérjék térszerkezetének stabilizálására bevett technika egy bizonyos szekvencia részlet, pl.: α -hélix, vagy egy β -kanyar ciklusba zárása valamilyen kémiai addukttal, amely két ponton rögzül a natív szekvenciához [129-131]. A ciklusba zárás megtörténhet két megfelelő közelségben lévő cisztein tiolcsoport oxidációjának eredményeként diszulfidhíd képzéssel is. Az alkalmazott keresztkötések a rendezetlen,

flexibilis alegységek konformációs entrópiáját csökkentik, ezzel egyben a rendezett-rendezetlen térszerkezetű populációk közötti konformációs egyensúlyt a rendezett irányba tolják el. A *chain-entropy* [132-133] modell mellett, figyelembe kell venni a *solvent-enthalpy* [134] modellt is. Ugyanis a rendezetlen fehérje rendeződése jelentősen csökkenti az oldószernek kitett felületet, emiatt hidrofób aminosavak, illetve a hidrogénkötés donorok és akceptorok eltemetetté válnak a szerkezetben, kevesebb fehérje-oldószer kölcsönhatást eredményezve. Ha a keresztkötés a rendezett állapotban rögzíti a térszerkezetet, akkor az az entalpia szempontjából jóval kedvezőbb. A térszerkezetet azonban csak jól megválasztott lokalizációjú keresztkötésekkel érdemes rögzíteni, amely a natív, rendezett térszerkezetnek megfelelően stabilizál, és nem eredményez térszerkezet változást vagy torzulást/feszülést a peptidgerincben. A megfelelő térállásban – pl: a receptorhoz kötődő konformáció – rögzített szerkezet több szempontból előnyös. Egyrészt szinte a teljes peptid/fehérje populáció az aktív, hatékony konformációban van, így farmakológiai felhasználás szempontjából hatékonyabb már kisebb koncentrációban is. A rögzített térszerkezet ellenállóbb a különböző extrémebb, denaturáló hatásokkal szemben, így például egy peptid alapú gyógyszer esetében az felhasználhatóság időtartama is hosszabb lehet. Ehhez szorosan kapcsolódik, hogy a stabilizált térszerkezet esetében kisebb eséllyel következik be irreverzibilis aggregáció, amely komplikálja mind az előállítását, mind a felhasználást [135].

2.3.2 Diszulfidhidak szerkezeti biológiája

A diszulfidhidak a természet leghatékonyabb eszközei a fehérjék natív térszerkezetének fenntartásában az erősen oxidatív extracelluláris környezetben. A megfelelő poszttranszlációs mechanizmus nélkül – amelyet eukariótákban legfőbbképpen az endoplazmatikus retikulum PDI, ERO1 és ERV2 enzim családjai katalizálnak [136] – a diszulfidhidak hibás kialakulása miatt a globuláris fehérjék esetleg nem a megfelelő térszerkezetet veszik fel, ami akár különféle betegségek, mint a diabétesz [137], rákos megbetegedések [138], kardiovaszkuláris [139] és neurodegeneratív [140] kórképek kialakulásához vezethet. A ciszteinek körülbelül 50%-a található diszulfidkötésben [141]. Megfigyelhető, hogy evolúciósan minél fejlettebb egy szervezet, annál nagyobb a diszulfidhidak előfordulása az adott élőlény proteomjában [142]. Annak ellenére, hogy a fehérjék evolúciója során a ciszteinek viszonylag későn alakultak ki, mégis a

diszulfidhidak evolúciós előnye miatt, a ciszteinek a fehérje szekvenciákon belül a legkonzerváltabb lokalizációjúak a többi aminosavhoz képest [143]. A diszulfidhidat alkotó ciszteinek 49%-a az elsődleges szekvenciában 25 aminosavnál távolabban helyezkedik el egymástól. Képződésüket és stabilitásukat meghatározza a redox potenciáljuk, amely függ az oxidálódó tiolok pKa értékétől (általában a pKa = 8,5, de a kémiai környezettől függően igen széles tartományban, 3,5 és 12,8 között változhat.) [144], a kialakult diszulfidhíd torziós szögeitől, az összekapcsolt domének dinamikájától és a diszulfidhíd kialakulásának entropikus hozzájárulásától [145-146]. A diszulfidhíd kialakulása termodinamikai szempontból akkor a legkedvezőbb, ha az oxidálódó ciszteinek a feltekeredő fehérjében eleve egymáshoz térközben vannak [147], – ehhez szükséges a megfelelő chaperonok közreműködése [148] – ennek hiányában a fehérje hibásan tekeredik fel. A rekombinánsan előállított peptidek/fehérjék korszakában létfontosságú ismerni a diszulfidkötések kémiai természetét és viselkedését, ugyanis számos gyógyászati polipeptid (inzulin, vazopresszin, oxytocin, monoklonális antitestek stb...)[149] alapvető gyógyszerbiztonsági feltétele a megfelelő natív diszulfidmintázat megléte. Emellett számos biológiai kísérlet esetében – például *refoldálás* során – is meg kell bizonyosodni arról, hogy egy redukciós/oxidációs folyamat milyen mértékben ment végbe.

Mára már több mint 160 000 fehérje térszerkezet található a fehérje adatbankban. (rcsb.org) Megfigyelhető, hogy ezekben a szerkezetekben a strukturális diszulfidhidak nagy hányadban eltemetetten hidrofób és aromás aminosavak körül helyezkedve el, hatékonyan hozzájárulva a globuláris fehérjét összetartó hidrofób kölcsönhatás hálózatot [150] kialakításához. A térközben csoportosuló aromás aminosavak és diszulfidhidak klasztereket alkotva egymással kölcsönhatnak, és számos esetben *vica-versa* árnyékolják egymást a környezeti tényezőktől [151-152]. Például az ribonukleáz A-ban a Tyr92 effektíven árnyékolja a fehérje felszín közelében a Cys40–Cys95 alkotta diszulfidhidat az esetleges redukciótól, fenntartva így a natív térszerkezetet. Emiatt van számos laboratóriumi redukciós protokollban első lépésként a fehérje térszerkezetének megbontása (denaturálószer, magas hőmérséklet, stb...) előírva. Enélkül a lépés nélkül a redukálószer nem tud a térszerkezetben eltemetett diszulfid közelébe jutni. Ezeknek a szerkezeti szempontból előnyös aromás-diszulfidhíd klasztereknek monitorozására a

dolgozat későbbi részében ismertetett közeli UV-tartományú ECD-spektroszkópia alkalmas lehet.

2.3.3 Diszulfidhíd stabilizált GLP-1 mimetikumok

A GLP-1 mimetikumok esetében is történtek kísérletek különböző keresztükötesi stratégiákkal, de máig klinikai fázisba ezek közül egy sem került. Korábban már említettem, hogy az eddig meghatározott térszerkezetekben a receptorhoz kötött GLP-1 teljesen helikális, így a helikális jelleg erősítése még szabad formában valóban növelheti a receptorhoz való kötődés gyakoriságát az entrópikus tag csökkenése által. A kísérletek így arra irányulnak, hogy keresztükötésekkel stabilizálják a GLP-1/Exenatide térszerkezetét. Exenatide esetében a hélix centrális részére konjugált különböző lipofilitású linkerek nemcsak a helikális jellegét erősítették, de növelték a proteázokkal szembeni ellenállást, valamint a biohasznosíthatóságot a vegyület szubkután adagolás mellett [153]. Másik esetben a GLP-1 N-terminális, receptor aktiválásért felelős szekvenciáját – illetve annak különböző karakterű aromás oldalláncokkal szubsztituált variánsait – keresztükötötték diszulfidhíddal, vagy laktám gyűrűvel [154]. A különböző szerkezeti változtatások célja az volt, hogy a keresztükötésekkel stabilizált szerkezetű, megnövelt lipofilitású csonkított peptid orális adagolás mellett is felszívódjon. Azonban az *in vitro* tesztelés során a keresztükötéses peptidek hatékonysága az EC_{50} értékek alapján messze elmaradt a keresztükötéseket nem tartalmazó peptideké mellett, annak ellenére, hogy ECD és NMR-adatok alapján a peptidek térszerkezete valóban rendezettebbé vált. A kutatóknak a publikálásakor nem volt még információjuk a GLP-1 N-terminálisának és a GLP-1R transzmembrán kötő zsebének kölcsönhatásairól, emiatt nem tudhatták, hogy bár a megnövelt N-terminális helicitás előnyös, de a beépített linker megléte szférikusán gátolja a fő peptidgerincet a receptor transzmembrán régiójának centrális kavításba való illeszkedésében. Más kutatócsoportok is diszulfidhíd beépítésével próbálták növelni a GLP-1 és az Exenatide stabilitását [155]. Ebben az esetben a stratégia az volt, hogy a peptidektermészetes szekvenciát a C-terminálison további 8-16 glicinnel meghosszabbítják, majd az N-terminálison és a glicinekkal meghosszabbított C-terminálison 1-1 aminosavat – amelyek a hajtúszerű szerkezetben térben közel vannak egymáshoz – ciszteinekre cserélnek. A két cisztein spontán oxidációjával kialakul a diszulfidhíd. Ezzel a stratégiával különböző tagszámú makrociklusokat hoztak létre. *In*

vitro és *in vivo* degradációs tesztekkel bizonyították, hogy a diszulfidhidas peptidek rezisztensebbek a különböző proteázokkal szemben, ami egyben a félélet idejük meghosszabbodásával is járt. Vizsgálták a biológiai aktivitást is. Érdekes módon a diszulfidhidas GLP-1 analógok hatékonysága hasonló nagyságrendű a természetes GLP-1 értékeivel, azonban a diszulfidhidas Exenatide mutánsok nem mutattak biológiai aktivitást. Ezen farmakológiai megfigyelésekre, azonban nem adtak pontos atomi szintű magyarázatot, szerintük az Exenatide származékok inaktivitásának konformáció változás az oka.

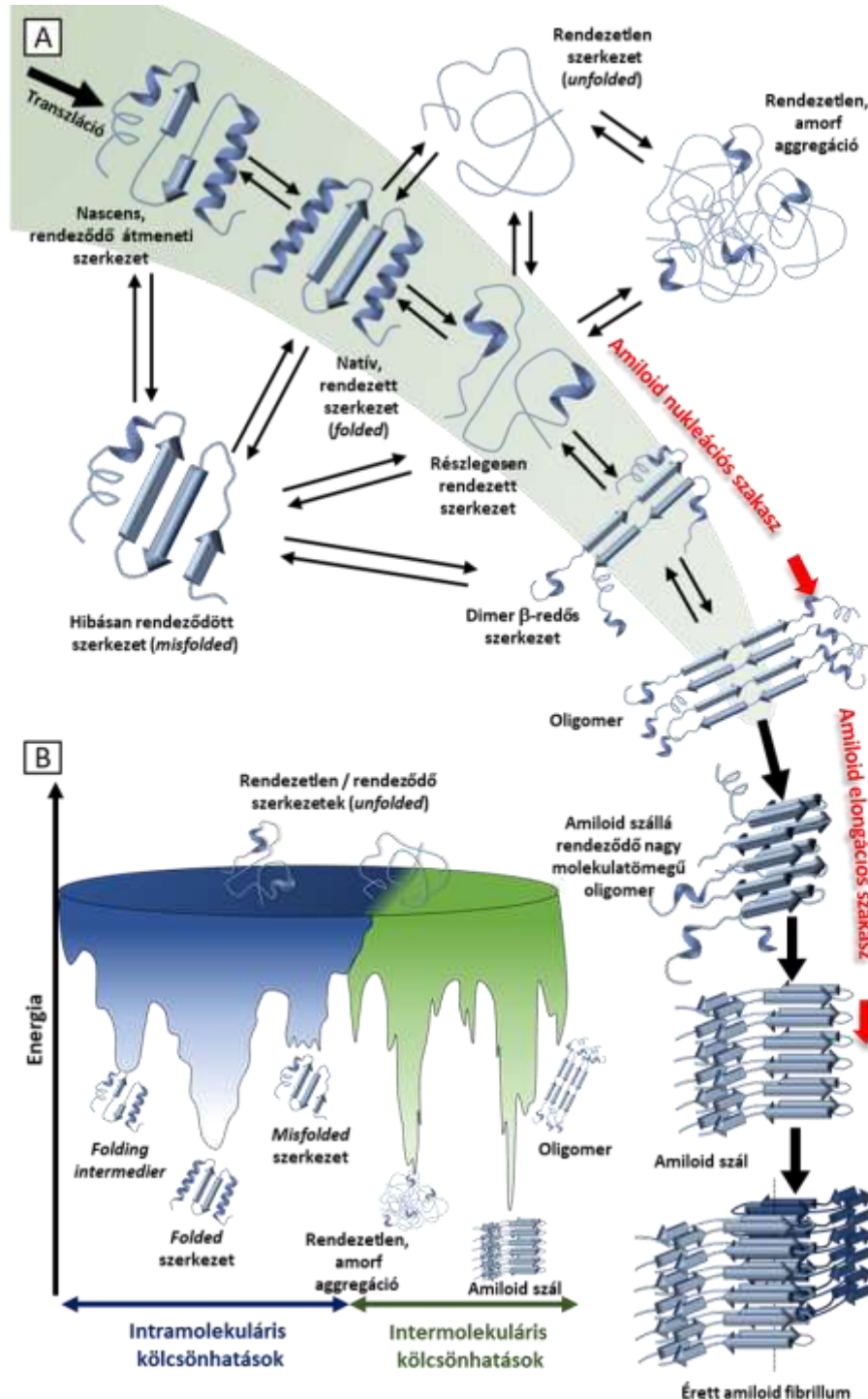
2.4 Fehérjék aggregációja és amiloid szerkezete

2.4.1 Fehérje aggregációs folyamatok

Fehérjék/peptidek kontrollálatlan aggregációja komoly problémát jelent a gyógyszerfejlesztésben [156-157]. Az aggregáció lehetősége a gyártástól a felhasználásig bármelyik fázisban megjelenhet ezért a peptidek, fehérjék expresszióját [158], tisztítását [159], liofilizását [160], formulációját [161], tárolását [162] a legnagyobb körültekintéssel kell megtervezni és ellenőrizni, hogy biztosítani lehessen azok minőségét, biztonságát és hatékonyságát. Azonban az aggregáció – ha kontrollált és reprodukálható – akár gyógyszer technológiai előnyökkel is bírhat. [163-164] Természetesen technológiai szempontból a reverzibilis és szabályozott aggregáció az előnyös. Az irreverzibilis aggregátumok a monomer forma hiányában elvesztik biológiai aktivitásukat és növelik az immunogenitás kockázatát az adagolás során [165].

Magát az aggregációt a globuláris fehérjék esetében a natív térszerkezet elvesztése váltja ki valamilyen környezeti hatás megváltozása miatt. Ilyen hatások pl.: a hőmérséklet, az oldat pH-ja, az oldat ionerőssége, kaotróp anyag jelenléte, vagy akár magának a peptidnek nagy koncentrációjú oldata. **(8. ábra/a)** Az aggregáció egymást párhuzamosan követő események sorozata, amely során a perturbált térszerkezetű fehérje monomer rendezett vagy rendezetlen módon, különböző fizikai és kémiai törvények szerint kovalens kötések kialakítása nélkül (ciszteinek szabad reaktív tiolesoportjai esetében kovalensen is) polimerizálódik/oligomerizálódik. A (részlegesen) denaturált fehérjék térszerkezeti fluktuációjából adódóan az ún. aggregáció-hajlamos szekvenciák / aggregációs promóter szekvenciák / aggregációs „hot spotok” – amelyek a feltekeredett

fehérjében harmadlagos szerkezet által eltemetettek voltak – a felszínre kerülhetnek és kölcsönhatnak egymással dimereket, oligomereket képezve. Ezt a kiindulási aggregációs lépést a(z) (aggregációs) mag-képzésnek, vagy nukleációnak nevezzük. (8.



8. ábra. A) Fehérjék térszerkezeti átalakulásai és rendezetlen-amorf, illetve rendezett amiloid aggregációja. Az amorf aggregátum és az oligomereknél nagyobb szupramolekuláris egységek oldhatósága a méret növekedésével csökken. B) A különböző konformációk lokalizációja az energiafelszínen.

ábra/a) Végző soron a különböző gyenge másodlagos kölcsönhatások - amelyek lehetnek elektrosztatikus [166], hidrofób [167], van der Waals és hidrogénhid [168] kölcsönhatások – összessége szabja meg az oligomerizáció lehetőségét. A kölcsönhatások összetételének és milyenségének mértéke azonban specifikusan függ a denaturált fehérje és a közeg tulajdonságaitól egyaránt, így nem lehet általános szabályszerűséget felállítani. Az viszont egyértelmű, hogy a nukleáció függ a perturbált fehérje koncentrációjától. Koncentrált oldatban a fehérje-fehérje kölcsönhatások száma megnő a „*crowding*” effektus miatt. Ezáltal már nem csak a távol-ható ionos kölcsönhatások játszhatnak szerepet a nukleációban, hanem a kisebb hatótávú hidrofób kölcsönhatások is [169]. A következő fázis az elongáció, amely során a kialakult aggregációs mag katalizátorként viselkedve további monomerek kapcsolódását segíti elő növelve az aggregátum méretét [170]. Az aggregátum növekedését ugyanazon faktorok befolyásolják, mint a nukleációt, így a fehérje szerkezeti és kolloidikai stabilitása kiemelt szerepet játszik [171-172]. Az elongáció során a növekvő molekulaméret miatt az aggregátumok oldhatósága lecsökken és párhuzamosan az oldatban lévő részecskék méret diszperzitása és opaleszcenciája is nő, amely nagyban megnehezíti a kialakuló kolloid rendszer analitikáját.

2.4.2 Az aggregációt befolyásoló tényezők

Az aggregációt befolyásoló tényezőket három nagy csoportra lehet osztani:

1) A fehérje természetéből fakadó szekvenciális és térszerkezeti faktorok: az amfipatikus szerkezeti elemek, a hidrofób és poláros aminosavak szekvenciális mintázata, a savas/bázikus oldalláncok protonáltsági állapota, a másodlagos szerkezeti elemek propenzitása, az egyes hidrofób szegmensek árnyékoltsága stb.... mind hatással vannak az aggregációra.

2) A fehérje környezetére jellemző paraméterek: A hőmérséklet egyrészt befolyásolja a fehérje oldaláról annak konformációs stabilitását, valamint a kémiai degradációját. Másrészt hatással van a közeg és a fehérje között fentálló kölcsönhatásokra, mint a fehérje-diffúzió, oldhatóság, közeg viszkozitás. A magasabb hőmérséklet eltolhatja a rendezett \leftrightarrow rendezetlen konformerek populációinak egyensúlyát a rendezetlen irányba, növelve a nukleáció lehetőségét. Azonban számos esetben bizonyították, hogy a hideg denaturáció is előidézhetheti az aggregációt [173-174]. A pH változtatása egyes aminosavak oldalláncainak (E,D,K,R,H,W,Y) és terminálisainak

protonálása/deprotonálása révén befolyásolja a töltések elrendeződését a szekvencia mentén, amely így hatással van az oldhatóságra és a fehérje által kialakított intra- és intermolekuláris kölcsönhatásokra is [175-176]. Az oldat pH-jával szorosan összefügg az oldat ionerőssége is [177]. Az egyes ionok jelenléte és természete nagyban befolyásolja az ionos kölcsönhatások erősségét, így a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is [178].

3) Technológiai eljárások, amelyeket alkalmaznak a fehérje rendszeren: Számos esetben fehérjék fagyasztásánál [179], a hideg denaturáció [180] vagy a jég indukálta denaturáció [181] miatt is történhet aggregáció. A fagyasztás és az olvasztás sebessége meghatározó szerepet játszik, amelyet a formuláció során vizsgálni kell [182]. Fehérjék kevertetése, ráztatása, vortexelése is előidézhet aggregációt [183]. Az aggregáció kiváltó oka lehet a megnövekedett levegő/oldószer érintkezési felület [184], a megnövekedett nyíróerő [185], vagy akár a keverőmágnes őrlő hatása is [186].

2.4.3 Az amiloid aggregáció

Az amiloid aggregáció [187] a különféle oligomerizációs folyamatok speciális esete, ugyanis az aggregációs folyamat rendezett, amelynek irányítója valamilyen fizikai-kémiai irányító elv, mint például dipólusmomentum, amfipatikus szerkezet vagy a szabad β -redős élek megléte a perturbált fehérje szerkezetében. **(8. ábra/a)** Az aggregáció eredményeként az oldhatatlan aggregátum unikális, szerkezeti paraméterek által definiálható uniformizált térszerkezetet ölt, melynek gerincszerkezete független a fehérje szekvenciájától. Az amiloid aggregáció, úgy, mint a *folding* - feltekeredés, *unfolding* - letekeredés, *misfolding* – nem a natív szerkezetnek megfelelő feltekeredés, alapvető része a fehérjék természetének [188]. A kis tagszámú, (<100 aminosav) egy doménes naszcens fehérjék szinte azonnal megtalálják a natív konformációjukhoz tartozó energia minimumukat a feltekeredési tölcsér – „*folding funnel*” - energia felszínén a translációjuk során [189]. **(8. ábra/b)** Ez azt is jelenti, hogy a gyors egy lépcsős konverzió miatt a két állapotuk között nincsenek intermedier állapotok [190], amelyek kiválthatnának aggregációt. Nagyobb, többdoménes fehérjék feltekeredése jóval hosszabb, nagyobb összhangot igénylő feladat, amely során számos lokális energia minimummal rendelkező intermedier is keletkezhet [191]. Ezek az intermedierek aztán a megfelelő módon, „*on-pathway*” [192] tovább rendeződnek a natív szerkezetnek megfelelően, vagy „*off-pathway*” [193] megrekednek az adott *misfolded* állapotban, és

előidézhetik az aggregációt. Az evolúció során, a fehérjék minőségét biztosító sejtszintű rendszerek [194], mint a helyes feltekeredésért elősegítő chaperonok [195], és a *misfoldolt* fehérjék degradációjáért felelős ubikvitinizációs és proteáz rendszerek [196] úgy fejlődtek ki, hogy a lehető leghatékonyabban kiszűrjék ezeket a kóros szerkezeteket. Ezzel párhuzamosan a natív fehérjék szekvenciája és térszerkezete is úgy evolválódott, hogy az adott fehérje fiziológiás környezetében a lehető legjobban eltemesse az aggregációs *hot-spot* szekvenciáját.

2.4.4 Az amilóma

Azoknak a fehérjéknek az összeségét, amelyek bizonyítottan amiloidot képeznek amilómának [197] nevezzük. Az amiloid *terminus technicus* a patofiziológiában olyan patogén sejtek és szövetek *fibrillum* – (amiloid rost) formációjára utal, ahol a keletkezett *fibrillum* kongó vörös festés után kereszt polarizált fényben zöld kettőstörést mutat. Eddig körülbelül ötven fehérjénél írtak le amiloid plakk képződését, amelyek valamilyen humán patológiás kórképpel állnak korrelációban [198]. **(1. táblázat)** Ezek a citotoxikus amiloid kötegek intracelluláris inklúziós testként [199] vagy extracelluláris plakkoként [200]

1 táblázat. Amiloidot képző fehérjék és az azokhoz köthető patológiás kórképek. Az egyes fehérjék aggregációs góc aminosav szekvenciája és mikrokristályának PDB kódja.

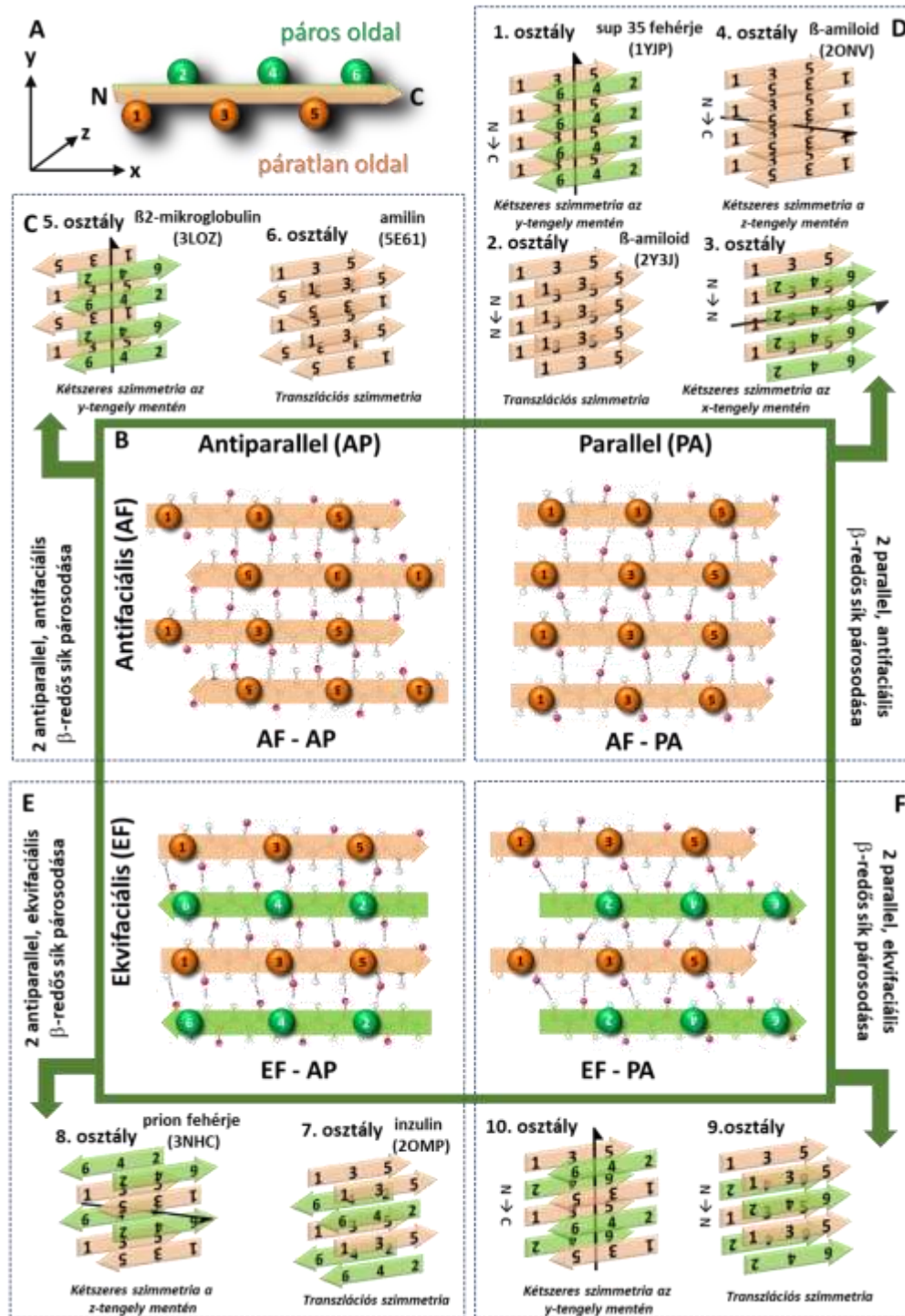
Amiloidot képző fehérje	Betegség	Aggregációs hot-spot szekvencia és annak PDB ID-je
α -szinuklein	Parkinson-kór	GAVVTGVTAVA (4RIL)
β -amiloid	Alzheimer-kór	MVGGVVIA (2Y3K)
tau	Alzheimer-kór Pick-betegség CTE – krónikus traumás encefalopátia	VQIVYK (2ON9)
inzulin	Insulin Amyloidosis	LYQLEN (2OMP)
IAPP - szigetsejt amiloid polipeptid (amilin)	2-es típusú cukorbetegség	FGAILSS (5E61)
transztiretin	SSA – szenilis szisztémás amiloidózis	TAVVTN(4XFO)
p53	Egyes rákos megbetegedések	LTIITLE (4RP6)
β 2-mikroglobulin	DRA – vese dialízissel kapcsolatos amiloidózis	LSFSKD (3LOZ)
Prion fehérjék	Creutzfeldt-Jakob betegség FFI – fatális familiáris inszomnia szivacsos szarvasmarha encefalopátia	GYMLGSA (4W5Y)

beleavatkozhatnak a fiziológiás sejtműködésbe [201] akár a proteoszómális fehérje degradáció gátlásával [202-203]; akár a mitokondrium, a lizoszómák és az endoplazmatikus retikulum membránjának megbontásával [204-205] vagy reaktív oxigén gyökök keletkezésének nem megfelelő szuppressziójával [206]. Az öregedéssel az egyes betegségek tünetei nagyobb valószínűséggel és intenzívebben jelennek meg, ugyanis az idősödő szervezet homeosztázisa, fiziológiás működése hanyatlik és a *misfoldolt*, hibás térszerkezetű fehérjék koncentrációja megnő [207]. Számos amiloidózis esetében a tünetegyüttesek már fiatalon is megjelenhetnek egy genetikai eredetű, egyszerű pontmutáció eredményeként, amely az egészséges natív fehérje intakt konformációját kóros mértékben megváltoztatja [208-210]. A citotoxikus fehérjék koncentrációjának növekedése mindenképpen fő kiváltó oka a betegségeknek [211-213], azonban az még nem véglegesen tisztázott, hogy maguk az idült amiloid plakkok, vagy a nehezen detektálható „*misfoldolt*” oligomerek felelősek a tünetegyüttesekért [214-218]. Például az Alzheimer-kórban a kognitív képességek csökkenésének mértéke nem korrelál az évek alatt felhalmozódó amiloid plakkok mennyiségével [219]. Emiatt az is feltételezhető, hogy az oldható toxikus oligomerek irreverzibilis oldhatatlan amiloid formába való kényszerítése a szervezet utolsóvonalbeli védekezése [220].

Azonban nem csak patogén fehérjék, hanem fiziológiás körülmények között fontos funkciókat betöltő fehérjék is, úgy mint, a transthyretin [221], lizozim [222], miogloblin [223] is képezhetnek amiloidot bizonyos denaturáló körülmények [224-225] között. Számos polipeptid hormon, de a bőr melanocitáiban lévő fehérjék is fiziológiás körülmények között amiloid formában tárolódnak, ezért a patofiziológiai definiálás helyett célszerűbb az amiloidok térszerkezet alapján történő definiálása.

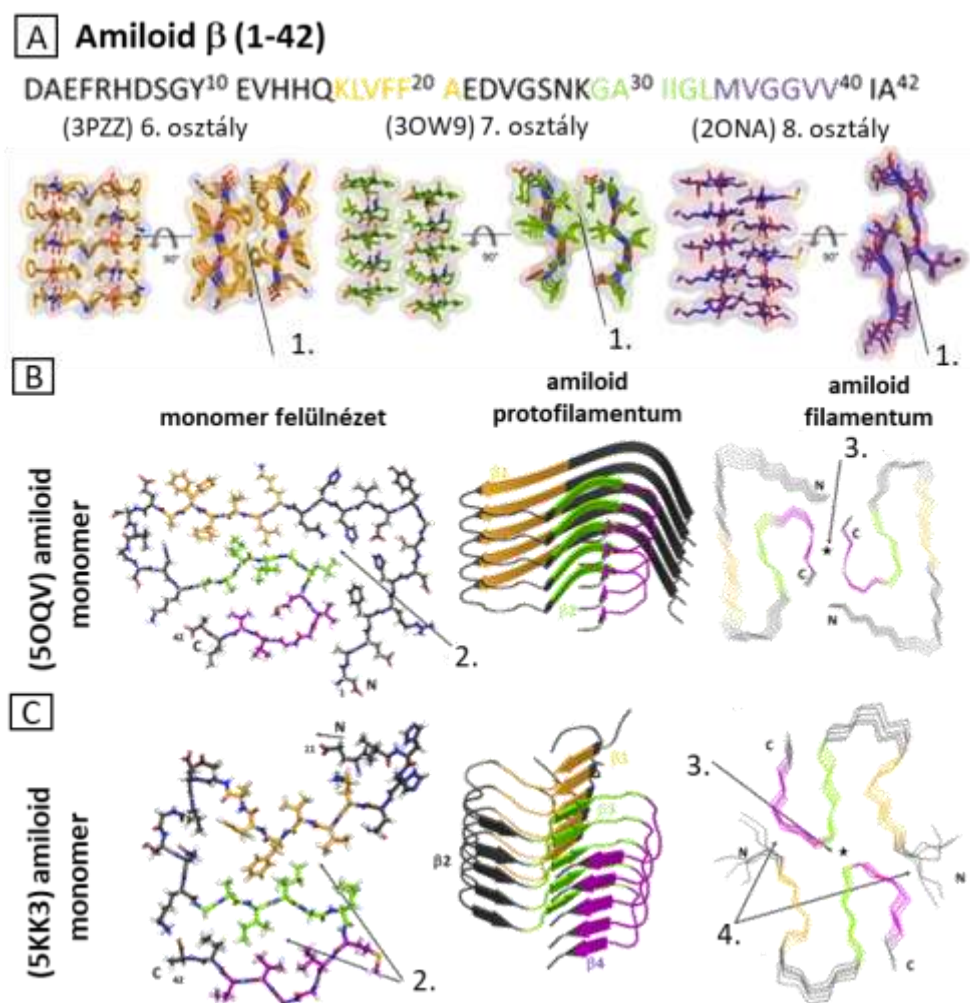
2.4.5 Az amiloid térszerkezet

Már a 30-as években is megfigyelték [226], hogy a denaturált albumin jellegzetes röntgendiffrakciós mintázatot ad, amely mintázatnak a térszerkezeti asszignációját Pauling és Corey [227] végezte el. Megmutatták, hogy a széttekeredett fehérjeláncok kinyúlnak és β -redős másodlagos térszerkezetet vesznek fel. Az egyes redők peptidgerincének C=O és NH csoportjai között rendezett H-híd hálózat alakul ki, amely



9. ábra. β -redők lehetséges elrendeződései az amiloid struktúrákban. A) Egy β -redős peptidszál sematikus rajza. Narancsszínnel a páratlan oldali oldalláncok (1,3,5) míg zöld színnel a páros oldali oldalláncok (2,4,6) vannak jelölve. B-E) A β -redős peptid láncok a zöld kertben lévő PA/AP-FA/AF módokon rendeződhetnek β -redős síkba, amelyeket a peptid-gerincek között kialakuló H-híd hálózat stabilizál. Két azonos β -redős sík párba állásával 10 különböző elrendeződésű β -redős gerinc alakulhat ki.

az egyes redőket 4,5-4,7 Å távolságra elhelyezkedő egymás felett-alatti párhuzamosan futó β -redő rétegekbe rendezi. **(8-9. ábra)** A β -redők merőlegesek az így kialakított létraszerű β -redős gerinc hossz tengelyére. A β -redős gerinc, másnéven a protofilamentum, hossz tengelye mentén megcsavarodik. A protofilamentumok kötegekbe rendeződve alkotják az idült amiloidszálat [228-230]. Eisenberg munkássága során számos amiloidogén fehérjéből származtatott – az aggregációért felelősnek gondolt – 6-10 aminosav hosszúságú peptidből sikerrel növesztett β -gerincű mikrokristályokat



10. ábra. Amiloid β (1-42) A) amiloidként kristályosodó peptidek (röntgen-diffrakciós szerkezet meghatározás) és B-C) a teljes szekvencia amiloid szerkezete (ssNMR, cryo-EM) Míg a különböző szekvenciájú peptidek (sárga, zöld, lila) eltérő felépítésű β -redős gerincet alkotnak, addig a teljes A β (1-42) fehérjében már PA-AF elrendeződés valósul csak meg. B) és a C) amiloid ugyanazon aminosav szekvencia eltérő polimorfiajú módosulata. 1. = Intramolekuláris homosztérikus zippzár. 2. = Intramolekuláris heterosztérikus zippzár. 3. = Intermolekuláris homosztérikus zippzár. 4. = Intermolekuláris heterosztérikus zippzár.

[231-233]. **(10. ábra/a)** A röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezetek alapján ezek a peptidek 10 osztályba sorolhatók **(9. ábra)** a bennük található β -redők egymáshoz viszonyított helyzetétől függően [234]. Az egyes β -redők állhatnak paralel (PA) és antiparalel (AP) helyzetben a $N \rightarrow C$ terminálisok orientációja alapján. A β -redőben az egymást követő aminosavak oldalláncai a peptid-gerinc síkjának két oldala felé helyezkednek el. A páratlan sorszámú aminosavak az egyik irányba, a páros sorszámú aminosavak oldalláncai a szemközti irányba mutatnak. **(9. ábra/a)** Ha a β -gerinc egy fokán párban álló azonos szekvenciájú β -redők azonos oldalláncai egymás felé irányulnak - tehát páros-páros, vagy páratlan-páratlan tagsorszámú aminosavak egymás felé néznek - akkor ekvifaciális (EF), ha az eltérő oldalú aminosavak néznek egymás felé, akkor antifaciális (AF) az elrendeződés. Így a párosodott β -gerincben az alábbi 4 fő csoportot különböztethetünk meg: AP-AF; AP-EF; PA-AF; PA-EF. Az amiloid gerinc hosszában a β -redős síkokat különböző szimmetria operátorok használatával párba állítva kapjuk meg a 10 különböző elrendeződésű β -gerincű csoportot. **(9. ábra/b-e)** A gerinc két síkját az ún. sztérikus cipzár tartja össze. A β -redők egymás felé irányuló főleg hidrofób oldalláncai komplementer [235] módon, egymással cipzár szerűen összefonódva töltik ki a két peptidgerinc közötti teret. (5-16 Å a gerincek közötti távolság) **(10. ábra/b-c)** A nagy felületen kialakuló ($\sim 200 \text{ \AA}^2$) van der Waals kölcsönhatások, aromás-aromás oldalláncok közötti kölcsönhatások, illetve a kialakuló H-hidak stabilizálják a β -gerincet. A szoros illeszkedés miatt vízmolekulák kiszorulnak a két réteg közül, ezért a β -gerinc ezen részét „száraz” oldálnak míg az oldószer felőli felületét „nedves” oldálnak nevezik. A hidrofób szabad β -élek „elrejtése” az amiloid szerkezetben – a hagyományos globuláris fehérjékre jellemző módtól (pl.: β -hordók) eltérően – a természet egyik védekező funkciója, a citotoxikus, β -redős, szolubilis oligomerekkel szemben [236]. A kialakult protofilamentumok kötegekbe rendeződve alkotják az idült amiloidszálat. A kötegekbe rendeződés azonban - sokszor a környezeti körülményektől függően – eltérő lehet [237-238]. Ezt amiloid polimorfának hívjuk [239]. **(10. ábra/b-c)** Például az Alzheimeres betegekből izolált tau amiloid kötegek [240] morfológiája eltért a krónikus traumatikus enkefalopátiában szenvedő betegeknél [241] (amerikai focisták, boxolók) jellemző, ugyancsak tau amiloid kötegektől, pedig az egyes protofilamentumok mindkét kórképben azonos szekvenciájúak. Belátható tehát, hogy az

amiloidok alapját adó szerkezeti koncepció uniformizált (lásd a 10 osztály), mégis számos heterogén szekvenciájú fehérje képes ugyanazon törvényszerűségek alapján amiloid térszerkezet kialakítására. A fehérje elsődleges szekvenciáját az aggregációs hajlammal, illetve a kialakuló amiloid szerkezetével összekapcsoló szabály még nem született, de vannak szekvenciális mintázatok, amelyek nagyobb aggregálódási hajlandóságot mutatnak [242], mint mások. Egyes prediktáló szoftverek az ilyen motívumok, illetve egyéb fizikai/kémiai/alaki tulajdonság alapján próbálják megjósolni egy fehérje aggregációra hajlamos szakaszát [243-245]. A nagyfelbontású cryo-EM [246] és ss-NMR [247] technológiának köszönhetően manapság már lehetőségünk van nem csak az aggregációra hajlamos peptid, hanem a teljes amiloid szerkezetű fehérje asszociátum vizsgálatára is [248-250]. **(10. ábra)**

2.4.6 Inkretin mimetikumok aggregációja

Az Exenatide vízoldhatóságának növelése és szerkezet stabilitása azért szükséges, mivel számos B osztályú GPCR ligandum és származékjai [251-253] esetében megfigyelték korábban az aggregációs hajlamot. Amfipatikus hélix jellegükből adódóan a szabad hidrofób felületek bizonyos körülmények között katalizátorai az önaggregációnak. Ennek eredménye, hogy a hélixek átmenetileg oligomer kötegekbe rendeződhetnek [254], majd egy bizonyos méret felett irreverzibilisen aggregálódnak.

A semaglutide fejlesztése során egy oktánsavval konjugált GLP-1 származék esetében az alábbiakat figyelték meg [255]. A peptid $pH = 7,5$ foszfát pufferben monomer α -hélix szerkezetű formában marad. $pH = 7,5$ -ös PBS pufferben (magnövelt ionerősségű foszfát puffer) 5°C fokon formulálva reverzibilis 20nm átmérőjű oligomereket képez, (GLP-1 a rá jellemző naszcens α -hélix helyett β -redős másodlagos szerkezetben van) amely szubkután beadást követően időben elnyújtott módon szabadul fel és hosszantartóan fokozza az inzulin elválasztást. Azonban, ha ugyanilyen körülmények között, de 25°C -on formulálták, akkor a képződő 50 nm átmérőjű, ugyancsak β -redős oligomerek beadását követően nem történt növekedés a bazális inzulin elválasztáshoz képest. Ezt a megfigyelést úgy magyarázták, hogy az oligomerizáció ebben az esetben irreverzibilis módon játszódtott le, megakadályozva a monomer GLP-1 analógok keringésbe kerülését. A semaglutide (és a többi zsírsavval konjugált peptid esetében is) a

peptid felszínére konjugált zsírsavlánc úgy viselkedik, mint egy denaturált globuláris fehérje felszínre került „ragadós” hidrofób motívuma, amely bizonyos körülmények között aggregációra képes.

A natívan α -helikális másodlagos szerkezetű GLP-1 konverziója β -redős másodlagos szerkezetűvé egyértelmű bizonyítéka az amiloid aggregációnak. A glükagon esetében – amely nagy szekvenciális homológiát mutat a GLP-1-gyel – már ss-NMR-technológiával meghatározták az amiloid forma térszerkezetét [256]. Csoportunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy az E19 kisebb mértékben aggregálódik, mint az Exenatide [112]. A VCD spektroszkópiai mérések során az E5 és E10 minifehérje koncentráció függő $\alpha \rightarrow \beta$ másodlagos szerkezeti átrendeződést mutatott a spektrális tulajdonságok alapján (E5 nagyobb mértékben) [257]. Azonban maga az atomi szintű szerkezeti átalakulás és az ezt kiváltó okok nem kerültek tisztázásra.

2.5 E5 minifehérje

Csoportunk korábbi eredményeiből kiindulva a doktori munkám során a 25 aminosav hosszúságú E5 peptidet és annak különféle mutánsait vizsgáltam. Az E5 peptid szerkezeti tulajdonságai előnyösek a számomra. a) Térszerkezete (4°C -on mért NMR-adatok alapján) megegyezik a triptofán-kalitka motívumra jellemző struktúrával, de tartalmazza a korábban bevezetett stabilitás és a vízóldhatóságát növelő aminosav cseréket is. b) Szekvenciája magába foglalja az összes aminosavat, amely a receptorhoz való kötődésben részt vesz, de nem tartalmazza a rendezetlen N-terminálist, így farmakológiai értelemben kompetitív antagonist. c) Helicitása a hasonló hosszúságú származékokénál magasabb. **(4. ábra)** Ennek két oka van. Egyrészt az N-terminálison lévő Glu-Glu-Glu szekvencia negatív töltésű oldalláncai fiziológiás pH-n kompenzálják a pozitív töltésű/protonált N-terminális amin csoportot, amely előnyös az α -hélix dipólusmomentuma szempontjából. Másrészt a glutamát triplet negatív töltésű oldalláncai a hélixet stabilizáló sóhid kötést alkothatnak a 16-os argininnel (Exenatidenak megfelelő számozás). Az E0 esetében ennek az argininnek a jelenléte kedvezőtlen volt a rendezettség szempontjából (Tc5b-el összehasonlítva), **(3. ábra)** mert az arginin oldalláncának és az N-terminális amin pozitív töltésének halmozódása növelte a hélix makro dipólus momentumát, destabilizálva az α -hélixet. Az E5 és a hosszabb variánsok esetében azonban az Arg jelenléte kedvező a sóhid kialakulása miatt. d) Az E5 az előzetes

információk alapján aggregációra képes. Mivel az E5 mérete kicsi, de harmadlagos térszerkezettel bír, spektroszkópiailag jól definiált, ezért előnyös modell az aggregáció vizsgálatára is.

3. Célkitűzések

A) Doktori kutatómunkám során az E5 minifehérje szekvenciáját alapul véve vizsgálok meg számos tényezőt, amely a triptofán-kalitka harmadlagos térszerkezetét stabilizálhatja, nagyobb termorezisztenciát biztosítva ezáltal az Exenatide analóg minifehérjének. Célom, hogy a hő hatására történő letekeredést atomi szinten, NMR-spektroszkópia segítségével jellemezzem és felderítsem, hogy ez milyen szerkezeti átrendeződésekkel jár együtt. Ehhez az E5 rendszer méretéből fakadóan oldatfázisú 2D homonukleáris méréseket végezek semleges pH-n, 5 gyógyszerészeti szempontból is fontos hőmérsékleten: 277K = 4°C, amely megfelel a hűtő hőmérsékletének és számos fehérje/peptid szerkezetű készítmény ajánlott tárolási hőmérséklete; 288K = 15°C, laborhőmérséklet; 299K = 26°C, közel szobahőmérséklet; 310K = 37°C, testhőmérséklet és egy melegebb hőmérsékleten 321K = 48°C. Párhuzamosan az NMR-mérésekkel, ugyanolyan körülmények között hőmérsékletfüggő ECD-spektrumokat is tervezek felvenni a közeli és távoli-UV tartományban szélesebb hőmérséklet tartományban 5°C és 85°C között. A két spektroszkópiai módszerből származtatott, általánosan is használt, a fehérje globális állapotát leíró adatsorok közötti korrelációt is tervezem vizsgálni a pontos atomi szintű változások függvényében. Az alábbi szekvenciális változtatások hatását kívánom tanulmányozni (1-4):

- 1) Az X14-R21 sóhíd esetében (E5-nek megfelelő számozás és ahol X lehet: E, D, Q, N) mi a szerkezeti magyarázata annak, hogy a D14-es aszparagin sav a Tc-fold nagyobb kompaktságát okozza (4°C-on), mint az azonos karakterű, csak egy metilén csoporttal hosszabb E14-glutaminsav? Arra szeretnék magyarázatot kapni, hogy a három rendszer rendezettsége miként változik a hőmérséklet emelésével és hogy az *unfolding* mechanizmusaik megegyeznek-e.
- 2) Az E5 esetében megvizsgálni, hogy a korábban bevezetett N1R szubsztitúció, amely a Tc5b→E0 szerkezetet eredményezte, milyen mértékben stabilizálja az E5 N-terminális helicitását és ez miként járul hozzá a hélix régió termostabilitásához.
- 3) Fel kívánom térképezni γ - pozícióban (4R) és (4S) fluor szubsztituált Pro17-et tartalmazó E5 származékok (E5_E14D_P17(4S)fP, E5_E14D_P17(4R)fP)

hőmérsékletfüggő denaturációját és atomi szintű magyarázatot adni a korábban már a Tc5b esetében leírt tapasztalatokra. Tervezem vizsgálni, hogy a poliprolin-hélixben történő hasonló szubsztitúciónak milyen hatása van a szerkezetre. Ezt az alábbi két mutáns esetében vizsgáltam: E5_E14D_P24(4S)fP, E5_E14D_P24(4R)fP.

- 4) Olyan E5 származékok termostabilitását is terveztem vizsgálni, amelynek a triptofán-kalitka motívumát egy diszulfidhíddal ciklizáljuk. A cisztein szubsztitúciókat, úgy végezzük el, hogy a cisztein tiolcsoportok a natív Tc-fold alapján térközben legyenek egymáshoz. Így lesz előállítva az E5_A4C_E14D_S25C (E5_SS) variáns. A ciszteinek a térközelség miatt előállítás során spontán oxidálódhatnak összekapcsolva a minifehérje N és a C terminálisát.
- B) Fő célként szerepelt az E19_SS előállítása és vizsgálata is, amely a teljes 39 aminosav hosszúságú Exenatiddal analóg és az A/4 pontban leírt diszulfidhíddal ciklusba zárt triptofán-kalitka koncepcióját követi. Továbbá vizsgálataim tárgya az E2_SS és az E11_SS peptid is. A négy különböző hosszúságú, N-terminálison α -helikális minifehérje esetében így leírható spektroszkópai paraméterek alapján, hogy a diszulfidhíd jelenlétének hatására milyen mértékben terjed ki a peptidek helicitására.
- C) A diszulfidhidas minifehérjék (EX_SS, ahol X = 2, 5, 11, 19) azonos szekvenciájú redukált párjainak (EX_2SH, ahol X = 2, 5, 11, 19) térszerkezet meghatározásával a cisztein szubsztitúciók hatását kívánom vizsgálni a kiindulási anyavegyületekhez (EX, ahol X = 2, 5, 11, 19) képest. Mivel a peptidek redukciója során nem várt problémákra derült fény, így szükségessé vált a peptidek redukció kinetikájának a vizsgálata is.
- D) Az E19_SS esetében nemcsak az esetlegesen megnövelt hőstabilitásra, hanem arra is kíváncsiak vagyunk, hogy megmarad-e az E19 esetében már korábban bizonyított agonista jelleg is. Ezt emlős-insulinoma sejtvonalakon (INS-1) tervezzük tesztelni oly módon, hogy a sejtek glükóz-függő inzulin felszabadulást Exenatide-származékok jelenlétében mérjük.

E) A Tc minifehérjék esetében irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy bizonyos körülmények között, nehezen reprodukálható módon képes amiloidot képezni. Célunk, hogy a környezeti paraméterek lépésről-lépésre történő változtatásával feltérképezzük az E5 minifehérje konformációs felszínét a térszerkezeti változásokat a távoli-UV (FUV) tartományú ECD-spektroszkópiával követve, hogy az aggregáció-képzésének feltételeit és folyamatait felderítsük. Továbbá atomi szinten is jellemezni kívánom az egyes aggregációs fázisokban a kialakuló amiloid filamentum morfológiáját. Az E5 szekvencia csonkolásával azonosítani kívánom azt a peptid részletet is, amely felelős az aggregáció megindításáért.

4. Módszerek

4.1 Peptidek előállítása és tisztítása

4.1.1 Bakteriális expresszió

A spektroszkópai módszerekkel vizsgált minifehérjék egy része bakteriális expresszióval lett előállítva. A kiindulási cDNS egy pET-32b vektor konstrukció volt, amelybe egybe lett szerkesztve fúziós fehérjeként az ubikvitin (8,5kDa) illetve egy polihisztidin címke is (His-tag). A fúziós fehérje megakadályozza a kis mértetű minifehérjék proteolitikus degradációját, a His-tag a minifehérje tisztításához szükséges. Az ubikvitin N-terminálisan a His-tag, C terminálisan az expresszálandó minifehérje van, amely ubikvitin-hidroláz enzimmal specifikusan lehasítható a tisztítás során. A vektorok tervezését és *E. coli* baktériumba [BL21(DE3) baktériumtörzs] juttatását Stráner Pál végezte. Agar lemezre szélesztett *E. coli* egy telepéből ON előkultúra lett előállítva 37°C-on 160 rpm-es ráztatással 50ml LB tápoldatban. Az expresszió ebből az előkultúrából lett indítva. 8 ml/L sejt szuszpenziót 100 μ /ml ampicillin koncentrációjú LB tápoldatban 37°C-on OD₆₀₀=1,2 értékig lett növesztve, majd 1mM IPTG hozzáadásával lett a fúziós fehérje termelése indukálva. 4 órán keresztül 37°C-on és 200rpm-mel történő ráztatás után a sejtek fel lettek tárva, majd affinitás kromatográfiával meg lettek tisztítva. ProfinityTM Ni-IMAC gyanta gyöngyök a felületükön nagy affinitással megkötik a His-tagés fúziós fehérjét, míg a többi fehérje kötődés nélkül áthalad az oszlopon. A fúziós fehérje imidazol oldattal lemosható az oszlopról, majd az imidazol dialízissel eltávolítható. A minifehérje élesztő ubikvitin hidrolázzal (YUH) lett lehasítva a fúziós fehérje komplexről. Újbóli affinitás kromatográfiás tisztítás során a minifehérje a nem kötődő frakcióba kerül, míg a His-taget hordozó ubikvitin az oszlopon marad. Expressziós módszerrel Taricska Nóra, Stráner Pál, Szabó Mária, Fazekas Dóra, Fazekas Zsolt, Vida István és jómagam állítottunk elő E5 szekvenciájú minifehérjéket és egyéb variánsokat.

4.1.2 Szilárd fázisú peptid szintézis

Bakteriális expresszió mellett a peptidek egy része szilárd fázisú peptid szintézissel lett előállítva. A fluor szubsztituált vegyületeket és egyes diszulfidhidas konstrukciókat Tóth Gábor állította elő a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetben. A néhány aminosavas (6-13) peptidek a kutatócsoportunkban használt,

áramlásos rendszerű peptidszintetizátorral lettek előállítva. Ennek lényege, hogy az áramlásos kémiai módszer előnyeit kihasználva a szintézishez egy HPLC készüléket használunk, amelynek oszlop töltete tartalmazza a gyantát, ahol a peptidszintézis történik. Az egyes aminosav-kapcsolószer elegyek, illetve a védőcsoportok lehasító elegyeket egymásután áramoltatjuk át a fűtött oszlopon. Szabad C terminális esetében az első aminosavat kézzel kell kapcsolni Wang típusú gyantára. Amid vég esetében Rink-amid gyantát használunk és nincs kiindulási kapcsolási lépés. Szabad C-terminális esetében a gyanta 1:1 arányú DMF/DCM-ben duzzasztása után a gyanta kapacitásához viszonyítva 5 ekvivalens feleslegben lévő aminosav van kapcsolva DIC kapcsolószer segítségével, DMAP katalizátor használata mellett. A többi kapcsolandó aminosavból egyenként külön üvegekbe 3,3 ekvivalensnyi lett feloldva 630 µl NMP-ben, valamint további 370 µl, 3,3 ekvivalensnyi HOBt vagy Oxima kapcsolószer lett 1 ml-re kiegészítve. Az első aminosavat tartalmazó gyanta oszlopba töltése, a rendszer 80°C-ra való termosztálása és ekvilibrálása után kezdődik meg a programozott gépi szintézis. A szintézis végeztével a peptidet egy TFA-EDT-Tioanizol-TIS-fenol hasítóeleggyel hasítjuk le a gyantáról. A TFA-s mosás után a rotációs vákuumbepárló által beszárított nyers peptidre étert töltünk. Az éteres szuszpenziót centrifugálás után dekantáljuk és friss éterrel újra szuszpendáljuk. Ezt a lépést addig ismételjük, amíg a szuszpenziónak tisztán éter szaga nem lesz. Ekkor vákuumexszikátorban kiszárítjuk a mintát.

4.1.3 A minták HPLC-s tisztítás

A nyers peptideket/fehérjéket fordított fázisú HPLC technikával lettek tisztítva Phenomenex oszlopon (Jupiter C18, 300Å, 10x250 mm) gradiens elúciós módszerrel acetonitril-víz 1%-os TFA-s elegyét használva. Liofilizálást követően a minták tisztasága és egységessége Goldschmitné-Göz Viktória közreműködésével egy Bruker Daltonics Esquire 3000+ elektronspray ionizációs spektrométeren, pozitív és negatív módban, 50-2000 m/z tartományban lettek ellenőrizve. A mintákat -4°C-on tároltuk a felhasználásig.

4.1.4 Amiloid aggregációs kísérletek

Az aggregációs vizsgálatok során az egyes fehérje minták esetében kb. 1 ml-es törzsoldat készítése volt az első lépés. Az eltelt idő során a törzsoldatban bekövetkező

fizikai-kémiai változások széleskörűen tanulmányoztuk különféle spektroszkópai/biofizikai módszerekkel. Az aggregációs kísérletek során vizsgáltuk, hogy az alábbi paraméterek változtatása miként befolyásolja az aggregációs hajlamot: 1) a fehérje szekvenciája, 2) a fehérje koncentrációja, 3) az oldat pH-ja, 4) az oldat ionerőssége (NaCl koncentráció), 5) a hőmérséklete, 6) és az oldat mozgatása (rázatás/kevertetés). A mintakészítés során a liofilizált fehérje vízben való oldása után az oldat $pH = 7$ -re lett állítva. Ez számított a kiindulási állapotnak. A következő lépésekben az oldat pH-ja, majd sókoncentrációja lett beállítva. A fehérje törzsoldatát állandó temperálás (és mágneses keverővel történő kevertetés) mellett parafilmmel lezárt eppendorf csövekben tároltuk. A mintavételezési alkalmak során a törzsoldatból minden egyes alkalommal 20 μ l térfogatú minta lett kivéve FUV ECD-spektroszkópai mérésekhez. Az ECD-mérésekkel követtük az aggregáció előrehaladottságát. Így általánosan minden kísérlethez az alábbi FUV ECD-spektrum sorozat tartozik: 1) $pH = 7$ -en felvett ECD spektrum, 2) a vizsgált pH-n rögzített, 3) a só hozzáadása után rögzített, 4) illetve az n mintavételi időpontban gyűjtött ECD-spektrum. Az E5 esetében a munka során az aggregációs folyamat és körülmények – az eredmények fejezetben részletezve – optimalva lettek. Az ilyen módon elvégzett kísérletekre mostantól E5 aggregációs protokollként fogok hivatkozni. Az aggregációs protokoll: $c_{E5} = 250 \mu\text{M}$, $c_{NaCl} = 50 \text{ mM}$, $pH = 4.1$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, kevertetés. A protokoll alapján elkészített minták időbeli aggregációját vizsgáltuk a továbbiakban részletezett biofizikai módszerekkel. A nagyobb térfogatot igénylő biofizikai módszerek esetében a törzsoldat ($\sim 1 \text{ ml}$) lett megvizsgálva, majd a mérés után a minta tovább lett temperálva (és kevertetve). Párhuzamosan minden mintavételezésnél egy kontroll ECD-mérést is végeztünk.

4.2 Oldatfázisú fehérje NMR-spektroszkópia és szerkezet számolás

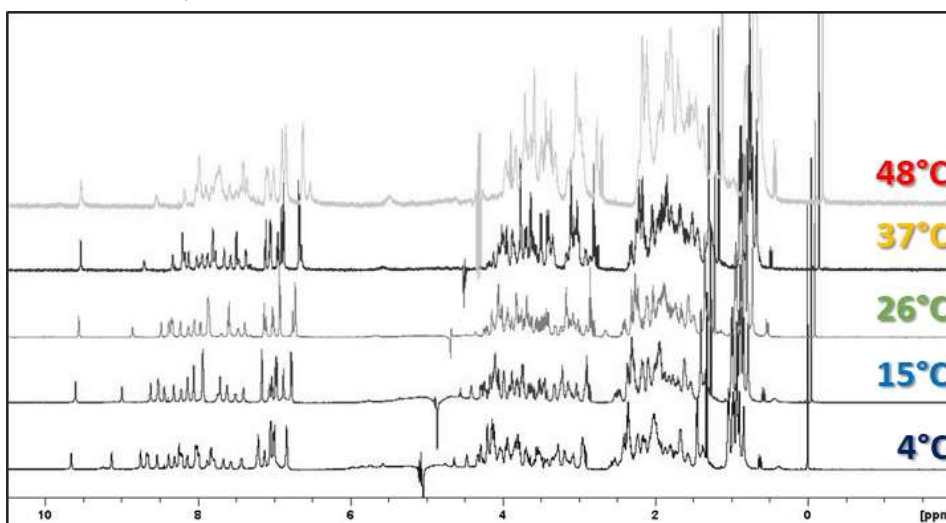
Az NMR-spektroszkópia nagy előnye, hogy oldatban, széles kísérleti körülmények között lehetővé teszi a fehérjék térszerkezet és dinamika vizsgálatát, nem csak globuláris, hanem rendezetlen, vagy naszcens másodlagos szerkezeti elemeket mutató rendszereken is. A limitáló tényező általában a fehérje mérete vagy oldhatósága. A triptofán-kalitikás minifehérjéket tulajdonságaik (natív formában stabil harmadlagos szerkezet miközben vízdoldható kisméretű monomer) ideálissá teszik, hogy a megváltozó körülmények mellett bekövetkező térszerkezet változásokat homonukleáris NMR-

mérések segítségével nyomon kövessük és karakterizáljuk. Így az előállításuk során nincs szükség drága izotóp (^{13}C , ^{15}N , ^2H) jelölésre. 1 mM-os fehérjekoncentráció mellett a szerkezetszámításhoz szükséges spektrumokat kevesebb, mint 24 óra alatt lehet rögzíteni. A homonukleáris spektrumok asszignációja során a fehérje minden egyes protonjának meghatározzuk a kémiai eltolódás értékét. Ezen adatokból következtetni lehet az adott hidrogén kémiai környezetére, így az adott régió másodlagos szerkezeti propenzitására is. A térközben lévő hidrogén spinek mágneses kölcsönhatásából távolság kényszerfeltételeket lehet meghatározni, amellyel megadható a minifehérje atomi felbontású térszerkezete is.

4.2.1 1D ^1H -NMR-spektrumok jelentősége

Annak ellenére, hogy az 1D spektrumok önállóan nem alkalmasak a fehérjék teljes asszignációjára – mivel egy 25 aminosavas peptid esetében is már jelentős a jelátfedés – mégis a spektrális tényezők számos információt nyújtanak a fehérje minta természetéről. A jel/zaj arányból következtetni lehet a minta koncentrációjára, instabil, aggregálódó minta esetében az aggregációt jelzi a jelek intenzitásának időbeli csökkenése. A jelek félértékszélessége és alakja meghatározza a spektrum minőségét. Egyrészt a jelek alakja indikálja a műszer shim tekercseivel beállítható mágneses tér homogenitást a mintatérben, amely növelésével a mért spektrum minősége javítható. Másrészt a minta oldaláról összefügg annak oldatbeli homogenitásával, valamint az oldott fehérje rotációs korrelációs idejével is, amelyet a moláris tömeg, a hőmérséklet és a viszkozitás egyaránt befolyásol. Amennyiben a jelek kiszélesedése tapasztalható akkor a következő lehetőségeket érdemes számításba venni: a minta aggregálódik, a kiszélesedés a megnövekedett molekula tömegű, de még mindig oldható oligomer képződés eredménye; a fehérje aggregálódik és oldhatatlan formában kicsapódhat; a fehérje gélesedik, megváltoztatva a minta viszkozitást. Amennyiben csak néhány jel szélesedik ki, akár az alapvonalba történő eltűnésig – jellemzően az amid NH proton jelei a pH függvényében – akkor valamilyen kémiai cserefolyamat jelenlétével kell számolni. A vízzel történő gyors kémiai csere miatt nem detektálhatóak a különböző funkciós csoportok (-OH, -SH, -NH₂, -COOH) protonjai sem. Speciális esetekben ezek a disszociálisan protonok is megjelenhetnek a spektrumon. Ilyenkor gyanakodni kell arra, hogy az adott proton a térszerkezetben eltemetett és emiatt kevésbé kitett a vízzel/D₂O-val történő cserének.

A jelek kémiai eltolódás diszperziója alapján következtetni lehet a fehérje adott körülmények közötti rendezettségére. Térszerkezettel rendelkező fehérjék esetében a permanens rendezett térszerkezeti elemekben kialakuló anizotróp mágneses tér miatt a jelek diszperziója nagy (**11. ábra**), míg rendezetlen, dinamikus fehérjéknél a kémiai eltolódás közel esik a *random coil* értékhez. (A *random coil* érték jelzi az egyes protonoknak azt a kémiai eltolódás értékét, amikor az adott aminosav teljesen rendezetlen környezetben van. Ezek meghatározása különböző rendezetlen peptid szekvenciákon történik [258-259].)



11. ábra. Az E5 miniféhérjéről felvett 1D ^1H spektrumok a hőmérséklet függvényében. Az egyes spektrumok 0,1 ppm-el vannak eltolva egymáshoz képest.

Az 1D ^1H spektrum lehetőséget biztosít arra, hogy a minta egyes komponenseinek jel alatti terület integrálásával meghatározzuk a komponensek koncentrációját vagy egymáshoz viszonyított arányát, amennyiben a komponensek jelei ismert asszignációjuk és alapvonalon elkülönülnek egymástól. Egy reakció komponenseinek esetében a jelek intenzitás/integrál változásából a reakcióra adott körülmények között jellemző kinetikai paramétereket meg lehet határozni. A doktori munkám során a vizes oldatokra tekintettel olyan 1D pulzus szekvenciát (*zgesgp*) alkalmaztam, amely víznyomást alkalmaz, lecsökkentve a jóval nagyobb koncentrációban lévő víz jelének érzékenység és jelátfedést zavaró hatását.

4.2.2 Alkalmazott 2D ^1H - ^1H homonukleáris NMR-technikák

A 2 dimenziós technikák bevezetésével a spektrumok felbontása olyan mértékben megnő, amely a minifehérjék esetében már elegendő a teljes spektrum asszignációjához. **(12. ábra)** A COSY és TOCSY-pulzusszekvenciák olyan proton-proton korrelációs kísérletek, amelyek során a mágnesezettség v. koherencia a kovalens kötésekön keresztül skaláris csatolás által tevődik az egyik protonról a másikra egy spinrendszeren belül. Az így kialakult spektrum indirekt dimenziójában (F1, t_1 , „y-tengely”) az egyik proton, míg direkt dimenziójában (F2, t_2 , „x-tengely”) a másik proton kémiai eltolódása van. A spektrumon átlósan végigfutó diagonális mentén az 1D-s spektrumot láthatjuk, míg a keresztkorrelációs csúcsok – *crosspeak* – vagy keresztcsúcsok azok, amelyek az információt hordozzák, így a COSY esetében a 2-3 kötésre ($^2J_{HH}$, $^3J_{HH}$) lévő szomszédos protonok között alakul ki keresztcsúcs, míg a TOCSY esetében az egy spinrendszeren belül lévő összes proton keresztkorrelációs csúcsot ad egymással. A fehérjék javarészt 20-fajta aminosavból épülnek fel, amelyek oldalláncaira egyenként jellemző kapcsolódási sorrend és kémiai eltolódások vonatkoznak jellegzetes COSY/TOCSY-spektrum mintázatot alkotva, segítve ezzel az aminosav típusok pontos meghatározását.

A COSY-spektrum [260] rendkívül hasznos a fehérje tisztaságának, homogenitásának ellenőrzésére is. Az amid régió HN-H α keresztcsúcsainak száma ismert szekvencia esetében az alábbi módon korrelál a fehérje aminosav számával: X-P+G-1, ahol X, az aminosavak száma; P, a prolinok száma, mivel a prolinnak nincs H α protonja; G, a glicinek száma, mivel a glicineknek két H α protonja van; valamint az N-terminális mozgékonyasága miatt eggyel kevesebb COSY-keresztcsúcs detektálható (-1). Ez a megközelítés gyakorlati szempontból számos esetben azonban nem helytálló, ugyanis a jelek átfedhetnek, a kémiai csere miatt az amid HN jelek kiszélesedhetnek vagy a két glicin jele degenerált. (a két α proton kémiai eltolódása megegyezik) A COSY-spektrum másik előnye, hogy a keresztcsúcsok finomszerkezetéből egyszerűen megadhatók a háromkötéses csatolási állandók ($^3J_{HH}$), amelyekből a Karplus összefüggés segítségével meghatározhatók egyes diéderes szögek, amelyeket a szerkezetmeghatározásnál kényszerfeltételként fel lehet használni. A φ szöget meghatározó $^3J_{HN-H\alpha}$ az α -hélixek esetében < 5 Hz, míg β -redőknél > 8 Hz, a χ^1 diéderes szöget meghatározó $^3J_{H\alpha-H\beta1/2}$ pedig azért jelentős, mert az oldalláncok β -metilén-hidrogének sztereospecifikus

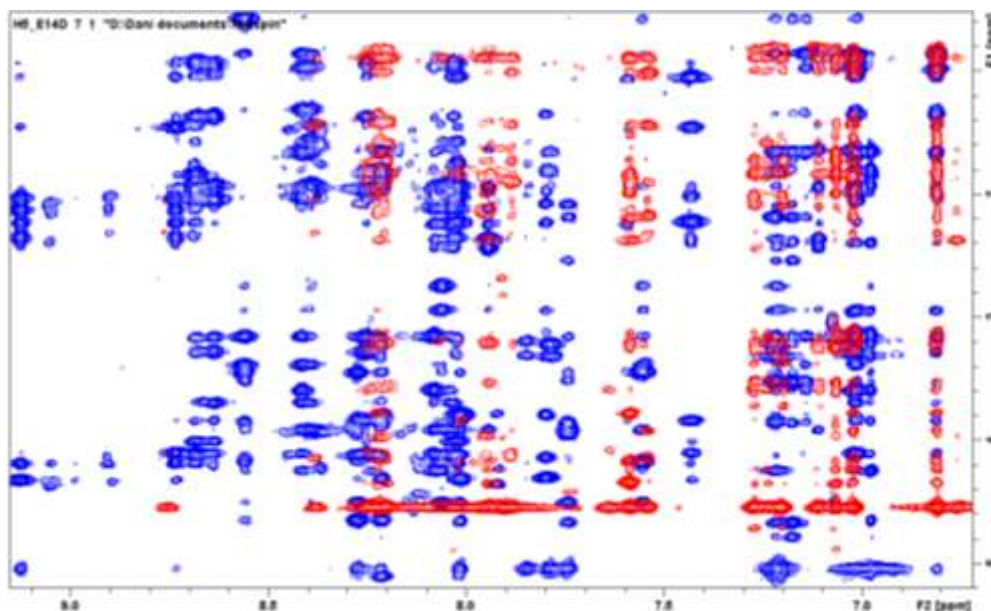
térállását határozhatja meg. A mérések során DQF-COSY [261] (cosygpprpf) szekvencia változatot használtam, amely kiszűr minden olyan jelet, amely nem a csatoló spinektől származik, így a vízjelet is, továbbá csak abszorpciós jelalakot eredményez, így a sima COSY-szekvenciával szemben a diagonálshoz közel eső keresztcsúcsok is jobban detektálhatók.

A TOCSY-spektrum [262] hasonló a COSY-kísérlethez, azonban ebben az esetben egy izotróp keverési periódusnak köszönhetően a mágnesezettség nem csak a szomszédos protonokra tevődik át, hanem lépésről lépésre a teljes spinrendszerre is kiterjed. A keverési idő hosszától függ, hogy milyen távolra terjed a mágnesezettség a kötésekén keresztül. 50 - 80 ms (d9 spinlock) alkalmas a hosszabb oldalláncú lizinek és argininek teljes spinrendszer megjelölésére, így a mérések során én is $d_9 = 80$ ms keverési időket alkalmaztam. Az oldalláncban kvaterner szénatomot vagy heteroatomot tartalmazó aminosavakhoz (aromás oldalláncúak és metionin) két különálló spinrendszer tartozik, míg a többi aminosavhoz csak egy, így egy spinrendszer keresztcsúcs számából is lehet következtetni az aminosav szerkezetére. A TOCSY-jelek térfogati integrálja fordítottan arányos a spinrendszeren belüli protonok egymáshoz viszonyított kötés mentén való távolságától. Így a TOCSY-jelintenzitásokból következtetni lehet a protonok spinrendszeren belüli konnektivitási sorrendjére, azonban érdemes párhuzamosan a COSY-jelmintázatot is ellenőrizni. A méréseim során az alábbi pulzusszekvenciát alkalmaztam: mlevgpph19.

A hidrogének spinjei az indirekt, kötésekén keresztüli skaláris csatolásokon kívül közvetlen dipoláris kapcsolatba is kerülnek a téren keresztül, megteremtve a lehetőségét a már asszignált aminosavak (spinrendszerek) szekvenciális sorba rendezéséhez. A dipoláris csatolás során a jelek intenzitás változása – NOE-jelenség [263] – alapján információt kapunk a csatoló spinek távolságáról, amennyiben azok 5-6 Å-on belül vannak egymástól. A NOE-effektuson alapuló szekvenciák, mint a 2D-NOESY [264] (noesygpph19) vagy peptidek esetében a 2D-ROESY [265] (roesygpph19) alkalmasak arra, hogy a spektrum asszignációjával feltérképezzük a térközelben lévő protonokat és ezen távolsági kényszerfeltételek alapján meghatározzuk a fehérje térszerkezetét [266]. Az ^1H - ^1H pár NOE-jelének intenzitása arányos a fehérje rotációs korrelációs idejével és a két proton közötti távolság hatodik hatványának a reciprokával. Mivel a korrelációs idő számos körülménytől (fehérje méret, viszkozitás, hőmérséklet) függ, így a NOE-jel

térfogati integrálját használjuk. Ez alapján megkülönböztethetünk szekvenciális NOE-jeleket, amelyek az (i-1), (i), (i+1) aminosavak között adódnak, rövid hatótávú NOE-jeleket, amelyek a másodlagos szerkezeti elemekre jellemzők és hosszúhatótávú NOE-jeleket, amelyek a fehérje harmadlagos szerkezetéről hordoznak értékes információt.

A triptofán-kalitikás minifehérjék esetében a helikális régióra jellemző $\text{HN}_i\text{-HN}_{i+1}$, $\text{HN}_i\text{-HN}_{i+2}$, $\text{H}\alpha_i\text{-HN}_{i+1}$, $\text{H}\alpha_i\text{-HN}_{i+3}$, $\text{H}\alpha_i\text{-HN}_{i+4}$, $\text{H}\alpha_i\text{-H}\beta_{i+3}$ keresztcsúcsok, míg távolható NOE-jelek megléte jelzi a C és N terminális közelségét egymáshoz, egyúttal a natív *Tc-fold* meglétét. A NOE-keresztcsúcsok elemzésével lehet továbbá összekapcsolni az aromás aminosavak gerinc és aromás gyűrű spinrendszerét, valamint a prolinokat elhelyezni a szekvenciában az alifás ujjlenyomat régióban fellelhető $\text{ProH}\delta_i$ és az azt követő aminosav $\text{H}\alpha_{i-1}$ keresztcsúcsainak megléte alapján. A távolságok pontos meghatározása alapvető feltétel, ezért a NOESY-spektrumok mérésekor körültekintően kell megválasztani a keverési időt (d8 mixing time), amely meghatározza azt az időt, amelyet a dipoláris kölcsönhatás kialakulására hagyunk. Ha túl rövid, akkor nincs elég idő, hogy az egymástól távolható magok esetében kialakuljon a dipoláris csatolás és fontos, de gyenge intenzitású távolható NOE-jelek elvesznek, míg, ha túl hosszú, az ún. spindiffúzió miatt az egyébként gyenge jelek felerősödnek tévesen arra következtetve, mintha térszomszágban lennének. Gyakorlatban ez kiküszöbölhető több keverési idő



12. ábra. Az E5_E14D minifehérje 2D NOESY-spektruma 4°C-on (kék – rendezett) és 48°C-on (piros – rendezetlen). Az ábrázolt tartományban (F2: 7-9 ppm) az amid csoportok és az aromás oldalláncok protonjainak keresztcsúcsai találhatóak.

párhuzamos használatával (80-120ms). A Tc-fehérjék esetében a $d_8 = 120$ ms megfelelően elegendőnek bizonyult.

4.2.3 Oldat fázisú NMR-minták és mérések

Az NMR-mintákat bevált, ugyanazon protokoll alapján készítettem elő. A liofilizált minifehérjékből vizes oldatot készítettem 0,5 - 0,8 mM koncentrációban általában 600 - 800 μ l össztérfogatban, (kis mennyiségű fehérje esetében, hogy elérjem a megfelelően tömény koncentrációt Shigemi típusú NMR-csővet használtam), amely a HPLC-tisztaságú víz mellett tartalmazott 8 - 10 % D_2O -t, amely szükséges a megfelelő lockoláshoz; DSS-t, belső referenciaként és antimikrobiális hatású NaN_3 -ot. A minifehérjék feloldási pH-ja 3,5 - 4,0 között van a HPLC-s tisztításból visszamaradó nyomnyi TFA miatt. A megfelelő pH beállításához nátrium-hidroxidot és sósavat használtam. A diszulfidhidat tartalmazó peptidek redukció-vizsgálata estében $pH = 7$ -es foszfát-puffert alkalmaztam oldószerként és 1M DTT vagy 1M, $pH = 7$ -re állított TCEP redukálószer alkalmaztam.

Az NMR-méréseket egy 16.4T (700MHz) Bruker Avance III spektrométeren végeztem, amely egy z-grádiensű 5mm-es inverz TCL mérőfejjel van felszerelve. Ez a mérőfej a munkám során egy Prodigy TCI H&F-C/N-D mérőfejre lett cserélve, amelynek megnövelt érzékenysége lehetővé tette hígabb koncentrációjú minták esetében is a megfelelő jel/zaj arányú spektrumok felvételét. A spektrumok feldolgozása és redukciókinetika esetében a jelek integrálása a a Topspin 3.5 - 4.0.7 szoftver segítségével történt.

Az egyes variánsok térszerkezetének meghatározása esetében egyazon minta lett használva mind az öt vizsgált hőmérsékleten. Minden mérésipontban először egy 1D 1H spektrum lett megmérve, ellenőrizve a minta egységességét, majd az 1H - 1H homonukleáris spektrumok rögzítése után ellenőrzésképpen egy újabb 1D 1H spektrum került felvételre. A homonukleáris spektrum hármaskok 2048x512 felbontás mellett, 32 v. 48 v. 64 scannel lettek rögzítve, amely kb. 24-48 órás mérési időt vettek igénybe. Magasabb hőmérsékleten ezidő alatt a peptidek esetlegesen elbomolhattak, amelyet az adott hőmérsékleten felvett két 1D proton spektrum jelmintázatának az összehasonlításával ellenőriztem. Bomlást semelyik vizsgált esetben nem tapasztaltam.

Az E5 minifehérje esetében a szerkezetváltozást a pH változtatás függvényében vizsgáltam. Azokon a pH értékeken, ahol előkísérletek alapján az aggregációs hajlam nagyobb volt, a minta koncentrációját jelentősen hígítottam, de nagyobb scan szám mellett vettem fel a spektrumokat, hogy megtartsam a megfelelő érzékenységet.

4.2.4 Diszulfidhidas minifehérjék redukciója

A diszulfidhíddal ciklizált minifehérjék esetében először az oxidált formáról vettem fel a homonukleáris spektrum sorozatokat, majd a redukálószer hozzáadása után 288K-en 1D ^1H spektrumok felvételével követtem a redukció végbemenetelét. Miután csak a redukált mintára jellemző jeleket lehetett detektálni, a redukált formákról is felvettem a homonukleáris spektrum hármassokat. Az ekkor tapasztalt jelentős különbségek a redukációs sebességben sarkalltak a redukció kinetikai vizsgálatokra.

A redukció kinetikai kísérletek során foszfát pufferben semleges pH-n vizsgáltam, hogy az alábbi paraméterek miként befolyásolják a redukció sebességét: 1) minifehérje α -hélixének árnyékoló hatása, 2) redukációs hőmérséklet 3) redukálószer természete 4) fehérje-redukálószer koncentrációja és egymáshoz viszonyított aránya 5) fehérje aggregációs képessége. A kinetika időbeli monitorozása ^1H spektrumok felvételével történt. A központi triptofán H ϵ 1 indol-gyűrűs protonjának kémiai eltolódása az oxidált és redukált formában más kémiai eltolódásnál van. A redukció során az oxidált/redukált jel-pár integrál változásának arányát volt célszerű követni. Mivel a jelpár alapvonalon elkülönül, így lehetséges az integrál arányuk alapján meghatározni a redukció állását. Az oldott oxidált fehérjének ismert a koncentrációja, amely arányos a kezdeti spektrum triptofán H ϵ 1 csúcs jel integrál értékével, így az oxidált/redukált forma aránya mellett a koncentráció is meghatározható. Az oxidált és redukált forma H ϵ 1 jelének integrációs tartományát minden spektrum sorozaton azonos kémiai eltolódás értékhatárok között rögzítettem és a DSS integrál értékével minden esetben normalizáltam.

4.2.5 Oldatfázisú NMR-technikák az aggregáció monitorozása során

Az aggregációs protokoll alapján elkészített mintákat vizsgáltam 2D-s heteronukleáris ^1H - ^{15}N HSQC mérésorozatok felvételével. ^1H - ^{15}N HSQC mérésekkel a gerincatom amid NH-k kémiai eltolódás változását követtük az időben az aggregáció

előrehaladtával. Sfhmqcf3gpph sofast-HSQC mérésekkel egy 2D spektrum kevesebb, mint 2 perc alatt rögzíthetővé vált.

Az E5_P17(4S)fP esetében 1D ^{19}F méréseket is végeztünk Bruker Avance-I 250MHz-es ^{19}F dedikált mérőfejjel felszerelt NMR-spektrométerén. A mintát a standard aggregációs protokoll alapján állítottuk elő. Az alapkoncepció szerint, az oligomerizáció során a különböző konformációjú vízdoldható monomerek/oligomerek elkülönülő 1D ^{19}F jelet adnak, így következtetni lehet az aktuális aggregációs állapot heterogenitására.

A translációs diffúziós mérések (DOSY) lehetőséget biztosítanak, hogy az oldott fehérjénknél meghatározzuk a diffúziós együtthatóját. A diffúziós együtthatóból a Stokes-Einstein egyenlet alapján megadható a molekula hidrodinamikai sugara (r_H) amely alapján következtetni lehet a fehérje méretére, rendezettségére és aggregáció megléte esetén az oligomerizációs fokra, amennyiben a oligomerek még vízdoldható nagyságúak. Az alábbi DOSY pulzusszekvenciát alkalmaztam: stebpp1s19.

4.2.6 Szerkezetszámolás NOE-kényszerfeltételek alapján

Az asszignált NOE-keresztcsúcsokat felhasználhatók a fehérje térszerkezet-számolásához akképpen, hogy távolsági kényszerfeltételeket generálunk ^1H - ^1H NOESY-keresztcsúcsok térfogati integráljából [267]. A NOE-jelek integrál-távolság kalibrálása elvégezhető ismert állandó távolságú protonok esetében, mint pl. két geminális helyzetű H atom egy $-\text{CH}_2-$ csoportban, ahol a van der Waals-feltétel alapján a referenciatávolság 1.8 Å. Mivel a spektrumon ezek a $-\text{CH}_2-$ jelek számos esetben átfedésben vannak, ezzel torzítva a pontos térfogati integrálást, ezért én a Tc minifehérjék esetében a jól elkülönülő keresztcsúcsként detektálható Trp indol aromás gyűrű H ϵ 1 - H ξ 2 proton közötti 2,4 Å-ös távolságot használtam. Az általam alkalmazott asszignáló program a CCPNMR 1.2 [268] az integrál-távolság konverziót úgy végzi el, hogy az összes asszignált jel integrálját átlagolja és ehhez az értékhez társít egy 3,2 Å-ös középértéket. (minimum távolság 1,8 Å; a maximum távolság 5 Å lehet) Ezt a távolság-integrál érték párost veszi referenciának és konvertálja a többi keresztcsúcs térfogati integrálját. Mind a két módszert alkalmazva nem találtam szignifikáns eltérést a konvertált távolságok között. A különbségekből adódó néhány század, tized Ångströmös szerkezeti bizonytalanság velejárója ennek a módszernek. A konvertált távolság értékek megközelítő jellegűek, amelyeknek van egy alsó és felső hibahatára. A számolt szerkezetben a távolságoknak bele kell esnie a

kalibrációból számolt értékhatárok közé. Az iteratív szerkezet finomítás során a hibahatárok csökkentésével érhető el egyre pontosabb szerkezet. A számolt szerkezet bizonytalanságát minél több keresztcsúcs asszignációja, vagyis távolsági kényszerfeltétel alkalmazása is csökkenti. Amennyiben a számolt szerkezetben egy távolság a hibahatáron kívül esik, akkor abban az esetben meg kell vizsgálni, hogy helyes-e az asszignációja. Számos esetben az átfedő jeleknél a program automatikus integrálását kell szimplán csak felülvizsgálni. A fehérje szerkezete tovább pontosítható más nem NOE-alapú kényszerfeltételek megadásával, mint a torziós szögek, maradék dipoláris csatolások és a hidrogén-hidak. A munkám során én csak a NOE-keresztcsúcsokból származtatott kényszerfeltételeket használtam.

Maga a szerkezetszámolás nem más, mint egy adott célfüggvény minimumának a meghatározása. Szerkezetszámolásra az Aria 2.0 [269] szoftvert használtam, amely CNS 1.21 [270] protokoll alapján az ún. derékszögű koordináta-tér és torziós szög-tér kényszerfeltételek által korlátozott molekuladinamika (*Cartesian space and torsion angle space molecular dynamics*) módszerét használja. A meghatározott kényszerfeltételekből kezdeti szerkezeteket generál és megpróbálja úgy finomítani azokat, hogy a számított szerkezetben a lehető legtöbb kényszerfeltétel hibahatáron belül megegyezzen a kísérleti paraméterekkel. Az energia minimalizációt potenciális energiafüggvények segítségével végzi el. Azért, hogy a minimalizáció során az egyes szerkezetek ne ragadjanak benne egy nagy potenciális energiagátú lokális energiaminimumú gödörben, ezért a protokoll alkalmazza az ún. szimulált hevítést (simulated annealing). A rendszer néhány pikoszekundumra tízezer Kelvinre hevül, majd folyamatosan elkezd lehűlni, amíg teljesen el nem éri az energia minimumot. A rendszer teljes potenciális energiáját a kezdeti atomi koordinátákból számoljuk, amely két tagból áll. Az egyik a kísérletileg meghatározott kényszerfeltétekből származó potenciális energia, míg a másik a klasszikus standard szerkezeti törvényekből álló tag, amely magában foglalja a kötéstávolságok, kötésszögek, a diéderes szögek, van der Waals kölcsönhatások és elektrosztatikus kölcsönhatások összeségét [271].

Az általam használt szoftvercsomag előnye, hogy az egyes lépések input/output fájljai kompatibilisek egymással, amely nagyban segíti az iteratív számolást. A CCPNMR szoftver használatával történik a ^1H - ^1H spektrumok asszignációja, a keresztcsúcsok térfogati integrálása és konvertálása távolsági kényszerfeltételekké. Az ARIA szoftver

tulajdonképpen egy grafikus felhasználói felület, amely kapcsolatot teremt a CCPNMR és a szerkezetszámolást végző CNS protokoll között. ARIA irányítja a folyamatot oly módon, hogy analizálja a konformereket egy iterációs folyamat végeztével, majd kiválasztja a hét legalacsonyabb potenciális energiájút és azokat egy következő iterációs lépésben tovább finomítja, de már szigorúbb feltételek mellett. Nyolc iteráció lépés után egy molekula dinamikai szimulációt futtatva a számolt szerkezetet elhelyezi az oldószernek megfelelő közegbe. A számolás eredménye egy energiaminimalizált szerkezetsokaság és az ahhoz tartozó átlagszerkezet .PDB fájl kiterjesztésben. Továbbá egy lista a megbízható és nem megbízható kényszerfeltételekről, a szerkezeti modellbe nem, vagy nehezen illeszkedő kényszerfeltételekről. Ezek az adatok egy iterációs-sorozat elvégeztével visszaimportálódnak a CCPNMR-be is, így a kifogásolt jelek listáját ellenőrizve, esetlegesen újraasszignálva, újra indítható a számítás. A beépített validáló programok (PROCHECK [272], WHATIF [273]) segítségével ellenőrizhetjük, hogy a peptidgerinc torziós szögei (ϕ, ψ) a Ramachandran diagram megengedett régiójába esnek, illetve egyéb szerkezeti elemek (diszulfidhidak, hélixek, stb...) geometriája, sztereokémiája megfelel-e az alapvető elvárásoknak. A számolt szerkezetek-sokaságokat a peptidgerinc és az összes atom RMSD (Å) értékeivel jellemezhetjük. Ez a szám azt mutatja, hogy mekkora az egyes szerkezetek eltérése az átlag szerkezettől, vagyis mennyire heterogének a számolt szerkezetsokaságok. Minél kisebb az RMSD érték, annál homogénebb az adott populáció. Az RMSD értéket vizsgálhatom a szekvencia mentén meghatározva a szekvencián belüli mozgékony, dinamikusabb (kevesebb kényszerfeltétel definiálta régiókat) és a rögzített szekvenciaszakaszokat. Az összes atom RMSD érték a szekvencia függvényében indikálja az egyes oldalláncok flexibilitását. Természetesen egy több atomból álló oldallánc (pl.: Lys) mindig nagyobb RMSD értéket ad mind egy rövid oldallánc (pl.: Ser). Hidrogénhidak, elektrosztatikus kölcsönhatások megléte esetében egyes oldalláncok orientálódnak és rögzülnek, így a szekvencia azon részén az összes atom RMSD értéke kisebb. Azonban az RMSD értékek információtartalmából körültekintően szabad csak következtetéseket levonni. Vegyünk egy elméleti példát az általam vizsgált hőmérséklet függő denaturáció analógiájára. Alacsony hőmérsékleten a fehérje rendezett globuláris formában van. A homonukleáris spektrumok alapján számos távolsági kényszerfeltételt meg tudok állapítani, így a 10 elemből álló szerkezetsokaság - legkisebb potenciális energiával rendelkező 10 tag -

uniform és emiatt kicsi az RMSD értéke is. Amennyiben a szerkezetszámolási protokollban kimenetként 10 helyett 50 elemű szerkezetsokaságot állítok be, az RMSD érték megnövekedhet, ugyanis egyre nagyobb potenciális energiájú tagok is bekerülhetnek a sokaságokba. A hőmérséklet növelésével a peptidgerinc dinamikusabbá válik. A szekvencián belül a megnövekedett dinamikájú részletekhez kevesebb kényszerfeltételt lehet rendelni, hiszen a dipoláris csatolás nem tud kifejlődni a folytonosan ide-oda mozgó hidrogén spinek között. Így mind a lokális és globális RMSD értékek megnövekednek. A hőmérséklet további emelésével párhuzamosan egyre kevesebb jel asszignálható és folyamatosan tovább nőnek az RMSD érték is. Ennek fényében az asszignált jelek mennyisége és minősége (intra/interreziduális, szekvenciális vagy távolható) a hőmérséklet függvényében indikátora a fehérje stabilitásának is. **(12. ábra)**

4.2.7 Fehérjék térszerkezetének jellemzése kémiai eltolódások alapján

Számos esetben 26°C felett már nem volt detektálható NOESY-keresztcsúcs, emiatt csak a COSY/TOCSY-spektrumokról asszignált kémiai eltolódásokat lehetett alkalmazni a szerkezet jellemzésére. Az egyes NMR-aktív magok (^1H , ^{13}C , ^{15}N) kémiai eltolódása jellemző az atomokat körülvevő szerkezeti/kémiai környezetre, így az eltolódásokból, illetve ún. másodlagos kémiai eltolódásokból megbecsülhetők a másodlagos szerkezeti elemek vagy azok hiánya. A másodlagos kémiai eltolódás (SCS) vagy kémiai eltolódás különbség (CSD) a kísérletesen meghatározott kémiai eltolódás és a *random coil* (lásd korábban) kémiai eltolódás különbsége. Minél nagyobb az egyes aminosavak SCS-nek az abszolút értéke annál inkább eltér a rendezetlentől az a szekvencia részlet. Helikális másodlagos szerkezet esetében a $\text{H}\alpha$ SCS-sek értékei negatívak, a $\text{C}\alpha$ és a $\text{C}\alpha - \text{C}\beta$ SCS értékei pozitívak. β -redők esetében pont a fordított tendencia figyelhető meg. Rendezetlen szekvenciák esetében az SCS-sek alapján megbecsülhetők a naszcens másodlagos szerkezeti elemek propenzitása. A T_c minifehérjék esetében a helikális régió rendezettségét/helicitását a $\text{H}\alpha$ protonok másodlagos kémiai eltolódásával, illetve ennek összegével jellemeztem. Ahhoz, hogy különböző hosszúságú helikális szegmensek egy értékkel összehasonlíthatók legyenek bevezettem az átlagos, egy aminosavra vonatkoztatott reziduális hélix rendezettség értéket: $(\sum_{i=1}^n \text{SCS}^{\text{H}\alpha})/n$, ahol n a vizsgált helikális szegmens aminosavszáma.

A Tc származékokban a központi triptofán indol oldallánca jelentősen befolyásolja a köré szerveződő aminosavak kémiai eltolódását. Az aromás gyűrűáram egy anizotróp mágneses teret indukál azt eredményezve, hogy az aromás indol síkja felett és alatt – egy elektron negatív árnyékolási kúpnak köszönhetően – a magok kémiai eltolódása a kisebb kémiai eltolódások felé esnek, míg az indol síkjában lévő magoknak nagyobb lesz a kémiai eltolódása az átlagosnál. Barua és mtsai. [274] kihasználva ezt a jelenséget, a Tc5b modellpeptid esetében meghatározták azokat a protonokat, amelynek eltolódása a legérzékenyebben függ az aromás köráramtól, ezáltal megfelelő indikátorai a triptofán-kalitikás térszerkezet rendezettségének. Barua által definiált protonok: L7H α , G11H α 2, P12H β 2, R16H α , P18H α , P18H β 2, P19H δ 1, P19H δ 2 valamint kiegészítve Rovó munkája alapján [112], a W6N ϵ 1 proton másodlagos kémiai eltolódás összegének abszolút értéke (CSD_{cage}) jól korrelál a Tc-*fold* motívum rendezettségével. Minél kompaktabb a hidrofób mag, annál magasabb ez az érték. Összehasonlításképpen 4°C-on a korábban említett racionálisan tervezett $CSD_{cage}^{Tc5b} = 10,70$ addig a rendezetlen $CSD_{cage}^{E0} = 1,79$. Denaturáció során, párhuzamosan az egyes szerkezeti elemek fellazulásával, majd a hidrofób kalitka további szolvatációjával csökken, majd megszűnik az effektus. A hőmérsékletfüggő stabilitás vizsgálatok során az 5 különböző hőmérsékleten, de azonos további kísérleti körülmények között lévő E5 mutánsok harmadlagos szerkezetének kompaktságát a CSD_{cage} értékekkel jellemeztem.

Az irodalomban számos random coil kémiai eltolódás érték található, amelyek bizonyos mértékben különböznek egymástól, függően a vizsgált modell peptid szekvenciájától és egyéb kísérleti paraméterektől, mint pl. deuterálószer jelenléte és koncentrációja, pH, hőmérséklet. Számos módszer figyelembe veszi ezeket a sajátosságokat és korigálja az alapértékeket [275]. A H α random coil értékek meghatározásához egy olyan online szoftvert [276] használtam, amely komplex módon több irodalmi korrelációs módszert [277-280] felhasználva, a kívánt hőmérsékleten és pH-n megadja a random coil értékeket a vizsgálni kívánt szekvencia mentén. A kapott értékeket felhasználva határoztam meg a H α protonok másodlagos kémiai eltolódását a minifehérjék helikális régiójában. A CSD_{cage} értékek számolásánál a Barua és Rovó által használt oldallánc random coil eltolódás értékeket használtam, hogy az általam kapott eredmények összehasonlíthatók legyenek más irodalmi példákkal. Azonban ezek a random coil értékek hőmérséklet és pH hatással nem korigáltak.

4.3 ECD-spektroszkópia

Az NMR-spektroszkópia mellett az elektronikus cirkuláris dikroizmus spektroszkópiát használtam kiterjedten a minifehérjék térszerkezet változásainak tanulmányozására. A királis és királishan perturbált kromofórok a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fényt különböző mértékben nyelik el, megteremtve az alapját a közeli és távoli UV-tartományban a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiának. A jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény különbözik, és ilyenkor a két tényező (abszorpció és törésmutató) hatására az áthaladás során a síkban polarizált fény elliptikusan polarizálttá válik, amelyet az ellipcitással lehet jellemezni. Fehérjék esetében a CD spektrumon az aminosav-tagszámra és a küvetta átmérőjére (fényúthossz) normált ellipticitást (mean residue ellipticity, $[\Theta]_{MR}$, fok·cm²·dmol⁻¹) ábrázoljuk a hullámhossz függvényében. Az NMR limitáló tényezői, mint az 50°C feletti hőmérsékleten való mérés, a fehérje mérete és aggregációs tulajdonságai az ECD bizonyos határokig kezelni tudja, így a spektroszkópiai módszerek együttes használatával (molekuladinamikai számításokkal kiegészítve) a komplementer információ töredékek szerkezeti magyarázattal szolgálhatnak a megfigyelt jelenségekre. Annak ellenére, hogy az ECD-spektroszkópia nem ad nagyfelbontású atomi képet a térszerkezetről, az ECD-görbék spektrális tulajdonságai számos információt szolgáltatnak a másodlagos szerkezeti elemekről, az aromás aminosavak és a diszulfidok környezetéről olyan oldatbeli körülmények között is, ahol az NMR nem alkalmazható.

4.3.1 Közeli UV-tartományú (NUV) ECD-spektroszkópia

A közeli UV-spektroszkópiában (NUV ECD) 250-300 nm tartományban főként a tirozin és triptofán aromás aminosavak jeleit detektáljuk (fenil-alanin kis extinciókoefficiense miatt nem jelentős a spektrális hozzájárulás). Az aromás aminosavak szerkezetükből adódóan benzoil jellegű kromofórok, így négy π - π^* átmenettel rendelkeznek [281] (L_a , L_b , B_b , B_a). Az L_a és L_b átmeneteknek az aromás környezet változására érzékeny, jól megkülönböztethető rezgési komponensei 260 és 300 nm között találhatóak, míg a B_b átmenet 225nm környékén van. A tirozin fenolos OH csoportja batokrom eltolódást eredményez a fenil-alaninhoz képest, az L átmenet elektromosan megengedett lesz (L_b abszorpciós sávja ~276 nm-nél jelenik meg míg ~287 nm-nél egy

vállat ad), miközben a B átmenet degenerációja megszűnik. A triptofán π - π^* átmenetek komplex jellege a rezgési finomszerkezetekből következik. Az L_b sávja ~281 nm és 293 nm közelében jelenik meg, míg az L_a átmenet sávja egy széles háttér hozzájárulást ad. A triptofán-kalitikás minifehérjékben a központi triptofán és tirozin közelsége továbbá kölcsönhatása miatt a tirozin L_b és a triptofán L_a és L_b sávjai információval szolgálnak a negyedleges szerkezet állapotáról és a Tyr-Trp pár oldalláncainak egymáshoz viszonyított térállásról [282]. A denaturálódás során, a központi hidrofób mag felnyílik, az oldószernek kitetté válnak az aromás kromofórok, környezetük megváltozik, és a szabad oldallánc rotáció miatt az oldallánc térállások kiátlagolódnak, az ECD-görbe ellipticitásának csökkenését eredményezve.

260 nm közelében a diszulfidhidaknak van gyenge abszorpciója, a kén atomok nemkötő elektronpályáiról a diszulfidkötés lazító pályájára való két n - σ^* átmenet eredményeként. Az átmenet függ a diszulfidkötés $C\beta$ -S-S- $C\beta$ torziós szögétől, így a 90° -tól való elmozdulása batokrómm eltolódást eredményez. A diszulfidhíddal ciklizált minifehérjék *in-situ* redukciója során e jelenség megléte (illetve a redukált esetben a hiánya) miatt lehetséges a redukció monitorozás NUV ECD-spektroszkópiával.

4.3.2 Távoli UV-tartományú (FUV) ECD-spektroszkópia

A távoli UV-tartományban (FUV ECD) 180-260 nm között a fehérjék peptidkötés gerjesztéséből adódó jelek detektálhatók. A CD görbe ebben a tartományban 1) az amid csoport oxigénjének nem kötő elektron pályája és a lazítópálya (n - π^*) közötti 2) és az amid csoport legmagasabb energiájú kötő pálya és lazító pálya (π - π^*) közötti elektronátmenetekből adódik. Az egyes fehérjék CD görbéje nagymértékben függ az amidok egymáshoz viszonyított térbeli helyzetétől – vagyis a peptidgerinc torziós szögeitől – így a másodlagos szerkezeti elemek aránya megbecsülhető a spektrum alapján. Az α -hélixek esetében a spektrumot ún. C típusú spektrumnak is hívják, ahol az n - π^* átmenet 220 nm környékén negatív sávot eredményez. A π - π^* átmenet egy ún. exciton módon (az egymáshoz közeli amid csoportok együttes gerjesztése során a kialakuló cirkuláris töltéselmozdulás eredményez mágneses dipólusmomentumot) felhasad és 192 nm-nél egy pozitív míg 208 nm-nél egy negatív sáv jelentkezik. A felhasadás mértéke függ a hélixek hosszúságától. A triptofán-kalitikás minifehérjék

esetében az N-terminális hélice mellett a 3_{10} -hélixre is hasonló, C típusú spektrum jellemző, míg a poliprolin II hélixre az ún. U típusú spektrumra hasonlító görbe a jellemző. Ebben az esetben $n-\pi^*$ átmenet 226 nm közelében gyenge pozitív, míg a $\pi-\pi^*$ erős negatív sávot eredményez a spektrumon. Az U típusú spektrum jellemző a rendezetlen, denaturált szerkezetű TC minifehérjékre is. Bár az inkretin mimetikumok natív állapota nem mutat a β -redőkre jellemző, ún. A-típusú spektrumot, azonban amiloid aggregáció során $C \rightarrow A$ típusú átrendeződés megfigyelhető. Amennyiben, ha már 5-7 aminosavnyi β -redős szál megjelenik, abban az esetben a spektrumon 216 nm-nél egy gyengébb negatív és 195-200 nm környékén egy intenzívebb pozitív sáv rajzolódik ki. Egyes esetekben ez az intenzívebb csúcs előjelet vált és negatív lesz. Ez azzal magyarázható, hogy a β -redők állhatnak parallel és antiparallel állásban is [283].

4.3.3 Dekonvolúciós módszerek

Az ECD-spektrumok alapján történő fehérjék szerkezeti elemzést nagymértékben elősegíti az ún. dekonvolúciós módszerek bevezetése. Ha azt feltételezzük, hogy a vizsgált fehérje ECD-spektruma additív módon adódik össze a korábban felsorolt másodlagos szerkezetekre jellemző tiszta ún. bázisspektrumokból, akkor meghatározhatjuk a másodlagos szerkezeti elemek típusát és az arányát a fehérjén belül. (de a szekvenciális lokalizációt nem.) A módszer palacknyaka a megfelelő „tisztaság” – vagyis egyfajta másodlagos szerkezettel bíró referencia peptidek/fehérjék – bázisspektrumok alkalmazása. Ahhoz, hogy biztosan hozzá lehessen rendelni a bázisspektrum spektrális tulajdonságait egy fehérjéhez, ismerni kell az adott referencia fehérje pontos atomi térszerkezetét. Ma már elérhető számos algoritmus, amely a betáplált ECD-spektrum alapján megbecsüli a másodlagos elemek arányát. Elsősorban az α -hélixek esetében megbízható az eredménye SELCON-, CONTIN-, és CDSSTR módszereknek, míg a β -redők esetében a neurális hálózat alapú CDNN lehet a megfelelő választás. Meg kell említeni azonban, hogy az ismert szerkezetű fehérjék és az ezekről felvett referencia ECD-spektrum adatbázis egyelőre még nem elég változatos, továbbá, hogy a 3-5 fő másodlagos szerkezeti komponensen kívül a többi szerkezeti elemet is biztonsággal meghatározza. Az amiloidszálak β -redői külön kiemelendők szerkezeti diverzitásuk szempontjából is. Manapság az egyik legalkalmasabb algoritmus a BeStSel,

amely figyelembe veszi a β -redők változatosságát, így képes a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek arányát a CATH [284] osztályozás szerint megbecsülni. Néhány aminosavas peptidek ECD-spektruma nagymértékben különbözhet a nagy globuláris fehérjékre jellemző „megszokott” CD görbétől, ezért ezek elemzésére az előzőleg említett algoritmusok nem alkalmazhatóak. A különbség a peptidek nagyobb flexibilitásából, a szerkezet érzékenyebb környezeti függéséből, illetve az oldalláncok nagyobb spektrális hozzájárulásából fakad. Egyfajta másodlagos szerkezettel rendelkező stabil peptid modellekről felvett ECD spektrum azonban nagyszerűen alkalmazható bázisspektrumként a felbontások során. A környezeti paraméterek változtatásának eredményeként fellépő térszerkezetváltozás (pl.: amiloid aggregáció, hődenaturáció stb.) is számszerűsíthető a dekonvolúciós módszerek használatával. Ilyen esetekben nem a másodlagos szerkezeti elemek arányát, hanem a konformációs állapotok számát és a szerkezeti átalakulás mértékét definiálhatjuk a betáplált spektrumsokaságok és bázis (vagy tanító) spektrumok alapján. Ilyen módszer a CCA+ [285-286] konvex peremfeltételű dekonvolúciós eljárás, amelyet én is alkalmaztam a doktori munkám során. A vizsgált ECD-görbe felírható: $f_j^c(\lambda) = \sum_{i=1}^P p_j g_i(\lambda)$, ahol $p_{i,j}$ a koefficienseket, a $g_i(\lambda)$ a bázisgörbék, míg P a bázisgörbék számát jelöli. A szoftver $\sum_{i=1}^N [f_j^m(\lambda) - f_j^c(\lambda)]$ kifejezést minimalizálja, ahol a $f_j^m(\lambda)$ az N darab mért ECD-görbe és az $f_j^c(\lambda)$ a bázisgörbék lineáris kombinációjával közelített spektrum. A minimalizálás során a $p_{i,j}$ [$i = 1, 2, \dots, P; j = 1, 2, \dots, N$] koefficienseknek a bázisgörbék mint vektorok által kifeszített minimális térfogatú szimplexen kell elhelyezkedniük a P dimenziós euklideszi térben [287].

4.3.4 ECD-spektroszkópiai mérések

Az ECD-mérések egy Jasco J810 spektrofotométeren lettek elvégezve. A FUV ECD-spektrumok esetében a 20-30 μM koncentrációjú fehérjeminta 1 mm átmérőjű kuvettában lett megmérve 185-260 nm között. A nyers ellipticitás adatok fényúthosszra és aminosav tagszámra lettek normalva ($[\Theta]_{\text{MR}}$, fok $\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$). NUV ECD-mérések esetében 10 mm átmérőjű kuvetta volt használva és a minifehérjékről 80-800 μM -os koncentráció tartományban 240-325 nm között lettek felvéve a spektrumok. A nyers NUV spektrumok ellipticitás adatai moláris ellipticitásra ($[\Theta]$, fok $\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) számoltuk

át. Az átváltásokhoz szükséges koncentrációk megadásához NanoDrop lite UV-VIS spektrofotométert használtunk. A koncentráció 3 párhuzamos mérés átlagaként lett meghatározva. Minden CD spektrum az oldószer alapvonalával korrigálva lett. A spektrumok felvételi sebessége (scanning speed) 50 nm/perc volt, az adatpontok felbontása (data pitch) 0,2 nm és a sáv szélesség (band width) 1 nm. Egy spektrum esetében 4 párhuzamos mérésorozat adatpontjai lettek kiátlagolva.

Hőmérsékletfüggés: A hőmérsékletfüggő mérések esetében Peltier típusú termosztátot használtunk. A távoli és közeli UV-tartományban a spektrumok 5 és 85 °C fok között lettek felvéve 5°C -os (FUV) illetve 2°C-os (NUV) lépésközönként. Ezáltal egy fehérjéről a FUV tartományban 17 spektrum, míg a NUV tartományban 41 spektrum lett felvéve. A CCA+ felbontás során a kettő minifehérje csoportról felvett hőmérséklet függő spektrumsorozatok lettek felbontva 2 komponensre. Az egyik csoport a 25 aminosavas minifehérjék: E5, E5_E14Q, E5_E14D, E5_R6N, E5_E14D_P17(4S)fP, E5_E14D_P17(4R)fP, E5_E14D_P24(4S)fP, E5_E14D_P24(4R)fP, E5_A4C_E14D_S25C. A másik csoportot a különböző hélix hosszúságú diszulfid-hidas/redukált minifehérjék alkották: E2, E2_SS, E2_2SH, E5, E5_SS, E5_2SH, E11, E11_SS, E11_2SH, E19, E19_SS, E19_2SH. A 2 komponensű dekonvolúció során a kapott egyik bázisgörbe a minifehérjék 4°C-os rendezett globuláris szerkezetére (rendezett/*folded* frakció – F), a másik bázisgörbe a 85°C-os rendezetlen szerkezetére (rendezetlen/*unfolded* frakció – U) jellemző.

Redukció kinetika: Az E19_SS peptid esetében *in situ* módon – a küvetében – lett a diszulfidhíd redukciója követve NUV ECD-spektrumok egységnyi időközönkénti felvételével 75 órán keresztül 15 °C-on. A fehérje koncentrációja 0,113 mM, az oldószer pH = 7-es foszfát puffer, a redukálószer 18-szoros feleslegben lévő TCEP volt. A 266-281-287-293 nm-en mért moláris ellipticitás $[\Theta]$ értékekből lett számolva az egyes t időpillanatokban a koncentráció az alábbi formula segítségével: $[SS]_t = \frac{[\Theta]_{\infty} - [\Theta]}{[\Theta]_{\infty} - [\Theta]_0} [SS]_0$, ahol $[SS]$ az oxidált fehérje t időbeli, illetve kiindulási koncentrációja, $[\Theta]_0$ a kiindulási oxidált minta; $[\Theta]_{\infty}$ az egyensúlyi/vég állapot; $[\Theta]$ t időbeli állapot moláris ellipticitása.

Aggregáció: A minifehérjék időfüggő aggregációját általánosan FUV ECD-mérésekkel követtük 25°C-on. A törzsoldatból vett minták 10-szeres hígítása és vortexelése után az ECD-mérések a korábban leírt általános protokoll alapján történtek. A törzsoldatok opálössége az aggregáció előrehaladtával – az amiloidszálak elongációja

miatt – megnőtt. A vortexelés során az idült amiloidszálak oly mértékben zúzódtak szét, hogy újra oldható formába kerültek. A hígítás tovább csökkentette az opaleszcenciát, valamint gátolta a vízóldható β -redős oligomerek újraasszociálását. Az ilyen módon preparált minta 4°C-on stabilan eltartható akár 1 hónapig az elvégzett ellenőrző kísérletek alapján. A CCA+ felbontás során az időfüggő amiloid aggregációs spektrumsorozaton kívül 2 tanító spektrumkészletet használtunk. Az egyik az E0 peptid hőmérsékletfüggése, amely a rendezetlen fehérjékre jellemző bázisspektrumot adja, a másik pedig a E5 hőmérsékletfüggése, amely a rendezett *Tc-foldra* jellemző bázisspektrumot adta. Így a 2 tanítóspektrum sorozat és az aggregációs kísérlet spektrumai (2*17 spektrum + n spektrum) három komponensre lettek felbontva, amely a 3 alábbi bázisgörbét eredményezte: 1) Rendezett (F) 2) Rendezetlen (U) 3) Amiloid (Amy). Az egyes spektrumok felbontást követő F/U/Amy aránya baricentrikus koordinátarendszerben lett ábrázolva. Az eltérő paraméterek között végrehajtott kísérletek a baricentrikus koordinátarendszerben megtett út alapján lettek jellemezve és összehasonlítva. Miután a E5 esetében a megfelelő aggregációs körülmények meg lettek határozva, a protokollhoz tartozó ECD-mérés sorozatot a továbbiakban az amiloid komponens tanítóspektrum sorozataként használtuk. A különböző E5 mutánsok és peptidek aggregációjának tanulmányozása esetében a felbontásokat már a három tanítóspektrum sorozat (F/U/Amy) felhasználásával végeztük el. NUV ECD-spektrumok felvétele során a törzsoldatból vett mintát csak vortexeltük, hígításra nem került sor, a mérések a korábban leírt protokoll alapján történtek.

Az ECD-minták előkészítését és mérését, valamint CCA+ programmal történő felbontását Taricska Nóra munkatársam végezte. Az E5 variánsok hőmérsékletfüggésének, valamint a SS-ciklizált variánsok eredményeinek kiértékelését és ábrázolását jómagam, míg az amiloid képződéshez köthető adatok kiértékelését és ábrázolását Taricska Nóra végezte.

4.4 Redukciókinetika modellezése

A diszulfidhidas peptidek esetében a spektroszkópai módszerek által monitorozott paraméterek alapján vizsgáltam a redukciók kinetikáját különböző körülmények között. A diszulfidhidak redukciója TCEP vagy DTT reagenssel SN_2 bimolekuláris nukleofil szubsztitúció, amely során mind a fehérje (SS), mind a

redukálószer (Red/RA) koncentrációja befolyásolja a redukció sebességét. A kinetikai paraméterek becsléséhez a COPASI 4.16 (Build 104) [288] biokémiai rendszer szimulátort használtam, amely paraméterezésében és az eredmények értelmezésében Keszei Ernő segített. Az oxidált/redukált peptidek koncentráció-idő függvényére Levenberg-Marquardt eljárás alapján illesztettem a görbéket. A később tárgyalt kinetikai modell alapján az alábbi mechanizmusokat vettem figyelembe: a fehérje redukciója ($SS + Red \xrightarrow{k_1} 2SH + Ox$), a fehérje visszaoxidációja ($2SH + O_2 \xrightarrow{k_2} SS$), a redukált fehérje kiválása ($2SH \xrightarrow{k_3} \emptyset$), illetve az O_2 diffúziója ($\emptyset \xrightarrow{k_4} O_2$). Ha egy sebességi együttható nagyságrendben jelentősen kisebb, a többihez képest, akkor azt a paramétert kivettem a modellből. A konfidencia intervallum félérték szélességét és az azon alapuló relatív szórásokat a becsült standard deviációkból számítottuk ki feltételezve, hogy a Student eloszlás $n - p$ szabadságfokú, ahol n az adatpontok száma és p a becsült paraméterek száma. Mivel a redukció másodrendű kinetikát mutatott a felezési időket az alábbi formula segítségével számoltam ki:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_1 (c_{Red,0} - c_{SS,0})} \ln \left(2 - \frac{c_{SS,0}}{c_{Red,0}} \right)$$

ahol a k_1 a redukció sebességi együtthatója, a $C_{SS,0}$ a kiindulási fehérje koncentráció, a $C_{Red,0}$ a kiindulási redukálószer koncentrációja. A formula azokban az esetekben használható, ha a $C_{Red,0} \geq C_{SS,0} \times 2$.

4.5 Az E19_SS fehérje inzulin szekréción vizsgálata

A diszulfidhíddal ciklizált E19_SS teljes agonistának vélt fehérje esetében Stráner Pállal vizsgáltuk az inzulin szekréción fokozó hatását in vitro INS-1E sejtvonalakon. A folyékony mitrogénben tárolt INS-1E sejt kultúrát a kiolvasztás után a standard protokoll szerint felszaporítottuk. A sejt kultúrát 37°C-on temperálva állandó médium csere mellett a tenyésztőflaska 80%-os borítottságáig növesztettük, majd passzáltuk. Az ötödik passzálást követően kezdtük meg a kísérleteket. Ekkor sejtszámolást végeztünk Trypan-blue festéssel Bruker kamrában. Az összejelzőszámot az alábbi képlettel határoztuk meg $N = n \times \text{hígítás} \times \text{sejtszuspenzió} \times 10^4$, ahol n két független sejtszámolás átlaga. A tenyésztő flakából 24 lyukú tesztlemeze passzáltuk a sejtszuspenzió 1 milliliterét. Folyamatos médiumcsere mellett megvártuk, míg az egyes lyukak sejt

borítottsága eléri a 80%-ot. A sejteket ekkor glükóz mentes RPMI 1640 médiumban CO₂ inkubátorban 2 órát inkubáltuk majd kétszeri KRBH mosás után fél óra elteltével 2,5 mM glükózt adtunk hozzá. Fél órás inkubáció után a lepipettázott és centrifugált felülúszót referenciaként használtuk fel. (alacsony glükóz szint melletti inzulin szekréció) Újabb KRBH mosás után fél óra elteltével 15 mM glükózt majd 20nM tesztelendő fehérjét pipettázunk sejtekre és fél órán át inkubáltuk a mintákat. (1 tálcához nem adunk fehérjét, ez lett az a kontroll csoport, ahol a magas glükóz koncentráció mellett elválasztott inzulin elválasztást mértük.) A lepipettázott, lecentrifugált felülúszó inzulin koncentrációját ELISA módszerrel határozzuk meg. Az ELISA méréseket a Mercodia kit protokollját követve végeztük el, az inzulin koncentrációkat kalibráció után az abszorbancia értékek alapján határoztuk meg. A kiértékelések során a párhuzamos mérések 2-2 legkisebb és legnagyobb értékét kizártuk az analízisből. A párhuzamos méréseket átlagoltunk és szórást számoltunk. Referenciaként pozitív kontrollként vizsgáltuk a bizonyítottan potens Exenatide, EDR és E19 minifehérjét, illetve a kompetitív antagonistát, inzulin elválasztást nem serkentő, N-terminálison csonkolt E10 és Tc5b minifehérjét, mint negatív kontroll.

4.6 Monomer E5 fehérjék molekuladinamika szimulációja

Az NMR-mérések alapján számolt $pH = 7$ -es (288K) fehérjék esetében molekuladinamikai számításokat is végeztünk az aggregációs protokollnak megfelelő körülmények között. A molekuladinamikai szimulációk kiindulása a számolt szerkezetek voltak, azonban a pH-tól függően, teoretikusan az egyes protonokat rögzítettük az aminosav oldalláncokon, így a deprotonálódás/protonálódás gátolva lett, tehát adott pH-n az egyes fehérjék töltésmintázata állandó. Az adott pH-n a fehérjék össztöltését a Protpi [289] szoftver segítségével határoztuk meg és az aminosavak átlagos protonálódási állandói alapján megbecsültük milyen töltéseloszlású mikroállapotok lehetnek a rendszerben a vizsgált pH-n. A molekula dinamikai szimulációkhoz GROMACS59 szoftvert használtunk AMBER-ff99SBildnp* erőterben. A TIP3P víz molekulákkal szolvatált monomer egy 12 oldalú dobozba lett elhelyezve, úgy, hogy minimum 10Å távolság legyen a fehérje és a doboz határa között. Az egyes szimulációs trajektóriák 1000 ns-ig futottak és minden 4. ps-ban a szerkezetről egy pillanatfelvétel készült. A trajektóriák szerkezetsokaságait távolság és az aromás oldalláncok egymáshoz

viszonyított térállását leíró paraméterekkel jellemeztük, majd vizsgáltuk az adatok eloszlását. A molekula dinamikai szimulációkat Ákontz-Kiss Hanna végezte, az adatokat együtt dolgoztuk fel.

4.7 Egyéb biofizikai és molekuladinamikai módszerek

A doktori dolgozat terjedelmére tekintettel az alábbi módszerekről csak dióhéjban szeretnék értekezni kihangsúlyozva, hogy az egyes módszerek milyen célból lettek alkalmazva. A felsorolt vizsgálatok eredményei segítenek komplexet képet adni az aggregációs folyamatokról és a kialakult amiloid morfológiájáról.

- 1) DLS. Az aggregációs protokoll alapján elkészített E5 minta oligomerizációját dinamikus fényszórás technikával monitoroztam. A kísérletek elvégzésében Fülöp Viktor (SE – Gyógyszerészeti Intézet) segített. Céлом a DLS mérésekkel az aggregáció során a részecskeméret eloszlásának jellemzése volt. A méréseket egy ZetaSizer Nano ZS készüléken végeztem. A mérésekhez szükség volt a minta abszorbanciájának ($ABS_{532nm} = 0,04851$) és refraktív indexének ($RI = 1,333$) meghatározására. A méréseket $5^{\circ}C$ -on végeztük, a lézer pozíciója 3,5 mm-nél volt rögzítve. Minden mintavételezéskor 2 méréssorozatot rögzítettünk egyenként 100-100 scannel. A mérések „protein function” módban történtek. Az egyes mérések során a polidiszperzitás indexet (PDI), az átlagos méretet (Z-average size) és az intenzitások méreteloszlását követtük.
- 2) AFM. Az atomerő mikroszkópia segítségével ugyancsak az aggregáció során kialakuló részecskék morfológiája lett vizsgálva. A méréseket Gyulai Gergő végezte az ELTE Kémiai Intézetének Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriumában.
- 3) TEM. Az E5 idült amiloidszálairól transzmissziós elektron mikroszkópos felvétel is készült. A méréseket az Osakai Egyetem Fehérje Kutató Intézetében végezték el.
- 4) Röntgendiffrakció. A E5 aggregációért felelős központi szekvencia részletéből (LYIQWL peptid) sikerült tűkristályokat növesztetni, szimplán a HPLC tisztítás során eluálódott főcsúcs acetónitriles-vizes elegyéből $4^{\circ}C$ -on. Dürvanger Zsolt a csoport Krisztallográfiai Laboratóriumának munkatársa végezte a

röntgendiffrakciós méréseket, az elektronsűrűség térképek feldolgozását és a szerkezet meghatározását.

- 5) Molekula dinamikai szimulációk. A szimulációk során egyrészt modelleztük az NMR és ECD-eredmények alapján, hogy az E5 esetében az átalakult β -redős fehérjeszálak milyen lehetséges módokon asszociálhatnak és ez milyen amiloid térszerkezetet eredményezhet. A szimulációkat és azok kiértékelését Ákontz-Kiss Hanna végezte.
- 6) Természetesen a végállapotra, az E5 amiloid rostok atomi felbontású térszerkezetére is kíváncsiak voltunk. Ehhez Brnóban cryo-EM méréseket, illetve Osakában szilárd fázisú NMR-méréseket végeznek. Ezek a vizsgálatok és feldolgozásuk azonban még folyamatban van.

5. Eredmények

5.1 Szintetizált peptidok jelölése és szekvenciája

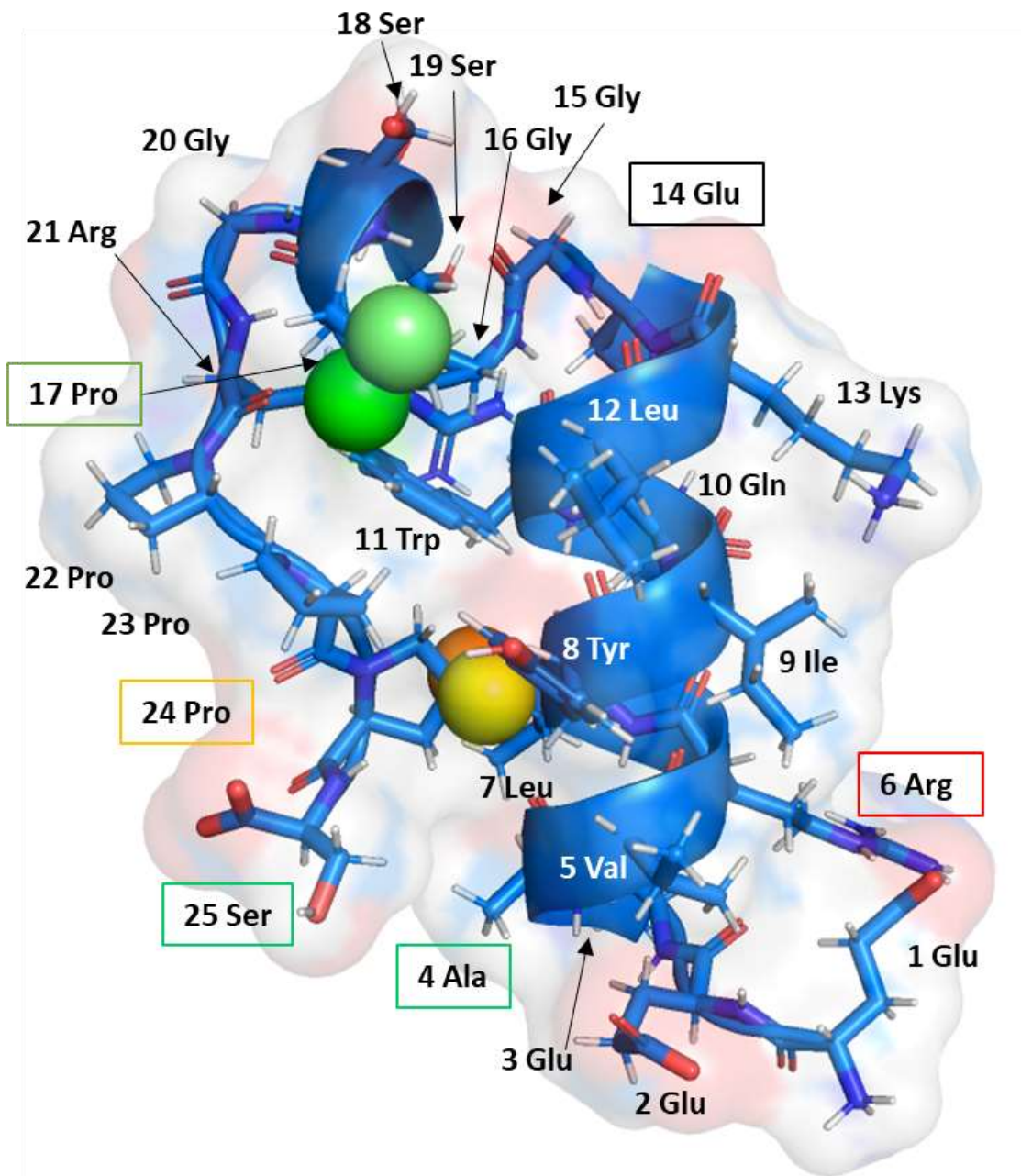
A munkám során előállított peptidok neve és aminosav szekvenciája a 2. táblázatban van felsorolva. (**2. táblázat**) A triptofán-kalitikára jellemző *fold*, az aminosavak, valamint az elvégzett szubsztitúciók szerkezetben belüli lokalizációja a **13. ábrán** van bemutatva.

1. táblázat. A szintetizált peptidok nevezéktana és szekvenciája. A 25 aminosavas peptidok esetében az itt bevezetett színkódot alkalmazom a doktori értekezésem során. A fluor szubsztituált peptid párok esetében a világosabb a (4*S*) a sötétebb a (4*R*) konfigurációnak felel meg. A szekvenciákban **vastag betűvel** az aminosav szubsztitúciók vannak jelölve, míg aláhúzással az -S-S- kötést kialakító ciszteinek vannak kiemelve. A diszulfidhidas variánsoknál az oxidált származék SS míg a redukált származék 2SH jelöléssel vannak ellátva. A 13-as peptid kivételével az N/C-terminálisok szabadak.

peptid neve	peptid szekvencia
Irodalmi példák	
GLP-1	HAEG TFTSD VSSYL EGQAA KEFIA WLKVG RG
Exenatide	HGEG TFTSD LSKQM EEEAV RLFIE WLKNG GPSSG APPPS
Tc5b	NLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS
25 aminosav hosszúságú E5 variánsok	
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

Diszulfidhíddal stabilizált eltérő α -hélix hosszúságú Exenatide származékok

E2_SS/E2_2SH	CV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC
E5_SS/E5_2SH	EEECV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC
E11_SS/E11_2SH	D LSKQM EEECV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC
E19_SS/E19_2SH	HGEG TFTSD LSKQM EEECV RLYIQ WLKDG GPSSG RPPPC
E5 szekvencia részletek amelyek az aggregációért felelősek	
Aggregációs core peptid	LYIQ WL
13-as helikális peptid	EEEAV RLYIQ WLK-NH ₂



13. ábra. Az E5 minifehérje 4°C-os szerkezete. A peptidgerinc *cartoon* modellje mellett az oldalláncok *stick* formában vannak feltüntetve. Az oxigén atomok vörössel, a nitrogén atomok kézzel, a hidrogén atomok fehérrel vannak kiemelve. Az egyes elvégzett szekvenciális szubsztitúciókat az aminosavak bekeretezésével jelöltem. A 17 prolin γ -pozíciójában a (4*R*) fluor szubsztitúció sötétzölddel, míg a (4*S*) fluor szubsztitúció világoszölddel van kiemelve. A 24 prolin esetében a (4*R*) fluor szubsztitúció narancsszínnel, míg a (4*S*) fluor szubsztitúció citrom sárgával van szemléltetve. A minifehérje felülete részleges átláthatóság (80%) mellett van feltüntetve.

5.2 25 aminosav hosszúságú E5 variánsok térszerkezetének kombinált spektroszkópai módszerekkel történő jellemzése

5.2.1 NOESY-kényszerfeltételek alapján meghatározott térszerkezetek és jellemzésük

Ebben a fejezetben összefoglalom az E5 variáns peptidek hőmérséklet függése során megfigyelt szerkezeti és spektroszkópai változásokat. 50 homonukleáris spektrumhármast teljes asszignációját és az azon alapuló szerkezetszámolást végeztem el.

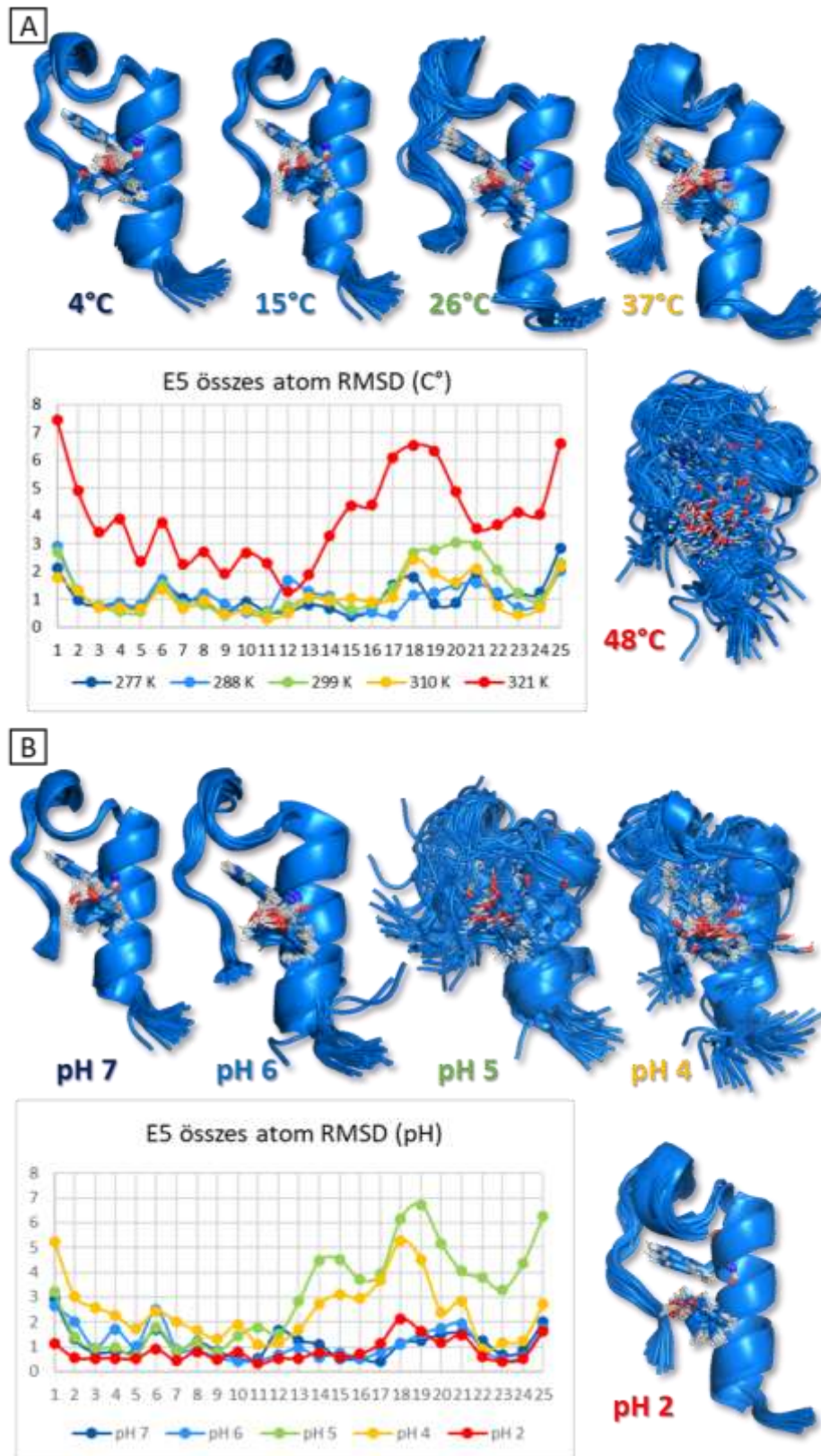
2. táblázat. Asszignált keresztcsúcsok száma és gerincatom RMSD értékek.

minifehérje	Szerkezetek						RMSD*
	Asszignált csúcsok						
	T	$i=0$	$i=1$	$1 < i < 5$	$i > 5$	Σ_j	
E5	4°C	299	141	148	78	666	0,376
	15°C	282	116	118	63	579	0,462
	26°C	278	104	87	48	517	0,280
	37°C	260	91	68	39	458	0,327
	48°C	133	37	35	16	221	1,006
E5_E14D	4°C	344	167	185	91	787	0,071
	15°C	311	149	153	75	688	0,137
	26°C	292	121	128	56	597	0,145
	37°C	264	150	175	77	666	0,161
	48°C	244	106	106	75	531	0,372
E5_E14Q	4°C	308	138	78	45	569	0,358
	15°C	272	98	68	46	484	0,255
	26°C	242	49	27	23	341	0,335
	37°C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	48°C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
E5_A4C_E14D_S25C	4°C	358	183	192	144	877	0,124
	15°C	332	168	147	104	751	0,172
	26°C	321	147	174	95	737	0,223
	37°C	316	125	139	92	672	0,185
	48°C	307	112	120	83	622	0,180
E5_R6N	4°C	285	135	133	77	630	0,167
	15°C	250	90	79	54	473	0,231
	26°C	243	76	47	28	394	0,485
	37°C	226	47	17	22	312	0,452
	48°C	145	12	8	11	176	0,866
E5_E14D_P17(4S)FP	4°C	322	141	165	105	733	0,138
	15°C	314	140	143	64	661	0,118
	26°C	283	179	181	77	720	0,119
	37°C	299	137	180	83	699	0,178
	48°C	157	52	51	47	307	0,575
E5_E14_P17(4R)FP	4°C	337	143	144	77	701	0,160
	15°C	309	139	137	74	659	0,126
	26°C	295	135	149	70	649	0,093
	37°C	242	98	100	47	487	0,179
	48°C	232	65	56	31	384	0,474
E5_E14D_P24(4S)FP	4°C	305	135	141	65	646	0,122
	15°C	294	108	107	45	554	0,170
	26°C	262	80	76	33	451	0,238
	37°C	206	32	47	14	299	0,332
	48°C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
E5_E14D_P24(4R)FP	4°C	310	173	175	75	733	0,176
	15°C	322	146	127	51	646	0,199
	26°C	294	151	153	35	633	0,273
	37°C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	48°C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

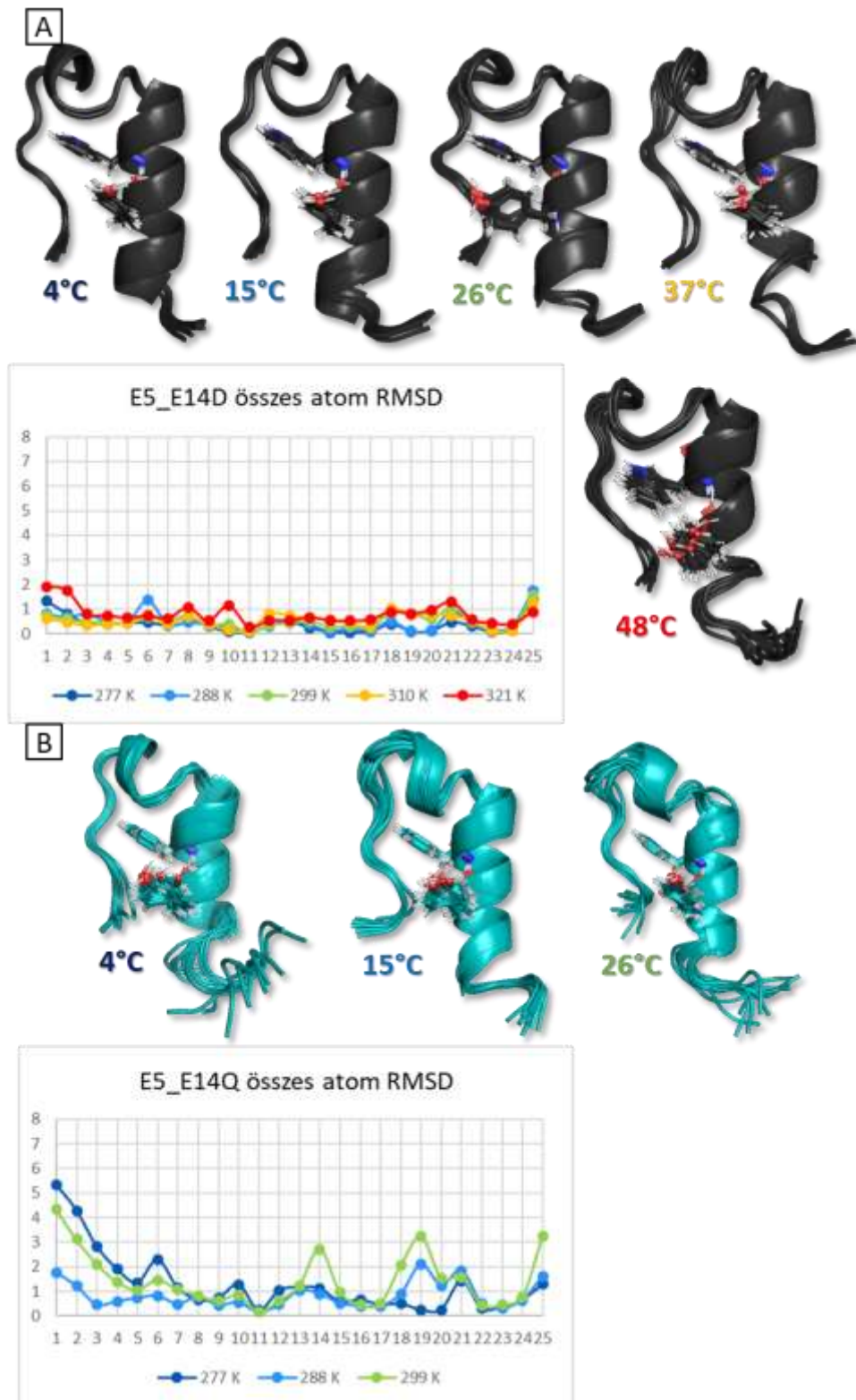
interreziduális szekvenciális ($i = 1$), közeli ($1 < i < 5$), és távolható ($i > 5$) keresztcsúcsok

Spektrumonként átlagosan 200-900 NOESY-keresztcsúcsot asszignáltam. (3.

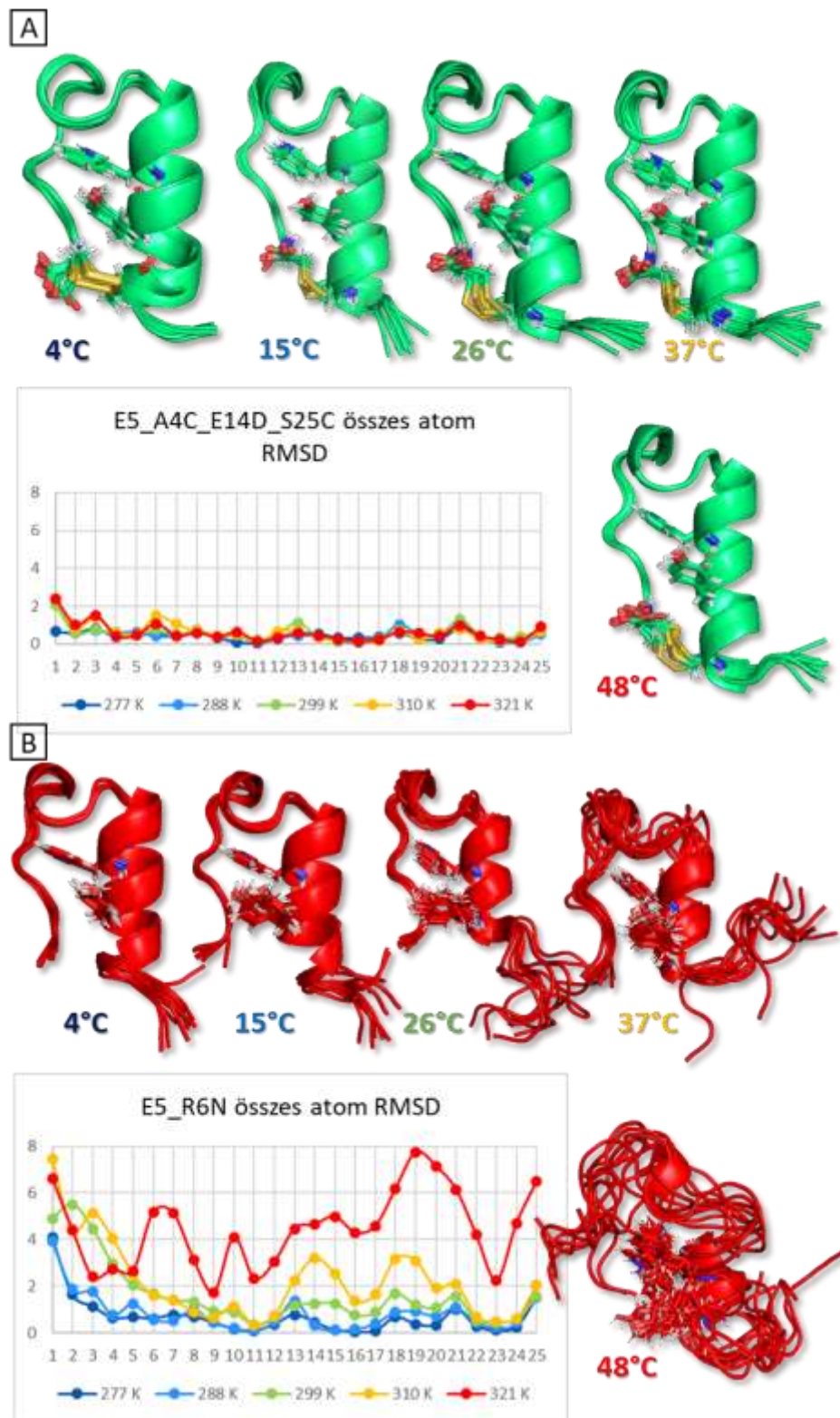
táblázat) A lépcsőzetes hőmérsékletnövelés következtében az egymást követő spektrumokon csak kisebb elmozdulások történtek a kémiai eltolódásokban, lehetővé téve, hogy a 25°C feletti, jelszegény spektrumok asszignációját is elvégezhessem az alacsonyabb hőmérsékleten felvett spektrumok jelminiózata alapján. Egyes esetekben a homonukleáris spektrum-hármast jelhiány miatt nem volt asszignálható, amelyet a táblázatban *n.a./nincs adat* jelöléssel láttam el. Az egyes E5 mutánsokat a vizsgált hőmérsékleteken (4/5°C, 15°C, 25°C, 37°C, 48°C) jellemzem az adott hőmérséklethez tartozó 10 tagú szerkezetsokaságokkal és átlagszerkezettel. (14-18. ábra) A hőmérséklet növelés hatására történő szerkezet fellazulást az RMSD értékekkel és az asszignált NOESY-keresztcsúcsokkal is számszerűsítem. A NOESY-keresztcsúcsok kategorizálva vannak intrareziduális ($i = 0$),



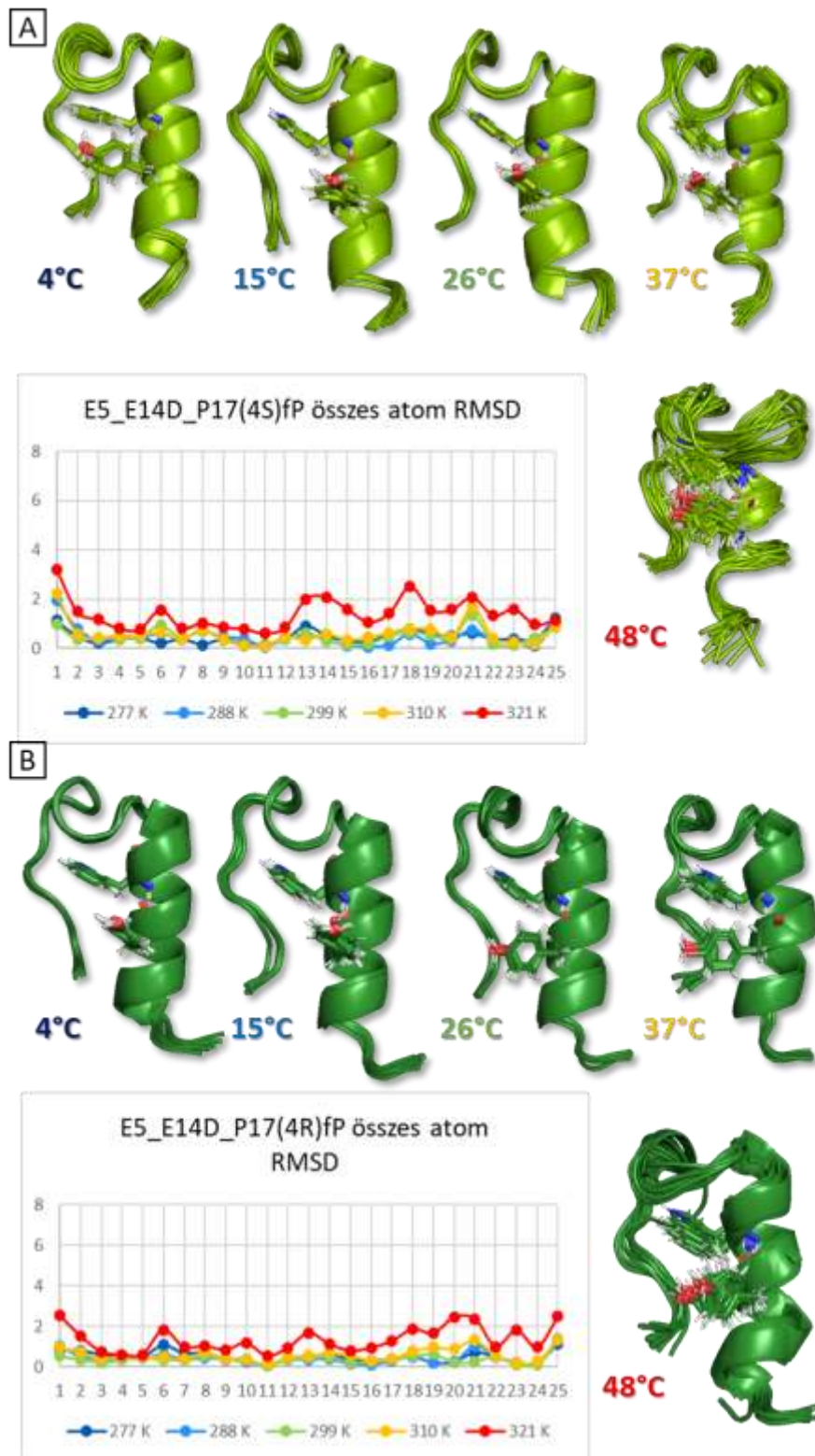
14. ábra. Az E5 minifehérje számolt térszerkezetei A) a hőmérséklet ($pH = 7$) B) a pH függvényében (15°C). A szerkezetsokaságokban a Tyr8 és Trp11 oldallánca van kijelölve. A grafikon a szekvencia mentén (x-tengely) az egyes aminosavak összes atom RMSD értékét (y-tengely (\AA)) mutatja.



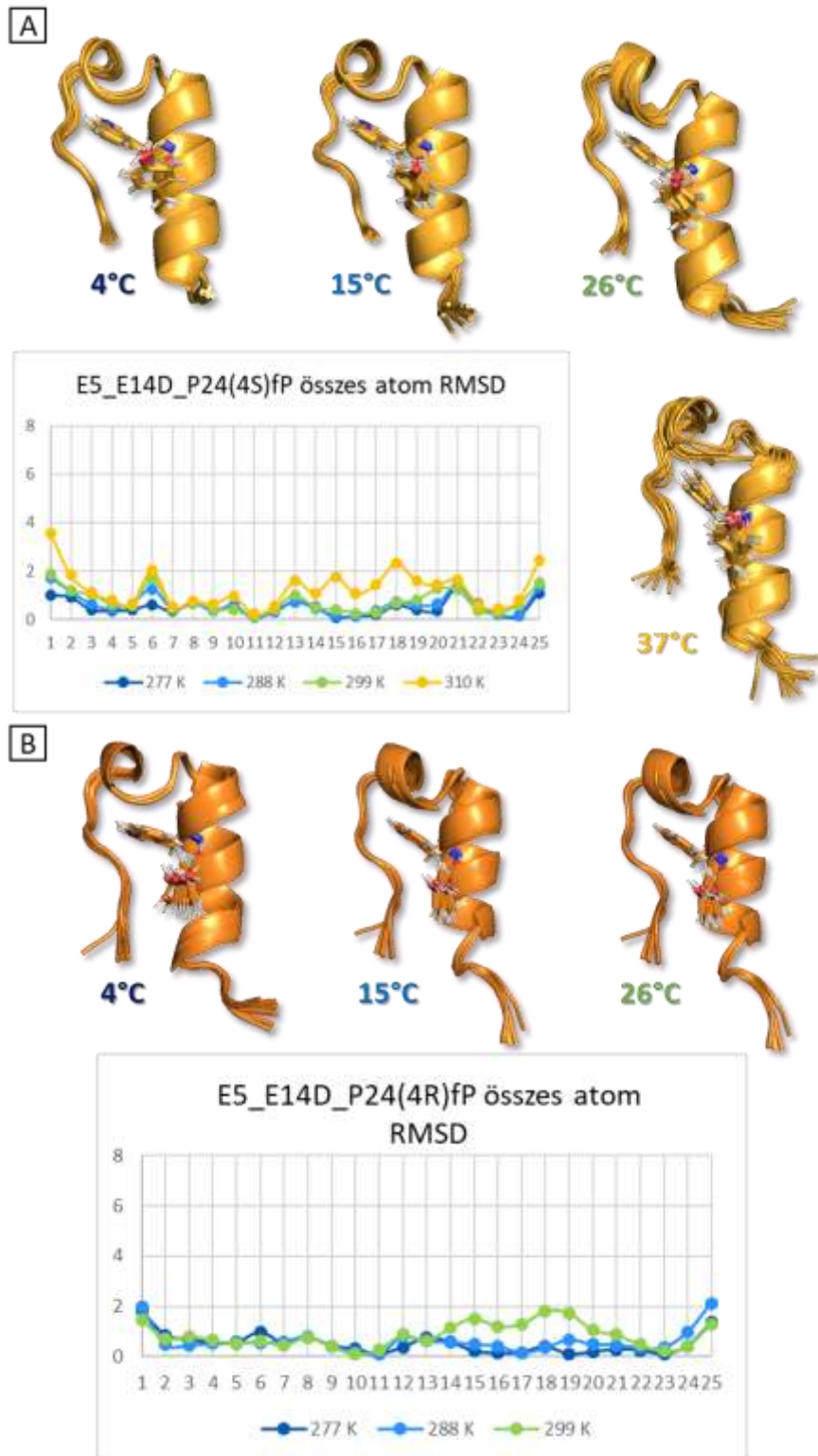
15. ábra. A) Az E5_E14D és az B) E5_E14Q minifehérje számolt térszerkezetei a hőmérséklet függvényében. A szerkezetsokaságokban a Tyr8 és Trp11 oldallánca van kijelölve. A grafikon a szekvencia mentén (x-tengely) az egyes aminosavak összes atom RMSD értékét (y-tengely (Å)) mutatja.



16. ábra. A) Az E5_A4C_E14D_S25C és az B) E5_R6N minifehérje számolt térszerkezetei a hőmérséklet függvényében. A szerkezetsokaságokban a Tyr8 és Trp11 oldallánca, illetve az E5_A4C_E14D_S25C esetében a Cys4 és Cys25 van kijelölve. A grafikon a szekvencia mentén (x-tengely) az egyes aminosavak összes atom RMSD értékét (y-tengely (Å)) mutatja.



17. ábra. A) Az E5_E14D_P24(4S)fP és az B) E5_E14D_P24(4R)fP minifehérje számolt térszerkezetei a hőmérséklet függvényében. A szerkezetsokaságokban a Tyr8 és Trp11 oldallánca van kijelölve. A grafikon a szekvencia mentén (x-tengely) az egyes aminosavak összes atom RMSD értékét (y-tengely (Å)) mutatja.



18. ábra. A) Az E5_E14D_P24(4S)fP és az B) E5_E14D_P24(4R)fP minifehérje számolt térszerkezetei a hőmérséklet függvényében. A szerkezetsokaságokban a Tyr8 és Trp11 oldallánca van kijelölve. A grafikon a szekvenca mentén (x-tengely) az egyes aminosavak összes atom RMSD értékét (y-tengely (Å)) mutatja.

alapján, ahol i a kölesönható protonok szekvenciális távolsága. **(3. táblázat)** Az E5 minifehérje esetében a hőmérsékletfüggés mellett a pH függvényében is vizsgáltam a bekövetkező konformáció változásokat. Az E5 konformációs állapotait 50 tagú szerkezetsokaságokkal határoztam meg, amelyekről az E5 amiloid aggregációja során adok részletesebb leírást. Az összes atomra vonatkozó RMSD értékekkel is jellemeztem az egyes fehérje szerkezetsokaságokat a szekvenciájuk mentén. **(14-18. ábra)** A diagrammok alapján meg lehet állapítani, hogy mely szegmensek azok, ahol a konformáció fellazulása elsőként bekövetkezik. A különböző variánsok hőmérsékletfüggő átlagszerkezeteinek esetében a gerinc-konformációt jellemző ϕ és ψ torziós szögeket Ramachandran diagramon ábrázoltam, **(kiegészítő ábra 1-2.)** melyeknek több mint 90%-a Ramachandran diagram „előnyös” régiójába esett. A helikális szakasz torziós szögparjai a jobbmenetes α -hélixnek megfelelő régióban ($-75 < \phi < 30$ és $-120 < \psi < -30$), az –RPPP– szekvencia részlet szögparjai pedig a poliprolin-hélixnek megfelelő régióban ($\phi = \sim 65$; $\psi = \sim 140$) helyezkedtek el, igazolva szerkezeti besorolásukat. A glicin aminosavak torziós szögei az oldallánc hiányából eredő nagyobb konformációs szabadság miatt csak a megengedett régiókba esnek jelentősen távolabb a többi aminosav lokalizációjától. (Gly15, Gly20: $\phi = \sim -30$; $\psi = \sim 135$; 16 Gly: $\phi = \sim 150$; $\psi = \sim 60$) Ez összhangban van a glicinek „csapágy”-szerű jellegével, ugyanis az egyes másodlagos szerkezeti elemek határát az E5 szekvenciában (α -hélix, 3_{10} -hélix, poliprolin-hélix) a fent felsorolt glicinek képzik. A hőmérséklet növelésével – párhuzamosan a denaturációval – egyes esetekben (Glu2, Glu3, Ser18, Ser19) az „előnyös”-ből a „megengedett” régiókba tolódtak el a ϕ - ψ szögparok értékei.

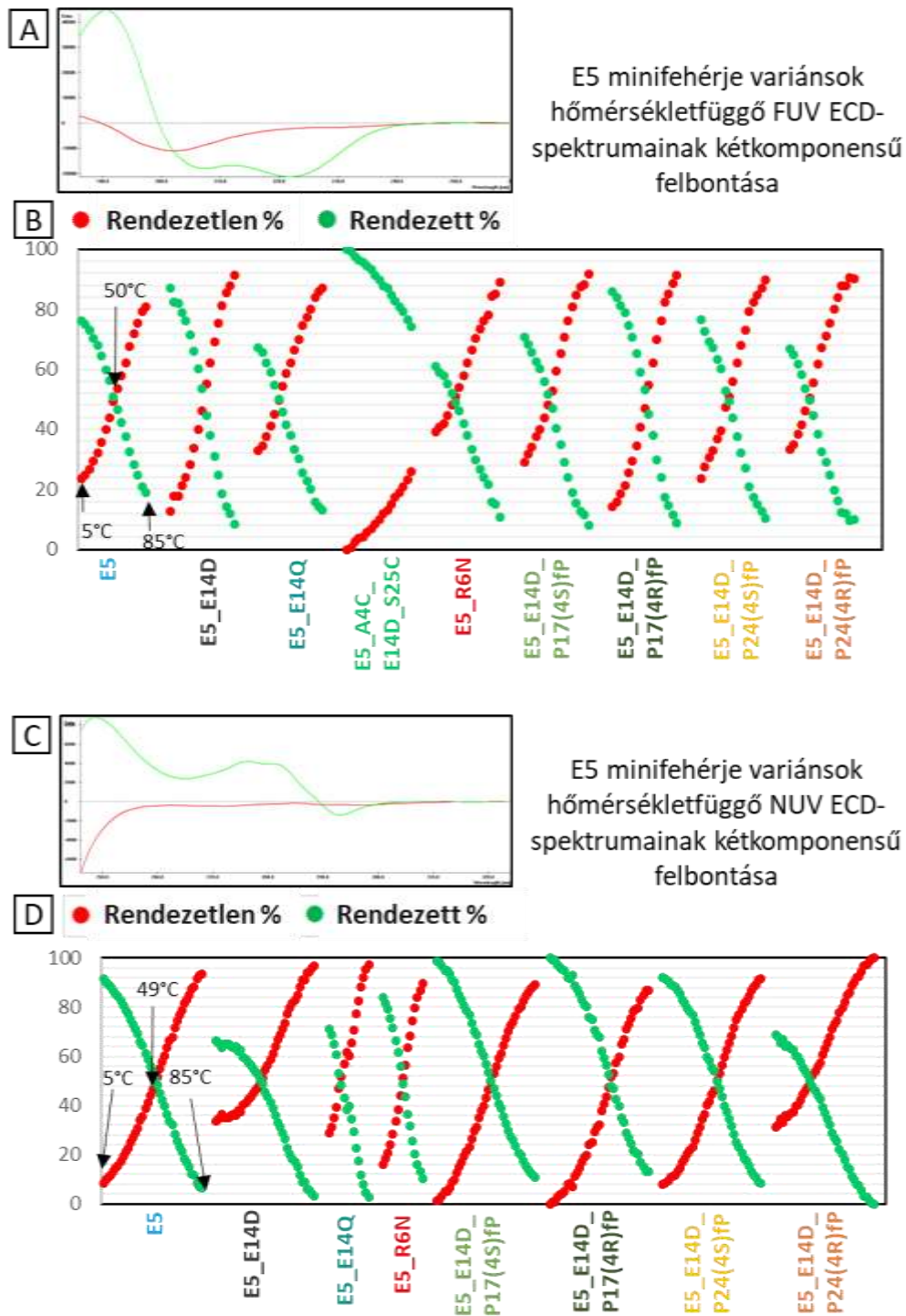
5.2.2 Az E5 variánsok szerkezetének jellemzése spektroszkópiai módszerek által meghatározott paraméterek alapján.

Az egyes fehérjék szerkezeti egységeit (α -hélix, Tc) a másodlagos kémiai eltolódások alapján jellemeztem 4-15-26-37-48 °C-on. A Glu2-től a Lys13-ig tartó helikális régiót a H α protonok másodlagos kémiai eltolódás összegével jellemeztem. (CSD_{hélix} 2-13) A Trp-kalitka jellemzésére bevezetett (CSD_{cage}) értéket a korábban leírtakhoz képest egy kis mértékben módosítani kellett. Az elemzésből kihagytam a 17PH β 2 és P24H δ 1 és P24H δ 2 (E5-nek megfelelő számozás) protonok kémiai

eltolódását. Ezen prolinok γ pozíciójában történt a fluor szubsztitúciója. Erre azért volt szükség, mert a fluor szubsztituált prolin variánsok esetében a fluor lokálisan nagymértékben megváltoztatja a kötések mentén a szomszédos protonok kémiai eltolódását. Mivel nem találtam irodalmi adatokat fluoro-prolinok random (rendezetlen szerkezethez tartozó) kémiai eltolódás értékeiről, így, ha a természetes prolin értékei alapján számoltam volna, akkor a térszerkezet rendezettségével korreláló CSD_{cage} adat torzult volna a fluor kompenzálatlan lokális hatásából eredő taggal. A számolt $CSD_{hélix 2-13}$ és a CSD_{cage} értékeket táblázatosan és a hőmérséklet függvényében grafikon formában adom meg. **(20-22. ábra, 1. kiegészítő táblázat.)**

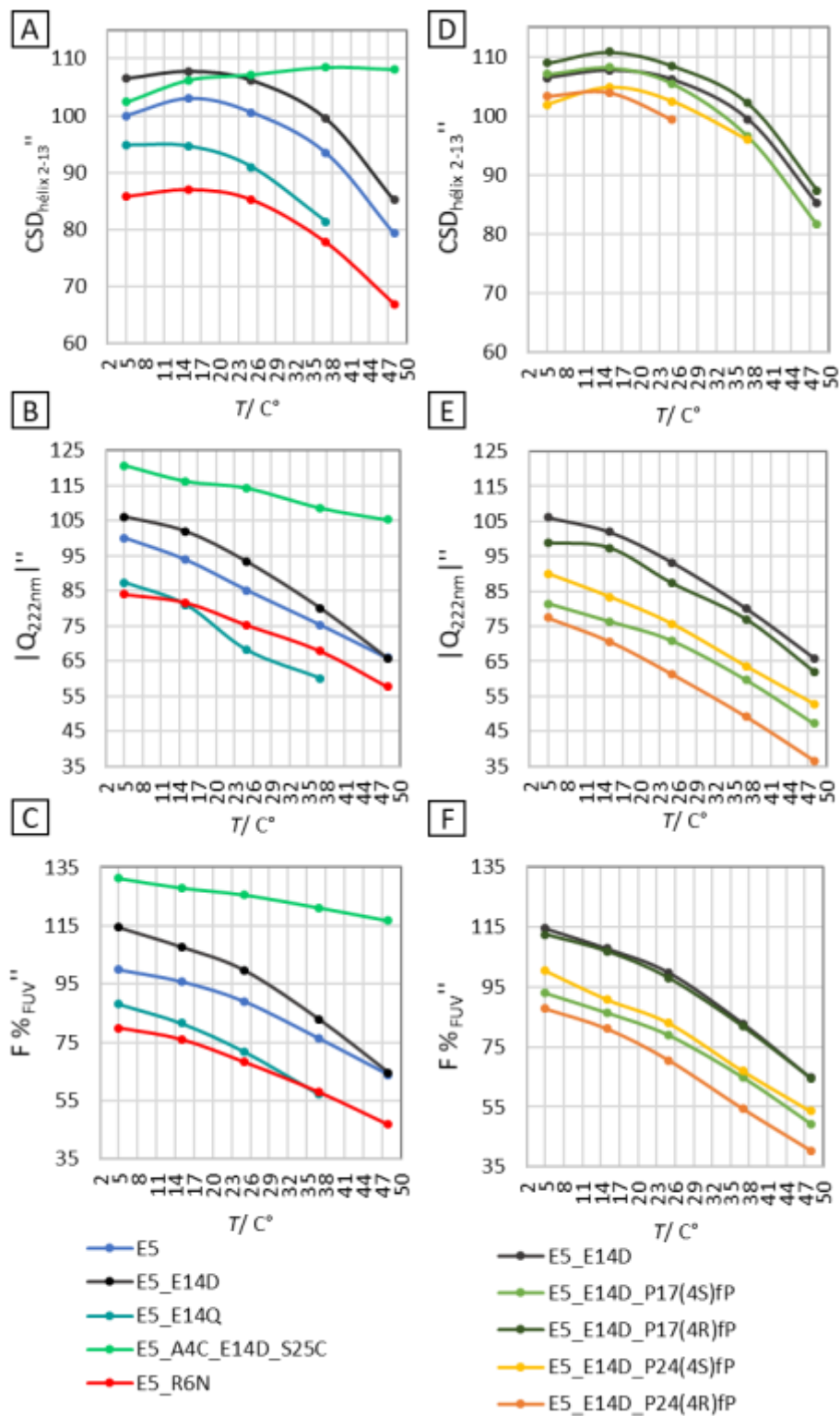
Távoli UV-tartományban 5-85°C között felvett ECD-görbék a **3-4. kiegészítő ábrákon** foglaltam össze. A hőmérséklet növelés hatására az összes peptid esetében különböző mértékben, de csökken a rendezettség. Ez az $n \rightarrow \pi^*$ (~222 nm) és a $\pi \rightarrow \pi^*$ (~190 nm) sávok abszolút intenzitásának a csökkenésével követhető nyomon. A rendezett \rightarrow rendezetlen átmenet izodichroikus pontja 202 nm közelében található. A hőmérsékletfüggő FUV ECD-spektrumokat célszerű számszerűsíteni megfelelő mérőszámok megadásával, a könnyebb összehasonlítás érdekében. Ehhez egyrészt a fehérje helicitásával arányos 222 nm-en mért moláris ellipticitás értékeit használtam fel **(5. kiegészítő ábra)**, másrészt a rendezett komponens (C típusú spektrum) a számított százalékos arányát. (kétkomponensű felbontás során) A kétkomponensű felbontás során az alábbi hőmérsékletfüggő FUV ECD-spektrumsorozatokat vettem alapul: E5, E5_E14D, E5_E14Q, E5_A4C_E14D_S25C, E5_R6N, E5_E14D_P17(4S)fP, E5_E14D_P17(4R)fP, E5_E14D_P24(4S)fP, E5_E14D_24(4R)fP. **(19. ábra)**

A közeli UV-tartományban felvett ECD-spektrumokat **(6-7. kiegészítő ábrák)** az egyes hullámhosszokon (276 nm, 280nm, 287nm, 293nm – **8-11. kiegészítő ábrák**) mért ellipticitás értékeivel és a kétkomponensű felbontás során kapott rendezett/rendezetlen komponens arányával jellemzem ugyancsak. Mivel a NUV spektrumon egyértelműen látszik, hogy az E5_A4C_E14D_S25C minifehérje esetében a diszulfidhíd spektrális hozzájárulása miatt a görbe alakja jelentősen eltér a többi minifehérjére jellemző Tyr-Trp kölcsönhatásra jellemző görbétől, emiatt ezt kihagytam a felbontásból. (Az E5, E5_E14D, E5_E14Q, E5_R6N, E5_E14D_P17(4S)fP, E5_E14D_P17(4R)fP, E5_E14D_P24(4S)fP, E5_E14D_24(4R)fP spektrumokat bontottam fel - **19. ábra**)

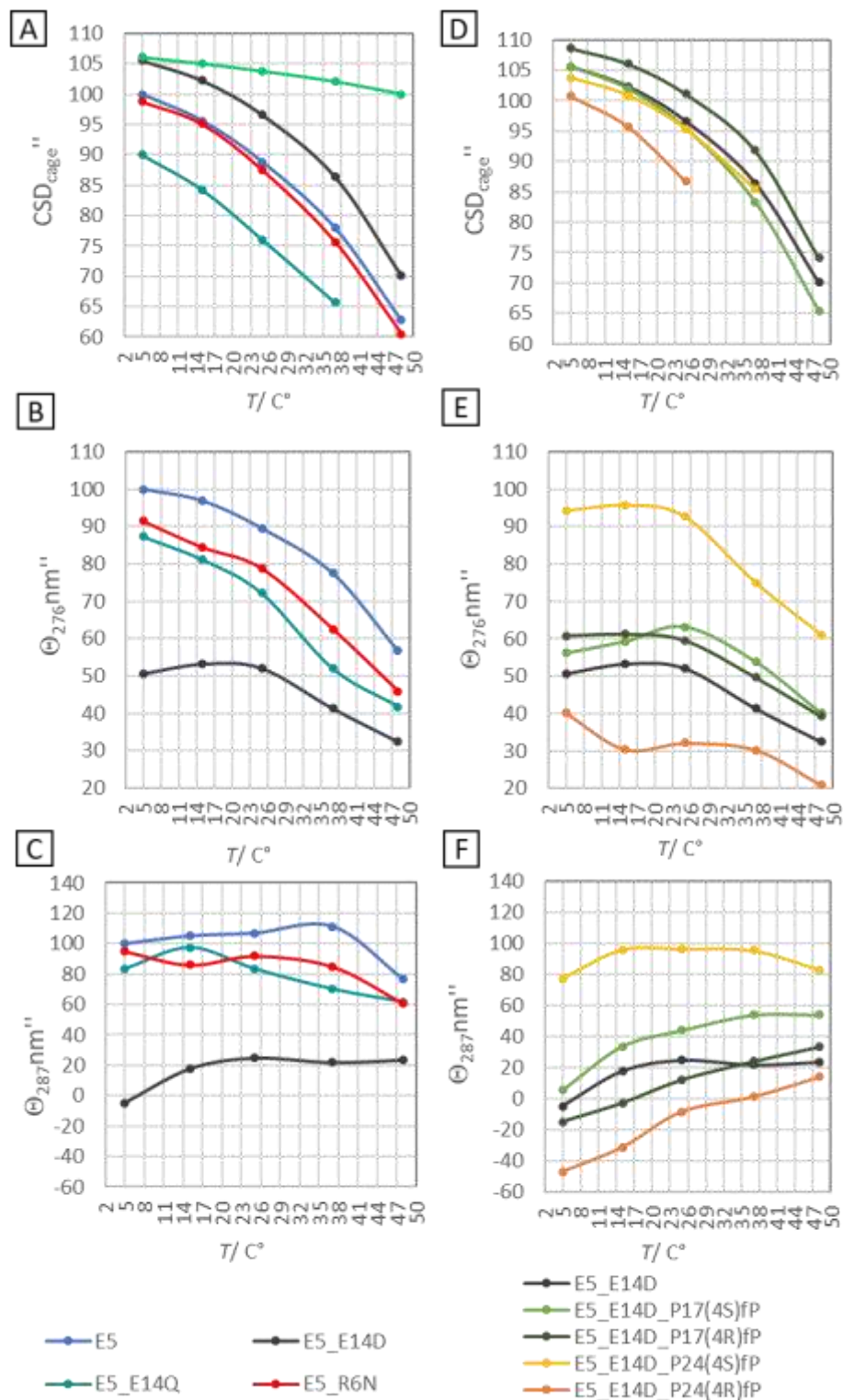


19. ábra. A dekonvolúciós folyamat során a **rendezett** és **rendezetlen** térszerkezethez meghatározott A) FUV ECD, C) NUV ECD-bázisgörbék. B-D) Az egyes komponensek aránya a hőmérséklet függvényében. A FUV ECD (B) esetében az egyes minifehérjék első pont párai az 5°C-hoz tartoznak, a pontok 5°C-os egységenként változnak egészen 85°C-ig. A 10. pont (50°C fok) jelöli az NMR-mérések határát. A NUV ECD (D) esetében, a pontok 2°C-os* egységenként változnak. A 23. pont* (49°C fok) jelöli az NMR-mérések határát. (*E5_E14Q és E5_R6N esetében 5°C-os egységenként változik és a 10. pont jelöli az 50°C-ot.)

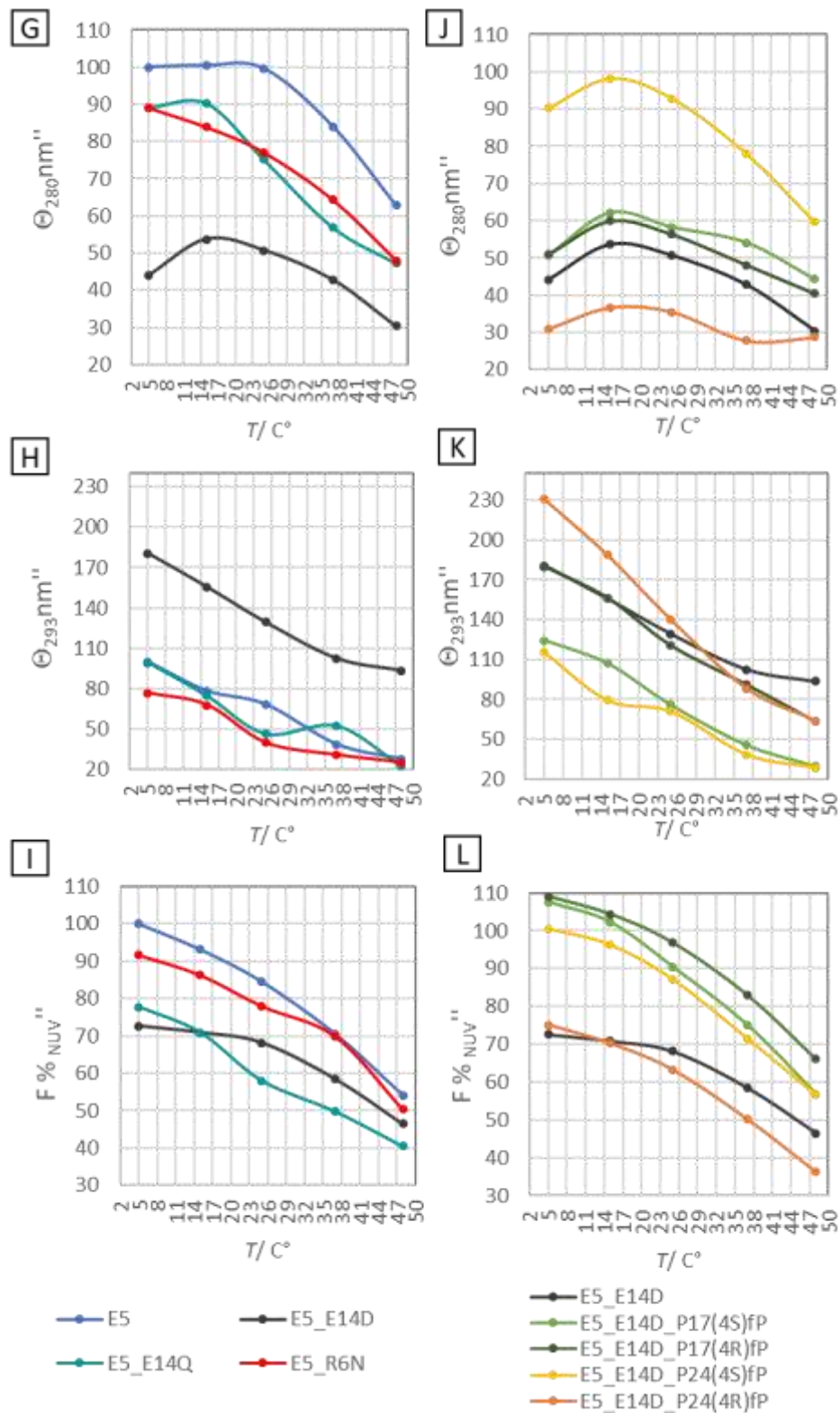
A kombinált ECD/NMR-spektroszkópiai adatok elemzése során megvizsgáltam, hogy az E5 minifehérjék esetében az α -hélix rendezettségére, valamint a triptofán-kalitka harmadlagos szerkezetére jellemző különböző eredetű spektroszkópiai adatok milyen mértékben korrelálnak egymással, illetve ekvivalens-e az információ tartalmuk. Az összehasonlítást 4/5°C, 15°C, 25/26°C, 37°C és 48°C végeztem el. Az α -hélix rendezettségének/helicitásnak mérőszámai: $CSD_{\text{hélix } 2-13}$; $[\Theta]_{222\text{nm}}$, $F_{\text{FUV}}\%$ (FUV ECD rendezett komponense). A triptofán-kalitka rendezettségének/kompaktságának a mérőszámai: CSD_{cage} , $[\Theta]_{276\text{nm}}$, $[\Theta]_{287\text{nm}}$, $[\Theta]_{280\text{nm}}$, $[\Theta]_{293\text{nm}}$, $F_{\text{NUV}}\%$ (NUV ECD rendezett komponense). **(1. kiegészítő táblázat)** Mivel a különböző mérőszámoknak eltérő a dimenziója, így célszerűbbnek láttam viszonyított-relatív értékek bevezetését. Az egyik megközelítés során egy fehérjéről felvett hőmérsékletfüggő adatsorozat minden elemét a kiindulási – legalacsonyabb hőmérsékletű adathoz – viszonyítottam, ez alapján megállapítható, hogy az adott fehérjének a rendezett natív állapotához képest milyen mértékben csökkent a rendezettsége: $X' = \frac{X_y^T}{X_y^{4^\circ\text{C}}} \times 100\%$ ahol X a mért adat, Y a minifehérje variáns, T a hőmérséklet. Így 100%-nak fog megfelelni minden minifehérje 4-5°C-on mért minden egyes értéke. **(2. kiegészítő táblázat)** A másik esetben minden hőmérsékletfüggő értéket a kiindulási szekvenciájú E5 4°C-on mért megfelelő értékéhez viszonyítottam: $X'' = \frac{X_y^T}{X_{E5}^{4^\circ\text{C}}} \times 100\%$. **(3. kiegészítő táblázat)** A relatív értékek alapján könnyedén megállapítható, hogy a vizsgált fehérjében hány százalékos a rendezettség – vagy a detektált jelenség – a referencia natív E5-höz képest az. (E5 értékei 4°C-on lesznek a 100%) Amenyibben egy minifehérje értéke 100% felett lesz akkor az adott körülmények között rendezettebbnek számít, mint a natív E5. A minifehérjék helikális szegmensét jellemző paraméterek a **20. ábrán**, míg a triptofán-kalitkára, illetve a Tyr-Trp kölcsönhatását leíró adatok hőmérsékletfüggései a **21. ábrán** vannak összefoglalva.



20. ábra. A minifehérjék helikális szegmensének jellemzése a normált spektroszkópiai adatokkal (X'' %) 4-48°C között A-C) az E5 variánsok B-F) a fluor szubsztituált E5 variánsok esetében. Az adatok a 3. kiegészítő táblázatban táblázat formában is megtalálhatóak. NMR-adat: A, D, FUV ECD-adat: B, C, E, F.



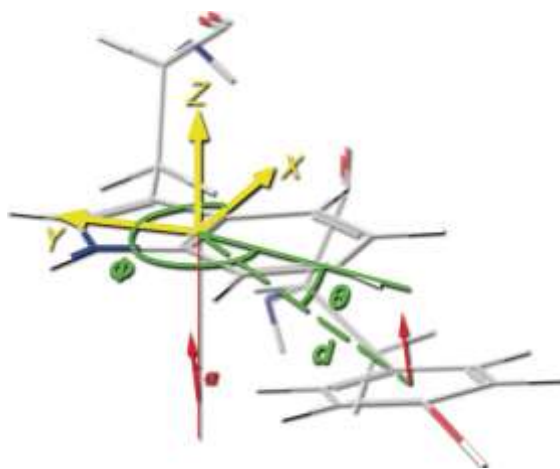
21. ábra A minifehérjék triptofán-kalitka jellemzése a normált spektroszkópiai adatokkal (X'' %) 4-48°C között A-C) az E5 variánsok B-F) a fluor szubsztituált E5 variánsok esetében. Az adatok a 3. kiegészítő táblázatban táblázat formában is megtalálhatóak. NMR-adat: A, D, NUV ECD-adat: B (276 nm), C (287 nm), E (276 nm), F (287 nm).



21. ábra folytatása. A minifehérjék triptofán-kalitka jellemzése a normált spektroszkópiai adatokkal (X° %) 4-48°C között G-I) az E5 variánsok J-L) a fluor szubsztituált E5 variánsok esetében. Az adatok a 3. kiegészítő táblázatban táblázat formában is megtalálhatóak. NUV ECD-adat: G/J (280nm), H/K (293nm).

5.2.3 Tyr-Trp térállás jellemzése az E5 minifehérje származékokban

A közeli-UV tartományban detektált Tyr-Trp aromás kölcsönhatás jellegzetes L_a-



22. ábra. A Trp-Tyr aromás oldalláncok egymáshoz viszonyított térállását leíró paraméterek koordináta rendszere. Szemléltetésnek Farkas Viktor [282] közleményéből van az ábra kölcsönözve.

L_b sávjainak (276nm, 280nm, 287 nm, 293 nm intenzitása függ a két aromás oldallánc egymáshoz viszonyított térbeli helyzetétől (**14-18. ábra:** aromás oldalláncok *stick* ábrázolása), amely jellemzésére általánosan 4 paraméter adható meg: a két aromás oldallánc tömegközéppontjainak távolsága d (Å); a két aromás gyűrű síkja által bezárt szög α (°); az aromás gyűrűk közötti

dőlésszög θ (°); és az aromás gyűrűk azimutiális szöge φ (°) (**22. ábra**) [290]. A térálláson kívül sávok intenzitását az oldalláncok hidratáltsága (másik megközelítésben: hidrofób

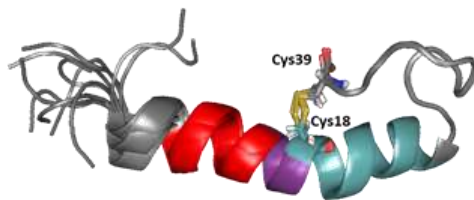
eltemetettsége) is befolyásolhatja. A denaturálódás során a királis környezet megváltozik, amely a Tyr-Trp kölcsönhatás és egyben a detektált sávok megváltozásához vezet. A számolt hőmérsékletfüggő szerkezetsokaságok alapján meghatározhatóak a Trp-Tyr pár térállását leíró paraméterek (d , α , θ , φ), amelyek hozzárendelhetők a közeli UV-tartományban detektált spektrális tulajdonságokhoz. (**4. kiegészítő táblázat**) Meg kell jegyezni, hogy az aromás oldalláncok pontos térállását a NOESY-jelek alapján nehéz meghatározni mivel számos bizonytalansági tényező is közrejátszik. Az egyik nehézség, hogy a tirozin aromás gyűrűjének a szembenálló protonjai degeneráltak (H δ # és H ϵ #), emiatt nem lehet biztosan meghatározni, hogy egy adott protonhoz az aromás sík a lapjával vagy az élével közelít. Egy másik nehézség, hogy a triptofán indol gyűrűjének proton kémiai eltolódásai egybeesnek, (Tc motívumban főleg a H ϵ 3, H ξ 3, H η 2, H ξ 2 jelek a hatos gyűrűn) emiatt a jelek átlapolnak, tovább nehezítve az asszignálást. Tyr8 – Trp11 pár oldalláncainak protonjai térszomszágban (4-6 Å) is vannak egymáshoz, ezért az aromás gyűrűk térállásának meghatározásához elengedhetetlen ezen jelek pontos asszignációja. Azonban aromás jellegük miatt ezeknek a jeleknek a kémiai eltolódása néhány tized ppm-en belülre esik, emiatt a keresztcsúcsaik a diagonálisok közelében gyakran zajos háttérben

vannak, amely így elfedi a keresztcsúcsokat vagy torzítja a jel integrálást – ezzel együtt a pontos távolságok megadását. Ezen adatok elemzését nagy körültekintéssel kell végezni, egy-egy, az átlagtól jelentősen eltérő adatnál érdemes megvizsgálni a magasabb vagy alacsonyabb hőmérsékleten mért értékeket is, illetve a tendenciákat is. A 48°C-on meghatározott szerkezetek egy része már jelentős rendezetlenséggel bír, amely a megnövekedett szórás értékekben is megnyilvánul.

5.3 Diszulfidhíd stabilizált minifehérjék szerkezetének, redukciójának és biológiai aktivitásának jellemzése

Az előző fejezetben bemutatott E5_A4C_E14D_S25C (a fejezetben E5_SS rövidítésű) diszulfidhidas variáns jelentősen megnövekedett termostabilitása indította arra, hogy megvizsgáljam a teljes 39 aminosavas, Exanatide hosszúságú E19_A18C_E28D_S39C (E19_SS) fehérje térszerkezetét. Mivel az E19_SS fehérje az

A



B

	rendezetlen	külső hélix	törés	belső hélix	3 ₁₀ hélix	PPI	
	2	8	14	17	27	34	39
GLP-1:	HA	EGTFTS	DVSSYL	EGQ	AAKEFIAWLV	KGRG	
Exanatide:	HG	EGTFTS	DLSKQM	EEE	AVRLFIEWLK	NGGPSSG	APPPS
E19:	HG	EGTFTS	DLSKQM	EEE	AVRLYIQWLK	EGGPSSG	RPPPS
E19_SS:	HG	EGTFTS	DLSKQM	EEE	<u>CVRLYIQWLK</u>	DGGPSSG	RPPPC
E11:			DLSKQM	EEE	AVRLYIQWLK	EGGPSSG	RPPPS
E11_SS:			DLSKQM	EEE	<u>CVRLYIQWLK</u>	DGGPSSG	RPPPC
E5:				EEE	AVRLYIQWLK	EGGPSSG	RPPPS
E5_SS:				EEE	<u>CVRLYIQWLK</u>	DGGPSSG	RPPPC
E2:					AVRLYIQWLK	EGGPSSG	RPPPS
E2_SS:					<u>CVRLYIQWLK</u>	DGGPSSG	RPPPC

23. ábra. A fejezetben összehasonlított diszulfidhidas (SS), redukált (2_SH) és anya vegyületek szekvenciája és az egyes szegmensek szerkezetben belüli pozíciója.

van a Tc-ra és a teljes (külső és belső) helikális szegmensre, ezért TCEP redukálószerrel redukáltam az SS kötést. A redukció a kis fehérje méret és a felszínen lokalizálódó SS kötés ellenére több időt vett igénybe, mint amelyet átlagos redukciós protokollok megkívánnak. Ez ösztönzött arra, hogy szisztematikusan vizsgáljam a redukció sebességét befolyásoló tényezők hatását a diszulfidhíd stabilizált Tc minifehérjecsaldon. E5_SS és az E19_SS mellett vizsgáltam még az E11_SS és E2_SS minifehérjéket, illetve

E5 szekvenciáján kívül (ami a receptorális kötődésért felelős) tartalmazza a rendezetlen N-terminális (receptor aktiválásáért felelős szegmens) és az ezeket összekötő ún. külső hélixet (**23. ábra**), ezért teljes agonista hatásának feltételezhető. E19_SS

esetében kíváncsi voltam, hogy a diszulfidhídnak mekkora stabilizáló hatása

ezek redukált formáit (E19_2SH, E11_2SH, E5_2SH, E2_2SH) összehasonlításban az irodalmi E19, E11, E5, E2 minifehérjékkel. **(23. ábra)** A szerkezetek komplex vizsgálatával megállapítható, hogy a diszulfidhíd megléte milyen mértékben befolyásolja a különböző hosszúságú hélix stabilitását, illetve a változó hélix hossz milyen hatással van a redukció sebességére.

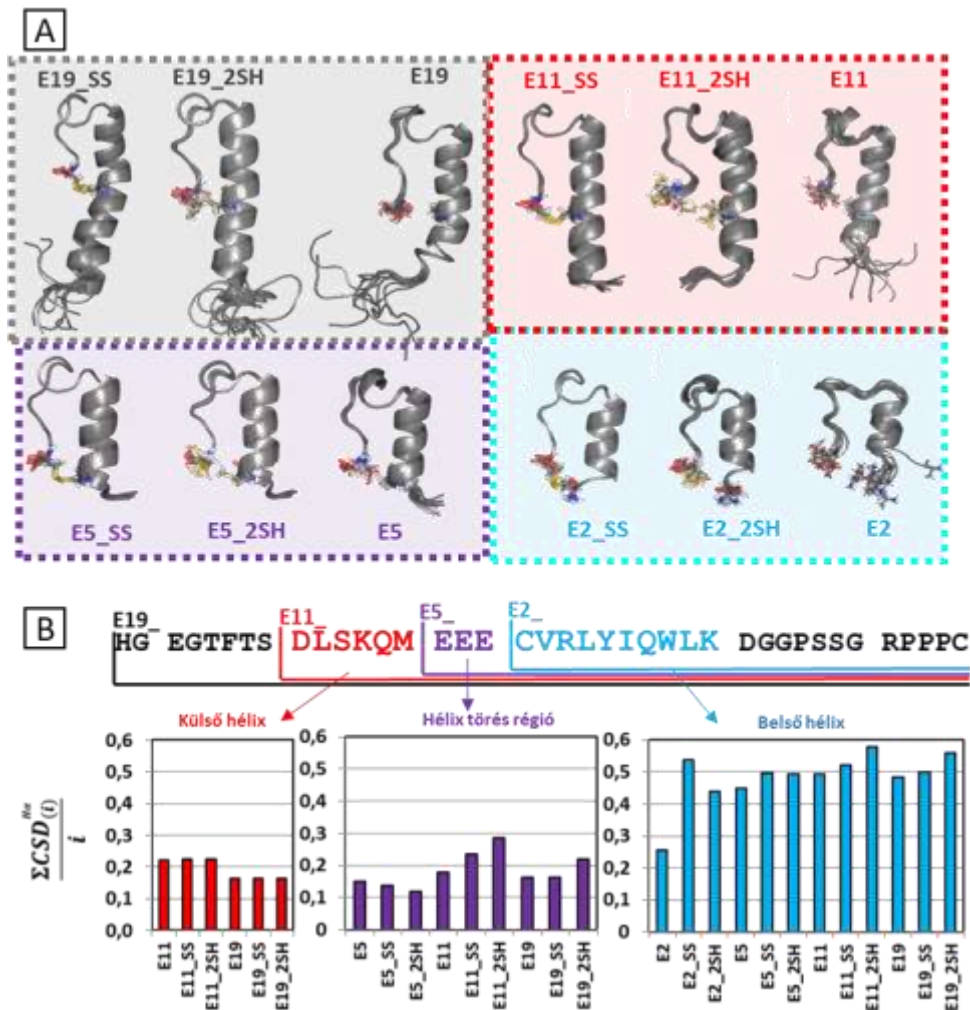
5.3.1 Diszulfidhíd stabilizált minifehérjék és azok redukált variánsának szerkezeti jellemzése összehasonlításban az egyező hosszúságú E2/E5/E11/E19 variánsokkal

A 12 minifehérjéről az 5.2 pontban már bővebben részletezett módon hőmérsékletfüggő közeli **(12-13. kiegészítő ábra)** és távoli UV **(14-15. kiegészítő ábra)** -tartományba eső ECD-spektrumsorozat állt rendelkezésre 5 és 85°C között. A FUV ECD-spektrumokat (12 x 17 spektrum) 2 komponensre bontottam **(16. kiegészítő ábra)** és a rendezett komponensek arányát (F_{FUV} 15°C) a **3. táblázatba** gyűjtöttem ki. Az SS-kötést tartalmazó fehérjék NUV ECD-spektrumok spektrális tulajdonságai jelentősen eltérnek a redukált (és a kiindulási) variánsokétól. Az eddigi Tyr-Trp kölcsönhatás kiegészül a diszulfidhíd kromfór közelségéből eredő hatással, így egy $SS \leftrightarrow Tyr \leftrightarrow Trp$ hidrofób közegben elhelyezkedő rendszer kölcsönhatásaiból származtatható sávok jelennek meg. A korábban megfigyelt Tyr-Trp sávok ellipticitás értékei az SS-kötés jelenlétében hipokróm irányba tolódnak el. Az oxidált és redukált származékok eltérő spektrális jellege lehetővé teszi a redukció kinetikájának NUV ECD-spektroszkópiával történő monitorozását.

3. táblázat. Minifehérjék szerkezetének jellemzése 15°C-on, $pH = 7$ -en. ^a rendezett komponens aránya 15°C-on. ^b a 10 tagú számolt szerkezetsokaságok gerincatomjainak RMSD értéke. ^c 4.2.7-es fejezetben leírtak alapján számolt ^d szekvencia hossza normált $H\alpha$ másodlagos kémiai eltolódások.

	E2			E5			E11			E19		
		_SH	_SS		_SH	_SS		_SH	_SS		_SH	_SS
F_{FUV} (%) ^a	3,7	14,8	51,8	51,5	42,8	63,4	70	76	96	43,7	65,8	51,6
RMSD (Å) ^b	1,47	0,31	0,11	1,59	0,13	0,15	1,51	0,34	0,27	1,22	0,69	0,69
CSD_{Cage} ^c	3,78	9,56	11,34	10,26	10,4	11,4	10,85	10,97	11,45	10,87	11,07	11,66
$(\sum CSD_i^{H\alpha})/i^d$	0,255	0,439	0,537	0,448	0,492	0,497	0,493	0,577	0,522	0,485	0,558	0,499

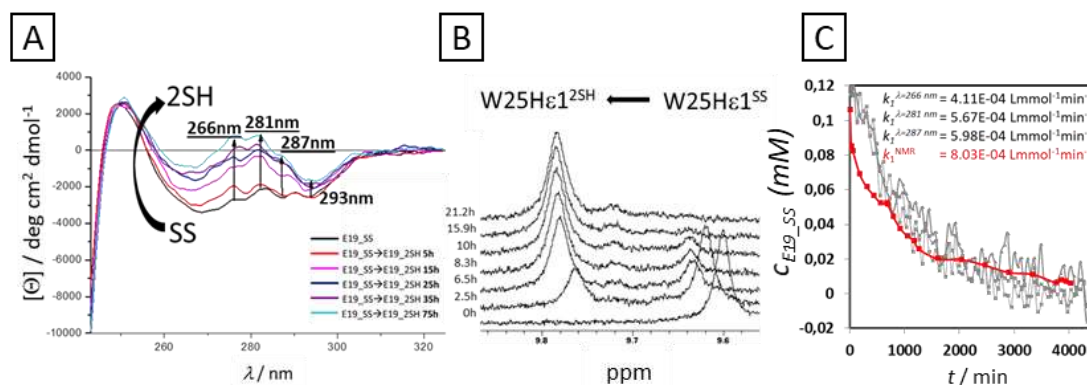
15°C-on, $pH = 7$ -es körülmények között NMR-rel meghatároztam a különböző hosszúságú α -héliceket tartalmazó oxidált/redukált származékok 10 tagú szerkezetsokaságait (**24. ábra/a**), amelyeket a gerinc atom RMSD értékekkel a CSD_{Cage} értékekkel és az α -hélixre (2-27) jellemző H_{α} protonok másodlagos kémiai eltolódásból számolt értékekkel jellemeztem: $(\Sigma CSD_i^{H_{\alpha}})/i$ (**3. táblázat**). Az érték megadja, hogy egy i hosszúságú α -hélixben (vagy csak egy szegmensében) mekkora egy alfa proton átlagos másodlagos kémiai eltolódása. (**24. ábra/b**), amely alapján következtetni lehet az adott szegmens helicitásának nagyságára.



24. ábra. A) NOESY-keresztcsúcsok alapján meghatározott 10 tagú szerkezetsokaságok *cartoon* ábrázolása. A diszulfidhidak pozíciója minden szerkezetben *stick* ábrázolással van kiemelve. Az anyavegyületek térszerkezetét Rovó Petra határozta meg. B) A hélix régió egyes szegmenseinek aminosavsámra normált H_{α} protonra számolt átlagos másodlagos kémiai eltolódása. $(\Sigma CSD_i^{H_{\alpha}})/i$

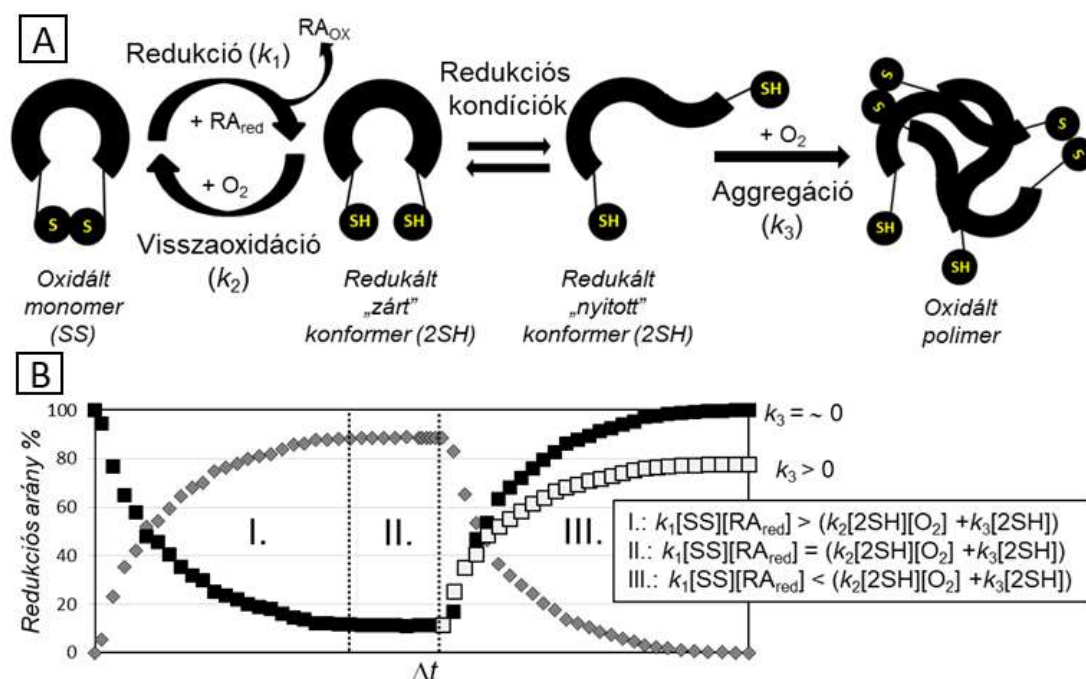
5.3.2 Redukciókinetika monitorozása spektroszkópai módszerekkel

Az E19SS→E19_2SH TCEP-es redukció előrehaladtát párhuzamosan 2 spektroszkópai módszerrel *in situ* módon monitoroztam azonos kísérleti körülmények között. (A reakció tér kialakítása különböző csak: az ECD esetében 10 mm-es fényúthosszú kűvetta, míg az NMR esetében egy 5 mm átmérőjű NMR-cső.) NUV ECD-spektroszkópiával a SS↔Tyr↔Trp komplex kromofór rendszer 2SH↔Tyr↔Trp rendszerre történő átalakulását követtem 266 nm, 281 nm, 287nm és 293 nm-en. (25. ábra/a, kiegészítő ábra 17.) A 293 nm-en mért adatokra a görbe illesztés standard



25. ábra. E19_SS (0,113 mM) redukciójának (18x-felesleg TCEP, 15°C, pH = 7) követése (55 óra) *in situ* módon A) NUV ECD és B) NMR-spektroszkópiával. C) A mért adatok alapján paraméter becsléssel meghatározott redukciós sebességi állandók: $k_1^{\lambda=266 \text{ nm}} = 4,11\text{E-}04 \text{ Lmmol}^{-1}\text{min}^{-1}$; $k_1^{\lambda=281 \text{ nm}} = 5,67\text{E-}04 \text{ Lmmol}^{-1}\text{min}^{-1}$; $k_1^{\lambda=287 \text{ nm}} = 5,98\text{E-}04 \text{ Lmmol}^{-1}\text{min}^{-1}$; $k_1^{\text{NMR}} = 8,03\text{E-}04 \text{ Lmmol}^{-1}\text{min}^{-1}$

deviációja túl nagy volt ezért a paraméterbecslést ezen az adatsoron nem végeztem el. Annak ellenére, hogy az NMR 1D ^1H mérésekkel monitorozott központi Trp indol oldallánca a diszulfidhídtól térben távol esik mégis Hε1 protonjának kémiai eltolódása az oxidált (9,6 ppm) és a redukált (9,76 ppm) formában jelentősen különbözik egymástól. (25. ábra/b) Ez azért érdekes, mert a szerkezeti adatok alapján, az oxidált és redukált Trp-kalitka rendezettsége között nincs jelentős különbség: $CSD_{\text{cage}}^{E19\text{SS}} = 11,66$; $CSD_{\text{cage}}^{E19\text{2SH}} = 11,07$. (3. táblázat) Az NMR-adatok világítottak rá, hogy a teljes redukció nem ment végbe, 55 óra elteltével egy egyensúlyi állapot áll be, ahol az oxidált fehérje még 8%-ban jelen van. A kialakult redoxi-rendszerben az oldott O_2 a feleslegben lévő redukálószer mellett is képes visszaoxidálni a már egyszer kiredukált formát. Ezért a továbbiakban a paraméter becslés során számoltunk a visszaoxidáció, illetve a rendezetlen aggregáció lehetőségével is. Aggregáció során az anyagmennyiség csökken,



26. ábra. A) A kialakult redoxi rendszer sematikus ábrázolása. RA_{red} : redukálószer, RA_{ox} : oxidált/elhasznált redukálószer*. Redukció (k_1), oxidáció (k_2), aggregáció (k_3) sebességi együtthatója. B) A redoxi rendszer egyes fázisai: I. redukciós szakasz, II. egyensúlyi állapot, III. oxidációs szakasz. Aggregáció jelenlétében nem érhető el a oxidált fehérje kiindulási koncentrációja a redoxi ciklus befejeztével.

*A redukció során az oldott O_2 nem oxidálja a TCEP-et, így a TCEP fogyása csak a fehérje redukációjához köthető. Ezt bizonyítva ^{31}P NMR-mérésekkel követtem a TCEP foszfor jelének változását 2 héten keresztül szobahőmérsékleten 50mM-os foszfát pufferben, parafilmezett NMR-csőben. Számottevő intenzitás változást nem tapasztaltam, valamint az oxidált TCEP jele sem volt detektálható.

amelyet az oxidált és a redukált jel összintegráljának csökkenése jelez. **(26. ábra)** Az egyensúlyi állapotban jelenlévő lassú cserefolyamatot (R_{ex}) az oxidált és redukált formák között CPMG-NMR [291] mérésekkel is alátámasztottuk az $E5_{SS} \leftrightarrow E5_{2SH}$ redoxrendszerben. A gerinc NH csoportokon detektálható lassú csere folyamata csak a redukált mintában van jelen és ott is csak a diszulfidhídhoz térközelben: Glu3, Cys4, Val5, Arg6, Tyr8, és a Cys25 aminosavak esetében **(18. kiegészítő ábra)**

E19_{SS} esetében a hőmérséklet hatását vizsgáltam a redukció sebességére. **(4. táblázat/a)** $60^\circ C$ -on már a redukció szinte azonnali ($t_{1/2} < 5$ perc), így kevés adatpont miatt nem illeszthető kinetikai görbe, mi több, a redukció végével az oldat opálössé vált, jelezve a fehérje kicsapódását. 120 perc elteltével a $60^\circ C$ -os minta centrifugálását követően nem lehetett detektálni oldatban lévő monomert NMR-rel. A meghatározott k_1 értékekből az

4. táblázat A vizsgált fehérjék redukciós paramétereinek összefoglalása A) a hőmérséklet (0,8 mM E19_SS, 18x felesleg TCEP), B) a kiindulási fehérje koncentráció (15 °C, E2_SS esetében 2x felesleg, E19_SS esetében 16x felesleg TCEP, C) kiindulási TCEP felesleg (15°C, 0,73mM E11_SS) függvényében. A részletes kinetikai paraméterek az **5-6. kiegészítő táblázatokban** találhatóak.

A	T [°C]	Egyensúlyi állapotig eltelt idő [h]	Redukciós ráta [%]	k_1 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	k_1 értékek szórása [%]
	15	~ 15	92	3.05×10^{-4}	181	3,27
	25	~ 6	94	7.68×10^{-4}	72	9,78
	37	~ 4	94	1.15×10^{-3}	48	1,68
	60	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

B	fehérje	[SS] [mM]	Egyensúlyi állapotig eltelt idő [h]	Redukciós ráta [%]	k_1 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	k_1 értékek szórása [%]
	E2_SS	1,05	~ 15 min	100	1.37×10^{-1}	3	16,92
	E2_SS	1,74	< 5 min	100	2.59×10^{-1}	~ 1	15,37
	E19_SS	0,12	~ 40 h	92	8.03×10^{-4}	466	12,37
	E19_SS	0,81	~ 15 h	92	3.05×10^{-4}	181	3.27

C	fehérje	[RA _{red}] [mM]	Egyensúlyi állapotig eltelt idő [h]	Redukciós ráta [%]	k_1 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	k_1 értékek szórása [%]
	E11_SS	12,78	~ 28 h	91	1.64×10^{-4}	337	2,98
	E11_SS	6,47	~ 35 h	89	2.61×10^{-4}	423	4,80

Arrhenius-egyenlet alapján számított aktiválási energiája $E_a = \sim 44.3$ kJ/mol-nak adódott a redukció folyamatára vonatkozóan.

A legrövidebb (E2_SS) és a leghosszabb (E19_SS) variáns esetében a kiindulási fehérje koncentrációt, (**4. táblázat/b**) míg E11_SS esetében a TCEP-felesleg redukció sebességére gyakorolt hatását vizsgáltam. (**4. táblázat/c**)

A 4 különböző α -hélix hosszúságú diszulfidhidas minipeptidet ugyanolyan enyhe körülmények között (1,5-1,7 mM fehérje, 15°C, $pH = 7$, 2x redukálószer felesleg) TCEP és DTT jelenlétében redukáltam, szisztematikusan vizsgálva az α -hélixhossz, illetve a redukálószer kémiai természetének hatását a redukció sebességére.

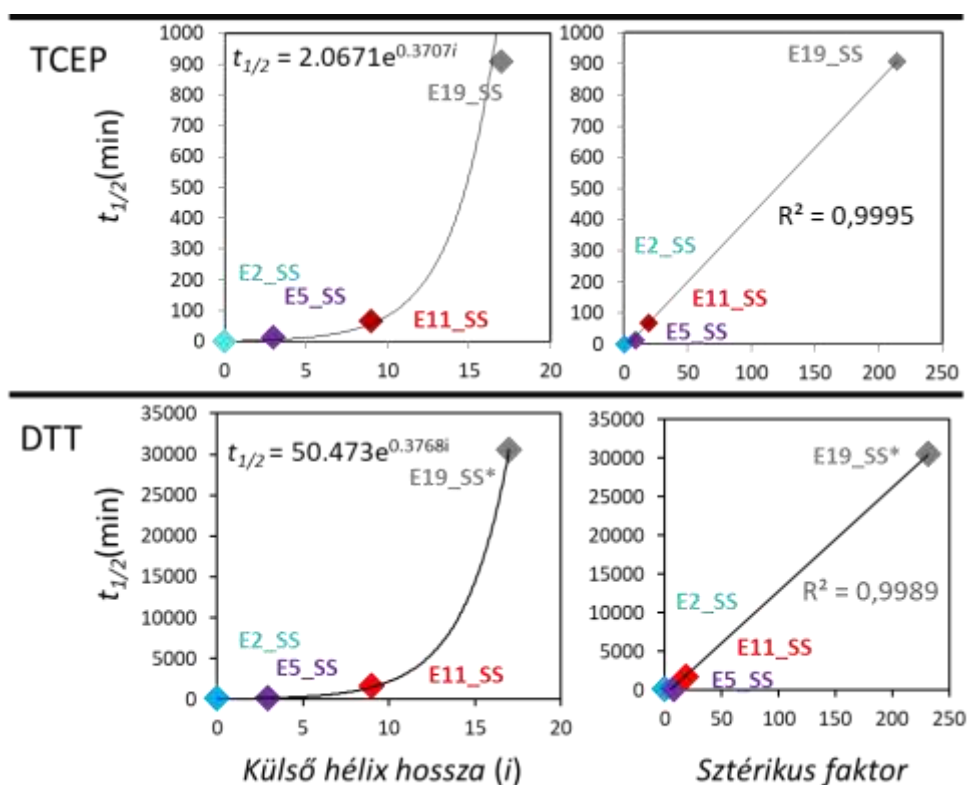
5. táblázat Összefoglaló táblázat a különböző hosszúságú diszulfidhidas minifehérjék redukciójáról (1,5-1,7 mM fehérje, 15°C, pH = 7, 2x redukálószer felesleg) és a külső/N-terminális hélixüket jellemző szerkezeti paraméterek. ^[a] sztérikus faktor (x) = $(1 / \frac{\Sigma CSD_{(i)}^{H\alpha}}{i}) \times RMSD \times i$, ahol *i* = a vizsgált szegmens hossz; ^[b] A korrelációs értékek alapján becsült felezési idő. A részletes kinetikai paraméterek az **7-8. kiegészítő táblázatokban** találhatóak.

E2_SS	E5_SS	E11_SS	E19_SS		
<5 m	~ 1 h	~ 5–6 h	~ 76 h	Egyensúlyi állapotig eltelt idő [h]	TCEP-es redukció
100	93	94	87	Redukciós ráta [%]	
$2,59 \times 10^{-1}$	$1,85 \times 10^{-2}$	$3,68 \times 10^{-3}$	$2,71 \times 10^{-4}$	k_1 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	
~ 1	14	67	909	$t_{1/2}$ [min]	
15,37	3,35	2,61	7,30	k_1 szórása [%]	
5h	9–10 h	138 h	n.a.	Egyensúlyi állapotig eltelt idő [h]	DTT-s redukció
100	95	~ 84	n.a.	Redukciós ráta [%]	
$4,04 \times 10^{-3}$	$2,18 \times 10^{-3}$	$1,52 \times 10^{-4}$	n.a.	k_1 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	
62	115	1659	30545 ^[b]	$t_{1/2}$ [min]	
5,315	1,064	45,152	n.a.	k_1 szórása [%]	
0	3	9	17	Külső hélix hossz (<i>l</i>)	Külső α -hélix jellemezése
0	0,39	0,55	1,41	Külső hélix RMSD	
0	0,14	0,26	0,11	$\frac{\Sigma CSD_{(i)}^{H\alpha}}{i}$	
0	8,56	19,26	213,74	Sztérikus faktor ^[a]	

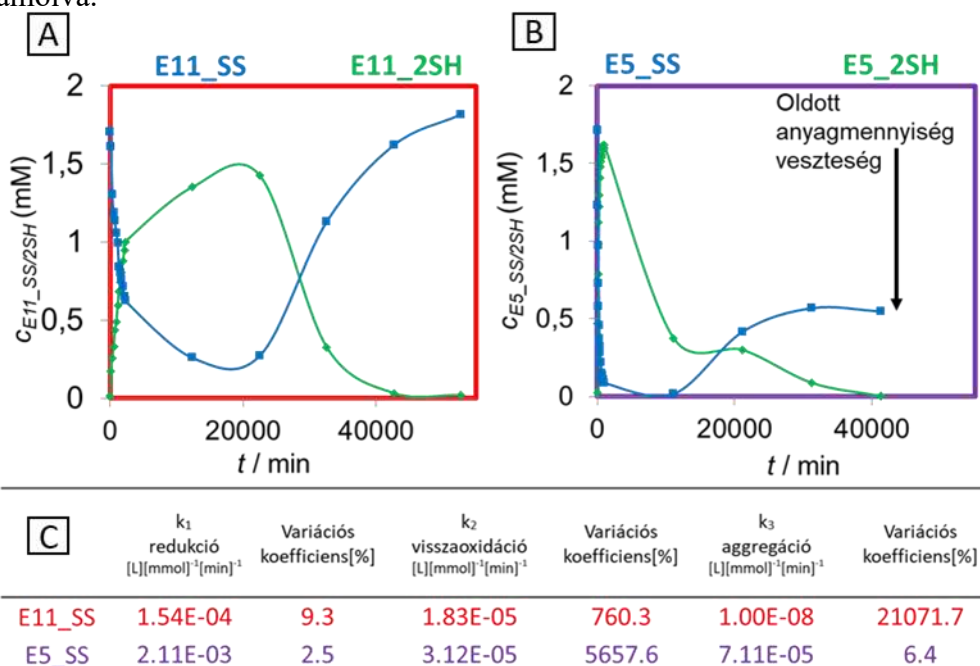
A **5. táblázat** eredményei alapján korrelációt kerestem a felezési idők és az SS-kötést árnyékoló külső α -hélix hossza között. Bevezettem a sztérikus faktort, amely az α -hélix hosszán kívül annak rendezettségével is számol. Ez a helikális szakasz RMSD értékével egyenesen, míg a másodlagos kémiai eltolódásból számolt értékekkel fordítottan arányos.

A felezési idők és a hélix elongációk között exponenciális összefüggést találtam, amelynek kitevője a DTT és TCEP esetében közel egyező. A felezési idők és az α -hélixek árnyékoló sztérikus hatása között egyenes arányosságot találtam. (**27. ábra**)

A hatodik táblázatban bemutatott E5_SS és E11_SS DTT-s redukcióját (**9. kiegészítő táblázat/a-b**) az egyensúlyi állapot beállta után tovább követtem, hogy a korábban felvázolt teljes redukciós ciklus modellt (**26. ábra**) igazoljam. (**28. ábra**) Míg az E11_SS/2SH-esetében körülbelül egy hónap után közel a teljes fehérje mennyiség visszaoxidálódott, addig az E5_SS/2SH esetében maga a redukció és a visszaoxidáció is gyorsabban lejátszódott, azonban ez idő alatt az oldott fehérje ~2/3-a az aggregáció során kivált az oldatból.



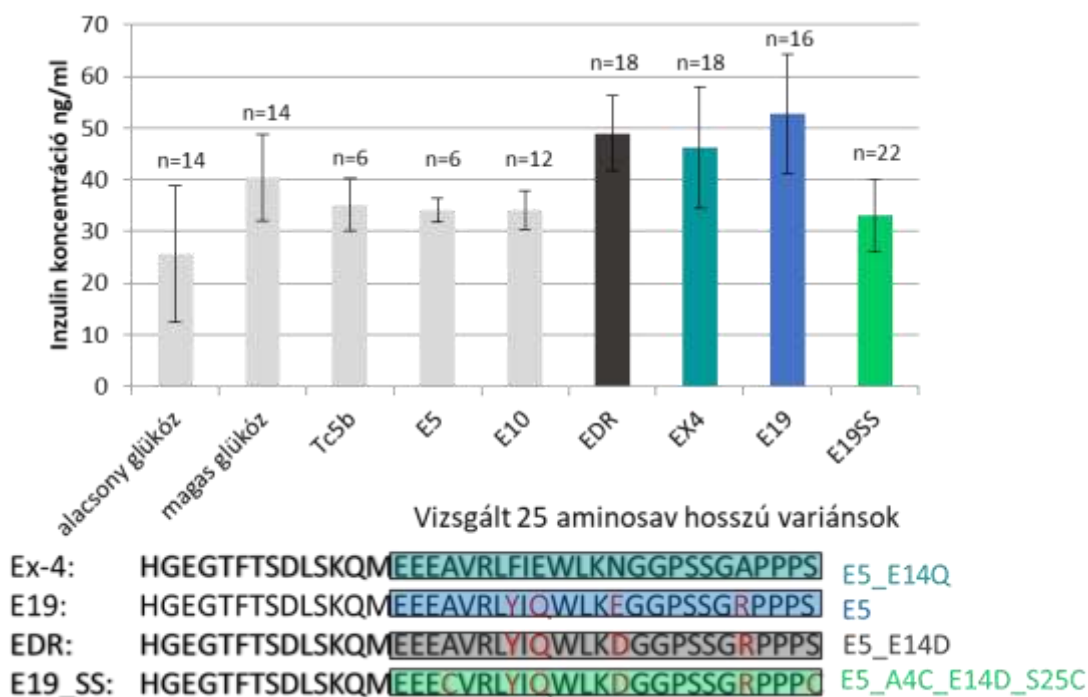
27. ábra. A diszulfidhidas minifehérjék redukciós felezési idejei a külső hélix hosszának, valamint a külső hélix sztérikus árnyékoló hatásának a függvényében TCEP és DTT redukálószer használva. * DTT esetében az első három pontra illesztett exponenciális függvény egyenlete alapján lett az E19_SS-hez tartozó érték kiszámolva.



28. ábra. A teljes redukciós ciklusa A) az E11_SS/2SH-nak, B) E5_SS/2SH-nak DTT redukálószer mellett ($pH = 7$, $15^\circ C$). C) A teljes redukciós ciklusra számolt sebességi együtthatók. (9. kiegészítő táblázat)

5.3.3 E19_SS biológiai aktivitásának mérése INS-1 emlős-sejttenyészeteken

Az elvégzett kísérletek eredményét **29. ábra** foglalja össze, ahol az egyes vizsgált inkretin mimetikumok inzulin elválasztást fokozó hatása van feltüntetve. Az EDR, E19, Exeanatide (EX4) és az E19_SS teljes 39 aminosav hosszúságú fehérjék Trp-kalitka szegmense (utolsó 25 aminosav) analóg az 5.2 fejezetben vizsgált minifehérjék szekvenciájával. Míg a korábban is bizonyítottan agonista hatású EDR, E19, EX4 14-30%-kal növelte magas glükóz szint mellett az elválasztott inzulin koncentrációját a kontrollhoz képest, addig az E19_SS a többi kompetitív antagonistával (Tc5b, E5, E10) egyetemben nem serkentette az inzulin elválasztást magas glükóz koncentráció jelenléte mellett.

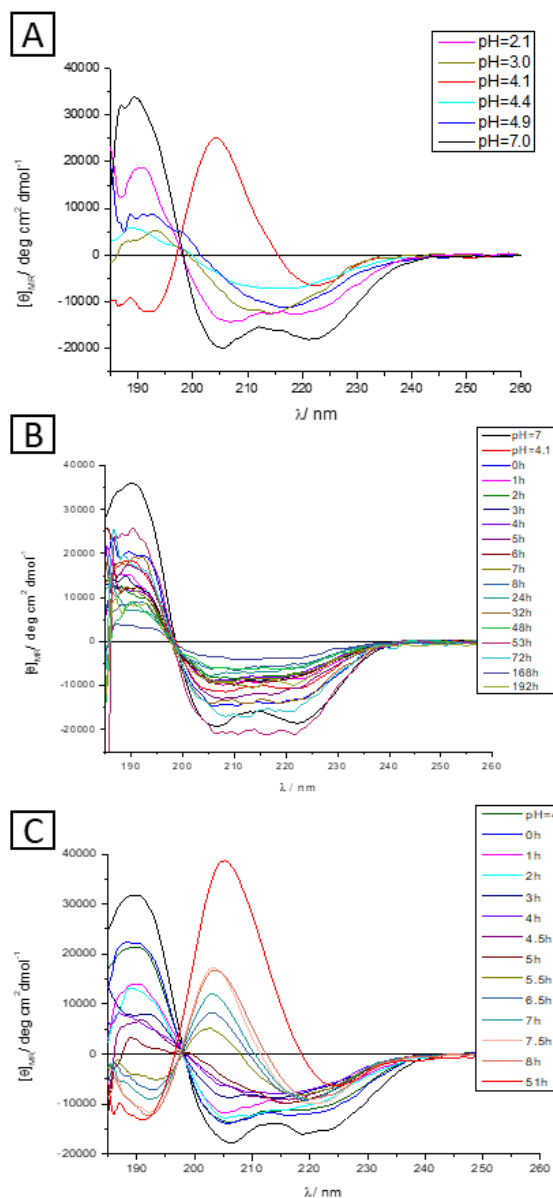


29. ábra. Exanatide analógok biológiai aktivitásának összefoglalója. Az alacsony/magas glükóz: alacsony/magas glükóz szint mellett referencia inzulin elválasztás hatóanyag jelenléte nélkül. Tc5b/E5/E10: N-terminálison csonkított negatív kontroll. EDR/EX4/E19: 39 aminosav hosszúságú pozitív kontroll csoport. Az egyes szekvenciákon kiemeltem a hőmérsékletfüggések esetében vizsgált 25-aminosavas csonkított analógokat.

5.4 E5 minifehérje amiloid aggregációjának vizsgálata

5.4.1 Az aggregáció vizsgálata FUV ECD-spektroszkópiával

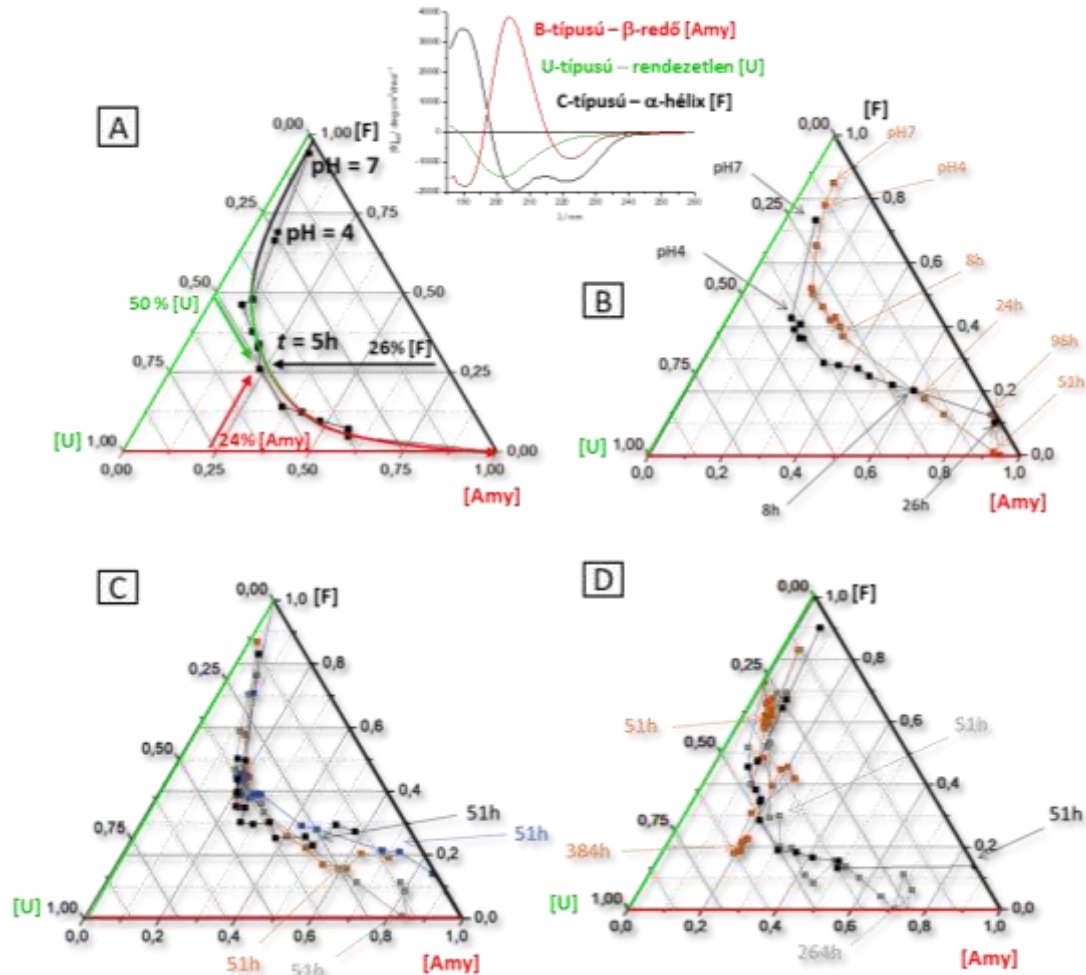
Ahogy a **8. ábrán** bemutattam ahhoz, hogy egy fehérje a potenciális energia



30. ábra. E5 minifehérje aggregáció vizsgálata FUV ECD-spektroszkópiával. A) pH-függés vizsgálata: $c_{E5} = 250 \mu\text{M}$, $c_{\text{NaCl}} = 50 \text{ mM}$, $T = 37^\circ\text{C}$ -on kevertetett minta ECD-spektruma 51 óra után. E5 minta ($pH = 4,1$, $c_{E5} = 250 \mu\text{M}$, $c_{\text{NaCl}} = 50 \text{ mM}$, $T = 37^\circ\text{C}$ spektrális változása kevertetés hiányában (B) és kevertetés mellett (C) az idő függvényében.

felületén megtaláljuk az amiloid szerkezetére jellemző energiaminimumot a szinte végtelen kísérleti paraméter közül (T , pH *c_{fehérje}*, c_{ion} , t) kell kiszűrni azokat az optimumokat, amelyek az E5 esetében α -hélix \rightarrow (rendezetlen) $\rightarrow\beta$ -redő konformációs átalakulást kiváltják. Az optimális kondíciók előszűréséhez az ún. HANABI [292] rendszert használtuk. Egy 96 lyukű tálcán az alábbi kísérleti paraméter mátrixban ($2 < pH < 7$; $80 \mu\text{M} < c_{E5} < 800 \mu\text{M}$; $0 \text{ mM} < c_{\text{NaCl}} < 100 \text{ mM}$ és $T = 37^\circ\text{C}$) vizsgáltuk FUV ECD-spektroszkópiával a β -redős amiloidokra jellemző B-típusú spektrum megjelenését. Az alábbi kísérleti kondíciók mellett: $c_{E5} = 250 \mu\text{M}$, $c_{\text{NaCl}} = 50 \text{ mM}$, $pH = 4.1$, $T = 37^\circ\text{C}$ -on sikerült intenzív B-típusú spektumot kapni ~ 50 órás inkubálás során. Az inkubáció során a mintát mágneses keverővel kevertetjük, ennek hiányában nem tapasztalható B-típusú spektrum megjelenése 192 óra után sem. **(30. ábra)** A fenti kondíciókat használtuk későbbiekben a standard amiloid minták

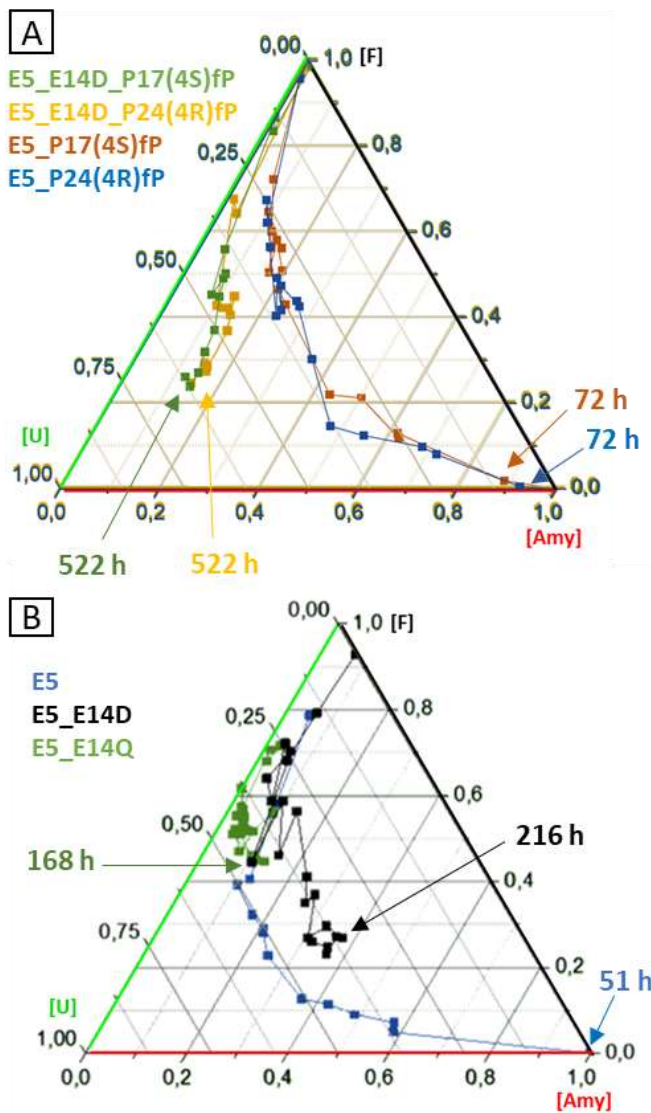
előkészítéséhez. Mivel rendelkezésünkre állt az intenzív B-típusú spektrum is, lehetőség nyílt a hőmérsékletfüggéseknél bevezetett rendezett (Folded) ↔ rendezetlen (Unfolded) 2 komponensű felbontást kibővíteni egy harmadik, β -redős amiloid (Amyloid) taggal. A három tiszta komponensű (F/U/Amy) bázisspektrum arányával lehet az aggregációt egy adott időpillanatban jellemezni. Baricentrikus koordináta rendszerben ábrázolva a



19. ábra E5 aggregáció jellemzése a baricentrikus koordináta rendszerben. A) A 3 tiszta távoli UV-tartományú ECD bázisspektrum, amelyek arányával jellemezzük az aggregáció előrehaladtát. Az optimalizált körülmények között elvégzett aggregációs kísérlet a baricentrikus koordinátarendszerben. Az „aggregációs utak” első pontja mindig a $pH = 7$ -es állapothoz, a második a $pH = 4$ -es állapothoz, a harmadik pont a só hozzáadása utáni állapot, majd az ezt követő pontsorozat az időfüggő állapotok. Az A) ábra esetében 5 óránál a felbontás alapján az átmeneti állapotú minta 50%-ban rendezetlen, 26%-ban még rendezett, 24%-ban már amiloid jellegű. B) Fehérje koncentráció hatása az aggregáció sebességére: 800 μ M (fekete), 400 μ M (narancs) 12,5 mM NaCl, 37°C mellett. C) Eltérő ionerősség hatása az aggregációra: 50 mM (fekete), 25 mM (vörös), 12,5 mM (szürke), 0 mM (kék) 250 μ M fehérje, 37°C mellett. D) Eltérő hőmérséklet hatása: 23°C (vörös), 37°C (fekete), 47°C (szürke) 250 μ M fehérje és 50 mM NaCl koncentráció mellett

komponens-hármasokat az idő függvényében leírható a konformációs átalakulás útja. A baricentrikus koordináta-rendszerben megtett út alapján összehasonlíthatóak a különböző körülmények között elvégzett aggregációs kísérletek. Ilyen módon az optimalizált körülmények ismeretében vizsgáltuk, hogy az aggregáció sebességére miként hat a hőmérséklet, a fehérje-, illetve a só-koncentráció. **(31. ábra)**

Az 5.2 fejezetben bemutatott E5 variánsok esetében is megvizsgáltuk az aggregációs hajlamot. **(32. ábra)** Minden esetben a standard protokollt alkalmaztuk. (250 μ M fehérje,



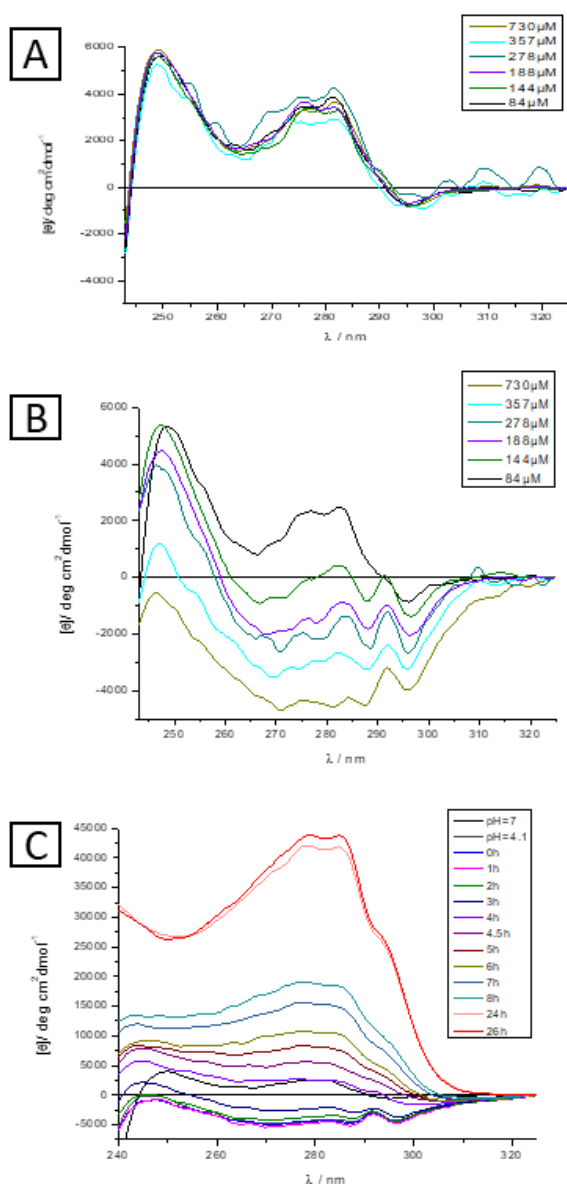
32. ábra E5 A) fluor variánsok és B) 14-es pozícióban szubsztituált variánsok másodlagos szerkezeti elemeinek változása az idő függvényében baricentrikus koordináta-rendszerben ábrázolva. Minden minta esetében az alábbiak voltak a kísérleti paraméterek: 250 μ M fehérje, 50 mM NaCl, $pH = 4,1$, $37^\circ C$, kevertetés.

50 mM NaCl, $pH = 4,1$, $37^\circ C$, kevertetés.) A fluor szubsztituált mutánsok esetében meg szeretnénk volna bizonyosodni arról, hogy a ^{19}F szubsztitúció nem gátolja az aggregációt, így az később vizsgálható lesz ^{19}F spektroszkópiával.

Azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált ^{19}F szubsztituált minták közül a 14-es pozícióban Asp oldalláncot tartalmazó variánsok (E5_E14D_P17(4S)fP, E5_E14D_P24(4R)fP) esetében nem, vagy csak részben ment az aggregáció.

Azonban az E5_P17(4S)fP, E5_P24(4R)fP mutánsok esetében, ahol a 14-es pozícióban Glu oldallánc található, megtörtént a teljes szerkezeti átalakulás, igaz ez több időt vett igénybe, mint az E5 esetén. A tapasztalt jelenségből adódóan megvizsgáltuk az E5_E14D és E5_E14Q (nem

fluor-szubsztituált) mutánsok aggregációs hajlandóságát is. Míg az E5_E14D esetében a végállapot egy $U \rightarrow \text{Amy}$ átmeneti állapotban, (31,8% [Amy], 26% [F], 42,2% [U]), addig az E14Q jellemzően egy $F \rightarrow U$ állapotban rekedt meg. (13% [Amy], 44,6% [F], 42,4% [U])



33. ábra Az aggregáció követése NUV ECD-spektroszkópiával. E5 koncentráció függése $84 < c_{E5} < 730 \mu\text{M}$ között 25°C -on 0 mM NaCl koncentráció mellett A) $pH = 6$ -os B) $pH = 4,1$ -es értéken. C) $c_{E5} = 800 \mu\text{M}$, $c_{\text{NaCl}} = 12,5 \text{ mM}$, $pH = 4,1$, $T = 37^\circ\text{C}$ kevertetés melletti amiloid aggregáció spektrális változásai.

5.4.2 Az aggregáció vizsgálata NUV ECD-spektroszkópiával

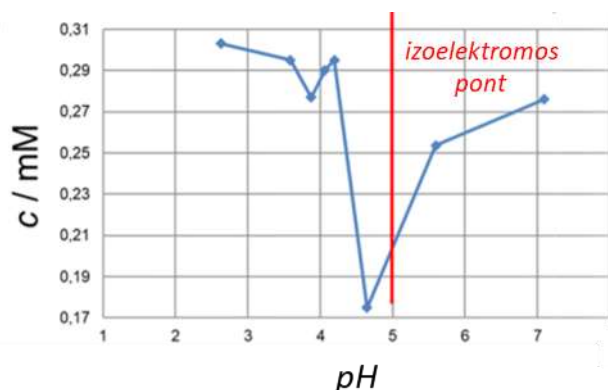
A rendezett, natív térszerkezetű E5-re jellemző közeli UV-tartományú ECD-spektrumot már korábban ismertettem. **(6. kiegészítő ábra/a)** A központi Tyr-Trp intramolekuláris aromás-aromás kölcsönhatásra jellemző sávok (pozitív: 276 nm, 280 nm, 287 nm és negatív 293 nm) – amelyek aromás oldalláncok eltott *face to face* elrendeződéséhez tartoznak – az aggregáció során drasztikusan változnak. A detektálható változáshoz egyaránt szükséges a fehérjeoldat megfelelő koncentrációja és pH-ja. $80\text{--}750 \mu\text{M}$ koncentráció tartományban pH-t $4,1$ -re állítva a fehérje koncentráció növelésével párhuzamosan a natív állapotra jellemző spektrum sávjainak intenzitása lecsökken, azonban a rendezetlen szerkezetkerekre jellemző (lásd.: **6. kiegészítő ábra**, 85°C) zérus intenzitás helyett negatív értékeket vesz fel. Ez a natív szerkezetre jellemző eltott *face to face* elrendeződés megváltozását indikálja. $pH = 6$ -on nem történik változás a spektrális tulajdonságokban.

A kevertetés során, azonban a negatív $[\Theta]$ értékek újra elkezdenek nőni. A spektrális tulajdonságok hasonlóak a natív szerkezetre, azonban a 293nm-nél lévő sáv is pozitívba vált. Ami igazán lényeges, hogy 26 óra elteltével a sávok intenzitása $[\Theta] = \sim 4000 \text{ deg cm}^2\text{dmol}^{-1}$ -ről (natív $pH = 7$) $[\Theta] = \sim 40000 \text{ deg cm}^2\text{dmol}^{-1}$ -re nő. A jelentős $[\Theta]$ növekedés intermolekuláris aromás-aromás kölcsönhatások jelenlétére utal, amely a később bemutatandó amilod-fibril modell alapját képezi. (33. ábra)

5.4.3 Az aggregációra hajlamos monomer térszerkezetének jellemzése NMR-spektroszkópiával.

Az ECD-mérések eredményei szerint az E5 aggregáció $pH = 4,1$ körül, 37°C -on, elektrolit jelenlétében történik, amely során a natív szerkezet részlegesen elveszíti rendezettségét, és a központi aromás oldalláncok kölcsönhatására visszavezethető NUV sávok $[\Theta]$ -a lecsökken. NMR-spektroszkópia segítségével erről az átmeneti, aggregációra hajlamos E5 konformerról szeretnénk volna atomi felbontást megközelítő szerkezetet meghatározni a korábban bemutatott E5 hőmérsékletfüggő szerkezetsokaságok – $pH = 7$ -en – (14. ábra/a) és a most részletezendő pH-függő mérés sorozatból – 15°C -on-meghatározott szerkezetsokaságok elemzésével. (14. ábra/b)

pH-függés vizsgálata során fehérje kiválást tapasztaltam a $pH = 4$ -5-ös tartományban, azonban a kiválás a reverzibilis volt. (34. ábra) A homonukleáris 2D spektrumokat 1 mintáról vettem fel az alábbi pH értékeknél: $pH = 2 \rightarrow 4 \rightarrow 5 \rightarrow 6 \rightarrow 7$ (15°C -on). Az oldott fehérjekoncentrációkat Nanodrop UV-VIS spektrofotométerrel határoztam



34. ábra. E5 pH-függő oldhatósága 15°C -on. Az izoelektromos pont a Protpi kalkulátor alapján lett meghatározva. <https://www.protpi.ch/>

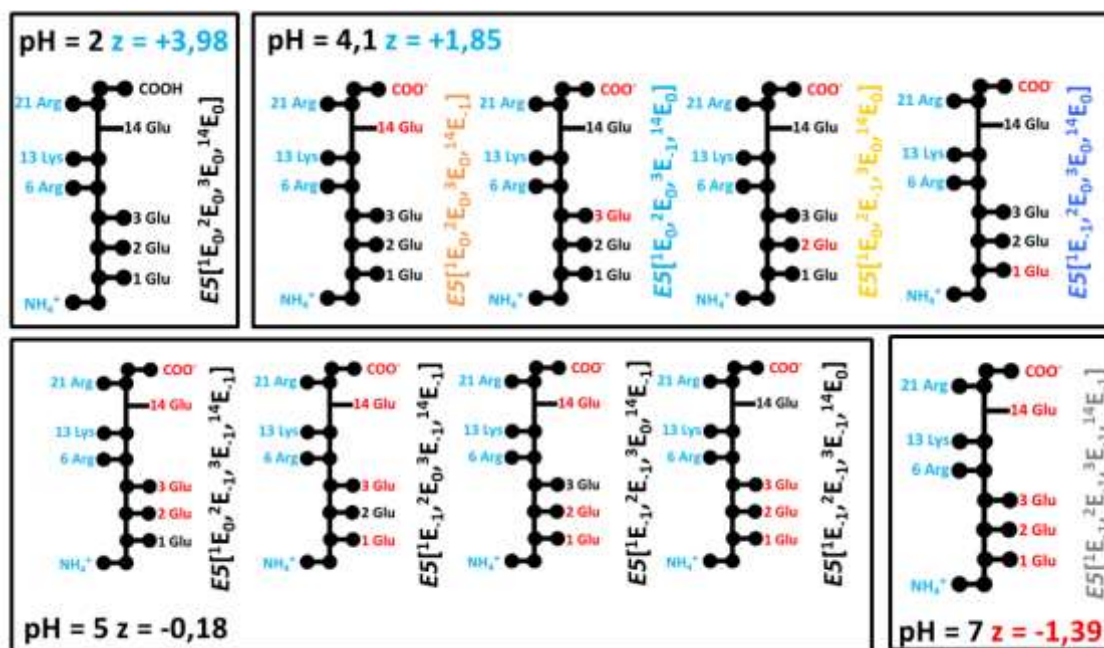
meg. A 2. táblázatból kitűnik, hogy $pH = 4$ és 5 között, 37°C felett az asszignálható keresztcsúcsok száma drasztikusan csökken egyrészt a denaturáció, másrészt az E5 kicsapódása miatt. A két tényező együttes hatása okozza, hogy nem lehetséges a szerkezetsokaságok meghatározása 37°C -on és $pH = 4$ -en. Az ionerősség növelése tovább

növeli a jelek kiszélesedését, ezért a só hatással sem tudtam kalkulálni. A $pH = 4$ -es szerkezetsokaságokat a könnyebb átláthatóság kedvéért klaszterekbe soroltam. (19. kiegészítő ábra)

5.4.4 Az E5 különböző protonáltsági mikroállapotai és azok molekuladinamikai modellezése

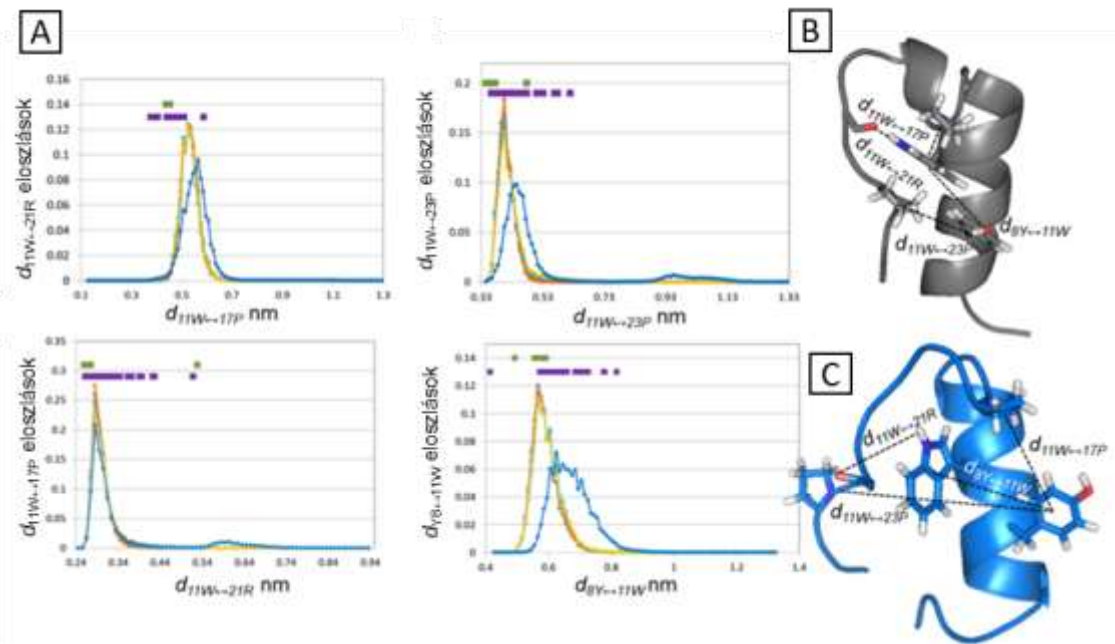
Az E5 aggregáció egyik előfeltétele a részleges rendezetlenség (szerkezeti fellazulás) megjelenése, azonban pusztán hődenaturáció hatására mégsem történik amiloid aggregáció. A $pH = 4,1$ -re történő megváltoztatásával a natív formára jellemző töltéseloszlást is megváltoztatjuk, amely egyrészt a natív szerkezetet perturbálja az intramolekuláris ionos kötések és hidrogénhidak átrendeződésével, másrészt hozzájárulhat új intermolekuláris kölcsönhatások kialakulásához az oligomerizáció során.

Megvizsgáltam, hogy az egyes pH értékeken mekkora az E5 össztöltése, illetve a szekvencia mentén történő töltéseloszláshoz mely oldalláncok miként járulnak hozzá. Ehhez a Protpi kalkulátort használtam. Megjegyzendő, hogy az egyes aminosav oldalláncok pontos protonálódási mikroállandói jelentősen függenek a kémiai környezettől. Pontos pK_a értékek hiányában csak megközelítő értékeket lehet adni a fehérje protonálódási makroértékeire, ezáltal az adott pH -n való össztöltésére. A protpi szoftver az aminosavak átlagos pK_a értékeivel számol. $pH < 7$ körülmények között az E5 minifehérjében el lehet tekinteni az N-terminális Glu amin ($pK_a : \sim 9,7$), a Lys ($pK_a : \sim 10,8$), Arg ($pK_a : \sim 12,5$) és a Tyr ($pK_a : \sim 9,1$) oldalláncok deprotonálódásától. Csak a Glu ($pK_a : \sim 4,3$) oldalláncok és a C-terminális Ser karboxiljának ($pK_a : \sim 2,1$) protonálásával/deprotonálásával kell számolni. Ezalapján $pH = 4,1$ -en a fehérje össztöltése $\sim +2$, amely az alábbi töltésekből adódik össze: N-terminális, Arg6, Lys13, Arg21 oldallánc \rightarrow 4db pozitív töltés, C-terminális Ser karboxil ($\sim 1:100$ az aránya a protonált/deprotonált állapotnak) és egy Glu oldallánc a négy közül (Glu1, Glu2, Glu3, Glu14) \rightarrow 2db negatív töltés. Annak ellenére, hogy a protonálódás pillanatszerűn zajlik, lehetnek olyan kitüntetett állapotok, amelyek egy H-híd vagy ionos kötés megléte miatt kevésbé disszociábilisak. A kérdés tehát az, hogy az E5-ben a 4 glutamát közül (1E , 2E , 3E , 4E) melyik az az egy, amely deprotonálva van, és a négy különböző töltésmintázatú mikroállapot miként viselkedik.



35. ábra. Az E5 minifehérjék összetöltése és szekvenciális töltéseloszlása az egyes mikroállapotok esetében. Piros – negatív töltés, fekete – semleges, kék – pozitív töltés az oldalláncon vagy a terminálison. Az egyes mikroállapotok mellett azok rövidítése található. A töltés – pH görbe a **20. kiegészítő ábrán** található.

Ezt a kérdést molekuladinamikai szimulációk (MD) alkalmazásával terveztük tisztázni. A kiindulási szerkezet az NMR-mérések alapján meghatározott $pH = 7$ -es E5 átlagszerkezetek voltak. $T = 37^\circ\text{C}$ és 50 mM NaCl koncentráció mellett rögzítettük a az egyes protonálódási mintázatokat. (**35. ábra**) Míg $pH = 7$ -en 1 féle töltésmintázat adódik: $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_{-1}, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_{-1}]$, addig $pH = 4,1$ -en 4 fajta: $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_{-1}]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_{-1}, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$. (Bal felső index a glutamát szekvenciális pozíciója, jobb alsó index jelzi a protonáltságot (0) / deprotonáltságot (-1).) Az 5 mikroállapotról egyenként egy 1000 ns-os szimulációt futtatunk és megfigyeltük, hogy a különböző töltésmintázatú állapotok miként viselkednek. Az egyes MD trajektóriákat, a térszerkezetet és az aromás oldalláncok térállását leíró paraméterekkel jellemeztük. (**6. táblázat, 21. kiegészítő ábra**) Trajektóriánként a szerkezetet jellemző paramétereknek (i - ix) az eloszlását vettem és összehasonlítottam ezeket. (**36. ábra**) Ez alapján kiszűrtem azokat a paraméter értékeket (**6. táblázat**), amely a leggyakoribb populációjú konformerek paraméteritől eltér. Ezek összehasonlítva kiválasztható volt a $pH = 4,1$ -hez tartozó mikroállapotok közül az amelyik a $pH = 7$ -hez tartozó mikroállapot viselkedésétől jelentősen eltért (és ezáltal feltételezhető volt, hogy az aggregációs folyamatot beindításában szerepet játszhat). A $pH = 7$ (-1 töltés) $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_{-1}, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_{-1}]$



36. ábra. A) Vizsgált paraméterek eloszlása az MD szimulációs trajektóriák alapján: $pH = 7$ -es $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_{-1}, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_{-1}]$, $pH = 4,1$ -es $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_{-1}]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_{-1}, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ mikroállapotok esetében. Az eloszlás görbék felett lineáris módon az NMR alapján meghatározott 50—50 $pH = 7$ -es (zöld) és $pH = 4$ -es (lila) szerkezetsokaság paraméterei szerepelnek. A többi paraméter eloszlása a **22. kiegészítő** ábrán szerepel. B) $pH = 7$ -es $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_{-1}, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_{-1}]$ mikroállapotra jellemző konformáció C) $pH = 4,1$ -es $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ mikroállapotra jellemző térszerkezet és a jellemző távolság paraméterek.

6. táblázat. Az NMR és az MD trajektóriák szerkezeteinek jellemzésére használt paraméterek.

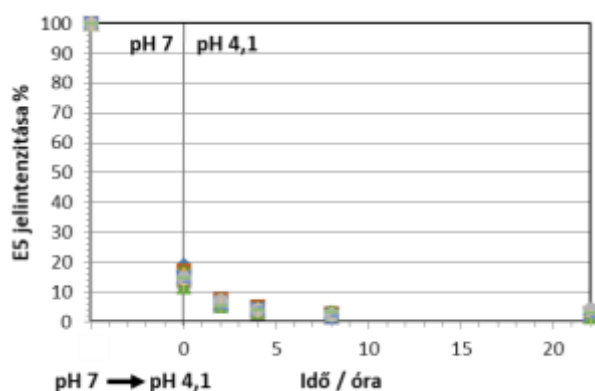
#	Mért paraméter	A paraméter leírása	Az átlagtól eltérő értékek
i	$d_{11W \rightarrow 17P}$	A távolság a Trp ¹¹ és a Pro ¹⁷ között	$d_{11W \rightarrow 17P} > 5.7 \text{ \AA}$
ii	$d_{11W \rightarrow 23P}$	A távolság a Trp ¹¹ és a Pro ²³ között	$d_{11W \rightarrow 23P} > 4.7 \text{ \AA}$
iii	$d_{11W \rightarrow 21R}$	A távolság a Trp ¹¹ NH és az Arg ²¹ CO között	$d_{11W \rightarrow 21R} > 6.0 \text{ \AA}$
iv	$d_{14E \rightarrow 21R}$	H-híd távolság a donor Arg ²¹ és az akceptor Glu ¹⁴ között	
v	μ ($^\circ$)	Az α -hélix vektora és a poliprolin hélix vektora által bezárt szög	$\mu > 45^\circ$
vi	$d_{8Y \rightarrow 11W}$	Tyr ⁸ és a Trp ¹¹ közötti távolság	$d_{8Y \rightarrow 11W} > 7.0 \text{ \AA}$
vii	α ($^\circ$)	Az aromás síkok által bezárt szög	$\alpha > 70^\circ$
viii	θ ($^\circ$)	Az aromás gyűrűk közötti dőlésszög	$40^\circ > \theta > 50^\circ$ $80^\circ > \theta > 90^\circ$
ix	φ ($^\circ$)	Az aromás gyűrűk azimutális szöge	$\varphi > 320^\circ$

mikroállapot és a $pH = 4$ -es (+2 töltés) $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_{-1}]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_{-1}, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ mikroállapotok eloszlásai megegyeznek. Ezekről az eloszlásokról az $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ mikroállapot eloszlása jelentősen vagy részben eltér és az egyensúlyi szerkezeti sokaságban megjelenik egy második minor populáció.

Eredményeink szerint tehát ez utóbbi töltésmintázat játszat döntő szerepet a $pH = 4,1$ -en beinduló aggregációs folyamatokban.

5.4.5 Az aggregáció követése NMR-spektroszkópiával és más biofizikai módszerekkel. Az oligomerizációs folyamat jellemzése

A vizsgálatok során az amiloid aggregációs protokoll ($pH = 4,1$ $c_{E5} = 250\mu M$, $c_{NaCl} = 50$ mM, $T = 37^\circ C$, kevertetés mellett) alapján elkészített törzsoldatból vett mintákat vizsgáltuk az idő függvényében. Az aggregáció előrehaladtát FUV ECD-spektroszkópiával követtük. Minden kísérlet során kialakult a B-típusú amiloidra jellemző spektrum.



37. ábra. 1H - ^{15}N HSQC amid keresztcsúcsok (18) intenzitás változása. 100%-nak a kiindulási integrál jel felel meg ($pH = 7$). A $pH = 4,1$ -re állítása felel meg az aggregáció kezdő időpontjának.

Mivel az ECD-mérések eredményei arra utalnak, hogy az E5_P17(4S)fP a fluorsubsztitúció ellenére is képez amiloidot (**32. ábra/a**) a 2D heteronukleáris 1H - ^{15}N HSQC és DOSY kísérletek mellett 1D ^{19}F NMR-méréssorozatok is végeztem. Mindhárom párhuzamos méréssorozat első, $pH = 7$ -es elemét sikerrel megtudtam mérni, azonban a minták $pH = 4,1$ -re állítása során a jelek intenzitása 80-100%-ot csökkent (kísérlettől függően). (**37. ábra**) 1H - ^{15}N HSQC esetében a még detektálható jelek kémiai eltolódásai a denaturált E5 monomere jellemzők. 2D spektrumok esetében az amid keresztcsúcsok csökkenő intenzitásuk ellenére is követhetőek maradtak. 22 óra elteltével a monomerek jelintenzitásai 1-3%-ra csökkentek a kiindulási jelintenzitáshoz képest. A 22 óra során az egyes amid jelek eltérő mértékben tolódtak el, amely azt jelzi, hogy a denaturált monomer térszerkezete lokálisan megváltozik. (**23. kiegészítő ábra**)

A ^{19}F -NMR 1D spektroszkópiával vizsgált E5_P17(4S)fP aggregációs kísérlete során a $pH = 7$ -es körülmények között a (HPLC tisztítás során visszamaradt) TFA (-76,55 ppm) mellett csak egy másik gyengébb csúcs volt detektálható a spektrumon -176,2 ppm-

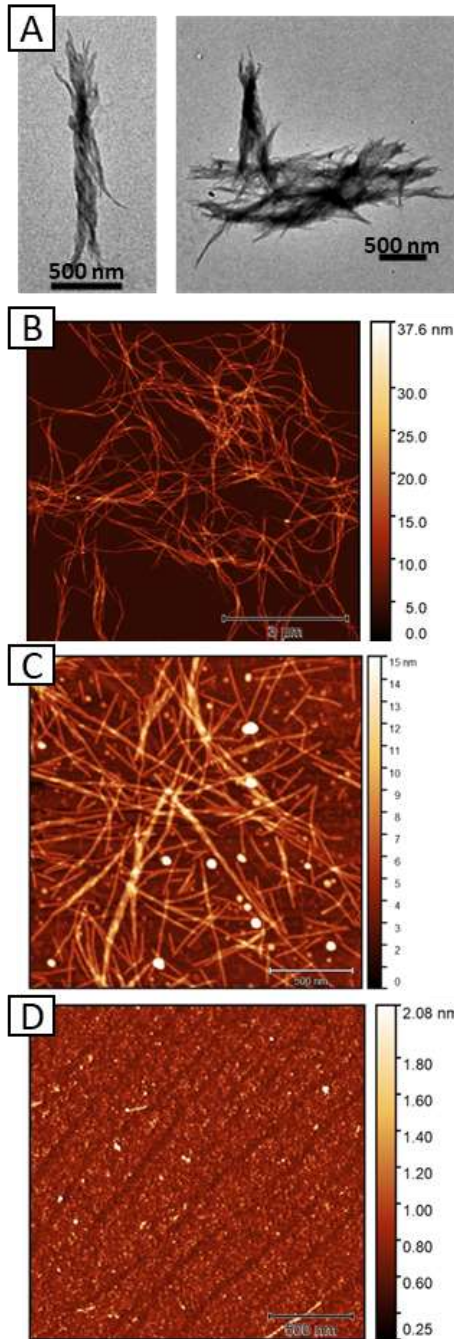
nél, amely megfelel a fluoroprolinok kémiai eltolódásának az irodalmi adatok alapján [293]. A minta $pH = 4$ -re állítása során a fluoroprolin jele eltűnt spektrumról.

A DOSY mérésekkel az oligomerek méretét vagy asszociációs fokát nem tudtam jellemezni a $pH = 4,1$ -en tapasztalt intenzitás veszteség miatt, de a $pH = 7$ -en (15°C) a mért diffúziós állandók alapján ($2,058 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) meghatározható a volt a monomer hidrodinamikai sugara, amely $11,7\text{\AA}$ -nek adódott. Összehasonlításként, a számolt szerkezetsokaságok alapján meghatározott hosszanti átmérő $\sim 26\text{\AA}$, míg a rövidebb átmérő $\sim 17\text{\AA}$ az E5 minifehérjék esetében.

Dinamikus fényszórás kísérletekkel az aggregáció egyes szakaszaira jellemző méreteloszlást tanulmányoztam. A DLS mérések detektálási határa (1 nm) megegyezik az E5 mérettartományával. Fontos azt leszögezni, hogy a mintáink nem monodiszperzek, hanem a natív monomerektől (1-2 nm-es átmérő) a különböző tagszámú oligomereken át a néhány száz nm hosszú amiloidszálakig minden méretű és alakú részecske megtalálható bennük. Ez azért lényeges, mert a már kialakult nagyobb részecskék mellett a kisebbek detektálhatósága lecsökken. Egy szemléletes példa: ha egy rendszerben csak két típusú szférikus részecske található egyenlő mennyiségben, egy 5 nm és 50 nm átmérőjű, akkor a térfogati hozzájárulás alapján 1:1000-hez, míg a szórt fény intenzitása alapján 1:1 000 000-hoz lesz a részecskék látszólagos aránya [294]. Ezen túlmenően sem a monomerek, sem a növekvő amiloid rostok kiterjedése sem izomertikus, emiatt a fényszórás inhomogén lesz, amely tovább torzíthatja az adatokat.

Előkísérletként megvizsgáltam 1) $400\mu\text{M}$ -os, $pH = 7$ -es, frissen készített E5 minta méreteloszlását 37°C -on, 2) egy korábban növesztett amiloid mintát, 3) illetve ennek a mintának a felülúszóját centrifugálás (45 perc, 3000RPM) után. **(24. kiegészítő ábra)** A friss minta esetében az eloszlás nem monomodális így a *Z-average* – kumuláns átlag méret – értékkel nem definiálhatjuk a mintát. A polidiszperzitás értékek (PDI: 0,4-0,7) diszperz méret eloszlását indikálnak. A párhuzamos mérések térfogati eloszlása alapján elkülöníthető 4 nagyobb populáció: $\sim 30 \text{ nm}$, $\sim 60 \text{ nm}$, $\sim 530 \text{ nm}$ és egy $5,5 \mu\text{m}$ átmérőjű. Az idült amiloid minta méreteloszlása homogén (PDI: 0,15-0,20) és kb. $\sim 4 \mu\text{m}$ -es *Z-average* értékkel jellemezhető. Ugyanezen minta centrifugálása során a $\sim 4 \mu\text{m}$ -es átmérőjű részecskék eltűnnek és megjelennek a friss mintára jellemző polidiszperz (PDI: 0,75-0,88) $\sim 60 \text{ nm}$, $\sim 600 \text{ nm}$, $\sim 1100 \text{ nm}$ átmérőjű részecskék.

Az aggregációs protokoll alapján elkészített majd temperált és kevertetett mintának 0-4-8-25 órát követően mértem meg a méreteloszlását. **(25. kiegészítő ábra)**.



38. ábra. E5 amiloid morfológiája TEM (A) és AFM (B-C) technikákkal. A minták a standard protokoll alapján lettek elkészítve. D) Az amiloid minta morfológiája 5 sec vortexelés után 37°C-on.

Egyértelmű méretnövekedés ($2\mu\text{m} \rightarrow 5\mu\text{m}$) tapasztalható, a kapott mérettartomány megegyezik a korábbi amiloid mérettartományával, azonban a jelentős polidiszperzitás (PDI: 1) miatt a minta nem alkalmas DLS méretmeghatározásra.

A TEM felvételeken amiloid rostok különíthetők el, amelyek $\sim 2-2,5 \mu\text{m}$ hosszúságúak. 5-10 szál összecsavarodva szupramolekuláris kötegeket képez, amelyek átmérője $\sim 200-250 \text{ nm}$. **(38. ábra/a)**

A frissen vortexelt oldatról készült AFM felvételeken egy amorf filmréteg detektálható, melyek keresztmetszeti profilján egyenletesen oszlanak el a $0,7-1,4 \text{ nm}$ magasságú (y-tengely) részecskék. **(26. kiegészítő ábra/a)** 24 óra elteltével szintén vortexelt minta esetében már megjelennek a TEM esetében is tapasztalt rostok, amelyeknek a hossza 250 nm , átmérője (x-tengely) $\sim 40-50 \text{ nm}$, a keresztmetszeti profilok alapján $3-5 \text{ nm}$ magasságúak (y). **(26. kiegészítő ábra/d)** Az összecsavarodott amiloidszálak által képzett rostok jelenléte és azoknak finomszerkezete a 72 órás vortexelés nélküli mintán figyelhető meg igazán. **(26. kiegészítő ábra/e)** Vortexelés hatására az aggregárumok

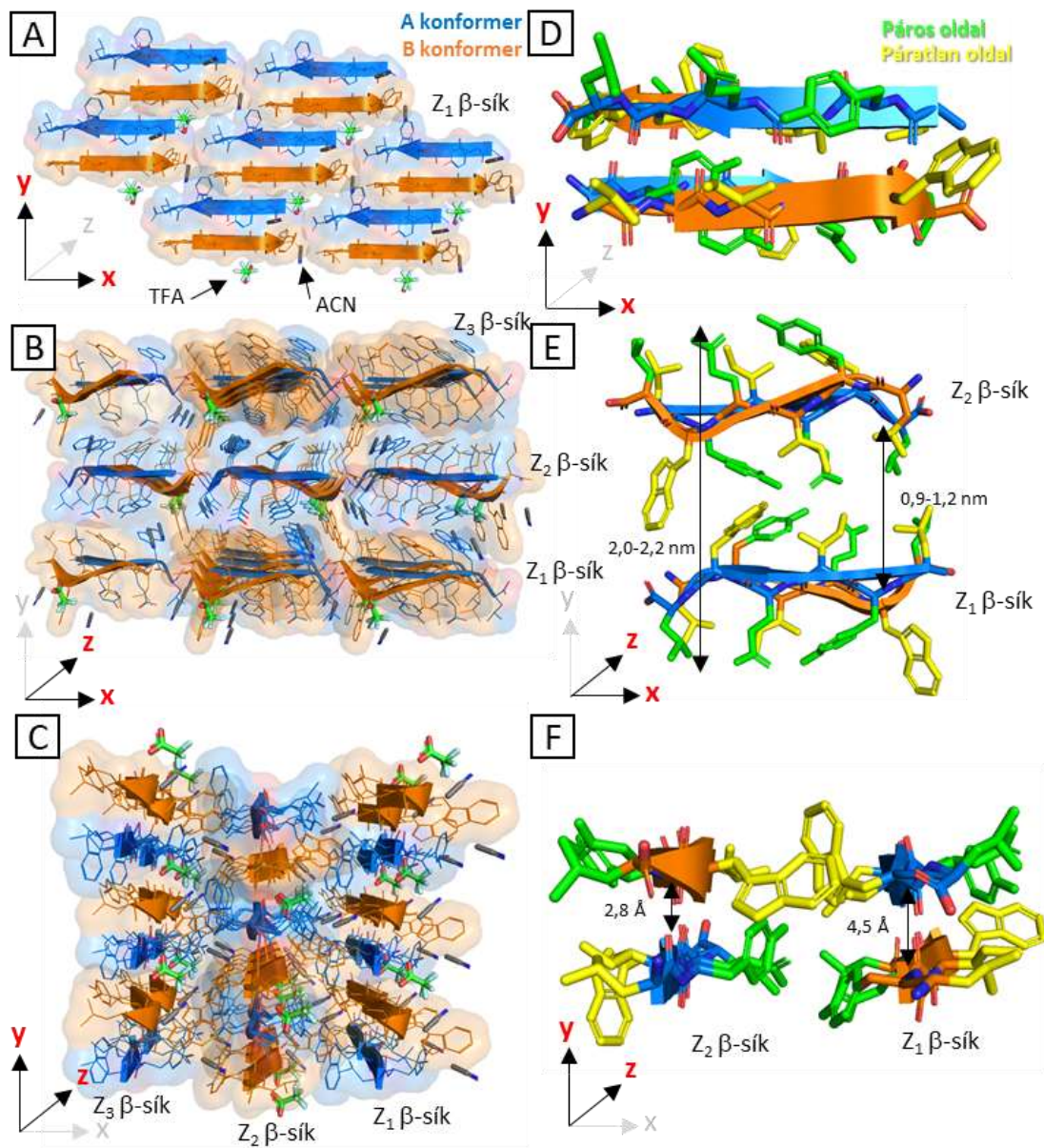
szétesnek és a képződő mono/oligomerek mérete megegyezik a friss minta mérettartományával ($0,7-2,1 \text{ nm}$). **(38. ábra/c-d)** A minta további öregedésével egy rendezett mozaikszerű $\sim 1 \text{ nm}$ -

es átmérőjű szálhálózat-rendszer is kialakul. **(26. kiegészítő ábra/i-j)** Mindeközben az amiloid rostok száma csökken. Feltételezhetően ennek az az oka, hogy több rost egyesülésével a növekvő aggregátumok kiülednek a törzsoldat aljára és nem kerülnek mintavételezésre. **38. ábra b** és **c** paneljén idült amiloidszálakról látható felvétel.

5.5 Az E5 amiloid modellek és az LYIQWL peptidkristály atomi felbontású térszerkezete

Az amiloidszál modellezése során figyelembe vettük, hogy a FUV ECD által detektált β -redős peptidszálak lehetnek parallel v. antiparalell állásúak, a NUV ECD-spektrum alapján az egyes β -redős monomerek aromás oldalláncai intramolekulárisan biztosan térközben vannak, akár az amiloid gerinc hossztengelye mentén akár a két β -sík között. Mivel a prolinok gátolják a kiterjedt β -redős réteg kialakulását, ezért az E5 szekvencia EEEAVRLYIQWLKEGG szegmense lehet felelős az aggregációért. Ezt az elképzelést bizonyítandó vizsgáltam az E5 helikális szegmensének, az EEEAVRLYIQWLK-NH₂ peptidnek aggregációját. Már a pH-függő FUV ECD-spektrumok is jelezték az aggregáció meglétét széles pH tartományban ($3 > \text{pH} > 7$). A zyggregator [295] nevű prediktáló program is az RLYIQWLK szekvencia részt jelölte meg aggregációs „hot-spot”-nak. Az információ töredékek alapján aggregációs modelleket építettünk amelyek összesen 8 peptidszálat tartalmaztak: 4-4 peptidlánc ($E5[{}^1E_1, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ állapotnak megfelelő töltésmintázattal), paralell és antiparalell állásban különböző szekvenciális átfedésekkel különböző morfológiájú β -redős síkokba épült fel, majd megvizsgáltuk, hogy az egyes síkok mennyire stabilak. **(27. kiegészítő ábra/a)** A legstabilabb variáció esetében a peptid láncok antiparalell állásban állnak, úgy, hogy a Y_A lánc-W_B lánc és a W_A lánc -Y_B lánc oldalláncok egymás felett/alatt helyezkednek el. A β -redők között a lehetséges 18 H-hídból 10 valósul meg (V⁵-E¹⁴, L⁷-L¹², I⁹-Q¹⁰, W¹¹-Y⁸, K¹³-R⁶) a modell alapján. **(27. kiegészítő ábra/b)**

RLYIQWLK aggregációs góc LYIQWL hexapeptid szegmenséből sikerült amiloid szerkezetű mikrokristályt növesztetni a HPLC tisztítás során eluálódó tiszta komponensből és annak szerkezetét röntgendiffrakciós módszerrel meghatározni. **(39. ábra)** A kristályszerkezetben az egyes β -síkok közé acetonitril (ACN) és trifluor-ecetsav (TFA) molekulák ékelődnek be, emiatt 2 fajta konformer rétegződik váltakozva egymásra, szendvicsszerűen eltérő Trp oldallánc irányultsággal. A peptid láncok az MD



39. ábra. Az E5 aggregációs góc LYIQWL peptidből növesztett mikrokristály térszerkezete. A)-B)-C) a kristályrács E)-F)-G) 2x2-es tetramer egység elől (xy), felül (xz) és oldalnézete (yz). Az egyes z síkokban a β -redős peptidszálak között alakul ki a H-híd rendszer, míg két β -sík között (Z_1 - Z_2) főleg hidrofób kölcsönhatások alakulhatnak ki. Egy Y-síkban a β -redős peptidszálak párhuzamosan futnak és páronként azonos felszínükön (páratlan-páratlan v. páros-páros) azonos aminosavak irányulnak egymás felé.

szimulációval megegyezően antiparallel állásúak, a 2 parallel β -redős sík pedig ekvifaciális módon helyezkedik el a 8-as osztálynak megfelelően. (9. ábra) A β -síkokban a dimer β -redők – feltehetőleg ugyancsak a TFA jelenléte miatt kissé elcsúszva helyezkednek el.

6. Megbeszélés

6.1 Az E5 származékok termális denaturációjának vizsgálata ECD és NMR-spektroszkópiával

6.1.1 A helikális jelleg jellemzése ($CSD_{\text{hélix } 2-13}$, $\Theta_{222\text{nm}}$, $F\%_{\text{FUV}}$)

A **20. ábra** görbéinek elemzése során megfigyelhető, hogy az ellipticitás adatok a hőmérséklet emelésével 4°C-tól folyamatosan csökkennek, addig az NMR-adatok alapján 15°C-on tűnik a helikális szakasz a legrendezettebbnek. A 4°C-on mért alacsonyabb helicitás ($CSD_{\text{hélix } 2-13}$) értékeket a hideg denaturáció jelenségével lehet magyarázni. A két spektroszkópiai módszer is eltérő mértékű denaturációt mutat. 4°C→48°C tartomány között megvizsgálva a görbéket az ECD-értékek meredekebben csökkennek, mint az NMR-adatok. (**20. ábra**) Az átlagos rendezettség 48°C-on a kiindulási állapothoz képest az NMR-adatok alapján ~20-27%-kal, $\Theta_{222\text{nm}}$ -en mért ellipticitás adatok alapján ~34-53%-kal, míg a spektrum dekonvolúció rendezett komponense ($F\%_{\text{FUV}}$) alapján ~26-54%-kal csökkent. (**2. kiegészítő táblázat**) A $F\%_{\text{FUV}}$ értékek alapján – amely a teljes peptidgerinc amid kromofórjainak elektronátmeneteit jellemzi – a rendezettség trendszerűen néhány százalékkal kisebb értéket ad, mint a 222 nm hullámhosszon mért ellipticitás, amely hélix régióra karakterisztikus. Ennek alapján az eredmények arra utalhatnak, hogy a denaturáció során a helikális szakaszok rendezettsége kisebb mértékben változik, mint a peptid más szegmenseié. Összevetve mindezt a térszerkezeti adatokkal látható - mind magukon a szerkezeteken mind a szekvenciális RMSD értékeken - hogy a helikális tartomány magasabb hőmérsékleteken kezd fellazulni, mint a 3_{10} -hélix régió (13-20 szegmens). (**14-18. ábra**) A szekvenciális RMSD értékek alapján a hélix tartománynak egészen 37°C-ig konstansan maximum 1-2 Å nagyságú szórása van, amely a régió stabilitását jelzi. Ez összhangban van a $CSD_{\text{hélix } 2-13}$ értékek plató jellegű szakaszával 4-26°C között, azonban ellentmondásban azokkal a megfigyelésekkel, hogy mind az ECD ellipticitás mind a hélixeket definiáló 1<i>i</i><5 távolságú keresztcsúcsok száma (**3.táblázat**) is folyamatosan csökken.

A **20. ábra** alapján a különböző E5 származékokat a másodlagos szerkezeti rendezettség alapján rangsorolva jelentős korreláció állapítható meg 4°C és 48°C között. Az X'' értékek alapján könnyen összehasonlíthatók a különböző mutánsok rendezettségei az E5 natív állapotához képest. A rendezettség értékek az alábbi tendenciát mutatják:

E5_A4C_E14D_S25C (E5_SS) > E5_E14D > E5 > E5_E14Q \cong E5_R6N. A diszulfidhíd beépítése 10-30%-kal (attól függően melyik értéket nézzük (**3. kiegészítő táblázat**)) nem csak hogy növelte a helicitást de termorezisztensé is tette az E5_A4C_E14D_S25C peptidet az E5-höz képest. 85°C-on az $F\%_{FUV} = 97\%$, míg a $|\Theta_{222nm}| = 88\%$. Az E14D szekvenciális csere kémiai szempontból nem tűnik jelentősnek, de hatására mintegy $\sim 30^\circ\text{C}$ -kal nőtt az E5_E14D szerkezetirezisztenciája az E5 natív állapotához képest a másodlagos kémiai eltolódások alapján. (Az E5_E14D olvadási görbéje, amikor a 100%-ot metszi: $CSD_{\text{hélix}2-13}^{4^\circ\text{C}}_{E5} = CSD_{\text{hélix}3-13}^{37^\circ\text{C}}_{E5_E14D}$ – **20. ábra**) Az E14Q és az R6N csere jelentős mértékben csökkentette a helikális jelleget. A másodlagos kémiai eltolódások alapján az R6N és az E14Q mutáns natív szerkezete (4°C) akkora rendezettséget mutat, mint az E5 $\sim 37^\circ\text{C}$ és $\sim 44^\circ\text{C}$ -on. Mindkét esetben egy töltéssel rendelkező aminosav szubsztitúciója egy semlegesre megváltoztatja a hélix töltéseloszlását, ezáltal a makro dipólusmomentumát, amely a hélix destabilizációjához vezet.

A fluor szubsztituált származékok hődenaturációjáról elmondható, hogy az E5_E14D_P17(4R)fP szubsztitúció nem okozott számottevő stabilizáló hatást az E5_E14D variánshoz képest, azonban a többi szubsztitúció esetében a stabilitás jelentősen romlott. (**20. ábra/d-e-f**) Az NMR és az ECD denaturációs görbék nem teljesen ugyanazt a tendenciát mutatják. Míg a $CSD_{\text{hélix} 2-13}$ értékek alapján a E5_E14D_P17(4S)fP kicsit rendezetlenebb az E5_E14D-hez képest, de rendezettebb a Pro24 γ pozíciójában szubsztituált származékokhoz képest. Az ECD-adatok szerint az E5_E14D_P24(4S)fP nagyobb rezisztenciával bír, mint az E5_E14D_P17(4S)fP. Valószínűleg a $CSD_{\text{hélix} 2-13}$ alapján megállapított stabilitási tendencia a helytállóbb, ugyanis a 24-es pozícióban fluor szubsztituált származékok rendezetlensége, mozgékonyága oly mértékben megnőtt 26°C felett, hogy a 2D-s spektrumokat a jelhiány miatt nem tudtam asszignálni. A számolt szerkezetsokaságok gerincatom RMSD értékei is reflektálták ezt a tendenciát. Míg 26°C -on az E5_E14D_P17(4S)fP esetében a szerkezetsokaságok jellemző RMSD = 0,119 Å, addig a E5_E14D_P24(4S)fP esetében az RMSD = 0,238 Å, és a E5_E14D_P24(4S)fP esetében pedig RMSD = 0,273 Å. (**3. táblázat**) Biztosan elmondható azonban, hogy a P17-es pozícióban a (4R) fluor szubsztitúció előnyösebb a (4S) szubsztitúcióval szemben, addig a P24-es prolin szubsztitúciónál az előzőek ellenkezője érvényes.

6.1.2 A harmadlagos térszerkezet - Trp-kalitka jellemzése (CSD_{cage}, $\Theta_{276\text{nm}}$, $\Theta_{280\text{nm}}$, $\Theta_{287\text{nm}}$, $\Theta_{293\text{nm}}$, F%_{NUV}, 8Tyr-11Trp térállás)

A Trp-kalitka jellemzése a kombinált spektroszkópiai módszerekkel komplexebb és kevésbé egyértelmű, mint a másodlagos szerkezeti elemek leírása. A CSD_{cage} értékekből következő rendezettségi sorrend korrelációt mutat a másodlagos szerkezet alapján meghatározott rendezettségi sorrenddel: **(20. ábra/a,d)** E5_A4C_E14D_S25C (E5_SS) > E5_E14D > E5 \cong E5_R6N > E5_E14Q. A ¹⁹F szubsztituált variánsok esetében érvényes ugyancsak, hogy a P17 γ -pozíciójában (4R) kis mértékben növeli, míg a (4S) szubsztitúció kis mértékben csökkenti az E14D-hez képest a termostabilitást. A P24 helyzetben a szubsztitúció a (4S) és a (4R) is destabilizál, azonban a (4R) esetében jelentősebb mértékben. Az asszignált keresztesúcsok száma **(2. táblázat)** és a számolt szerkezetsokaságok **(14-18. ábra)** gerincatomjainak RMSD változása korrelál a CSD_{cage} alapján meghatározott rendezettségi sorrenddel.

A NUV ECD-spektrumok felbontásának rendezett komponensként (F%_{NUV}) asszignált értékei is a növekvő hőmérséklet függvényében konstans csökkenést mutatnak, azonban más a rendezettség sorrendje, mint a CSD_{cage} értékek esetében. **(20. ábra)** A F%_{NUV}” görbéket két halmazba osztottam az alapján, hogy mekkora a kiindulási (4°C) rendezettségük. Az E5, E5_R6N, E5_E14D_P17(4S)fP, E5_E14D_P17(4R)fP, E5_E14D_P24(4S)fP variánsok esetében a F%_{NUV}”^{4°C}=90-110%. Az E5_E14D, E5_E14Q, E5_E14D_P24(4R)fP esetében a F%_{NUV}”^{4°C}=70-80%. **(3. kiegészítő táblázat)** Ez azt jelentené, hogy az E14D vagy E14Q szubsztitúció ~20-30%-kal csökkenti a Trp-kalitka kompaktságát, azonban a P17(4R/4S)fP vagy a P24(4S)fP szubsztitúció kompenzálja ezt a hatást. A P24(4R)fP szubsztitúciónak látszólag nincs jelentős hatása. A közeli ECD-spektrumok dekonvolúciójának az eredménye arra enged következtetni, hogy a Trp-kalitka globális rendezettsége nem jellemezhető egyértelműen ezekkel az adatokkal.

A közeli UV-tartományban a négy vizsgált hullámhossz hőmérsékletfüggésére **(21. ábra, 8-11. kiegészítő ábra)** az alábbi általános megfigyelések érvényesek: A hőmérséklet növelésével a sávok abszolút intenzitása csökken, 85°C-on detektált zérus közeli értékek az aromás kölcsönhatások megszűnését jelzik. A 276 és 280 nm-en mért pozitív jelek intenzívebbé válnak, míg a 287 nm-en mérték gyengébbek és a hőmérséklet növeléssel nem lineáris módon csökkenek (30-40°C-on van az intenzitás maximuma). A

293 nm-es negatív sávoknak még gyengébb az intenzitása és a hőmérséklet növelésével a negatív értékektől tartanak a zérus felé.

Az egyes variánsok 276 nm és 287 nm-en monitorozott Tyr L_b átmenetei a hőmérsékleti denaturáció során más-más tendenciát mutatnak. A 276 nm-en mért ellipticitások alapján az E5_E14D elkülönül az E5/R6N/E14Q variánsoktól. Az utóbbi három mutánsban jóval intenzívebbek a sávok, azonban a hőmérséklet növelésével folytonosan csökkennek, viszont az E14D bár alacsonyabb intenzitású, mégis ~27°C-ig konstans értékeket mutat. Hasonló plató fázis figyelhető meg az összes fluorozott variáns esetében is 4-27°C között (ezek is E14D szekvenciájúak). Míg a P17-en történő ¹⁹F szubsztitúciónak nincs számottevő hatása, addig a P24(4S)fP jelentősen növeli, a P24(4R)fP szubsztitúció csökkenti 276 nm-en az L_b sáv intenzitását.

280 nm és 287 nm-en az intenzitás különbségekből adódó sorrend megfelel a 276 nm-en tapasztaltaknak. A P24(4S)fP és a P24(4R)fP származékok ellipticitása maximum és minimum értékeket mutat a többi E14D mutánsval való összehasonlításban a teljes hőmérséklet tartományban. A két hullámhosszon alacsonyabb hőmérsékleten az ellipticitás értékek konstansok vagy kissé növekednek. 280 nm-en 26°C felett, míg 287 nm-en 50°C felett kezdett el csak csökkenni az intenzitása a sávoknak.

Az E5_E14D_P24(4S)fP esetében tapasztalt jelentős intenzitás növekedés 276/280/287 nm-en az E5_E14D-hez képest annak tulajdonítható, hogy a (4S) fluor atom Trp/Tyr-hoz térközbe esik és a F atom ily módon perturbálja az aromás elektron átmeneteket. Maga az intenzitás növekedés azonban nem eredményezi a stabilitás növekedését is (NMR-térszerkezet és a keresztcsúcsok alapján - **2. táblázat, 15. ábra/a**).

293-nm-en a korábbi tendenciáknak pont az ellenkezője figyelhető meg. Az ellipticitások abszolút értéke a hőmérséklet növelésével eleinte minden esetben csökken majd ~50°C felett konstans értéket vesz fel. Az intenzitások sorrendje is felcserélődött: Az E5_E14D/ E5_E14D_P24(4R)fP-nek spektrumában található a legintenzívebb negatív sáv, míg az E5/R6N/E14Q/ E5_E14D_P24(4R)fP alkotja a gyengébb intenzitású csoportot.

A közeli UV-tartomány egyes hullámhosszainak hőmérsékletfüggő ellipticitás változása alapján elmondható, hogy a hidrofób magban bekövetkező változások nem lineárisak. Eleinte (4-50°C-ig) a 293 nm-en mért aromás kölcsönhatás az érzékeny, míg a másik a másik három három hullámhosszon a detektált kölcsönhatás 30°C-ig konstans

marad (az E14D variánsoknál a legszembetűnőbb), majd az intenzitása elkezd csökkenni. Arra lehet következtetni, hogy 293-nm mért intenzitás értékek a hidrofób mag hidratáltságával állnak kapcsolatban, míg a másik három hullámhossz a Trp-Tyr oldalláncok geometriájával. A Trp-Tyr oldalláncok hidratálódásával párhuzamosan csökken a detektált jel abszolút intenzitása. A hőmérsékletfüggő szerkezetek alapján elmondható, hogy 48°C-ig a Trp-kalitikára jellemző harmadlagos szerkezet csak megolvad, ún. „molten-globule” jellegűvé válik, azonban nem bomlik fel teljesen. Ezt bizonyítja a 48°C-on megmaradó tucatnyi $i>5$ típusú keresztcsúcs jelenléte. A fentiek alapján a 293 nm-en megfigyelt oladási görbék a CSD_{cage} oladási görbékkel (**20. ábra/a,d**), valamint a térszerkezeti adatokkal korrelálhatóak.

A Tyr8-Trp11 térállásáról a szerkezetsokaságok alapján meghatározott paraméterek alapján (**4. kiegészítő táblázat, 14-18. ábra: d (Å); φ (°); θ (°); α (°)**) az alábbiak mondhatóak el: 1) 4-48°C-ig a Tyr-Trp közötti távolság számottevően nem változik, 5,5-6,5 Å között mozog. Mivel a központi hélix, amelyben a Tyr-Trp elhelyezkedik stabil így az azimutális szög értékek is állandóak (310-330°). A rendezetlen jelleg meglétét az azimutális szög nagymértékű csökkenése és az értékek szórásának növeledése indikálja (pl.: 48°C-on az E5, E5_R6N, esetében $253,9 \pm 103,9$; $183,6 \pm 152,9$). A korábban említett asszignálási bizonytalanság miatt a θ és α szöveget közelítő értékeként kell kezelni. A hőmérséklet függvényében nem figyelhetőek meg egyenletes, koherens tendenciák az értékek változásában. A dőlésszög (θ) 15-30° között mozog. Az α szög meghatározza, hogy a Tyr-Trp aromás oldalláncok „face to face – (ff)” ($\alpha \cong 0^\circ$) vagy „edge to face – (ef)” ($\alpha \cong 90^\circ$) elrendeződésben állnak. A síkok által bezárt szögek (α) szórnak a legnagyobb mértékben, az átlaguk függetlenül a szekvenciától és a hőmérséklettől 40° körül mozog és néhány esetben közelíti meg a 0° vagy 90°-ot (min: 14,9°, max: 78,7°). Az E5_E14D_P24(4R)fP esetében minden hőmérsékleten az átlagtól eltérő magasabb értékek ($\alpha \cong 50-60^\circ$) szignifikánsak tekinthetők. E variáns esetében Tyr8 oldallánc markánsabb *edge to face* állása annak köszönhető, a poliprolin-hélix szorosabban simul a szemközti α -hélixhez elfordítva így az oldalláncot.

Az aromás oldalláncok helyzete és a NUV hullámhosszakon detektált intenzitások alapján elmondható, hogy 4-48°C-os hőmérséklettartományt vizsgálva a 276 és 280 nm-en megfigyelt 30-35°C-ig tartó plató szakaszokhoz az aromás oldalláncok $\theta \cong 15-30^\circ$ és $\alpha \cong 45^\circ$ értékekkel jellemezhető térállását lehet rendelni. A tendenciák alapján, a két

hullámhosszon a nagyobb intenzitásokhoz (E5, E5_R6N, E5_E14Q, E5_E14D_P17(4S)fP) a $0^\circ < \alpha < 45^\circ$ értékek, míg a gyengébb intenzitású jelekhez (E5_E14D_P17(4R)fP) a $45^\circ < \alpha < 90^\circ$ értékek konvergálnak.

6.2 Az egyes aminosav szubsztitúciók térszerkezetre gyakorolt hatása

6.2.1 A 14X-21R sóhíd finomhangolása: E5, E5_E14D, E5_E14Q

A $CSD_{\text{hélix } 2-13}$, $\Theta_{222\text{nm}}$, $F\%_{\text{FUV}}$, CSD_{cage} értékek (**20-21. ábra**), valamint az asszignált keresztcsúcsok (**2. táblázat**) a számolt szerkezetek és azok RMSD értékei (**14-15. ábra**) alapján egyértelműen az alábbi rendezettségi/stabilitási sorrend állapítható meg: E5_E14D > E5 > E5_E14Q. A leginkább termorezisztens E5_E14D a vizsgált paramétertől függően akár 30-40°C-kal magasabb hőmérsékleten destabilizálódik csak olyan mértékben (X'') (**20-21. ábra**) mint az E14Q. Az E14Q mutáns esetében világos, hogy $pH = 7$ -en a Gln14 oldalláncáról hiányzó negatív töltés miatt nem alakulhat ki olyan erős elektrosztatikus kölcsönhatás a Arg21 pozitívan töltött guanidino csoportjával, mint ami a Glu-Arg pár között fellép. A kérdés, hogy az E5 és az E5_E14D esetében, ahol a Glu14 és a Asp14 kémiaiailag hasonló karakterű, miért mutatkozik szignifikáns különbség a stabilitás értékekben. A szerkezetsokaságok alapján a 3_{10} -hélix régió a Gln10, Trp11, X14 (X=Asp/Glu/Gln), Ser19, Arg21 aminosavak kölcsönhatás rendszerével jellemezhető (**28. kiegészítő ábra**). Fontos megjegyezni, hogy a hőmérsékletfüggő szekvenciális RMSD adatok alapján ez az a régió, amely melegítés során leghamarabb fellazul és dinamikussá válik megnyitva a lehetőségét a hidrofób Trp-kalitka további felnyílása előtt (amit a megemelkedett RMSD értékek és keresztcsúcsok hiánya jelez). Az asszignált keresztcsúcsokon alapuló hálózatrendszer alapján az alábbiak mondhatók el. (**28. Kiegészítő ábra**)

1) Mindhárom esetben a Trp11 indol oldalláncának NH protonja és az Arg21 gerinc karbonil csoportja között egy H-híd alakul ki, amely hatására az arginin oldallánca körbe öleli, ezáltal árnyékolja a Trp oldalláncát. Az Arg-Trp keresztcsúcsok száma tehát jól jellemzi a sóhíd stabilitását. Az E5_E14D esetében a Ser19 oldallánca a hidrofób mag felé fordul így az –OH csoport oxigénje és az Arg21 gerinc amid protonja között, illetve a Ser –OH protonja és a Trp11 indol nitrogénje között két újabb H-hídat alakíthat ki, amely egy H-híd triádot alkot. (Trp11-Ser19-Arg21) Ez a magyarázata annak, hogy az

összes E14D mutánsokban (fluor szubsztituáltak is) a Ser egyébként disszociábilis –OH protonja megjelenik az NMR-spektrumon. Az E5 mutánsban ez a Ser-OH a oldószer felé mutat és nem alakul ki a H-hidak által összekötött triád, míg a E14Q mutánsban egy köztes állapot jön létre és a triád 3 tagjából csak kettő (I./II.) kapcsolódik. A Ser19-OH protonja és a Trp11 indol N között kialakuló gyenge H-híd lehet magyarázata annak, hogy a közeli UV-tartományban a triptofán L_a sáv intenzitása t lecsökken (280 nm) illetve megnő (293nm) az E14D szekvenciájú mutánsban, de nem az E5/E14Q mutánsokban.

2) A 14-es pozícióban Asp/Glu/Gln más-más kölcsönhatásokban vesz részt: Az Asp (E14D) esetében az oldallánc rövidege miatt a karboxilát csoport csak az Arg21 pozitív töltésű guanido csoportjával tud kölcsönhatni és a teljes populáció sóhídban van. A Glu (E5) esetében a hosszabb oldallánc a szerkezetsokaságok (és a keresztcsúcsok) alapján nem csak a sóhídban tud részt venni, hanem a Gln10 oldallánc amid protonjaival is tud H-hidat opcionálisan kialakítani, amely viszont nem stabilizálja a 3_{10} -hélixet. Ez a „csiki-csuki” effektus a Glu14 esetében azt eredményezi, hogy a sóhídban a populációk egy hányada vesz részt csak, amely eredményeként csökken az sóhíd kötés stabilizáló hatása. A hőmérséklet növelésével a 3_{10} -hélix geometriáját meghatározó keresztcsúcsok száma a stabilitási értékekkel (X'') koherensen csökken ($4^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$ változás során az E5:35 \rightarrow 13, E14D:52 \rightarrow 22, E14Q: 17 \rightarrow 4), a Ser19-OH a felszínre emelkedik és a stabilizáló kölcsönhatások hiányában a 3_{10} -hélix különböző mértékben ugyan, de fellazul.

Az E14Q mutáns esetében a 3_{10} -hélix destabilizálása mellett az α -hélix N-terminálisa is jelentősen rendezetté vált (**15. ábra/b**), attól függetlenül, hogy a szubsztitúció szekvenciálisan távol esik. Erre pontos atomi szintű magyarázatot nem találtam, de összefüggésben állhat azzal, hogy $pH = 7$ -en az α -hélix C-terminálishoz közeli végéről eltávolított negatív töltés megváltoztatja az α -hélix makro dipólusmomentumát, amely kihat az N-terminálisra is.

Az aggregáció szempontjából is jelentős szerep tulajdonítható a sóhídnek. Az aggregációs kísérleti körülmények mind a stabilitás ellen hatnak, elősegítve az E5 kompakt térszerkezetének a felnyílását. A 37°C növeli a 3_{10} -hélix szegmens mozgékonyágát, (**15. ábra/a**) a $pH = 4,1$ -en a Glu14 oldallánc protonálódik, megszüntetve az ionos kölcsönhatás kialakulásának lehetőségét (**15. ábra/b**), míg a megnövelt ionerősség hatására a fehérje felszínén lévő intramolekuláris ionos kötések egy része felszakad. (**29. kiegészítő ábra**) Az E5_E14D esetében a megnövekedett

denaturációs ellenállóképesség lehet az oka annak, hogy az általános aggregációs körülmények mellett nem képződött amiloid. **(32. ábra/b)** Az adott kísérleti körülmények mellett a FUV ECD-spektrumok átmeneti jellege (C/U-típusú) azt mutatja, hogy az E14D destabilizálódott, de nem annyira, hogy az intermolekuláris oligomerképződés meginduljon, mint az E5-esetében. Az E14Q hidrofób magja bár könnyebben felnyílhat, azonban $pH = 4,1$ -en más az össztöltése (+2,155), ezáltal a töltés- mintázata is, mint az E5-nek (+1,846), véleményem szerint ezért nem tapasztalható a β -redős szerkezet megjelenése. **(32. ábra/b)** Ez a megfigyelés egyben rávilágít az aggregációhoz szükséges megfelelő protonáltsági mintázat jelentőségére. Más kondíciók mellett valószínűleg mindkét mutáns amiloid aggregációja megtörténne. Az is feltételezhető, hogy a 14-es pozícióban az aminosavon szükséges az oldalláncon egy disszociábilis karbonsav az oligomerizációhoz, azonban az EEEAVRLYIQWLK-NH₂ C-terminálison amidált peptid, amely az E5 helikális szakaszának felel meg, ugyancsak aggregál az ECD-adatok alapján. **(30. kiegészítő ábra)**

6.2.2 R6N szubsztitúció hatása

A hatos pozícióban arginint tartalmazó E5 variánsoknál $pH = 7$ -en minden esetben kialakul egy sóhíd a Glu3 és a Arg6 oldallánca között, amelyre bizonyíték az oldallánc protonok (H β , H γ) közötti keresztcsúcsok megléte. Az R6N szubsztitúció hatására ez az extrahelikális kölcsönhatás megszűnik, amelynek eredményeként a C-terminális rendezetlensége jelentősen megnő. **(16. ábra/b)** A különböző hélix rendezettséget jellemző adatok alapján a helicitás mértéke 4°C-on 15-20%-kal csökken. **(20. ábra)** A C-terminális rendezetlensége azonban csak kismértékben befolyásolja a hidrofób Trp-kalitka rendezettségét **(21. ábra/a, 21. ábra/i)**

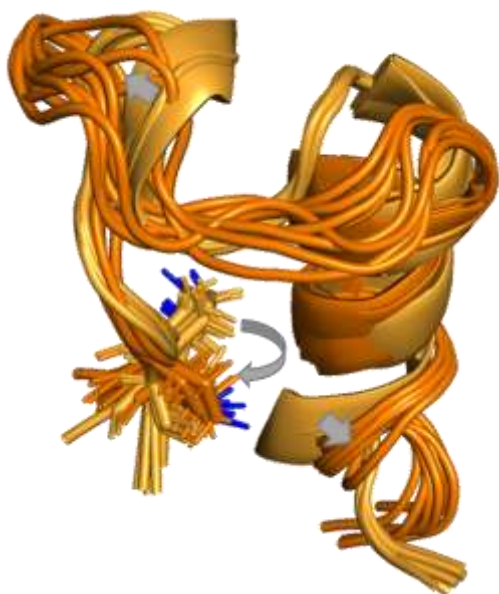
6.2.3 A fluor szubsztituált variánsok

A különböző pozícióban megvalósult ¹⁹F szubsztitúció eltérő módon és mértékben, de hatással van az E5 variánsok térszerkezetére. Mivel az összes fluor szubsztituált származék az E14D módosításának tekinthető, ezért a korábban bemutatott stabilizáló hatások itt és érvényesek. **(28. kiegészítő ábra)** Ezekhez társul a fluor szubsztitúciók hatása. A 4°C-on meghatározott térszerkezetek alapján, a prolin *endo/exo*

konformációja közti egyensúlyt a (4R) az *exo*, míg a (4S) az *endo* irányba tolja el a bevezetésben leírtaknak megfelelően. **(31. kiegészítő ábra)** Szekvenciális pozícótól függetlenül a prolinok peptidgerince *transz* térállású ($\Omega \cong 180^\circ$) és a (4S)-*endo* konformáció esetében sem tapasztaltam a 2D homonukleáris spektrumok alapján *cisz* térállású minor komponens megjelenését. A ϕ - ψ torziós szögpárok alapján, a P17 esetében ϕ szögek megegyeznek $[(-)45-(-)60^\circ]$ között mozognak] míg a ψ szögek esetében a P17(4S)fP tér el $(+20^\circ)$ az átlagtól (-20°) . A P24 esetében a ϕ szögek -50° és -80° között változnak, míg a ψ szögek esetében a P24(4R)fP (150°) tér el az átlagostól $(-90 < \psi < +90)$. Az említett torziósszög különbségek, illetve *exo-endo* térállás mellett a fluor kémiai természetéből adódó speciális hidrofobicitás, a nagy elektronegativitás és a három nemkötő elektronpár és azok kölcsönhatása finomhangolhatja a térszerkezetet.

A P17(4S)fP és a P17(4R)fP szubsztitúció Trp-kalitka térszerkezetre gyakorolt hatása összhangban van Naduthambi modelljével [128], miszerint míg a (4R) stabilizálja, addig a (4S) destabilizálja a 3_{10} -hélix térszerkezetet. A rendezettséget jellemző NMR-mérőszámok alapján ez a különbség csak néhány százalékos, amely nem változik a hőmérséklet függvényében. **(20. ábra/d, 21. ábra/d)** Mindkét esetben a fluor a minifehérje felszínén helyezkedik el, amely a hidratáció szempontjából előnytelen, azonban a (4R) esetében a nagy elektrondenzitású fluor a Trp11 gyűrűjének elektronszegényebb hidrogénjei felé irányul, mely kölcsönhatás előnyös lehet a térszerkezet stabilitása szempontjából. **(31. kiegészítő ábra)** Az E14D és a P17(4R)fP esetében a 3_{10} -hélix geometriája azonos, a P17(4S)fP esetében kissé torzult. Ez a megfigyelés összhangban van a FUV ECD-adatokkal, ahol az E14D és a P17(4R)fP görbék értékei korrelálnak nagyobb mértékben. **(20. ábra/e,f)**

A P24(4S)fP és a P24(4R)fP szubsztitúció eltérő mértékben, de mindkét esetben destabilizálja az α -hélixet és a Trp-kalitka motívumot is. P24(4S)fP esetében a fluor el van temetve a hidrofób magban a Tyr és a Trp oldallánca közé, míg a P24(4R)fP rendszer esetében a felszínén helyezkedik el. **(31. kiegészítő ábra)** A fluorok a 24-es γ pozícióban térközbe $(2,5-4,0 \text{ \AA})$ kerülnek az α -hélix H-híd hálózatához - perturbálva azt, csökkentve ezzel a helicitás mértékét. **(20. ábra/d-f)** A 4°C térszerkezetek alapján P24(4S)fP és az E14D 3_{10} és PP_{II} -hélix geometriája megegyezik, P24(4R)fP esetében azonban ez a régió kissé a terminálisok irányába van eltolva, ami a Tyr8 oldallancának az elfordulását és a helicitás további csökkenését eredményezheti. Mivel a P24(4S)fP és



40. ábra Az E5_E14D_P24(4R)fP 4°C-os (világosnarancs) és 26°C-os (sötétnarancs) szerkezetsokasága. Kékkel a a (4R) fluor atom van jelölve. Szürke nyilak jelzik a szövegben leírt szerkezeti változásokat.

az E14D variánsok geometriája hasonló, a NUV ECD-spektrumokban tapasztalt Tyr/Trp L_a-L_b sávok ellipticitás növekedése a P24(4S)fP esetében visszavezethető a térközben lévő fluor atom és az aromás oldalláncok kölcsönhatására. (**21. ábra/e,f, 22. ábra/j**) P24(4R)fP variáns esetében egy érdekes szerkezeti változást figyeltem meg magasabb hőmérsékleten, amely indukálhatja 26°C felett a térszerkezet elvesztését. (**40. ábra**) A 26°C-os átlagszerkezetben a 24-es prolin 90°-ban elfordul a PP_{II}-hélix tengelye

körül az α -hélix irányába, így a (4R) pozícióban lévő fluor a Tyr8 felé irányul, és a (4R)-re jellemző exo konfiguráció a kedvezőtlenebb endo konfigurációra változik (A peptidgerinc *transz* állása nem változott).

Az átfordulás hatására a 3₁₀-hélix kiegyenesedésével, a Ser19-OH a felszínre kerülésével felgyorsul a Trp-kalitka hidratációja és felbomlása. A P24(4S)fP szubsztitúció esetében nem tapasztalható ilyesfajta konformáció változást.

6.2.4 Diszulfidhíd beépítésének hatása

A diszulfidhíd beépítése jelentős mértékben növelte nem csak a Trp-kalitka térszerkezet termorezisztenciáját, de a rendezettség mértékét is - a spektroszkópiai mérőszámok alapján (X''). A FUV ECD-adatok alapján a Trp-kalitka gyűrűbe zárásával a helicitás 20-30%-kal növekszik az E5-höz képest (**20. ábra**), és 85°C-on is megmarad a kiindulási rendezettség ~75%-a. Ez az érték a többi variáns esetében mindössze ~10-30%. (**2. kiegészítő táblázat**) A hidrofób mag irreverzibilis gyűrűbe zárásával nemcsak a hőstabilitás növekedett, hanem az amiloid aggregációs hajlam is lecsökkent. Az E5_A4C_S25C variáns esetében a standard aggregációs protokoll mellett nem figyelhető meg aggregáció, a minifehérje két hét után is megtartotta C-típusú görbe jellegét. (**32. kiegészítő ábra**)

A különböző α -hélix hosszúságú oxidált(SS)/redukált(2SH) diszulfidhíd ciklizált variánsok térszerkezetét (15°C) jellemző spektroszkópiai adatsorozatok alapján az alábbiak mondhatók el: 1) Minél rövidebb α -hélixszel rendelkezik a variáns, a gyűrűbe zárás annál nagyobb mértékben stabilizálja a harmadlagos térszerkezetet. (CSD_{cage}^{E2} : 3,78 \rightarrow CSD_{cage}^{E2-2SS} : 11,34; CSD_{cage}^{E19} : 10,87 \rightarrow CSD_{cage}^{E19-SS} : 11,66) A redukált szerkezetek CSD_{cage} értéke csak kis mértékben növekszik az anyavegyülethez képest. Ez alól kivétel az CSD_{cage}^{E2} : 3,78 \rightarrow CSD_{cage}^{E2-2SH} : 9,56, amely esetben a nagyfokú rendezettség növekedésnek az oka, hogy az N-terminálisra elhelyezett cisztein elősegíti az α -hélix rendeződését [296], amely hatására a harmadlagos szerkezet is rendeződik. **(3. táblázat)**

2) A távoli UV-tartományú ECD-spektrumok felbontásának rendezett komponense **(3. táblázat)** alapján az E11_SS/2SH bír a legnagyobb arányú helicitással (F_{FUV} : 96%/76%), amely összhangban van a számolt szerkezetekkel is. **(24. ábra/a)** Az E19_SS bár ugyanolyan hosszúságú hélixszel rendelkezik, mint az E11_SS, azonban az első 8 aminosav (HGEGTFTS) rendezetlen jelleggel bír, emiatt arányaiban kisebb a rendezett helikális komponens értéke. (F_{FUV} : 51,6%)

3) A különböző hélix szegmensek kémiai eltolódáson alapuló rendezettségének vizsgálatával részletesebb információ nyerhető mind az S-S kötés oxidációs állapotának, mind az α -hélix hosszának szerkezeti hatásáról. **(24. ábra/b)** A külső hélixre nincs hatással a diszulfidhíd jelenléte, azonban az ECD-adatokkal összhangban az E11 csoport esetében nagyobb a rendezettség. Ez alapján az E19 hosszúságú csoportban a rendezetlen N terminális mozgékonyasága kihat a külső hélixre, perturbálva annak helicitását. Hosszabb α -hélixek esetében megfigyelhető egy törés a hélix hossz tengelye mentén az -EEE- szekvenciánál. Erre a régióra nem csak a hossz (E11>E19>E5), hanem a diszulfidhíd jelenléte is hatással van. E19/E11 variánsoknál a hélix törésnél és a belső hélix esetében megfigyelhető, hogy a 2SH származékok rendezettsége nagyobb, mint a SS variánsoké. Ez azt jelzi, hogy a diszulfidhíd beépítése bár kis mértékben stabilizál, de rigidebbé is teszi a helikális szakaszt, azonban a redukció hatására a feszülés megszűnik a hélixben. A rövidebb hélixek (E2/E5) esetében ez a jelenség nem tapasztalható. A belső hélix kb. kétszer akkora helikális rendezettséggel bír, mint a N-terminálishoz közelebbi szakasz. **(24. ábra/b)**

6.3 Az *in vitro* kísérletek eredményei

Az *in vitro* kísérletek alapján megállapítható, hogy a korábban már bizonyítottan potens exendin-4, EDR és E19 körülbelül 15-20%-kal növelte az elválasztott inzulin mennyiségét magas glükóz koncentráció mellett. Annak ellenére, hogy az E19_SS termostabilitása jelentősen nagyobb, mint a másik három aktív származéké, a biológiai teszt alapján mégis inaktívnak bizonyult, úgy mint az N-terminálison csonkított Tc5b/E5/E10 variánsok. Minden bizonnyal az elmaradt biológiai hatás a Trp-kalitka ciklizálásának az eredménye és nem a ciszteinek szubsztitúciójának. A kísérlet bizonyíték egy még el nem döntött kérdésre, miszerint az Exenatide receptorhoz kötődése során a Trp-kalitka felnyílik-e vagy sem. Korábbi krisztallográfiai, illetve cryo-EM mérések során nem találtak megfelelő elektronsűrűséget, hogy a ligandum 3_{10} -hélixétől a C-terminálisig (PDB ID: 3C59,6B3J) terjedő szakaszát a modellekbe beépítsék, ami arra utal, hogy ez a szakasz flexibilis marad a receptor extracelluláris doménhez kötött állapotban is. Az E19_SS esetében a ciklizálás miatt a Trp-kalitka azonban nem tud felnyílni. Evers és munkatársai [297] egy N-terminálison csonkított, az E19_SS-sel analóg módon ciklizált Exenatide/glükagon kiméra kristályszerkezete (PDB ID: 6GB1) alapján bizonyították, hogy a ciklizált Trp-kalitka motívum is kötődik a TM régióról leválasztott EC-doménhez. Az E19_SS biológiai inaktivitása abból fakadhat, hogy az extracelluláris domén elmozdulása során a ligandum N-terminálisa nem tud megfelelően a kötőzsebbe mozdulni feltehetőleg sztérikus okokból. Az E19_SS rögzített C-terminálisa a kötőzsebbe merülés során az ECL-1-be és TM2-be ütközik. A diszulfidhidat nem tartalmazó ligandumok esetében a Trp-kalitka motívum fel tud nyílni és így idomulhat a környezetéhez, azonban az E19_SS esetében a kovalens SS kötés ezt gátolja. **(2. ábra b/c)** A kísérlet az irodalmi szerkezetek mellett bizonyítja, hogy a receptorhoz való kötődéséhez nem szükséges a Trp-kalitka felnyílása azonban a megfelelő receptor aktiváláshoz igen. Előzetes molekuladinamikai számításaink azt sugallják, hogy bár a SS-kötéssel ciklizált Trp-kalitka elférne a TM hélixek által alkotott kavitásban, azonban ez az aktivált állapotban egyébként helikális ECL-1 deformálásához vezet – tehát csak úgy tud a receptorhoz kötődni, ha jelentősen megváltoztatja azt. **(2. ábra b/c)** Ha ez a feltételezés igaz, akkor elmondható, hogy az ECL-1 megfelelő konformációjának kitüntetett szerepe van a ligandum-szelekcióban. A fentiek alapján a Trp-kalitka motívum nem csak stabilizálja oldatban a minifehérjét, hanem ún. „entrópia-rezervoár” funkciót is

betölt a kötődés során. A receptorhoz kötődés, valamint ennek során az N-terminális rendeződése entalpia növekedéssel jár, amelyet a kötődéssel párhuzamosan felnyíló mozgékony C-terminális entrópia növekedése kompenzálhat. A C-terminális entrópia rezervoár funkciója részben magyarázattal szolgál arra, hogy az Exenatide miért kötődik hatékonyabban a GLP-1R-hoz mint maga a GLP-1.

6.4 A Redukciókinetikai eredmények tárgyalása

6.4.1 A redoxi rendszer jellemzése spektroszkópiai módszerekkel

Mivel a SS/2SH variánsok térszerkezete hasonló, emiatt az ugyancsak hasonló spektrális tulajdonságú távoli UV-tartományú ECD-görbék nem elégségesek a redukció nyomon követésére. Ha egy aromás rendszer térközelében van a diszulfidhíd, akkor az aromás sávok intenzitása a diszulfidhíd jelenléte miatt nagymértékben megváltozik. Redukció során a diszulfidhíd hozzájárulása fokozatosan csökken és a redukált (2SH) forma NUV ECD-görbéje a kiindulási anyavegyületkéhez lesz hasonló. **(25. ábra/a, 14-15. kiegészítő ábra)** A párhuzamosan elvégzett 1D NMR-mérések világítottak rá arra, hogy a spektrális változás hiánya nem jelenti egyben a redukció 100%-os végbemenetelét is. Az 1D NMR-spektrumon az oxidált/redukált állapothoz tartozó jelek alapján százalékosan meghatározható a redukció előrehaladta és az egyensúlyi állapotra jellemző SS/2SH arány. Amennyiben a redukció nem teljes a NUV ECD-spektrumok alapján akkor nem meghatározható a pontos redukciós ráta, az azonban igen, hogy az adott körülmények között a spektrális változás hiánya az egyensúly beálltát jelzi-e. A NUV ECD 3 hullámhosszon meghatározott redukciós sebességi állandók jelentős mértékben eltérnek. **(25. ábra/c)** A 287 nm-en meghatározott korrelál leginkább az NMR alapján meghatározott értékkel, azonban az eltérés így is ~25%-os. ($k_1^{\lambda=287\text{ nm}} = 5,98\text{E-}04\text{ Lmmol}^{-1}\text{min}^{-1}$; $k_1^{\text{NMR}} = 8,03\text{E-}04\text{ Lmmol}^{-1}\text{min}^{-1}$) Az 1D NMR-spektrumok alapján nem csak a pontos redukciós ráta határozható meg, hanem az aggregáció mértéke is. Aggregáció során a kiindulási (t_0) időpillanathoz képest a jelek összintenzitása lecsökken. A csökkenés mértéke arányos az oldatból kiváló fehérje koncentrációjával. **(26. ábra, 28. ábra)**

Az E5 rendszeren elvégzett CPMG mérések alapján a lassú cserefolyamat (R_{ex}) csak a redukált forma esetén (E5_2SH) figyelhető meg. A diszulfidhíd környezetében

lokalizált lassú cserefolyamat megléte azzal magyarázható, hogy az egyensúlyi rendszerben az $SS \leftrightarrow 2SH$ állapotok a még rendszerben lévő felesleg redukálószer és az oldott O_2 jelenléte miatt (TCEP-et az O_2 az adott körülmények között nem oxidálja) folyamatosan egymásba alakulnak.

Az diszulfidkötés *in situ* redukciójának monitorozása NMR-spektroszkópiával alkalmas a teljes redoxi ciklus jellemzésére, amennyiben adott legalább egy-egy alapvonalon elkülönülő jel, amely az oxidált és redukált állapothoz köthető. Természetesen olyan szerkezetek esetében, amelyet több diszulfidhíd is rögzít, a módszer alkalmazása bonyolultabb és az egyes konformációs állapotokhoz köthető 1D jelmintázat asszignálásának hiányában nem is alkalmazható.

6.4.2 A redukciós kinetikai eredmények összehasonlítása

A laboratóriumi gyakorlati munka során fehérjék/peptidek redukcióját vizsgálva számos esetben hajlamosak vagyunk csak protokollokat követni, figyelmen kívül hagyjuk a redukció kémiai hátterét és nem győződünk meg a redukció tényleges végbemeneteléről. A diszulfidhíddal rögzített Trp-kalitikás minifehérjék redukciójának NMR-spektroszkópiás jellemzése lehetővé tette az egyes környezeti paraméterek redukció sebességre gyakorolt hatásának a vizsgálatát, és a redoxi rendszerben végbemenő folyamatok kinetikai jellemzését. Az eredmények értelmezése előtt fontos megemlíteni, hogy mivel a redukció temperált környezetben az NMR-csőben történt *in situ* módon, így a minta kevertetésére nem volt lehetőség. Kevertetés mellett a redukciók minden bizonnyal kevesebb időt vettek volna igénybe.

Mivel a TCEP-es / DTT-s redukció bimolekuláris nukleofil szubsztitúció (S_N2), így a redukció sebessége függ a redukálandó anyag és a redukálószer koncentrációjától is. Az E19_SS redukciója esetében pl.: kétszeres felesleg TCEP mellett 0,12 mM koncentrációjú fehérje redukciója kb. 40 órát, míg 0,81 mM-os koncentrációjú minta redukciója csupán csak 15 órát vett igénybe. **(4. táblázat/b)** Ez a megfigyelés rávilágít arra a tényre, hogyha kevesebb az anyagmennyiség attól még a redukció nem vesz kevesebb időt igénybe. A redukálószer arányának növelése előnyös a redukciós idő szempontjából, azonban 15°C -on 18x-os TCEP felesleg mellett az E19_SS esetében ismeretlen minor melléktermék megjelenését tapasztaltam, amely nem jelent meg

kétszeres felesleg mellett. **(33. kiegészítő táblázat)** E11_SS redukciója során a TCEP felesleget a fehérjéhez képest 8,8-szorsáról 17,6-szorosára növeltem, amely a redukciós felezési időt mindössze 20%-kal csökkentette. **(4. táblázat/c)**

A hőmérséklet növelésével jelentősen növelhető a redukció sebessége **(4. táblázat/a)**. A magasabb hőmérséklet előnyös a diffúzió, a kémiai reakció (E_a gáton való áthaladás) és a fehérje letekeredése szempontjából, amennyiben a redukálandó diszulfidhíd a térszerkezetben el van eltemetve. Az E19_SS \leftrightarrow E19_2SH esetében 60°C-on a teljes anyagkoncentráció kiválása a nyitott/rendezetlen konformációjú redukált monomerek intermolekuláris oxidációjára vezethető vissza. Alacsonyabb hőmérsékleten nincs csapadék képződés, mivel az E19_2SH rendezett, a hosszú N-terminális α -hélix árnyékolja a szabad -SH csoportokat, **(13., 16. kiegészítő ábra)** amelyek így csak intramolekulárisan oxidálódhatnak össze újra. Az α -hélix árnyékoló hatására lehet visszavezetni az E11_SS \leftrightarrow E11_2SH és a E5_SS \leftrightarrow E5_2SH esetében a teljes redukciós ciklus alatt megfigyelt különbségeket **(28. ábra)**. 15°C-on, mivel az E5_2SH C-terminálisa mobilisabb, és az α -hélixnek elhanyagolható sztérikus árnyékoló hatása van **(24. ábra)**, a teljes redukciós ciklus során a minifehérje $\sim 2/3$ -a kiválik az oldatból. Az E11_2SH nem aggregálódik és a teljes koncentráció a ciklus végével visszaoxidálódik ($k_3^{E11_2SH} < k_3^{E11_2SH}$). Magasabb hőmérsékleten fehérjék redukciója esetében az intermolekuláris oxidáció mellett számolni kell egyéb olyan mellékreakciók megjelenésével is, mint a β -elimináció vagy a racemizáció.

A vizsgált minifehérjékben az N-terminális α -hélix sztérikus árnyékoló hatásának nem csak a redukált minta aggregációjára, hanem az redukció sebességére is hatása van. Annak ellenére, hogy mind a 4 minifehérje esetében a SS-kötés a molekula felszínén található azonos kísérleti paraméterek között a redukciós sebességi együtthatók között 3 nagyságrend különbség adódik. **(5. táblázat)** Minél rövidebb az α -hélix, annál könnyebben jut a redukálószer a diszulfidhíd közelébe, így gyorsabb és teljesebb a redukció. Az E2_SS esetében 100%-os redukciós ráta mellett a teljes fehérje koncentráció redukálódott kevesebb, mint 5 perc alatt. E19_SS α -hélice 17-aminosavval hosszabb, amely hatékonyan leárnyékolja a diszulfidhidas kötést, így a 87%-os redukciós ráta mellett kb. 76 óra kellett az egyensúlyi állapot kialakulásáig. Rövidebb α -hélix gyorsabb visszaoxidácót is eredményez, így a teljes redukciós ciklus kevesebb időt vesz igénybe. **(28. ábra)**. A számolt redukciós felezési idők exponenciális függésben állnak az N-

terminálison történő α -hélix elongációjával (**27. ábra**): $t_{\frac{1}{2}} = 2,067e^{0,3707i}$, ahol i az elongáció hossza. DTT redukálószerrel megismételve a redukciónkat azonos körülmények között ugyanazokat a tendenciákat tapasztaljuk, mint a TCEP esetében. Bár a DTT-s redukció is S_N2 reakciómechanizmus, azonban a TCEP-től eltérő kémiai tulajdonságai miatt (**5. táblázat**) jelentősen több időt vesz igénybe (pl: E2_SS redukciója TCEP-pel kevesebb mint 5 perc, DTT-vel kb. 5 óra.) A TCEP esetében fennálló összefüggés a DTT esetében is megfigyelhető: $t_{\frac{1}{2}} = 50,473e^{0,3768i}$. Mindkét függvény esetében a természetes alap kitevője szinte megegyezik utalva a megfigyelt jelenség azonosságára, míg az együttható az adott redukálószerre jellemző és arányos a redukció sebességével. A sztérikus faktor bevezetésével a hélixhossz mellett a hélix rendezettségének kiterjedésével is számolok. A sztérikus faktor fordítottan arányos a másodlagos kémiai eltolódáson alapuló rendezettséggel (minél rendezettebb a hélix annál uniformizáltabb és kisebb kiterjedésű) és egyenesen arányos a vizsgált hélix szegmens RMSD értékével (minél nagyobb az RMSD, annál nagyobb a szerkezetek bizonytalansága). Lineáris összefüggést figyeltem meg a redukciós felezési idők és a SS-kötés árnyékolásával arányos sztérikus faktor nagysága között. (**27. ábra**)

A redukciókinetikát befolyásoló sztérikus effektusok mellett azonban figyelembe kell venni a redukciós mechanizmus szempontjából a diszulfidcsoport közelében az elektrosztatikus kölcsönhatásokat is (**34. kiegészítő ábra**), amelyek részben magyarázatot adnak a TCEP és a DTT esetében tapasztalt jelentős redukciós sebesség különbségre. (**5. táblázat**) A diszulfidhíd Trp-kalitka felőli oldala mind a 4 variánsban hasonló. Ez igaz a C-terminális cisztein karboxilát csoportjára is, amely $pH = 7$ -en negatívan töltött. Az elektrosztatikus különbségek az N-terminális meghosszabbításából fakadnak. Az E2_SS esetében $pH = 7$ -en az N-terminális protonálva van és egy pozitív töltést hordoz. Az elongáció során az E5_SS esetében a rendezetlen EEE szekvencia beiktatásával a pozitív N-terminális eltávolodik a SS-kötéstől és a helyére a glutamátok negatív töltésű oldalláncai lépnek. Az α -hélix további hosszabbításával (E11_SS) a glutamátok (7 Glu, 8 Glu) térállása rögzül és a Glu7-Glu8 fogja közre az SS kötést. (**34. kiegészítő ábra**) Az E11_SS és az E19_SS diszulfidhíd környezete megegyezik, így a két variáns között tapasztalt redukció sebesség növekedés tisztán a sztérikus hatásokra vezethető vissza.

A TCEP foszfin csoportjának nukleofil támadása hatékonyabban valósulhat meg abban az esetben, ha a diszulfidhíd protonált állapotban van. A támadást elősegíti a TCEP tetrahedrális geometriája, amelyben a foszfor nemkötő elektronpárja nyílszerűen előremutat. **(35. kiegészítő ábra)** Az aktivációs Gibbs szabadenergia jelentős része a diszulfidkötés hasítására fordítódik és nem a molekuláris átrendeződésre [298]. A reakció sebességét meghatározó lépés így a diszulfidkötés hasítása [299]. amikor a nukleofil támadás során kialakult tiofoszfónium só (S^-P^+ ionpár) és egy szabad SH/S^- csoport marad vissza. A foszfin nem kötő elektronpárjának támadása a vizsgált minifehérjéknél előnyösebb a C-terminális közeli kénen, mert a diszulfidkötés hasításával kialakuló intermedier $S-P^+$ kationt a C-terminális cisztein COO^- csoportja stabilizálhatja ionpár képzéssel. Az N-terminális közeli SH/S^- távozócsoportot a térszomszágban lévő kationos csoportok stabilizálhatják, ezáltal gyorsítják, míg az anionos csoportok lassítják az S_N2 reakciót [300-301].

Az E2_SS esetében a térszomszágban lévő Cys1 protonált NH_3^+ terminálisa stabilizálhatja a tiolát távozó csoportot, mi több kialakulhat egy $H-N-C^\alpha-C^\beta-S$ ötagú pszeudogyűrű a ciszteinen belül, amelyben egy $N \rightarrow S$ intramolekuláris protontranszfer katalizálja a reakciót. Ugyancsak előnyös, hogy a távozó negatív tiolát csoport a rendezett α -hélix N-terminálisán alakul ki, mivel a hélix δ^+ makro dipólusmomentuma stabilizálja. E két elektrosztatikus hatás és a szférikus gátlás hiánya eredményezi az E2_SS szinte azonnali redukcióját. **(5. táblázat)** A feltevés bizonyítására az N-terminális katalizáló hatását acilezéssel ($-NH_3^+ \rightarrow -NH-Ac$) megszüntettem az Ac-E2_SS variánsban. Ennek hatására a redukciós felezési idő szignifikánsan megnőtt ($t_{1/2}^{E2_SS} \sim 1 \text{ min} \rightarrow t_{1/2}^{Ac-E2_SS} \sim 8 \text{ min}$), valamint a redukcióval párhuzamosan azonnali csapadék kiválást tapasztaltam. **(36. kiegészítő ábra)** Az E2_SS-hez képest a jelentősebb aggregációs hajlam $N \rightarrow C$ intramolekuláris aciltranszfernek tulajdonítható [302]. Miután a diszulfidhíd redukálódott, a korábbi proton transzfernek megfelelően egy ötagú pszeudogyűrű kialakulásával a távozó SH/S^- csoport acilálódhat. Ez meggátolja a további intramolekuláris visszaoxidáció lehetőségét és a szterikus árnyékolás hiányában intermolekuláris oxidáció történhet meg, amely nagyfokú rendezetlen aggregációt eredményez.

Az N-terminális -EEE- hosszabbítással az N-terminális elektrosztatikus katalizáló hatása megszűnik. Emellett az anionos oldalláncú, dinamikus N-terminális glutamátok

($pH = 7$) a diszulfidkötés közelében akadályozzák mind az SS-kötés protonációját, mind az ugyancsak anionos S^- távozócsoport elmozdulását, így nő a redukciós idő. ($t_{1/2}^{E2_SS} \sim 1$ min $\rightarrow t_{1/2}^{E5_SS} \sim 14$ min)

Az E11_SS esetében a sztérikus árnyékoló hatás válik a domináns tényezővé. Az elektrosztatikus hatások kissé változnak az E5_SS-hez képest. A törés régió rendeződésével a glutamát oldalláncok kitüntetett irányokba orientálódnak, így a Glu7 és Glu9 oldallánca közrefogja bár a diszulfidhidat, azonban ezekkel az anionos oldalláncokkal a Lys4 és a Arg12 kationos oldallánca sóhidat alkothat, amely kompenzálja a glutamát oldalláncok redukciót lassító hatását. **(34. kiegészítő ábra)**

DTT redukálószer esetében a reakciómechanizmus szintén S_N2 típusú, de kis mértékben eltér a TCEP-nél tapasztalttól. Ahhoz, hogy a DTT megfelelő nukleofil támadó csoport legyen, első lépésben deprotonálódnia kell. Mivel a DTT bázikus tulajdonságú ($pK_{a1} = 9,2$ a $pK_{a2} = 10,1$) így $pH = 7$ -en a deprotonált DTT koncentrációja kevesebb mint 1%-. A sikeres nukleofil támadás után egy lineáris -S-S-S- átmeneti komplex alakul ki, ahol a parciális negatív töltések a két távozó kén atomon lokalizálódnak. **(35. kiegészítő ábra)** Míg a TCEP semleges foszfin nem kötő elektronpárjával szemben a deprotonált DTT negatív töltést hordoz, a diszulfidhíd közelében lévő negatív töltések taszítják / pozitívak elősegítik a DTT SS-kötéshez jutását. Mi több a DTT esetében a -SS- \rightarrow -SH HS- reakció két lépésből áll. Az első támadás során a távozó tiolcsoport mellett a peptid-DTT komplex alakul ki, amelyben a DTT még szabad tioljának újra deprotonálódnia kell. A peptid-DTT diszulfidhidat a DTT még szabad tiolát csoportja egy második nukleofil támadás során hasítja el, amely során a DTT tovább oxidálódik és hattagú gyűrűvé zárul. Ezen hatások eredménye, hogy a DTT-s redukció $pH = 7$ -en jelentősen lassabb függetlenül az α -hélix sztérikus árnyékolásától. **(5. táblázat)**

6.5 E5 minifehérjék aggregációja

6.5.1 Az aggregáció jellemzése FUV ECD-spektroszkópiával

Az E5 minifehérje aggregátumai nem lépnek reakcióba az aggregáció kinetikájának leírására széleskörűen alkalmazott Thioflavin-T-vel, így a konformáció változás kinetikáját teljes mértékben a FUV ECD-spektroszkópia alapján tudtam

karakterizálni. A kísérlet sorozatok alapján tisztán látszódott, hogy az E5 aggregációja erősen függ a közeg pH-jától. Az aggregáció optimum pH-ja 4,1 körül van. **(30. ábra/a)** Ennél a pH értéknél alacsonyabb vagy magasabb értékek mellett a B típusú spektrum fokozatosan a rendezett α -helikálisra jellemző C-típusú spektrumba vált át. Az optimális pH mellett a minta kevertetése is szükséges a megfelelő $\alpha \rightarrow \beta$ átalakuláshoz. A kevertetés egyrészt hozzájárul az aggregáció szempontjából megfelelő *misfoldolt* konformerek ütközési rátájának növeléséhez elősegítve az oligomer aggregációs magok kialakulását, másrészt a nyíróerők feldarabolják az elongálódó amiloidszálakat kisebb, már kialakult β -redős oligomerekre, amelyek újabb aggregációs magként szolgálhatnak.

Az egyes időpillanatokban rögzített FUV ECD-görbék felbontása alapján meghatározott komponensek (F, U, Amy) arányának baricentrikus ábrázolása lehetővé teszi három aggregációra jellemző fázis elkülönítését. **(31. ábra/a)** Az első fázisban a komponens arányok a $F \rightarrow U$ tengellyel (zöld) párhuzamosan változnak, ez a pH változtatás és a NaCl jelenléte által indukált letekeredési szakasz. A helikális jelleg elvesztésével párhuzamosan megnő a rendezetlen térszerkezetű populáció aránya. A következő fázis a nukleációs fázis. A denaturáció hatására létrejövő dinamikus egymásba alakuló, diverz konformációjú rendezetlen fehérje populációnak vannak bizonyos kitüntetett ún. „ragadós” konformációs állapotai (*misfoldolt* konformerek), amelyek kölcsönhatásba lépve egymással kialakítják az oligomer asszociátumokat. Ezek az oligomerek fognak templátként szolgálni a további elongációhoz. Ebben a fázisban dől el, hogy a fehérje képes-e az aggregációra az adott körülmények között. A korábban tárgyalt E5_E14D és E14Q variánsok ebben a diffúz, átmeneti fázisban ragadtak meg. **(32. ábra/b)** A harmadik fázisban történik a kialakult templátok elongációja, ($U \rightarrow \text{Amy}$ piros tengellyel párhuzamosan) amely során a β -redős szerkezetre jellemző B-típusú spektrum hozzájárulási aránya fokozatosan nő, míg a rendezetlen U-típusú párhuzamosan csökken. Az elongációs szakasz során a rendezetlen \leftrightarrow aggregációra hajlamos *misfoldolt* populációk aránya fokozatosan a *misfoldolt* irányba tolódik el, ahogy az átalakult monomerek kiválnak az oldatból az amiloid kötegekhez épülés során. A minta kevertetése miatt a növekvő amiloidszálak töredeznek, azonban ez nem változtat a már a kialakult β -redős fehérjeszálak szerkezetén.

A körülmények optimalizálásával ($c_{E5} = 250 \mu\text{M}$, $c_{NaCl} = 50 \text{ mM}$, $pH = 4,1$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, kevertetés) az aggregáció reprodukálhatóvá vált. Az optimált körülmények kísérleti

paramétereinek változtatása rávilágít arra, hogy az egyes változók az aggregáció melyik szakaszban játszanak kulcsfontosságú szerepet. A fehérje koncentráció növelésével **(31. ábra/b)** egyértelműen nő az aggregáció sebessége, amely annak köszönhető, hogy a megfelelően *misfoldolt* populációk nagyobb arányban vannak jelen és nagyobb valószínűséggel lépnek kölcsönhatásba egymással. 8 óra után az $[AMY]^{800\mu M} = 61\%$, míg $[AMY]^{400\mu M} = 34\%$.

A különböző NaCl koncentrációk esetében **(31. ábra/c)** megfigyelhető, hogy az első és a második fázis független, azonban az elongációs fázis függ az ionerősségtől. Érdekes módon minél kisebb a só koncentrációja, annál gyorsabb az aggregációs folyamat. 76 órás kevertetés után: $[AMY]^{0mM} = 85\%$, $[AMY]^{12.5mM} = 78\%$, $[AMY]^{25mM} = 63\%$, míg $[AMY]^{50mM} = 52\%$. Az eredmények alapján feltételezhetnénk, hogy a hozzáadott só csökkenti az aggregációs hajlamot, azonban irodalmi példák alapján [303-304] racionálisabb magyarázatnak tűnik, hogy nagyobb só koncentrációnál gyorsabb és teljesebb az aggregáció. Az ellentmondás feloldható, megfontolva, hogy az ionok semlegesítik az esetleges azonos töltésből fakadó taszító kölcsönhatásokat az elongáció során, így a még vízoldható oligomerek gyorsabban és nagyobb mértékben válhatnak ki az oldatból, emiatt már korábban csökken a detektálhatóságuk ECD-spektroszkópiával.

Az E5 aggregáció szempontjából a 37°C-os hőmérsékleti érték az optimális. **(31. ábra/d)** 51 óra kevertetés után $[AMY]^{23^\circ C} = 12\%$, $[AMY]^{37^\circ C} = 86\%$, $[AMY]^{47^\circ C} = 34\%$. 23°C-on 2 nap kevertetés után a Trp-kalitka még főként rendezett, és további 2 hét inkubált kevertetés során is csak a rendezetlen komponens aránya nő. Egyrészt alacsonyabb hőmérsékleten a minifehérje nem tekeredik szét **(31. ábra/a)** olyan mértékben, hogy az aggregációra hajlamos fellazult konformációjú populáció kialakuljon. Másrészt a Brown-mozgás is kisebb mértékű, emiatt kevesebb a hatásos fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakulásának a lehetősége. 47°C-on azt gondolhatnánk, hogy azért tapasztalunk kisebb értékeket (hasonlóan a NaCl koncentráció vizsgálata során tapasztaltakhoz) mert a gyorsan növekvő stabil amiloidszálak kiestek az ECD detektálási tartományból. Azonban a 47°C-os kísérlet esetében nem erről van szó, hiszen további inkubáció során, 11 nap alatt az aggregáció teljessé válik. Az NMR-mérések alapján számolt szerkezetekben a termális letekeredés 47°C-on nagyobb mértékű **(32. ábra/a)**, mint 37°C-on, ennek ellenére a megnövekedett hőmozgás gátolja az elongációs fázisban az amiloidszálak növekedését. (51 óra utáni U→Amy tengellyel párhuzamos szakasz)

6.5.2 Az E5 minifehérje denaturációja

Az ECD-mérések bizonyították, hogy az aggregációs folyamatok megindításához nélkülözhetetlen a minifehérje megfelelő denaturációja és ehhez egy optimális hőmérséklet és pH egyaránt szükséges. A hőmérsékletfüggő térszerkezet analízis (**31. ábra/a**) alapján megállapítható, hogy az E5 37°C-on $pH = 7$ -en megőrzi a rendezett Trp-kalitka motívumát és 48°C-on válik *molten-globule* jellegűvé. (ebben az esetben is van 16 távolható ($i > 5$) kényszerfeltétel – **2. táblázat**) A 37°C-os E5 szerkezetsokaságról megállapítható, hogy a helikális szegmens még rendezett, és csak a 3_{10} -hélix PSSGR szekvencia válik dinamikussá, amely 48°C-on már kiterjed a teljes szekvenciára.

A pH-állítás során 2 nem várt dologra lettem figyelmes. 1) Az izoelektromos pont környékén az aggregáció reverzibilis (**34. ábra**), ugyanis a pH-t tovább növelve a fehérje újra szolvatálódott. 2) A pH változtatás által befolyásolt letekeredés nem lineáris, mint a hőmérsékletfüggés esetében. (**14. ábra**) $pH = 7$ és extrém savas $pH = 2$ értékek esetében is egyező konformációjú rendezett Trp-kalitka szerkezetsokaságot számoltam. (A távolható keresztcsúcsok száma ($i > 5$) $pH = 7 \rightarrow 77$, $pH = 2 \rightarrow 84$ – **2. táblázat**). Az eredmény abból a szempontból különösen érdekes, hogy a két pH-n teljesen eltér az oldalláncok protonáltsági állapota. (**35. ábra**) Míg $pH = 7$ -en az összes karboxil funkció csoport (E1, E2, E3, E14, oldalláncok és S25 C-terminális) deprotonált és alkalmas sóhíd és egyéb ionos kölcsönhatás kialakítására, addig $pH = 2$ -n ezek a csoportok döntően protonált állapotban vannak. (A bázikus N-terminális, R6, K13, R21 oldallánca a vizsgált pH tartományban minden esetben protonált állapotban van.) Az E5-ben megtalálható Glu3-Arg6 és az Glu14-Arg21 között egy-egy sóhíd, amelyek (hiányának) térszerkezetre gyakorolt hatását a korábban ismertetett E14Q (**15. ábra/b**) és R6N (**16. ábra/b**) mutánsok esetében bemutattam. A glutamát oldalláncok protonálásával hasonló a rendezettség szempontjából kedvezőtlen hatásokra számítottam, amely a $pH = 2$ -es szerkezetsokaságok esetében mégsem valósul meg. Érdekes megjegyezni, hogy mind a $pH = 7$ -es (-1,39 ösztöltés), mind a $pH = 2$ -es (+3,98 ösztöltés) állapotnak csak egy-egy fajta uniformizált töltéseloszlása (1-1 fajta mikroállapot) van, amelyhez ugyancsak uniformizált, rendezett (alacsony RMSD értékkel illeszthető) térszerkezetsokaság is rendelhető.

A pH csökkentésével a savas karakterű csoportok protonáltsága egyre nő, miközben az össztöltés csökken. **(20. kiegészítő ábra)** A protonálódással a szekvencia töltésmintázatának diverzitása nő és ezzel párhuzamosan a számolt térszerkezetek rendezettsége, uniformitása csökken. **(35. ábra, 14. ábra/b)** Izoelektromos ponton (~ pH 5.0; össztöltés 0) négyfajta töltésmintázat egyidejű meglétére van lehetőség attól függően, hogy melyik egy glutamát protonálódik. (Mivel az átlagos $pK_{C-term.}^{Ser} < pK_{oldall.}^{Glu}$, ezért a C-terminális fog utoljára protonálódni) A lehetséges mikroállapotok aránya a glutamát oldalláncok pontos pKa értékeinek ismeretében határozható meg. Hasonló eset áll fenn az amiloid képződés pH-ján is ($pH = 4,1$; össztöltés $\sim +2$). Ebben az esetben a 4 mikroállapot között az a különbség, hogy melyik glutamát oldallánc hordozza a negatív töltést a deprotonált C-terminális mellett (a másik három Glu ezen a pH-n protonált, azaz semleges). A számolt térszerkezetek alapján a $pH = 5,0$ -ön és $pH = 4,1$ -en mért szerkezetsokaságok már *molten globule* jellegűek, csakúgy, mint az E5 48°C-on meghatározott szerkezetsokasága. A két kitüntetett pH-n még asszignálható 16/22 távolható ($i > 5$) keresztcsúcs, amely a Trp-kalitka motívumra jellemző. **(2. táblázat)** A szekvenciális RMSD értékek alapján is hasonló mértékű és lokalizációjú a fellazulás, mint 48°C-on. **(14. ábra/b)** A $pH = 5$ és a $pH = 4$ sokaságok között adódik azonban két különbség: az izoelektromos ponton a poliprolin-szegmens rendezetlenebb és mozgékonyabb, mint $pH = 4,1$ -en, míg az aggregációs pH-n az α -hélix lazul fel nagyobb mértékben, mint a többi pH-hoz tartozó szerkezetsokaságokban. Az izoelektromos pH-n a szerkezet jobban fellazult, mint $pH = 4,1$ -en, azonban a megfelelő töltés-mintázat és a perturbált α -hélix hiánya miatt nem indul meg az aggregáció. A $pH = 4,1$ -en meghatározott 50 tagú szerkezetsokaságok klaszterekbe rendezve jobban szemléltetik, hogy milyen konformációs állapotokban fluktuálhat a minifehérjék térszerkezete. **(19. kiegészítő ábra)** A populáció 40%-ra jellemző a natív Trp-kalitka térszerkezetre, míg a többi klaszter csak részlegesen rendezett.

Érdemes megemlíteni, hogy az aggregációs protokoll során az első lépés mindig az oldat $pH = 7$ -ről $\rightarrow pH = 4,1$ -re állítása, így a szerkezetsokaságok alapján vizualizálni lehet a baricentrikus koordináta rendszerben történő F \rightarrow U elmozdulást. A 37°C-on történő temperálás a kialakult *molten globule* jellegű állapotot tovább lazítja azonban ez a nagyfokú heterogenitás és mozgékonyág már nem detektálható 2D homonukleáris mérésekkel.

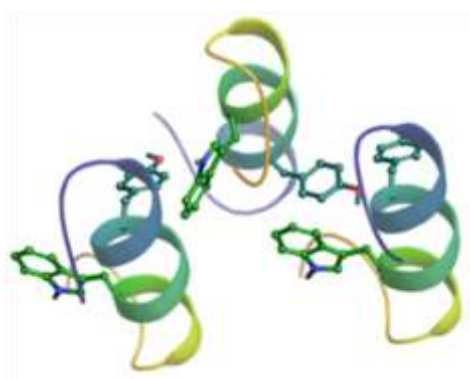
6.5.3 Az E5 aggregációra hajlamos állapotának meghatározása kombinált molekuladinamikai szimulációk és az NMR által meghatározott térszerkezetek alapján

A teoretikusan rögzített protonáltsági állapotok molekuladinamikája alapján megállapítható (**21. kiegészítő ábra**), hogy a $pH = 4,1$ -es mikroállapotok közül az $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ viselkedése eltér a másik 3 protonáltsági állapottól, amelyek szerkezeti paraméterei a natív térszerkezetéhez hasonlóak. (**36. ábra**) Az $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ esetben a kalitka felnyílását a Trp11 és a Pro17 időleges eltávolodása idézi elő, amely hatására reverzibilis módon a C-terminális egy hosszabb időre eltávolodik az α -hélixről és az α és a PP_{II} hélix között bezárt szög (μ°) átlagos értéke 20° -ról 60° -ra növekszik. (**21. kiegészítő ábra**) Ezen átmeneti és reverzibilis felnyílás során alakulnak ki az aggregációra hajlamos *misfoldolt* térszerkezetek. Az 50-50 számolt szerkezet és a molekuladinamikai trajektóriák vizsgált paramétereinek elemzése alapján az alábbiak mondhatóak el. Az NMR-adatok alapján $pH = 7$ -en meghatározott szerkezetsokaságok paramétereinek kicsi a szórása és az eloszlás tartományuk közel esik az MD alapján számolt $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_{-1}, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_{-1}]$ $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_{-1}]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_{-1}, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ állapotok eloszlásának maximumával. Az aggregációs pH-n az NMR-sokaságok diverzitása megnő a szerkezeti fluktuáció növekedésével. Ez a tendencia figyelhető meg a $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ állapot esetében is. Mivel a $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_{-1}]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_{-1}, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ mikropopulációk konformációs tere az eloszlások alapján megegyezik az aggregációra nem hajlamos $pH = 7$ -es $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_{-1}, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_{-1}]$ mikroállapotéval, feltételezhető, hogy nem ez a három mikroállapot felelős az aggregáció iniciálásáért. A távolsági paraméterek alapján (*i-iv*) a natív *foldra* jellemző távolságokhoz képest (**36. ábra/b**) az $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ esetében a nagyobb távolságok felé tolódnak el az eloszlás-maximumok, jelezve a Trp-kalitka kompaktságának elvesztését. A Tyr-Trp térállás is megváltozik a pH hatására. Az oldalláncok eltávolodnak egymástól (+ 0,9 Å) és a *Trp-foldra* jellemző eltolt *face to face* állásból ($\alpha^\circ \sim 20-50^\circ$, $\theta \sim 10-40^\circ$) az eloszlásgörbe az eltolt *edge to face* állás felé tolódik ($\alpha^\circ > 60-70^\circ$, $\theta > 40^\circ$). Ezek a szerkezetek még részlegesen rendezettek, azonban a Trp-kalitka már felnyílt, a poliprolin-hélix eltávolodott a még jelenlévő α -hélixről, az eddig eltemetett aromás és hidrofób oldalláncok a felszínre kerülnek. $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$

trajektóriából azok a *misfoldolt* szerkezeteket, amelyek a legtöbb *i-ix* paraméterekben eltérnek a többi trajektória szerkezetsokaságaitól (**36. ábra/c**) tehetők felelőssé az aggregációs folyamatok megindításáért.

6.5.4 Az oligomerizációs folyamat és az aggregátumok morfológiájának jellemzése

A megfigyelt szerkezeti változásokat alátámasztják a közeli UV-tartományban felvett ECD-spektrumok. (**33. ábra/c**) A natív *Trp-foldra* jellemző NUV görbe intenzitásának csökkenése indikálja ($pH = 7 \rightarrow [\Theta]_{280} \sim 4000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, $pH =$



41. ábra. A spektroszkópai adatok alapján feltételezett elsődleges oligomer asszociátumok. A *misfoldolt* monomerek feltételezett antiparallel orientációját a még meglévő α -hélixek dipolmomentumból fakadó elektrosztatikus kölcsönhatások meglétére alapoztuk.

$4,1 \rightarrow [\Theta]_{280} \sim 2000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) az *edge to face* térállású monomerek gyakoriságának növekedését. Hasonló ellipticitás csökkenést tapasztaltam az E5_E14D_P24(4R)fP (*edge to face*) esetében is az E5_E14D_P24(4S)fP (*face to face*) való összehasonlításban. Azonban $pH = 4,1$ -en a sávok koncentrációfüggő intenzitáscsökkenése is informatív. A koncentráció növekedésével a csökkenés még szignifikánsabbá válik, tehát valószínű az intramolekuláris aromás kölcsönhatások helyett a *crowding* effektus miatt intermolekuláris aromás kölcsönhatások alakulnak ki. Mivel az *edge to face* elrendeződés energetikailag kedvezőbb és a

natív konformáció hiányában a Tyr-Trp párnak már nem gátolt a szabad rotációja, így a nukleáció (első 1-2 óra) során képződő oligomerekben egy laza intermolekuláris *edge to face* elrendeződés alakulhat ki. (**41. ábra**) Ennek a tranziens állapotnak az időtartománya megegyezik a FUV ECD-ben mért nukleációs szakasz időtartományával.

A kísérlet kezdete után, 1-2 óra elteltével, a NUV ECD-sávok intenzitása elkezd újból növekedni, miközben a FUV ECD-elbontás alapján meghatározott β -redős [Amy] frakció aránya is növekedésnek indul. 2-6 óra között alakulnak ki azok a szekunder oligomerek, amelyben az α -hélix \rightarrow β -redő átalakulás már megtörtént. Ebben a periódusban az egyes konformációk heterogén módon vannak jelen. ([F] = 24%, [U] =

50%, [Amy] = 26% - **31. ábra/a)** Eközben a [F]→[U]→[Amy] átalakulás már folyamatos, a már β -redős oligomerek szabad β -élei katalizálják a monomerek [U]→[Amy] átmenetét, elősegítve ezzel az elongációt. Az elongáció során a NUV ECD-görbe újra a natív szerkezetre jellemző *face-to-face*-szerű elrendeződést mutatja, miközben a sávok intenzitásának növekedése jelzi a β -redők között megjelenő, egyre növekvő intermolekuláris aromás kölcsönhatás-hálózat kialakulását.

A standard aggregációs protokollt követve az összes oldatfázisú NMR kísérletet esetében (2D ^1H - ^{15}N HSQC, 1D ^{19}F , DOSY) azt tapasztaltam, hogy $p\text{H} = 7$ -ről 4,1-re állítása során az oldatban lévő monomer fehérjehez köthető jelintegrál intenzitása 80-90%-ot csökkent. (**37. ábra**) Az oldott formában visszamaradó 10-20%-nyi monomer fehérje koncentrációja tovább csökken idővel az amiloidszál elongációjának eredményeként. Az intenzitás csökkenés egyértelmű jele az oligomerizációnak. Azonban az nem tisztázott, hogy az oligomerek kiválnak az oldatból, vagy a csak az okozza az intenzitáscsökkenést, hogy a nem kovalens asszociáció eredményeként a molekulatömeg növekedésből (növekvő globális korrelációs idő – τ_c) adódó gyors T_2 relaxáció miatt az oligomerek jelei kiszélesednek és eltűnnek. A megjelenő opaleszcencia a kiválást támasztja alá, míg az oligomerek oldatban maradását az, hogy ECD-spektroszkópiával detektálható marad a szerkezeti átalakulás. A ^1H - ^{15}N HSQC alapján (**23. kiegészítő ábra**) a monomerről megállapítható, hogy a jel intenzitás csökkenése mellett az egyes jelek kis mértékben (0,05-0,2 ppm) eltolódnak az aggregációs kísérlet ideje alatt. Szinte az összes eltolódó jel (Glu2, Glu3, Val5, Leu7, Ile9, Gln10, Lys13, Ser25) az α -helikális régióra korlátozódik. Ezalapján kijelenthető, hogy a detektálható monomerek esetében a $p\text{H} = 4,1$ -re állításakor pillanatszerűen fellazul és rendezetlenné válik a 3_{10} és PP_{II} hélix régiók térszerkezete és ez az aggregáció későbbi szakaszaiban már nem változik tovább, míg az α -helikális régióé igen.

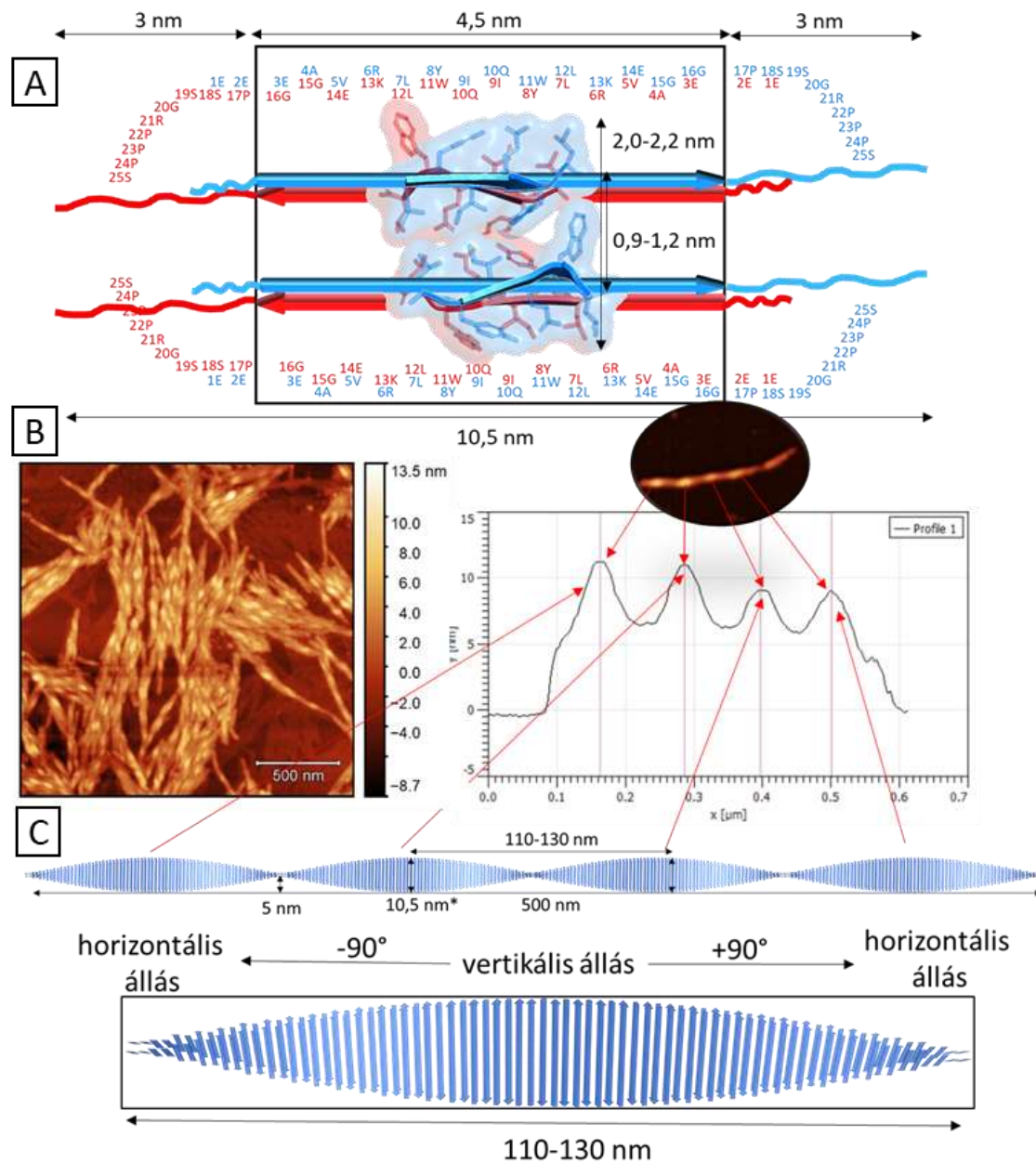
A dinamikus fényszórás eredményeket is megfelelő körültekintéssel kell kezelni a monodiszperzitás és az izometrikus alak hiánya miatt. A frissen elkészített $p\text{H} = 7$ -es mintában már eleve detektálhatóak voltak a monomernél jóval nagyobb átmérőjű részecskék, miközben az 1-2 nm átmérőjű monomernek nincsen jele. (**24. kiegészítő ábra/a)** Ez nem azt jelenti, hogy monomer nincs az oldatban, hiszen az NMR-spektroszkópia megerősítette a monomerek jelenlétét. A két módszer eredményeinek együttes elemzése alapján elmondható, hogy a friss mintában nagy koncentrációban a

DLS detektálási határán mozgó monomerek vannak jelen, azonban a kis mennyiségben jelen lévő oligomerek, amelyek a nagyobb méretükből kifolyólag detektálhatatlanok az NMR számára, elfedik a monomerek jelét a DLS mérések során. A korábban bemutatott példa alapján a méretkülönbségből adódó torzítás miatt a kis koncentrációjú, de nagyobb mérettartományú oligomerek dominálják a térfogati súlyozott eloszlásokat. Ezt támasztja alá, hogy a korábban növesztett idült amiloid mintát lecentrifugálva a nagyobb (~4 µm-es) átmérőjű részecskék eltávolításával a felülúszóban detektálhatóvá válnak a korábbi frissen készített oldat esetében megfigyelt mérettartományok. **(24. kiegészítő ábra/a-b)** A nem izometrikus alak miatt ugyanazon részecske különböző mértékű fényszórást mutathat, amely kiszélesíti az egyes populációk mérettartomány-eloszlását és növeli a polidiszperzitást. Az aggregáció időbeli monitorozása során a maximális PDI értékek miatt az eredmények megkérdőjelezhetőek, de egy növekedési tendencia egyértelműen megfigyelhető. **(25. kiegészítő ábra)**

Az AFM mérések eredményei alátámasztják a korábbi mérések eredményeit. A kiindulási pillanatban rögzített felvétel alapján **(26. kiegészítő ábra/a-b)** a fehérjeréteg átlagos magassága (1-3,4 nm), amely megegyezik az E5 monomer méretdimenzióival a DOSY és a szerkezetszámolás alapján. Az AFM topográfia alapján megjelennek 3,4 nm magasságú részecskék is, amelyek dimer/trimer oligomerek lehetnek. 24 óra elteltével (FUV ECD-spektrum már B típusú - **30. ábra/c**) a törzsoldatból kivett és vortexelt mintán megjelennek a kezdeti rövidebb amiloidszálak uniform morfológiával: kb. 45 nm-es hosszúságú (x) és 3-5,5 nm-es magasság (y). **(26. kiegészítő ábra/c-d)** Sajnos a minta vortexelése miatt nem megállapítható, hogy a 72 órás mintára jellemző morfológia megjelent-e már 24 óra után is, de a 72 órás minta alapján ezek a korai filamentumok tovább rendeződtek összetettebb szerkezetű, hosszabb (~0,5 µm) amiloid kötegekbe. **(26. kiegészítő ábra/e-f)** A hosszanti tengely mentén tapasztalható periodikus (~110-130 nm-ként) 3,5-5,0 nm-es kitüremkedések (a teljes magasság 8-12 nm) valószínűleg a kialakult amiloidszálban tapasztalható csavarodás miatt jöttek létre. 72 órás minta vortexelését követően az amiloidszálak 1-2 nm-es oligomerekre bomlanak, amelyek morfológiája diverz, azonban megtarthatták β-redős szerkezetüket, mivel a távoli ECD-tartományban ekkor is detektálható a B típusú spektrumuk. **(26. kiegészítő ábra/g-h)**

6.5.5 Az E5 amiloidszál

A NUV ECD-spektrum alapján megfigyelt drasztikus intenzitás növekedés az elongálódó amiloidszálban megfigyelhető intermolekuláris Tyr-Trp kölcsönhatások hálózata révén alakul ki. **(33. ábra/c, 39. ábra)** A kölcsönhatásokat figyelembe véve az MD szimulációk alapján prediktált legstabilabb antiparallel E5 „YW” szerkezetben a natív állapotban helikális szakaszok alkotják a β -redős gerincet. **(27. kiegészítő ábra/a)** Amennyiben azt feltételezzük, hogy az E5 β -gerincének a térszerkezete lineáris, mint a szekvenciálisan homológ glükagon (PDB ID:6NZN) [260] esetében, akkor az átfedő β -redős gerinc hossza 45 Å-nek adódik míg a rendezetlen prolinban gazdag C-terminálisok kb. 30 Å hosszúak. **(42. ábra/a)** Az MD szimuláció alapján prediktált „YW” modell architektúráját támasztotta alá az aggregációs gócként viselkedő LYIQWL peptid szakaszból növesztett kristály térszerkezete is. Az LYIQWL esetében a β -redős síkban ($Z_1, Z_2 \dots Z_n$) a redők antiparallel állásban állnak, úgy, hogy az alábbi aminosavak ekvifaciális módon átfednek egymással: $L1^A \text{ szál} - L6^B \text{ szál}, Y2^A \text{ szál} - W5^B \text{ szál}, I3^A \text{ szál} - Q4^B \text{ szál}$. A párhuzamos β -síkok adott y-koordinátáinál lévő β -redői páronként parallel állásúak és egymásnak azonos felszínüket (páros-páros, páratlan-páratlan oldal) mutatják. **(39. ábra/e)** Emiatt a LYIQWL szekvenciát az ekvifaciális-antiparallel felosztás 8. osztályába lehet sorolni. A két párhuzamos β -síkban ($Y_1, Y_2 \dots Y_n$) elhelyezkedő paralell redők peptidgerince közötti $C\alpha - C\alpha$ távolság $\sim 9-12$ Å, míg a teljes átmérő kb. 20-22 Å. **(39. ábra/e)** Az atomi szerkezeti információk alapján rekonstruálni lehet az AFM felvételeken megfigyelt morfológiát **(42. ábra/b-c)**: $\sim 8-12$ nm-es kiemelkedések megfelelnek az E5 peptid hosszának (vertikális állás), míg a völgyek ($\sim 5-6$ nm) esetében az előbbi vertikális állás 90° -kal elfordulva valósul meg (horizontális állás). **(42. ábra/c)** A vertikális állásban az egyszálú amiloid rost keresztmetszetének kb. 2,2 nm-nek kellene lennie a modell alapján, a horizontális állásban pedig kb. 8-12 nm (peptidszál hossza). Azonban az AFM alapján látszik, hogy a rostok átmérője konstans és nincs olyasfajta összecsilláció, mint amelyet a magassági értékekben tapasztaltam. A jelenség egyik magyarázata az, hogy az AFM laterális felbontása kevésbé jó, mint a magassági. A másik lehetőség, hogy egy rosttal másik 2-3 amiloid rost is futhat párhuzamosan, kötegekbe rendeződve, így a



42. ábra. A feltételezett E5 amiloid struktúra a MD, az AFM és a röntgen kristallográfia alapján. A) A kristályszerkezet alapján feltételezett β -gerinc (keretben) és a rendezetlen C-terminálisok sematikus rajza. B)-C) 72 órás amiloidszálak AFM morfológiájának és az amiloid modellnek a harmonizálása.*(bár a sematikus ábrán tisztán β -redők láthatók, de a 10,5 nm-es távolságban már a rendezetlen szegmensek hossza is bele van kalkulálva.)

vertikális állásban is nagyobb szélességet tapasztalhatunk. Az egy síkban antiparalell módon futó peptid gerincek $C\alpha$ - $C\alpha$ távolsága $\sim 5\text{Å}$. (39. ábra/f) Két vertikális állapot 180° -os tekeredése között átlagosan $\sim 120\text{ nm}$ a távolság. Erre a távra $0,5\text{ nm}$ -es $C\alpha$ - $C\alpha$

távolságokkal számolva 240-240 β -redős peptidszál esik, így két egymást követő antiparalel peptidszál $0,75^\circ$ -os szöget zár be egymással.

7. Következtetések

Doktori munkám során az Exenatide inkretin mimetikum hatóanyag harmadlagos térszerkezettel bíró szekvencia részletének és pontmutációkkal előállított variánsainak hőmérséklet és pH-függő konformáció változásait, illetve az ehhez köthető amiloid aggregációját vizsgáltam kombinált spektroszkópai módszerekkel.

A szerkezetsokaságok rendezettségét leíró, kémiai eltolódásból számolt, NMR-paraméterek és a közeli és távoli UV-tartományában felvett ECD-spektrumok harmonizálása alapján elmondható, hogy a másodlagos szerkezetet jellemző paraméterek ($CSD_{\text{hélix } 2-13}$; $[\Theta]_{222\text{nm}}$, $F_{\text{FUV}}\%$) nagymértékben korrelálnak egymással a vizsgált hőmérséklet tartományban. A szekvenciális módosítások térszerkezetre gyakorolt hatása koherens módon tükröződik ezen értékek megváltozásának tendenciáiban. A spektroszkópai módszerekkel számszerűsített rendezettségi mérőszámokhoz hozzá lehet rendelni a számolt térszerkezet sokaságokat, amely alapján a kvantifikáció mellett vizualizálni is lehet a letekeredés mértékét. A natív térszerkezetek csak 37°C-48°C között (pontos szekvenciától függően) kezdenek drasztikusan fellazulni. Ebben a hőmérséklet tartományban a spektrum-analízis alapján a rendezett komponensek aránya kb.50-60%. Ennél alacsonyabb hőmérséklet tartományban nem figyelhető meg számottevő térszerkezeti változás, amely egybecseng a $CSD_{\text{hélix}}$ értékek alapján levonható következtetésekkel, míg az FUV ECD-adatok a rendezettség monoton csökkenést mutatják.

A negyedleges térszerkezetet – a triptofán-kalitkát 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 egyértelmű megfeleltetés az NMR és az ECD-adatok között. A 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 két metodika inkább kiegészíti, minthogy helyettesítené egymást. A NUV spektrumok alapján olyan térszerkezeti változásokra is következtetni lehet, amely más módszerekkel nem detektálhatóak. 1) A Trp-kalitka denaturációja során a 278//280/283 nm-en mért sávok intenzitás értékeiben megfigyelt platók jelzik, hogy az aromás oldalláncok környezete 26°C-ig nem változik, amely összhangban van a korábban leírtakkal. 2) A NUV ECD-spektroszkópia bizonyos limitációk mellett alkalmas fehérjék

diszulfidhíd redukciójának nyomon követésére, olyan esetekben is, amikor az oxidált és a redukált térszerkezetek egyezése miatt nincs különbség a két állapot FUV ECD-spektruma között. Amennyiben a diszulfidhídhoz térközelben található Tyr/Trp, akkor a redukció előrehaladta a 287 nm-en mért intenzitás változás alapján megállapítható. A redukció hatásfokát ilyen módon nem lehet megállapítani, csak azt, hogy az adott redukciós körülmények között beállt-e az egyensúlyi állapot. 3) Az amiloid aggregáció során monitorozott NUV ECD-sávok intenzitás változása unikális információt hordoz az oligomerációs folyamatokról. A NUV ECD által bizonyított intermolekuláris aromás kölcsönhatások megléte szolgált alapul az amiloid térszerkezeti modell felépítéséhez.

Nem csak a különböző pozíciójú aminosav, hanem már az egyes atomi szintű fluor szubsztitúciók is jelentősen befolyásolják a Trp-kalitka motívum stabilitását és termorezisztenciáját. A prolinok γ helyzetben történő enantiomer-szelektív szubsztitúciója szekvenciális pozíciótól (Pro17/Pro24) és kiralitástól (*4R/4S*) függően hatással van a térszerkezetre. A *4S/4R* szubsztitúció valóban befolyásolja a prolin endo \leftrightarrow exo térállását, azonban a 2D-s homonukleáris spektrumok alapján nem tapasztaltam a (*4S*) fluor szubsztituált fehérjék esetében a *cis*z térállású konformer megjelenését. A Tc5b származékok esetében már korábban leírt Pro17 (*4R*) szubsztitúció valóban stabilizálja, míg a (*4S*) destabilizálja, a Trp-kalitka rendezettségét, azonban a rendezettségben megfigyelt változások nem számottevők. Ellentétben a Pro17 szubsztitúciójával a Pro24-en történő (*4R*) szubsztitúció jelentősebb mértékben destabilizálja a térszerkezetet, mint a (*4S*) szubsztitúció. Ez arra utal, hogy az enantiomer szelektív szubsztitúciónak kisebb hatása van a peptidgerinc konformációjára, hiszen a *4S* fluor szubsztitúciók során nem volt detektálható a *cis*z \leftrightarrow *trans*z izoméria arányának változása. Azonban a fluor hidratáltsága, illetve aromás oldalláncokkal való kölcsönhatása befolyásolja a harmadlagos térszerkezetet, és ezáltal felelős a hődenaturáció során a rendezettségben tapasztalt különbségekért is, amely különbségek tükröződnek a közeli UV-tartományban detektált sávok intenzitás értékein is. A fluor szubsztituált szerkezetek denaturációs folyamatai hasonlóak, kivéve a P24(*4R*)fP rendszeré, amely esetében a PP_{II} hélixben megfigyelt rotáció katalizálja a Trp-kalitka fellazulását. A fluor szubsztitúció az E5_P17(*4S*)fP és az E5_P17(*4R*)fP mutánsok esetében az amiloid aggregációt lassítja (51 \rightarrow 72 óra), de nem akadályozza meg. Az amiloid modell alapján mivel a prolinok nem β -redő alkotók, így a F-atomok nem a β -

gerinc kialakulását és elongációját befolyásolják, hanem a F→U folyamatban játszhatnak szerepet.

Az E5, E5_E14D és E5_E14Q rendszerek esetében jelentős stabilitási különbségeket detektáltunk, részben a 14X-21R sóhíd eltérő mértékben való kialakulása, részben a 3₁₀-hélixet stabilizáló H-híd hálózat létrejötte miatt, amelynek egyik központi eleme Ser19-OH csoportja. Az E14Q mutánsban nem alakult ki a sóhíd, az E5 mutánsban $pH = 7$ -en kialakulhat a sóhíd, azonban a Ser19-OH a felszíni elhelyezkedése miatt nem vesz részt a H-híd hálózatban. Az E14D mutánsban mindkét szerkezeti elem megtalálható, amely a Trp-kalitka olvadási hőmérsékletének növekedését eredményezi. Az említett kölcsönhatások csak késleltetik a letekeredést, azonban a felnyílási folyamat mechanizmusát nem változtatják meg. Az E14D mutáns esetében, feltehetően azért nem történik aggregáció az E5 szempontjából ideális körülmények között, mert az optimálisabb kölcsönhatás hálózat miatt 37°C-on kompaktabb, kevésbé felnyílt, mint az E5 és nem található a populációk között aggregációra hajlamos térszerkezet. A hidrofób-kalitka felnyílása a 3₁₀-hélix mozgékonyságának növekedésével kezdődik, így ennek a szegmensnek a rögzítése kulcsfontosságú. A 3₁₀-hélix felbomlásával a PP_{II} hélix és az α -hélix N és C terminális közeli szegmense fokozatosan fellazul. Azonban 48°C-ig, az asszimilált keresztcsúcsok és a számolt térszerkezetek alapján, nem történik meg a teljes letekeredés. A Trp-kalitka motívum, valamint a (naszcens) helikális jelleg még fellelhető ebben a *molten globule* jellegű állapotban, amelyben a távoli UV-tartományú ECD-spektrum felbontások alapján a rendezett és a rendezetlen szerkezeti jellegek kb. 50-50%-ban vannak jelen. Természetesen a megfigyelt arány és a letekeredettségi állapot függ az elvégzett szubsztitúció térszerkezetre gyakorolt hatásától. 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-kalitkára jellemző térszerkezet irreverzibilisen rögzül egy kiterjesztett hőmérséklettartományban (4-85°C). Ez a tulajdonság gyógyszer stabilitási és technológiai szempontból rendkívül előnyös, mivel az eltarthatósági körülmények spektrumát szélesíti. A natív térszerkezet fixált, így a *fold* letekeredésére visszavezethető rendezett-rendezetlen aggregációs folyamatoktól is el lehet tekinteni oldat fázisban. A C-terminális kovalens rögzítése előny az eltarthatóság szempontjából, ugyanakkor hátrány hatástani szempontból (az E19_SS és a GLP-1R

receptor kölcsönhatásakor). Bevett stratégiának számít, hogy a hatóanyagot már oldott formában a receptor-kötődésnek megfelelő konformációban rögzítsük, csökkentve ezzel a kötődés entalpiikus (ΔH) tagját. Az E19_SS esetében a kötődés az a GLP-1R extracelluláris doménjéhez megvalósulhat az irodalmi adatok alapján, azonban a megnövekedett inzulin szekréció hiánya alátámasztja a receptor aktiválásának a hiányát is. Az E19_SS konstrukció egyúttal bizonyítja, hogy az Exenatide típusú inkretin mimetikumok esetében a GLP-1R aktiválása során a C-terminális régióknak fel kell nyílnia a TM hélixek alkotta kötőzsebbe mozdulás során.

A korábban már bizonyítottan agonista hatású 39 aminosav hosszú Exenatide származék E19 és EDR variánsok Trp-kalitka szegmenseinek hőstabilitás vizsgálatai alapján egyértelműen kijelenthető, hogy az EDR variáns, amely a 25 aminosav hosszúságú E5_E14D analógja, potenciális hatóanyagjelölt lehet. Az EDR az Exenatidenak (E5_E14Q analógia) megfelelő hatékonysággal rendelkezik, azonban hőstabilitása és rendezettsége nagyobb: $CSD_{hélix2-13}^{4^\circ C}_{E5_E14Q} = CSD_{hélix2-13}^{41^\circ C}_{E5_E14D}$ (20. ábra/a).

A diszulfidhíd beépítése a különböző hosszúságú E2/E5/E11/E19 minifehérjékbe a mérettel fordítottan arányosan növeli a stabilitást az anyavegyülethez képest. A diszulfidhíd a Trp-kalitka motívumot a különböző méretű peptidek esetében hasonló mértékben rendezi, míg az α -hélixre csak lokálisan terjed ki. A diszulfidhidas variánsok redukciója során kialakuló redukált (2SH) szerkezetek rendezetebbek az anyavegyületeknél. A hosszabb peptidek belső helikális szegmensei nagyobb helicitást mutatnak redukáltan, mint a SS-híddal ciklusba zárva, amelyből arra lehet következtetni, hogy diszulfidhíd feszülést gerjeszt a belső-hélixben. A redukció során a Trp-kalitka rendezettsége kis mértékben csökken, de az unikális harmadlagos térszerkezeti motívum megmarad. A szerkezeti hasonlóság ellenére a diszulfidhídtól távol eső Trp He1 protonja eltérő kémiai eltolódásnál található az oxidált és a redukált formában, lehetőséget biztosítva a redukció-kinetika NMR-spektroszkópiával történő jellemzésére.

A kisméretű minifehérjék redukciója komplexebb folyamatnak bizonyult, mint azt előre gondoltuk. A redukció mellett a fehérje visszaoxidációjával és aggregációjával is számolni kellett, amely folyamatok a kísérleti paraméterek mellett függenek az adott molekula rendezettségétől, valamint az α -hélix diszulfidhidat árnyékoló hatásától is. A különböző kísérleti körülmények között elvégzett redukciók rávilágítanak a gyakorlati

laboratóriumi munka során általánosan változtatott paraméterek redukció kinetikára gyakorolt hatására. Ezen változók függvényében érdemes racionálisan megtervezni előkísérletek alapján egy-egy fehérje megfelelő redukciós kondícióit és a lehetőségekhez mérten spektroszkópai módszerekkel ellenőrizni a folyamat végbemenetelének teljességét is. A különböző méretű minifehérjék egy homológ rendszert alkotnak, azonban már az eltérő α -hélix hosszúság és annak diszulfidhidat árnyékoló hatása is három nagyságrenddel tudja megváltoztatni a redukcióhoz szükséges időt. Ismert térszerkezet alapján érdemes tanulmányozni a diszulfidhidak környezetében található töltéssel rendelkező oldalláncok jelenlétét is, ugyanis ezek a csoportok is befolyásolják a redukció mechanizmusát. A sztérikus gátlás és az elektrosztatikus kölcsönhatások mellett a redukálószer (TCEP, DTT) kémiai természetéből adódó különbségekre is rávilágítottam munkám során. A redukció körülményeinek tervezésekor a diszulfidhíd környezetét, valamint a redukálószer minőségét egyaránt figyelembe kell venni.

Az E5 pH-függő térszerkezet vizsgálatával a hőmérsékletfüggés mellett sikerült a pH okozta denaturációs folyamatot leírni. Míg a hőmérséklet növelésével párhuzamosan a rendezettség folyamatosan csökken, addig a pH változtatás esetében nem figyelhető meg ilyenfajta linearitás. A $pH = 7$ -es és $pH = 2$ -es körülmények között a térszerkezet uniform és rendezett. A 2-es pH értéken tapasztalt natív szerkezetre jellemző *fold* kialakulás azért meglepő, mert ezen a pH-n minden savas karakterű csoport protonált állapotban van, és így nem alakulhatnak ki azok az ionos stabilizáló kölcsönhatások, amelyek pH=7-en megtalálhatóak. A két szélső pH értéktől az izoelektromos pont felé tartva az E5 térszerkezete fellazul és heterogénné válik. Az egyes pH értékeken a lehetséges különböző protonáltságú mikroállapotok száma korrelál a számolt térszerkezetek egységességével. Amennyiben csak egyféle protonáltsági mikroállapot lehet, úgy a szerkezeti populáció homogén, és kis RMSD értékkel jellemezhető. A lehetséges mikroállapotok számának növekedésével a populációk megoszlának az egyes állapotok között a pK_a -értékeinek függvényében. Az egyes állapotokhoz eltérő térszerkezetek tartoznak és mivel a számos mikroállapotnak csak alacsonyabb a populációs betöltöttsége, így az NMR alapján az egyes mikroállapotok térszerkezetének populáció-súlyozott átlagát mérem. A mikroállapotok számának növekedése heterogén, rendezetlen térszerkezetben nyilvánul meg. A molekula dinamikai szimulációk alapján kimutatható, hogy az aggregációs pH-n a legnagyobb gyakoriságú mikroállapotok, egy

kivétellel a hasonló tulajdonságokkal bírnak. Az eltérő természetű populációhoz tartozó mikroállapot Trp-kalitka motívuma reverzibilis módon felnyílhat. A hidrofób és aromás oldalláncok felszínre kerülésével megindul az oligomerizáció.

Az oligomerizáció, illetve az azt követő elongációs folyamatok során tapasztalható rendezett/ α -hélix \rightarrow rendezetlen \rightarrow β -redős/amiloid átalakulás követhető és számszerűsíthető a távoli UV-tartományban felvett ECD-spektrum sorozatok dekonvolúciójával. A baricentrikus koordinátarendszerben az egyes komponensek összetételének időfüggő ábrázolásával a különböző variánsok, illetve az eltérő körülmények között végrehajtott kísérletek összehasonlíthatóvá válnak.

Heterogén méreteloszlása miatt a nukleációs folyamat nehezen jellemezhető. Egyik általam használt biofizikai módszerrel sem lehetett az aggregációs rendszer méreteloszlását és morfológiáját teljeskörűen karakterizálni. A párhuzamosan használt módszerek alapján szerzett részinformációk csak közelítő képet nyújtanak az aggregáció kezdeti szakaszáról. Az elongáció során kialakuló már szabályos morfológiával bíró rövidebb-hosszabb amiloid kötegek térszerkezetére modellt állítottam fel az aggregációs göcként viselkedő LYIQWL peptid amiloid szerű kristályszerkezetére, az AFM mérések, valamint a molekuladinamikai szimulációk alapján. **(42. ábra)** Az amiloid modell szerint az egymást követő β -redők antiparallel állásúak és a redők által alkotott rétegek ekvifaciális típusúak. Az amiloidszál hossz tengelyére merőleges szemközti β -redők páronként paralelek és azonos felszínükkel (és aminosavakkal) alkotnak közös felületet. Az Eisenberg féle osztályozás alapján a 8. osztályba sorolhatóak. A Glu3-Gly16 szegmens feltehetőleg egy lineáris β -redőt alkot, amelynek C-terminálisáról az ugyancsak lineárisnak vélt, de minden bizonnyal jóval mozgékonyabb prolin gazdag rész nyúlik túl. Az amiloidszál hossz tengelye mentén sorakozó antiparallel redők egymással $0,75^\circ$ -os szöveget zárnak be, amely egy csavart morfológiát eredményez.

8. Összefoglalás

Doktori munkám során a 2-es típusú cukorbetegség terápiájában alkalmazott peptid alapú hatóanyag, az exendin-4 25 aminosavas származékjainak stabilitását, hőmérséklet és pH indukált letékeredését, redukciókinetikáját, valamint amiloid aggregációját vizsgáltam kombinált NMR/ECD-spektroszkópiai és biofizikai módszerekkel. A rendezettséget jellemző paraméterek és a számolt térszerkezetsokaságok alapján a hődenaturáció számszerűsíthető és atomi szinten vizualizálható. Az elvégzett pontmutációk a hőmérséklet növelése során csak késleltethetik a letékeredést, azonban nem változtatnak a letékeredés mechanizmusán. A 14-es pozíciójú E/D/Q mutánsok szerkezetének elemzésével rávilágítottam a stabilitási különbségek atomi szintű magyarázatára. A prolin γ -pozíciójában történő sztereospecifikus fluor szubsztitúciók által a térszerkezet finomhangolható, azonban rendezett térszerkezetek esetében ez a hatás nem a peptidgerinc *cisz* \leftrightarrow *transz* izomer egyensúlyának eltolódásból fakad, hanem a fluor atom elektrosztatikus kölcsönhatásaira és szolvatáltsági állapotára vezethető vissza. A Trp kalitka diszulfidhíddal történő ciklizálásával a natív térszerkezet széles hőmérséklet tartományban intakt megmarad. Az E19_SS a kiemelkedő stabilitása ellenére, az elvégzett inzulin szekréción tesztek alapján, nem agonista, hanem kompetitív antagonist hatásának bizonyult. Ezzel bizonyítottuk, hogy az Exenatide típusú peptidek esetében a ligandum Trp-kalitka C-terminálisának felnyílása szükséges a GLP-1R aktivációja során. A diszulfidhíd redukció kinetikájának mérésével meghatároztam különböző körülmények között, hogy a redukálószer természete, a diszulfidhíd kémiai környezete és a különböző hosszúságú és rendezettségű α -hélixek sztérikus gátló hatása miként befolyásolja a redukció kimenetelét. Mivel redukált állapot egy egyensúlyi rendszer, amelyben az oxidáció és a redukció egyaránt jelen van, így a redukált forma térszerkezete befolyásolja az inter-, és intramolekuláris oxidáció arányát ezzel a molekula aggregációs hajlamát is. Az E5 pH-függő térszerkezetei alapján bizonyítható, hogy a vizsgált pH-kon megtalálható mikroállapotok száma arányos a térszerkezetek heterogenitásával. MD szimulációk segítségével meghatároztuk azt a mikroállapotot és annak leggyakrabban előforduló konformereit, amely az E5 amiloid aggregációjának megindításáért felelős. ECD-spektroszkópiával kvantitatív módon jellemeztük a teljes F \rightarrow U \rightarrow Amy átalakulást. Az *in vitro* és *in silico* adatok kombinált felhasználásával meghatároztam az E5 minifehérje lehetséges amiloid térszerkezetének a morfológiáját.

9. Summary

In my PhD thesis the stability, the temperature and pH dependent unfolding, the reduction kinetics and amyloid aggregation of various 25 amino acid long derivatives of exendin-4 peptide used in therapy of T2DM were investigated by joint NMR/ECD spectroscopy and other biophysical methods. Based on the calculated structural ensembles and parameters that describe the folded fraction, thermal denaturation can be quantified and visualized in atomic level. Point mutations may delay the key events triggering unfolding of the peptides during temperature increase but cannot change the unfolding mechanism. I have elucidated the - at atomic detail - the observed stability differences between the systems carrying Asp/Glu/Gln residues at the 14th position of the sequence. By the stereospecific γ position ^{19}F substitution of prolines the 3D structure of the peptides and their stability can be fine-tuned. However, this effect cannot be assigned to the equilibrium shift in the cis-trans isomerization of the peptide bond, rather it concerns the electrostatic interactions and the solvation state of the ^{19}F . The cyclisation of the Trp-cage by a disulfide bond results in an intact and compact native fold over a wide temperature range. In spite of the superb heat-resistance of the disulfide stapled E19_SS, according to *in vitro* insulin secretion tests, it is not an agonist but instead displays competitive antagonistic effect. With this experiment, we proved that the C-terminal segment of the GLP-1 analogues with exendin-4 like structures must open up synchronously with the displacement of the N-terminal towards the GLP-1R binding pocket. Monitoring the reduction kinetics of the disulfide bond allowed me to determine how the nature of the reducing agent, the chemical environment of the disulfide bond, and the steric hindering effect of the different length α -helices influences the outcome of the reduction under different circumstances. The reduced SH peptides are in steady state, where both oxidized and reduced forms are present, and the conformation of the reduced form determines the extent of the inter- and intra-molecular re-oxidation, thus the aggregation propensity of the system, as well. The pH dependent structural ensembles of E5 correlate with the NMR-observed structural heterogeneity. The molecular dynamic simulations allowed characterization of the specific microstate and its structural features that triggers the initialization of the E5 amyloid aggregation. The F \rightarrow U \rightarrow Amy structural transition was monitored, characterized and quantified by ECD spectroscopy. Combining the result of the multiple *in vitro* and *in silico* results I proposed a possible morphology for the E5 amyloid fibril.

10. Irodalomjegyzék

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, kilencedik kiadás. Brüsszel, Belgium: 2019. Elérhető: <https://www.diabetesatlas.org> , Hozzáférés dátuma: 2020.02.16
- [2] Hannah Ritchie and Max Roser (2020) - "Causes of Death". Online publikáció OurWorldInData.org , Hozzáférés dátuma: 2020.02.19
- [3] International Diabetes Federation. IDF Clinical practice recommendations for managing Type 2 diabetes in primary care. Brüsszel; 2019. Elérhető: <https://www.idf.org/e-library/guidelines/128-idf-clinical-practicerecommendations-for-managing-type-2-diabetes-inprimary-care.html> , Hozzáférés dátuma: 2020.02.19
- [4] La Barre, J., (1932). Sur les possibilités d'un traitement du diabète par l'incrétine. *Bull Acad Royal Med Belg.* 12:620–634.
- [5] Perley, M. J., & Kipnis, D. M. (1967). Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *The Journal of clinical investigation*, 46(12), 1954–1962.
- [6] Brown, J. C., Mutt, V., & Pederson, R. A. (1970). Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *The Journal of physiology*, 209(1), 57–64.
- [7] Brown, J. C., & Dryburgh, J. R. (1971). A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence. *Canadian journal of biochemistry*, 49(8), 867–872.
- [8] Dupre, J., Ross, S. A., Watson, D., & Brown, J. C. (1973). Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 37(5), 826–828.
- [9] Bell, G. I., Sanchez-Pescador, R., Laybourn, P. J., & Najarian, R. C. (1983). Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*, 304(5924), 368–371.
- [10] Sandoval, D. A., & D'Alessio, D. A. (2015). Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiological reviews*, 95(2), 513–548.
- [11] Vrang, N., & Larsen, P. J. (2010). Preproglucagon derived peptides GLP-1, GLP-2 and oxyntomodulin in the CNS: role of peripherally secreted and centrally produced peptides. *Progress in neurobiology*, 92(3), 442–462.
- [12] Mojsov, S., Heinrich, G., Wilson, I. B., Ravazzola, M., Orci, L., & Habener, J. F. (1986). Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level

of post-translational processing. *The Journal of biological chemistry*, 261(25), 11880–11889.

[13] Siegel, E. G., Schulze, A., Schmidt, W. E., & Creutzfeldt, W. (1992). Comparison of the effect of GIP and GLP-1 (7-36amide) on insulin release from rat pancreatic islets. *European journal of clinical investigation*, 22(3), 154–157.

[14] Holst, J. J., Orskov, C., Nielsen, O. V., & Schwartz, T. W. (1987). Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS letters*, 211(2), 169–174.

[15] Drucker, D. J., & Nauck, M. A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet (London, England)*, 368(9548), 1696–1705.

[16] Deacon, C. F., Johnsen, A. H., & Holst, J. J. (1995). Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80(3), 952–957.

[17] Kieffer, T. J., McIntosh, C. H., & Pederson, R. A. (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*, 136(8), 3585–3596.

[18] Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*, 63(6), 1256–1272.

[19] Wacker, D., Stevens, R. C., & Roth, B. L. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell*, 170(3), 414–427.

[20] Goodman, O. B., Jr, Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., & Benovic, J. L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, 383(6599),

[21] Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5402), 655–661.

- [22] Alexander, S. P., Davenport, A. P., Kelly, E., Marrion, N., Peters, J. A., Benson, H. E., Faccenda, E., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., & CGTP Collaborators (2015). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *British journal of pharmacology*, *172*(24), 5744–5869.
- [23] Mason, J. S., Bortolato, A., Congreve, M., & Marshall, F. H. (2012). New insights from structural biology into the druggability of G protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, *33*(5), 249–260.
- [24] Rask-Andersen, M., Almén, M. S., & Schiöth, H. B. (2011). Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, *10*(8), 579–590.
- [25] Allen, J. A., & Roth, B. L. (2011). Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *51*, 117–144.
- [26] Rothman, R. B., Baumann, M. H., Savage, J. E., Rauser, L., McBride, A., Hufeisen, S. J., & Roth, B. L. (2000). Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation*, *102*(23), 2836–2841.
- [27] Christopoulos, A., Changeux, J. P., Catterall, W. A., Fabbro, D., Burris, T. P., Cidlowski, J. A., Olsen, R. W., Peters, J. A., Neubig, R. R., Pin, J. P., Sexton, P. M., Kenakin, T. P., Ehlert, F. J., Spedding, M., & Langmead, C. J. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands. *Pharmacological reviews*, *66*(4), 918–947.
- [28] Archbold, J. K., Flanagan, J. U., Watkins, H. A., Gingell, J. J., & Hay, D. L. (2011). Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development. *Trends in pharmacological sciences*, *32*(10), 591–600.
- [29] Bortolato, A., Doré, A. S., Hollenstein, K., Tehan, B. G., Mason, J. S., & Marshall, F. H. (2014). Structure of Class B GPCRs: new horizons for drug discovery. *British journal of pharmacology*, *171*(13), 3132–3145.
- [30] Song, G., Yang, D., Wang, Y., de Graaf, C., Zhou, Q., Jiang, S., Liu, K., Cai, X., Dai, A., Lin, G., Liu, D., Wu, F., Wu, Y., Zhao, S., Ye, L., Han, G. W., Lau, J., Wu, B., Hanson, M. A., Liu, Z. J., ... Stevens, R. C. (2017). Human GLP-1 receptor

transmembrane domain structure in complex with allosteric modulators. *Nature*, 546(7657), 312–315.

[31] Zhang, H., Qiao, A., Yang, D., Yang, L., Dai, A., de Graaf, C., Reedtz-Runge, S., Dharmarajan, V., Zhang, H., Han, G. W., Grant, T. D., Sierra, R. G., Weierstall, U., Nelson, G., Liu, W., Wu, Y., Ma, L., Cai, X., Lin, G., Wu, X., ... Wu, B. (2017). Structure of the full-length glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*, 546(7657), 259–264.

[32] Jazayeri, A., Rappas, M., Brown, A., Kean, J., Errey, J. C., Robertson, N. J., Fiezd-Vandal, C., Andrews, S. P., Congreve, M., Bortolato, A., Mason, J. S., Baig, A. H., Teobald, I., Doré, A. S., Weir, M., Cooke, R. M., & Marshall, F. H. (2017). Crystal structure of the GLP-1 receptor bound to a peptide agonist. *Nature*, 546(7657), 254–258.

[33] Zhang, Y., Sun, B., Feng, D., Hu, H., Chu, M., Qu, Q., Tarrasch, J. T., Li, S., Sun Kobilka, T., Kobilka, B. K., & Skiniotis, G. (2017). Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature*, 546(7657), 248–253.

[34] Liang, Y. L., Khoshouei, M., Radjainia, M., Zhang, Y., Glukhova, A., Tarrasch, J., Thal, D. M., Furness, S., Christopoulos, G., Coudrat, T., Danev, R., Baumeister, W., Miller, L. J., Christopoulos, A., Kobilka, B. K., Wootten, D., Skiniotis, G., & Sexton, P. M. (2017). Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex. *Nature*, 546(7656), 118–123.

[35] de Graaf, C., Song, G., Cao, C., Zhao, Q., Wang, M. W., Wu, B., & Stevens, R. C. (2017). Extending the Structural View of Class B GPCRs. *Trends in biochemical sciences*, 42(12), 946–960.

[36] Siu, F. Y., He, M., de Graaf, C., Han, G. W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J. S., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V., Wang, M. W., & Stevens, R. C. (2013). Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*, 499(7459), 444–449.

[37] Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494(7436):185-194.

[38] Zhang, Y., Sun, B., Feng, D., Hu, H., Chu, M., Qu, Q., Tarrasch, J. T., Li, S., Sun Kobilka, T., Kobilka, B. K., & Skiniotis, G. (2017). Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature*, 546(7657), 248–253.

- [39] Shimizu, I., Hirota, M., Ohboshi, C., & Shima, K. (1987). Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain. *Endocrinology*, *121*(3), 1076–1082.
- [40] Göke, R., & Conlon, J. M. (1988). Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide on rat insulinoma-derived cells. *The Journal of endocrinology*, *116*(3), 357–362.
- [41] Pyke, C., Heller, R. S., Kirk, R. K., Ørskov, C., Reedtz-Runge, S., Kaastrup, P., Hvelplund, A., Bardram, L., Calatayud, D., & Knudsen, L. B. (2014). GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology*, *155*(4), 1280–1290.
- [42] Pyke, C., & Knudsen, L. B. (2013). The glucagon-like peptide-1 receptor--or not?. *Endocrinology*, *154*(1), 4–8.
- [43] Tomas, E., & Habener, J. F. (2010). Insulin-like actions of glucagon-like peptide-1: a dual receptor hypothesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *21*(2), 59–67.
- [44] Nuche-Berenguer, B., Portal-Núñez, S., Moreno, P., González, N., Acitores, A., López-Herradón, A., Esbrit, P., Valverde, I., & Villanueva-Peñacarrillo, M. L. (2010). Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor. *Journal of cellular physiology*, *225*(2), 585–592.
- [45] Ban, K., Noyan-Ashraf, M. H., Hoefler, J., Bolz, S. S., Drucker, D. J., & Husain, M. (2008). Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*, *117*(18), 2340–2350.
- [46] Tudurí, E., López, M., Diéguez, C., Nadal, A., & Nogueiras, R. (2016). Glucagon-Like Peptide 1 Analogs and their Effects on Pancreatic Islets. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *27*(5), 304–318.
- [47] Richards, P., Parker, H. E., Adriaenssens, A. E., Hodgson, J. M., Cork, S. C., Trapp, S., Gribble, F. M., & Reimann, F. (2014). Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes*, *63*(4), 1224–1233.
- [48] Franklin, I., Gromada, J., Gjinovci, A., Theander, S., & Wollheim, C. B. (2005). Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes*, *54*(6), 1808–1815.

- [49] Körner, M., Stöckli, M., Waser, B., & Reubi, J. C. (2007). GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 48(5), 736–743.
- [50] Nauck, M. A., Niedereichholz, U., Ettl, R., Holst, J. J., Orskov, C., Ritzel, R., & Schmiegel, W. H. (1997). Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *The American journal of physiology*, 273(5), E981–E988.
- [51] Noyan-Ashraf, M. H., Momen, M. A., Ban, K., Sadi, A. M., Zhou, Y. Q., Riazi, A. M., Baggio, L. L., Henkelman, R. M., Husain, M., & Drucker, D. J. (2009). GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes*, 58(4), 975–983.
- [52] Mannucci, E., & Dicembrini, I. (2012). Incretin-based therapies and cardiovascular risk. *Current medical research and opinion*, 28(5), 715–721.
- [53] Sonne, D. P., Engström, T., & Treiman, M. (2008). Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regulatory peptides*, 146(1-3), 243–249.
- [54] Scholte, M., Timmers, L., Bernink, F. J., Denham, R. N., Beek, A. M., Kamp, O., Diamant, M., Horrevoets, A. J., Niessen, H. W., Chen, W. J., van Rossum, A. C., van Royen, N., Doevendans, P. A., & Appelman, Y. (2011). Effect of additional treatment with EXenatide in patients with an Acute Myocardial Infarction (EXAMI): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 12, 240.
- [55] Lønborg, J., Vejstrup, N., Kelbæk, H., Bøtker, H. E., Kim, W. Y., Mathiasen, A. B., Jørgensen, E., Helqvist, S., Saunamäki, K., Clemmensen, P., Holmvang, L., Thuesen, L., Krusell, L. R., Jensen, J. S., Køber, L., Treiman, M., Holst, J. J., & Engström, T. (2012). Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *European heart journal*, 33(12), 1491–1499.
- [56] Kim, M., Platt, M. J., Shibasaki, T., Quaggin, S. E., Backx, P. H., Seino, S., Simpson, J. A., & Drucker, D. J. (2013). GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nature medicine*, 19(5), 567–575.

- [57] Pyke, C., Heller, R. S., Kirk, R. K., Ørskov, C., Reedtz-Runge, S., Kaastrup, P., Hvelplund, A., Bardram, L., Calatayud, D., & Knudsen, L. B. (2014). GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology*, *155*(4), 1280–1290.
- [58] Schisano, B., Harte, A. L., Lois, K., Saravanan, P., Al-Daghri, N., Al-Attas, O., Knudsen, L. B., McTernan, P. G., Ceriello, A., & Tripathi, G. (2012). GLP-1 analogue, Liraglutide protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose induced endoplasmic reticulum stress. *Regulatory peptides*, *174*(1-3), 46–52
- [59] Wang, D., Luo, P., Wang, Y., Li, W., Wang, C., Sun, D., Zhang, R., Su, T., Ma, X., Zeng, C., Wang, H., Ren, J., & Cao, F. (2013). Glucagon-like peptide-1 protects against cardiac microvascular injury in diabetes via a cAMP/PKA/Rho-dependent mechanism. *Diabetes*, *62*(5), 1697–1708.
- [60] Ceriello, A., Novials, A., Ortega, E., Canivell, S., La Sala, L., Pujadas, G., Esposito, K., Giugliano, D., & Genovese, S. (2013). Glucagon-like peptide 1 reduces endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress induced by both hyperglycemia and hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes care*, *36*(8), 2346–2350.
- [61] Koska, J., Sands, M., Burciu, C., D'Souza, K. M., Raravikar, K., Liu, J., Truran, S., Franco, D. A., Schwartz, E. A., Schwenke, D. C., D'Alessio, D., Migrino, R. Q., & Reaven, P. D. (2015). Exenatide Protects Against Glucose- and Lipid-Induced Endothelial Dysfunction: Evidence for Direct Vasodilation Effect of GLP-1 Receptor Agonists in Humans. *Diabetes*, *64*(7), 2624–2635.
- [62] Chai, W., Dong, Z., Wang, N., Wang, W., Tao, L., Cao, W., & Liu, Z. (2012). Glucagon-like peptide 1 recruits microvasculature and increases glucose use in muscle via a nitric oxide-dependent mechanism. *Diabetes*, *61*(4), 888–896.
- [63] Hunter, K., & Hölscher, C. (2012). Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC neuroscience*, *13*, 33.
- [64] Richards, P., Parker, H. E., Adriaenssens, A. E., Hodgson, J. M., Cork, S. C., Trapp, S., Gribble, F. M., & Reimann, F. (2014). Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes*, *63*(4), 1224–1233.

- [65] Blundell, J., Finlayson, G., Axelsen, M., Flint, A., Gibbons, C., Kvist, T., & Hjerpsted, J. B. (2017). Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity. *Diabetes, obesity & metabolism*, *19*(9), 1242–1251.
- [66] Mossello, E., Ballini, E., Boncinelli, M., Monami, M., Lonetto, G., Mello, A. M., Tarantini, F., Baldasseroni, S., Mannucci, E., & Marchionni, N. (2011). Glucagon-like peptide-1, diabetes, and cognitive decline: possible pathophysiological links and therapeutic opportunities. *Experimental diabetes research*, *2011*, 281674.
- [67] Harkavyi, A., & Whitton, P. S. (2010). Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation as a means of neuroprotection. *British journal of pharmacology*, *159*(3), 495–501.
- [68] Hölscher C. (2012). Potential role of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in neuroprotection. *CNS drugs*, *26*(10), 871–882.
- [69] D'Alessio, D., Vahl, T., & Prigeon, R. (2004). Effects of glucagon-like peptide 1 on the hepatic glucose metabolism. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, *36*(11-12), 837–841.
- [70] Ikezawa, Y., Yamatani, K., Ohnuma, H., Daimon, M., Manaka, H., & Sasaki, H. (2003). Glucagon-like peptide-1 inhibits glucagon-induced glycogenolysis in perivenous hepatocytes specifically. *Regulatory peptides*, *111*(1-3), 207–210.
- [71] Armstrong, M. J., Gaunt, P., Aithal, G. P., Barton, D., Hull, D., Parker, R., Hazlehurst, J. M., Guo, K., LEAN trial team, Abouda, G., Aldersley, M. A., Stocken, D., Gough, S. C., Tomlinson, J. W., Brown, R. M., Hübscher, S. G., & Newsome, P. N. (2016). Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet (London, England)*, *387*(10019), 679–690.
- [72] Katsiki, N., Athyros, V. G., Karagiannis, A., & Mikhailidis, D. P. (2017). Semaglutide, lipid-lowering drugs, and NAFLD. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, *5*(5), 329–330.
- [73] Rakipovski, G., Rolin, B., Nøhr, J., Klewe, I., Frederiksen, K. S., Augustin, R., Hecksher-Sørensen, J., Ingvorsen, C., Poley-Wolf, J., & Knudsen, L. B. (2018). The GLP-1 Analogs Liraglutide and Semaglutide Reduce Atherosclerosis in ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-} Mice by a Mechanism That Includes Inflammatory Pathways. *JACC. Basic to translational science*, *3*(6), 844–857.

- [74] Meier, C., Schwartz, A. V., Egger, A., & Lecka-Czernik, B. (2016). Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone*, 82, 93–100.
- [75] Mabileau, G., Mieczkowska, A., Irwin, N., Flatt, P. R., & Chappard, D. (2013). Optimal bone mechanical and material properties require a functional glucagon-like peptide-1 receptor. *The Journal of endocrinology*, 219(1), 59–68.
- [76] Monami, M., Dicembrini, I., Marchionni, N., Rotella, C. M., & Mannucci, E. (2012). Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on body weight: a meta-analysis. *Experimental diabetes research*, 2012, 672658.
- [77] Pi-Sunyer, X., Astrup, A., Fujioka, K., Greenway, F., Halpern, A., Krempf, M., Lau, D. C., le Roux, C. W., Violante Ortiz, R., Jensen, C. B., Wilding, J. P., & SCALE Obesity and Prediabetes NN8022-1839 Study Group (2015). A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *The New England journal of medicine*, 373(1), 11–22.
- [78] Gao, H., Wang, X., Zhang, Z., Yang, Y., Yang, J., Li, X., & Ning, G. (2007). GLP-1 amplifies insulin signaling by up-regulation of IRbeta, IRS-1 and Glut4 in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine*, 32(1), 90–95.
- [79] Sancho, V., Trigo, M. V., González, N., Valverde, I., Malaisse, W. J., & Villanueva-Peñacarrillo, M. L. (2005). Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *Journal of molecular endocrinology*, 35(1), 27–38.
- [80] Garber, A. J., Abrahamson, M. J., Barzilay, J. I., Blonde, L., Bloomgarden, Z. T., Bush, M. A., Dagogo-Jack, S., DeFronzo, R. A., Einhorn, D., Fonseca, V. A., Garber, J. R., Garvey, W. T., Grunberger, G., Handelsman, Y., Hirsch, I. B., Jellinger, P. S., McGill, J. B., Mechanick, J. I., Rosenblit, P. D., & Umpierrez, G. E. (2019). Consensus Statement By The American Association Of Clinical Endocrinologists And American College Of Endocrinology On The Comprehensive Type 2 Diabetes Management Algorithm - 2019 Executive Summary. *Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 25(1), 69–100. <https://doi.org/10.4158/CS-2018-0535>
- [81] DeFronzo, R. A., Ratner, R. E., Han, J., Kim, D. D., Fineman, M. S., & Baron, A. D. (2005). Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks

in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 28(5), 1092–1100. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1092-1100.

[82] Seufert, J., & Gallwitz, B. (2014). The extra-pancreatic effects of GLP-1 receptor agonists: a focus on the cardiovascular, gastrointestinal and central nervous systems. *Diabetes, obesity & metabolism*, 16(8), 673–688.

[83] Meier J. J. (2012). GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology*, 8(12), 728–742.

[84] Blevins, T., Pullman, J., Malloy, J., Yan, P., Taylor, K., Schulteis, C., Trautmann, M., & Porter, L. (2011). DURATION-5: exenatide once weekly resulted in greater improvements in glycemic control compared with exenatide twice daily in patients with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(5), 1301–1310.

[85] Pfeffer, M. A., Claggett, B., Diaz, R., Dickstein, K., Gerstein, H. C., Køber, L. V., Lawson, F. C., Ping, L., Wei, X., Lewis, E. F., Maggioni, A. P., McMurray, J. J., Probstfield, J. L., Riddle, M. C., Solomon, S. D., Tardif, J. C., & ELIXA Investigators (2015). Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome. *The New England journal of medicine*, 373(23), 2247–2257.

[86] Marso, S. P., Daniels, G. H., Brown-Frandsen, K., Kristensen, P., Mann, J. F., Nauck, M. A., Nissen, S. E., Pocock, S., Poulter, N. R., Ravn, L. S., Steinberg, W. M., Stockner, M., Zinman, B., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., LEADER Steering Committee, & LEADER Trial Investigators (2016). Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine*, 375(4), 311–322.

[87] Marso, S. P., Holst, A. G., & Vilsbøll, T. (2017). Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine*, 376(9), 891–892.

[88] Holman, R. R., Bethel, M. A., Mentz, R. J., Thompson, V. P., Lokhnygina, Y., Buse, J. B., Chan, J. C., Choi, J., Gustavson, S. M., Iqbal, N., Maggioni, A. P., Marso, S. P., Öhman, P., Pagidipati, N. J., Poulter, N., Ramachandran, A., Zinman, B., Hernandez, A. F., & EXSCEL Study Group (2017). Effects of Once-Weekly Exenatide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine*, 377(13), 1228–1239.

- [89] Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., Prickett, K. S., & Andersen, N. H. (2001). Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states. *Biochemistry*, *40*(44), 13188–13200.
- [90] Gentilella, R., Pechtner, V., Corcos, A., & Consoli, A. (2019). Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes treatment: are they all the same?. *Diabetes/metabolism research and reviews*, *35*(1), e3070.
- [91] Knudsen, L. B., Nielsen, P. F., Huusfeldt, P. O., Johansen, N. L., Madsen, K., Pedersen, F. Z., Thøgersen, H., Wilken, M., & Agersø, H. (2000). Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *Journal of medicinal chemistry*, *43*(9), 1664–1669.
- [92] Lau, J., Bloch, P., Schäffer, L., Pettersson, I., Spetzler, J., Kofoed, J., Madsen, K., Knudsen, L. B., McGuire, J., Steensgaard, D. B., Strauss, H. M., Gram, D. X., Knudsen, S. M., Nielsen, F. S., Thygesen, P., Reedtz-Runge, S., & Kruse, T. (2015). Discovery of the Once-Weekly Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analogue Semaglutide. *Journal of medicinal chemistry*, *58*(18), 7370–7380.
- [93] Frederiksen, T. M., Sønderby, P., Ryberg, L. A., Harris, P., Bukrinski, J. T., Scharff-Poulsen, A. M., Elf-Lind, M. N., & Peters, G. H. (2015). Oligomerization of a Glucagon-like Peptide 1 Analog: Bridging Experiment and Simulations. *Biophysical journal*, *109*(6), 1202–1213.
- [94] Clodfelter, D. K., Pekar, A. H., Rebhun, D. M., Destrampe, K. A., Havel, H. A., Myers, S. R., & Brader, M. L. (1998). Effects of non-covalent self-association on the subcutaneous absorption of a therapeutic peptide. *Pharmaceutical research*, *15*(2), 254–262.
- [95] Knudsen, L. B., & Lau, J. (2019). The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide. *Frontiers in endocrinology*, *10*, 155.
- [96] Thorens, B., Porret, A., Bühler, L., Deng, S. P., Morel, P., & Widmann, C. (1993). Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*, *42*(11), 1678–1682.
- [97] Runge, S., Schimmer, S., Oschmann, J., Schiødt, C. B., Knudsen, S. M., Jeppesen, C. B., Madsen, K., Lau, J., Thøgersen, H., & Rudolph, R. (2007). Differential structural

properties of GLP-1 and exendin-4 determine their relative affinity for the GLP-1 receptor N-terminal extracellular domain. *Biochemistry*, 46(19), 5830–5840.

[98] Christensen, M., Miossec, P., Larsen, B. D., Werner, U., & Knop, F. K. (2014). The design and discovery of lixisenatide for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert opinion on drug discovery*, 9(10), 1223–1251.

[99] Larsen, B.D., Jensen, L., Mørk, N., Bjerrum, M.J., Nielsen, G., Frokjaer, S., & Denmark, C.-. (2000). Structural Inducing Probes (Sip) - Blows New Hope Into The General Use Of Peptides As Drugs.

[100] Buse, J. B., Drucker, D. J., Taylor, K. L., Kim, T., Walsh, B., Hu, H., Wilhelm, K., Trautmann, M., Shen, L. Z., Porter, L. E., & DURATION-1 Study Group (2010). DURATION-1: exenatide once weekly produces sustained glycemic control and weight loss over 52 weeks. *Diabetes care*, 33(6), 1255–1261.

[101] Rodbard, H. W., Rosenstock, J., Canani, L. H., Deerochanawong, C., Gumprecht, J., Lindberg, S. Ø., Lingvay, I., Søndergaard, A. L., Treppendahl, M. B., Montanya, E., & PIONEER 2 Investigators (2019). Oral Semaglutide Versus Empagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes Uncontrolled on Metformin: The PIONEER 2 Trial. *Diabetes care*, 42(12), 2272–2281.

[102] <https://www.novonordisk-us.com/media/news-releases.html?122973> Hozzáférés dátuma: 2020.02.15

[103] Hess, S., Rotshild, V., & Hoffman, A. (2005). Investigation of the enhancing mechanism of sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate effect on the intestinal permeability of polar molecules utilizing a voltage clamp method. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 25(2-3), 307–312.

[104] Buckley, S. T., Bækdal, T. A., Vegge, A., Maarbjerg, S. J., Pyke, C., Ahnfelt-Rønne, J., Madsen, K. G., Schéele, S. G., Alanentalo, T., Kirk, R. K., Pedersen, B. L., Skyggebjerg, R. B., Benie, A. J., Strauss, H. M., Wahlund, P. O., Bjerregaard, S., Farkas, E., Fekete, C., Søndergaard, F. L., Borregaard, J., ... Knudsen, L. B. (2018). Transcellular stomach absorption of a derivatized glucagon-like peptide-1 receptor agonist. *Science translational medicine*, 10 (467), eaar7047.

[105] Bui, V., & Neumiller, J. J. (2018). Oral Semaglutide. *Clinical diabetes : a publication of the American Diabetes Association*, 36(4), 327–329.

- [106] Streicher, W. W., & Makhatadze, G. I. (2007). Unfolding thermodynamics of Trp-cage, a 20 residue miniprotein, studied by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry*, *46*(10), 2876–2880.
- [107] Culik, R. M., Serrano, A. L., Bunagan, M. R., & Gai, F. (2011). Achieving secondary structural resolution in kinetic measurements of protein folding: a case study of the folding mechanism of Trp-cage. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *50*(46), 10884–10887.
- [108] Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., & Andersen, N. H. (2002). Designing a 20-residue protein. *Nature structural biology*, *9*(6), 425–430.
- [109] Barua, B., Lin, J. C., Williams, V. D., Kummner, P., Neidigh, J. W., & Andersen, N. H. (2008). The Trp-cage: optimizing the stability of a globular miniprotein. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, *21*(3), 171–185.
- [110] Hudáky, P., Stráner, P., Farkas, V., Váradi, G., Tóth, G., & Perczel, A. (2008). Cooperation between a salt bridge and the hydrophobic core triggers fold stabilization in a Trp-cage miniprotein. *Biochemistry*, *47*(3), 1007–1016.
- [111] Williams, D. V., Byrne, A., Stewart, J., & Andersen, N. H. (2011). Optimal salt bridge for Trp-cage stabilization. *Biochemistry*, *50*(7), 1143–1152.
- ¹[112] Rovó, P., Farkas, V., Stráner, P., Szabó, M., Jermendy, A., Hegyi, O., Tóth, G. K., & Perczel, A. (2014). Rational design of α -helix-stabilized exendin-4 analogues. *Biochemistry*, *53*(22), 3540–3552.
- [113] Hudáky, P., Stráner, P., Farkas, V., Váradi, G., Tóth, G., & Perczel, A. (2008). Cooperation between a salt bridge and the hydrophobic core triggers fold stabilization in a Trp-cage miniprotein. *Biochemistry*, *47*(3), 1007–1016.
- ¹[114] Kieffer, T. J., & Habener, J. F. (1999). The glucagon-like peptides. *Endocrine reviews*, *20*(6), 876–913.
- [115] Siu, F. Y., He, M., de Graaf, C., Han, G. W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J. S., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V., Wang, M. W., & Stevens, R. C. (2013). Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*, *499*(7459), 444–449.
- [116] Hoang, H. N., Song, K., Hill, T. A., Derksen, D. R., Edmonds, D. J., Kok, W. M., Limberakis, C., Liras, S., Loria, P. M., Mascitti, V., Mathiowetz, A. M., Mitchell, J. M., Piotrowski, D. W., Price, D. A., Stanton, R. V., Suen, J. Y., Withka, J. M., Griffith, D.

A., & Fairlie, D. P. (2015). Short Hydrophobic Peptides with Cyclic Constraints Are Potent Glucagon-like Peptide-1 Receptor (GLP-1R) Agonists. *Journal of medicinal chemistry*, 58(9), 4080–4085.

[117] Purser, S., Moore, P. R., Swallow, S., & Gouverneur, V. (2008). Fluorine in medicinal chemistry. *Chemical Society reviews*, 37(2), 320–330.

[118] Salwiczek, M., Nyakatura, E. K., Gerling, U. I., Ye, S., & Kokschi, B. (2012). Fluorinated amino acids: compatibility with native protein structures and effects on protein-protein interactions. *Chemical Society reviews*, 41(6), 2135–2171.

[119] Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., & Scharpé, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(9), 736–744.

[120] Weiss, M. S., Jabs, A., & Hilgenfeld, R. (1998). Peptide bonds revisited. *Nature structural biology*, 5(8), 676.

[121] Kang, Y. K., & Choi, H. Y. (2004). Cis-trans isomerization and puckering of proline residue. *Biophysical chemistry*, 111(2), 135–142.

[122] Panasik, N., Jr, Eberhardt, E. S., Edison, A. S., Powell, D. R., & Raines, R. T. (1994). Inductive effects on the structure of proline residues. *International journal of peptide and protein research*, 44(3), 262–269.

[123] Gorres, K. L., Edupuganti, R., Krow, G. R., & Raines, R. T. (2008). Conformational preferences of substrates for human prolyl 4-hydroxylase. *Biochemistry*, 47(36), 9447–9455.

[124] Tandon, M., Wu, M., Begley, T. P., Myllyharju, J., Pirskanen, A., & Kivirikko, K. (1998). Substrate specificity of human prolyl-4-hydroxylase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8(10), 1139–1144.

[125] Golbik, R., Yu, C., Weyher-Stingl, E., Huber, R., Moroder, L., Budisa, N., & Schiene-Fischer, C. (2005). Peptidyl prolyl cis/trans-isomerases: comparative reactivities of cyclophilins, FK506-binding proteins, and parvulins with fluorinated oligopeptide and protein substrates. *Biochemistry*, 44(49), 16026–16034.

[126] Thomas, K. M., Naduthambi, D., & Zondlo, N. J. (2006). Electronic control of amide cis-trans isomerism via the aromatic-prolyl interaction. *Journal of the American Chemical Society*, 128(7), 2216–2217.

- [127] Zheng, T. Y., Lin, Y. J., & Horng, J. C. (2010). Thermodynamic consequences of incorporating 4-substituted proline derivatives into a small helical protein. *Biochemistry*, *49*(19), 4255–4263.
- [128] Naduthambi, D., & Zondlo, N. J. (2006). Stereoelectronic tuning of the structure and stability of the trp cage miniprotein. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(38), 12430–12431.
- [129] Lau, Y. H., de Andrade, P., Quah, S. T., Rossmann, M., Laraia, L., Skold, N., Sum, T. J., Rowling, P. J. E., Joseph, T. L., Verma, C., et al. (2014) Functionalised staple linkages for modulating the cellular activity of stapled peptides. *Chemical Science* *5*, 1804–1809
- [130] Yu, C., & Taylor, J. W. (1999). Synthesis and study of peptides with semirigid i and i + 7 side-chain bridges designed for alpha-helix stabilization. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *7*(1), 161–175.
- [131] Walensky, L. D., & Bird, G. H. (2014). Hydrocarbon-stapled peptides: principles, practice, and progress. *Journal of medicinal chemistry*, *57*(15), 6275–6288.
- [132] Poland, D.C., Scheraga, H.A. (1965), Statistical mechanics of noncovalent bonds in polyamino acids. VIII. Covalent loops in proteins. *Biopolymers*, *3*: 379-399
- [133] Paul, J. F., (1956) Theory of Elastic Mechanisms in Fibrous Proteins *ournal of the American Chemical Society* *78* (20), 5222-5235
- [134] Doig, A. J., & Williams, D. H. (1991). Is the hydrophobic effect stabilizing or destabilizing in proteins? The contribution of disulphide bonds to protein stability. *Journal of molecular biology*, *217*(2), 389–398.
- [135] Wetzel, R., Perry, L. J., Baase, W. A., & Becktel, W. J. (1988). Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(2), 401–405.
- [136] Patil, N. A., Tailhades, J., Hughes, R. A., Separovic, F., Wade, J. D., & Hossain, M. A. (2015). Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins. *International journal of molecular sciences*, *16*(1), 1791–1805.
- [137] Grek, C., & Townsend, D. M. (2014). Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. *Endoplasmic reticulum stress in diseases*, *1*(1), 4–17.

- [138] Xu, S., Sankar, S., & Neamati, N. (2014). Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug discovery today*, *19*(3), 222–240.
- [139] Ali Khan, H., & Mutus, B. (2014). Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Frontiers in chemistry*, *2*, 70.
- [140] Andreu, C. I., Woehlbier, U., Torres, M., & Hetz, C. (2012). Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS letters*, *586*(18), 2826–2834.
- [141] Bechtel, T. J., & Weerapana, E. (2017). From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease. *Proteomics*, *17*(6), 10.1002/pmic.201600391.
- [142] Wong, J. W., Ho, S. Y., & Hogg, P. J. (2011). Disulfide bond acquisition through eukaryotic protein evolution. *Molecular biology and evolution*, *28*(1), 327–334.
- [143] Jordan, I. K., Kondrashov, F. A., Adzhubei, I. A., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. (2005). A universal trend of amino acid gain and loss in protein evolution. *Nature*, *433*(7026), 633–638.
- [144] Hatahet, F., & Ruddock, L. W. (2009). Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants & redox signaling*, *11*(11), 2807–2850.
- [145] Jensen, K. S., Hansen, R. E., & Winther, J. R. (2009). Kinetic and thermodynamic aspects of cellular thiol-disulfide redox regulation. *Antioxidants & redox signaling*, *11*(5), 1047–1058.
- [146] Singh R., Whitesides G.M., Thiol–Disulfide Interchange in The Chemistry of Sulfur-Containing Functional Groups (Ed.: S. Patai), Wiley, London, 1993: 633–658.
- [147] Creighton, T. E., & Goldenberg, D. P. (1984). Kinetic role of a meta-stable native-like two-disulphide species in the folding transition of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Journal of molecular biology*, *179*(3), 497–526.
- [148] Nakamoto, H., & Bardwell, J. C. (2004). Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the Escherichia coli periplasm. *Biochimica et biophysica acta*, *1694*(1-3), 111–119.
- [149] Lau, J. L., & Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *26*(10), 2700–2707.

- [150] Bhattacharyya, R., Pal, D., & Chakrabarti, P. (2004). Disulfide bonds, their stereospecific environment and conservation in protein structures. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 17(11), 795–808.
- [151] Ioerger, T. R., Du, C., & Linthicum, D. S. (1999). Conservation of cys-cys trp structural triads and their geometry in the protein domains of immunoglobulin superfamily members. *Molecular immunology*, 36(6), 373–386.
- [152] Singh, J. and Thornton, J.M.(1985), The interaction between phenylalanine rings in proteins, *FEBS Letters*, 191,
- [153] Zhang, L., Navaratna, T., & Thurber, G. M. (2016). A Helix-Stabilizing Linker Improves Subcutaneous Bioavailability of a Helical Peptide Independent of Linker Lipophilicity. *Bioconjugate chemistry*, 27(7), 1663–1672.
- [154] Hoang, H. N., Song, K., Hill, T. A., Derksen, D. R., Edmonds, D. J., Kok, W. M., Limberakis, C., Liras, S., Loria, P. M., Mascitti, V., Mathiowetz, A. M., Mitchell, J. M., Piotrowski, D. W., Price, D. A., Stanton, R. V., Suen, J. Y., Withka, J. M., Griffith, D. A., & Fairlie, D. P. (2015). Short Hydrophobic Peptides with Cyclic Constraints Are Potent Glucagon-like Peptide-1 Receptor (GLP-1R) Agonists. *Journal of medicinal chemistry*, 58(9), 4080–4085.
- [155] Li, Y., Zheng, X., Tang, L., Xu, W., & Gong, M. (2011). GLP-1 analogs containing disulfide bond exhibited prolonged half-life in vivo than GLP-1. *Peptides*, 32(6), 1303–1312.
- [156] Ross, P. L., & Wolfe, J. L. (2016). Physical and Chemical Stability of Antibody Drug Conjugates: Current Status. *Journal of pharmaceutical sciences*, 105(2), 391–397.
- [157] Wang, S., Wu, G., Zhang, X., Tian, Z., Zhang, N., Hu, T., Dai, W., & Qian, F. (2017). Stabilizing two IgG1 monoclonal antibodies by surfactants: Balance between aggregation prevention and structure perturbation. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 114, 263–277.
- [158] Paul, A. J., Schwab, K., Prokoph, N., Haas, E., Handrick, R., & Hesse, F. (2015). Fluorescence dye-based detection of mAb aggregates in CHO culture supernatants. *Analytical and bioanalytical chemistry*

- [159] Arakawa, T., Ejima, D., & Akuta, T. (2017). Protein aggregation under high concentration/density state during chromatographic and ultrafiltration processes. *International journal of biological macromolecules*, *95*, 1153–1158.
- [160] Roughton, B. C., Iyer, L. K., Bertelsen, E., Topp, E. M., & Camarda, K. V. (2013). Protein aggregation and lyophilization: Protein structural descriptors as predictors of aggregation propensity. *Computers & chemical engineering*, *58*(2013), 369–377.
- [161] Pindrus, M., Shire, S. J., Kelley, R. F., Demeule, B., Wong, R., Xu, Y., & Yadav, S. (2015). Solubility Challenges in High Concentration Monoclonal Antibody Formulations: Relationship with Amino Acid Sequence and Intermolecular Interactions. *Molecular pharmaceuticals*, *12*(11), 3896–3907.
- [162] Connolly, B. D., Le, L., Patapoff, T. W., Cromwell, M., Moore, J., & Lam, P. (2015). Protein Aggregation in Frozen Trehalose Formulations: Effects of Composition, Cooling Rate, and Storage Temperature. *Journal of pharmaceutical sciences*, *104*(12),
- [163] Srinivasan, A. R., Lakshmikuttyamma, A., & Shoyele, S. A. (2013). Investigation of the stability and cellular uptake of self-associated monoclonal antibody (MAb) nanoparticles by non-small lung cancer cells. *Molecular pharmaceuticals*, *10*(9), 3275–3284.
- [164] Dekel, Y., Machluf, Y., Gefen, T., Eidelstein, G., Kotlyar, A., Bram, Y., Shahar, E., Reslane, F., Aizenshtein, E., & Pitcovski, J. (2017). Formation of multimeric antibodies for self-delivery of active monomers. *Drug delivery*, *24*(1), 199–208.
- [165] Moussa, E. M., Panchal, J. P., Moorthy, B. S., Blum, J. S., Joubert, M. K., Narhi, L. O., & Topp, E. M. (2016). Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *Journal of pharmaceutical sciences*, *105*(2), 417–430.
- [166] Arora, J., Hu, Y., Esfandiary, R., Sathish, H. A., Bishop, S. M., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., Volkin, D. B., & Weis, D. D. (2016). Charge-mediated Fab-Fc interactions in an IgG1 antibody induce reversible self-association, cluster formation, and elevated viscosity. *mAbs*, *8*(8), 1561–1574.
- [167] Galm, L., Amrhein, S., & Hubbuch, J. (2017). Predictive approach for protein aggregation: Correlation of protein surface characteristics and conformational flexibility to protein aggregation propensity. *Biotechnology and bioengineering*, *114*(6), 1170–1183.

- [168] Fitzpatrick, A. W., Knowles, T. P., Waudby, C. A., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2011). Inversion of the balance between hydrophobic and hydrogen bonding interactions in protein folding and aggregation. *PLoS computational biology*, 7(10), e1002169.
- [169] Ota, C., Noguchi, S., Nagatoishi, S., & Tsumoto, K. (2016). Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution by Using Raman Spectroscopy. *Pharmaceutical research*, 33(4), 956–969.
- [170] Wang, W., & Roberts, C. J. (2018). Protein aggregation - Mechanisms, detection, and control. *International journal of pharmaceuticals*, 550(1-2), 251–268.
- [171] Austerberry, J. I., Dajani, R., Panova, S., Roberts, D., Golovanov, A. P., Pluen, A., van der Walle, C. F., Uddin, S., Warwicker, J., Derrick, J. P., & Curtis, R. (2017). The effect of charge mutations on the stability and aggregation of a human single chain Fv fragment. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 115, 18–30.
- [172] Wang S, Zhang X, Wu G, Tian Z, Qian F. Optimization of high-concentration endostatin formulation: Harmonization of excipients' contributions on colloidal and conformational stabilities. *Int J Pharm*. 2017;530(1-2):173-186.
- [173] Luan, B., Shan, B., Baiz, C., Tokmakoff, A., & Raleigh, D. P. (2013). Cooperative cold denaturation: the case of the C-terminal domain of ribosomal protein L9. *Biochemistry*, 52(14),
- [174] Meliga, S. C., Farrugia, W., Ramsland, P. A., & Falconer, R. J. (2013). Cold-induced precipitation of a monoclonal IgM: a negative activation enthalpy reaction. *The journal of physical chemistry. B*, 117(2), 490–494.
- [175] Kim, N. A., An, I. B., Lim, D. G., Lim, J. Y., Lee, S. Y., Shim, W. S., Kang, N. G., & Jeong, S. H. (2014). Effects of pH and buffer concentration on the thermal stability of etanercept using DSC and DLS. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 37(5), 808–816.
- [176] Oyetayo, O. O., & Kiefer, H. (2016). Experimental Model System to Study pH Shift-Induced Aggregation of Monoclonal Antibodies Under Controlled Conditions. *Pharmaceutical research*, 33(6), 1359–1369.

- [177] Kutsch, M., Hortmann, P., Herrmann, C., Weibels, S., & Weingärtner, H. (2016). Dissecting ion-specific from electrostatic salt effects on amyloid fibrillation: A case study of insulin. *Biointerphases*, *11*(1), 019008.
- [178] Zhang, L., Yu, L., Zhang-Van Enk, J., Huang, G., & Zhang, J. (2017). Phase Behavior of an Fc-Fusion Protein Reveals Generic Patterns of Ion-Specific Perturbation on Protein-Protein Interactions. *Journal of pharmaceutical sciences*, *106*(11), 3287–3292.
- [179] Vlieland, N. D., Nejadnik, M. R., Gardarsdottir, H., Romeijn, S., Sediq, A. S., Bouvy, M. L., Egberts, A., van den Bemt, B., & Jiskoot, W. (2018). The Impact of Inadequate Temperature Storage Conditions on Aggregate and Particle Formation in Drugs Containing Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitors. *Pharmaceutical research*, *35*(2), 42.
- [180] Liu, L., Braun, L. J., Wang, W., Randolph, T. W., & Carpenter, J. F. (2014). Freezing-induced perturbation of tertiary structure of a monoclonal antibody. *Journal of pharmaceutical sciences*, *103*(7), 1979–1986.
- [181] Twomey, A., Less, R., Kurata, K., Takamatsu, H., & Aksan, A. (2013). In situ spectroscopic quantification of protein-ice interactions. *The journal of physical chemistry. B*, *117*(26), 7889–7897.
- [182] Connolly, B. D., Le, L., Patapoff, T. W., Cromwell, M., Moore, J., & Lam, P. (2015). Protein Aggregation in Frozen Trehalose Formulations: Effects of Composition, Cooling Rate, and Storage Temperature. *Journal of pharmaceutical sciences*, *104*(12), 4170–4184.
- [183] Telikepalli, S. N., Kumru, O. S., Kalonia, C., Esfandiary, R., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., & Volkin, D. B. (2014). Structural characterization of IgG1 mAb aggregates and particles generated under various stress conditions. *Journal of pharmaceutical sciences*, *103*(3), 796–809.
- [184] Ghazvini, S., Kalonia, C., Volkin, D. B., & Dhar, P. (2016). Evaluating the Role of the Air-Solution Interface on the Mechanism of Subvisible Particle Formation Caused by Mechanical Agitation for an IgG1 mAb. *Journal of pharmaceutical sciences*, *105*(5), 1643–1656.

- [185] Liu, L., Qi, W., Schwartz, D. K., Randolph, T. W., & Carpenter, J. F. (2013). The effects of excipients on protein aggregation during agitation: an interfacial shear rheology study. *Journal of pharmaceutical sciences*, *102*(8), 2460–2470.
- [186] Gikanga, B., Eisner, D. R., Ovadia, R., Day, E. S., Stauch, O. B., & Maa, Y. F. (2017). Processing Impact on Monoclonal Antibody Drug Products: Protein Subvisible Particulate Formation Induced by Grinding Stress. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, *71*(3), 172–188.
- [187] Baldwin, A. J., Knowles, T. P., Tartaglia, G. G., Fitzpatrick, A. W., Devlin, G. L., Shamma, S. L., Waudby, C. A., Mossuto, M. F., Meehan, S., Gras, S. L., Christodoulou, J., Anthony-Cahill, S. J., Barker, P. D., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2011). Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(36), 14160–14163.
- [188] Dobson C. M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in biochemical sciences*, *24*(9), 329–332.
- [189] Daggett, V., & Fersht, A. R. (2003). Is there a unifying mechanism for protein folding?. *Trends in biochemical sciences*, *28*(1), 18–25.
- [190] Fersht A. R. (2000). Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(4), 1525–1529.
- [191] Vendruscolo, M., Paci, E., Karplus, M., & Dobson, C. M. (2003). Structures and relative free energies of partially folded states of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(25), 14817–14821.
- [192] Capaldi, A. P., Shastry, M. C., Kleanthous, C., Roder, H., & Radford, S. E. (2001). Ultrarapid mixing experiments reveal that Im7 folds via an on-pathway intermediate. *Nature structural biology*, *8*(1), 68–72.
- [193] Bollen, Y. J., Sánchez, I. E., & van Mierlo, C. P. (2004). Formation of on- and off-pathway intermediates in the folding kinetics of *Azotobacter vinelandii* apoflavodoxin. *Biochemistry*, *43*(32), 10475–10489.
- [194] Kleizen, B., & Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology*, *16*(4), 343–349.

- [195] Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., & Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(10), 781–791.
- [196] Pickart, C. M., & Cohen, R. E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(3), 177–187.
- [197] Goldschmidt, L., Teng, P. K., Riek, R., & Eisenberg, D. (2010). Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3487–3492.
- [198] Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M. J., & Westermark, P. (2014). Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 21(4), 221–224.
- [199] Bäuerlein, F., Saha, I., Mishra, A., Kalemánov, M., Martínez-Sánchez, A., Klein, R., Dudanova, I., Hipp, M. S., Hartl, F. U., Baumeister, W., & Fernández-Busnadiego, R. (2017). In Situ Architecture and Cellular Interactions of PolyQ Inclusions. *Cell*, 171(1), 179–187.e10.
- [200] Drummond, E., Nayak, S., Faustin, A., Pires, G., Hickman, R. A., Askenazi, M., Cohen, M., Haldiman, T., Kim, C., Han, X., Shao, Y., Safar, J. G., Ueberheide, B., & Wisniewski, T. (2017). Proteomic differences in amyloid plaques in rapidly progressive and sporadic Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 133(6), 933–954.
- [201] Olzscha, H., Schermann, S. M., Woerner, A. C., Pinkert, S., Hecht, M. H., Tartaglia, G. G., Vendruscolo, M., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U., & Vabulas, R. M. (2011). Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell*, 144(1), 67–78.
- [202] Jackson, M. P., & Hewitt, E. W. (2016). Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays in biochemistry*, 60(2), 173–180.
- [203] Guo, Q., Lehmer, C., Martínez-Sánchez, A., Rudack, T., Beck, F., Hartmann, H., Pérez-Berlanga, M., Frottin, F., Hipp, M. S., Hartl, F. U., Edbauer, D., Baumeister, W., & Fernández-Busnadiego, R. (2018). In Situ Structure of Neuronal C9orf72 Poly-GA Aggregates Reveals Proteasome Recruitment. *Cell*, 172(4), 696–705.e12.

[204] McLaurin, J., & Chakrabarty, A. (1996). Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, 271(43), 26482–26489.

[205] Goodchild, S. C., Sheynis, T., Thompson, R., Tipping, K. W., Xue, W. F., Ranson, N. A., Beales, P. A., Hewitt, E. W., & Radford, S. E. (2014). β 2-Microglobulin amyloid fibril-induced membrane disruption is enhanced by endosomal lipids and acidic pH. *PLoS one*, 9(8), e104492.

[206] Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65–74.

[207] Pilla, E., Schneider, K., & Bertolotti, A. (2017). Coping with Protein Quality Control Failure. *Annual review of cell and developmental biology*, 33, 439–465.

[208] Li, J., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2001). Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry*, 40(38), 11604–11613.

[209] Krone, M. G., Baumketner, A., Bernstein, S. L., Wyttenbach, T., Lazo, N. D., Teplow, D. B., Bowers, M. T., & Shea, J. E. (2008). Effects of familial Alzheimer's disease mutations on the folding nucleation of the amyloid beta-protein. *Journal of molecular biology*, 381(1), 221–228.

[210] Mangione, P. P., Esposito, G., Relini, A., Raimondi, S., Porcari, R., Giorgetti, S., Corazza, A., Fogolari, F., Penco, A., Goto, Y., Lee, Y. H., Yagi, H., Cecconi, C., Naqvi, M. M., Gillmore, J. D., Hawkins, P. N., Chiti, F., Rolandi, R., Taylor, G. W., Pepys, M. B., Bellotti, V. (2013). Structure, folding dynamics, and amyloidogenesis of D76N β 2-microglobulin: roles of shear flow, hydrophobic surfaces, and α -crystallin. *The Journal of biological chemistry*, 288(43), 30917–30930.

[211] Brais, B., Bouchard, J. P., Xie, Y. G., Rochefort, D. L., Chrétien, N., Tomé, F. M., Lafrenière, R. G., Rommens, J. M., Uyama, E., Nohira, O., Blumen, S., Korczyn, A. D., Heutink, P., Mathieu, J., Duranceau, A., Codère, F., Fardeau, M., & Rouleau, G. A. (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature genetics*, 18(2), 164–167.

[212] Scheuermann, T., Schulz, B., Blume, A., Wahle, E., Rudolph, R., & Schwarz, E. (2003). Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *12*(12), 2685–2692.

[213] Scarpioni, R., Ricardi, M., Albertazzi, V., De Amicis, S., Rastelli, F., & Zerbini, L. (2016). Dialysis-related amyloidosis: challenges and solutions. *International journal of nephrology and renovascular disease*, *9*, 319–328.

[214] Glabe, C. G., & Kaye, R. (2006). Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology*, *66*(2 Suppl 1), S74–S78.

[215] Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J. G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J., Schätzl, H., & Lasmézas, C. I. (2007). In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS pathogens*, *3*(8), e125.

[216] Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H., & Riek, R. (2011). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(10), 4194–4199.

[217] Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., & Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *The Journal of biological chemistry*, *272*(35), 22364–22372.

[218] Breydo, L., & Uversky, V. N. (2015). Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers. *FEBS letters*, *589*(19 Pt A), 2640–2648.

[219] Nelson, P. T., Alafuzoff, I., Bigio, E. H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., Castellani, R. J., Crain, B. J., Davies, P., Del Tredici, K., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Haroutunian, V., Hof, P. R., Hulette, C. M., Hyman, B. T., Iwatsubo, T., Jellinger, K. A., Jicha, G. A., Kövari, E., ... Beach, T. G. (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *71*(5), 362–381.

[220] Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., & Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates

implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 416(6880), 507–511.

[221] Colon, W., & Kelly, J. W. (1992). Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry*, 31(36), 8654–8660.

[222] Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C., & Pepys, M. B. (1997). Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*, 385(6619), 787–793.

[223] Fändrich, M., Fletcher, M. A., & Dobson, C. M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, 410(6825), 165–166.

[224] Ikenoue, T., Lee, Y. H., Kardos, J., Saiki, M., Yagi, H., Kawata, Y., & Goto, Y. (2014). Cold denaturation of α -synuclein amyloid fibrils. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 53(30), 7799–7804.

[225] Buell, A. K., Dobson, C. M., & Knowles, T. P. (2014). The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation. *Essays in biochemistry*, 56, 11–39.

[226] Astbury, W. T., Dickinson, S., & Bailey, K. (1935). The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *The Biochemical journal*, 29(10), 2351–2360.1.

[227] Pauling, L., & Corey, R. B. (1951). Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(11), 729–740.

[228] Dearborn, A. D., Wall, J. S., Cheng, N., Heymann, J. B., Kajava, A. V., Varkey, J., Langen, R., & Steven, A. C. (2016). α -Synuclein Amyloid Fibrils with Two Entwined, Asymmetrically Associated Protofibrils. *The Journal of biological chemistry*, 291(5), 2310–2318.

[229] Fitzpatrick, A., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Crowther, R. A., Ghetti, B., Goedert, M., & Scheres, S. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, 547(7662), 185–190.

[230] Gremer, L., Schölzel, D., Schenk, C., Reinartz, E., Labahn, J., Ravelli, R., Tusche, M., Lopez-Iglesias, C., Hoyer, W., Heise, H., Willbold, D., & Schröder, G. F. (2017).

Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6359), 116–119.

[231] Soriaga, A. B., Sangwan, S., Macdonald, R., Sawaya, M. R., & Eisenberg, D. (2016). Crystal Structures of IAPP Amyloidogenic Segments Reveal a Novel Packing Motif of Out-of-Register Beta Sheets. *The journal of physical chemistry. B*, 120(26), 5810–5816.

[232] Saelices, L., Sievers, S. A., Sawaya, M. R., & Eisenberg, D. S. (2018). Crystal structures of amyloidogenic segments of human transthyretin. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 27(7), 1295–1303.

[233] Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Riek, C., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 435(7043), 773–778.

[234] Eisenberg, D. S., & Sawaya, M. R. (2017). Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annual review of biochemistry*, 86, 69–95.

[235] Lawrence, M. C., & Colman, P. M. (1993). Shape complementarity at protein/protein interfaces. *Journal of molecular biology*, 234(4), 946–950.

[236] Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2002). Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2754–2759.

[237] Klement, K., Wieligmann, K., Meinhardt, J., Hortschansky, P., Richter, W., & Fändrich, M. (2007). Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's abeta(1-40) amyloid fibrils. *Journal of molecular biology*, 373(5), 1321–1333.

[238] Close, W., Neumann, M., Schmidt, A., Hora, M., Annamalai, K., Schmidt, M., Reif, B., Schmidt, V., Grigorieff, N., & Fändrich, M. (2018). Physical basis of amyloid fibril polymorphism. *Nature communications*, 9(1), 699.

[239] Annamalai, K., Gührs, K. H., Koehler, R., Schmidt, M., Michel, H., Loos, C., Gaffney, P. M., Sigurdson, C. J., Hegenbart, U., Schönland, S., & Fändrich, M. (2016). Polymorphism of Amyloid Fibrils In Vivo. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 55(15), 4822–4825.

[240] Fitzpatrick, A., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Crowther, R. A., Ghetti, B., Goedert, M., & Scheres, S. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, *547*(7662), 185–190.

[241] Falcon, B., Zivanov, J., Zhang, W., Murzin, A. G., Garringer, H. J., Vidal, R., Crowther, R. A., Newell, K. L., Ghetti, B., Goedert, M., & Scheres, S. (2019). Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature*, *568*(7752), 420–423.

[242] Falcon, B., Zivanov, J., Zhang, W., Murzin, A. G., Garringer, H. J., Vidal, R., Crowther, R. A., Newell, K. L., Ghetti, B., Goedert, M., & Scheres, S. (2019). Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature*, *568*(7752), 420–423.

[243] Pawar, A. P., Dubay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2005). Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Journal of molecular biology*, *350*(2), 379–392.

[244] hompson, M. J., Sievers, S. A., Karanicolas, J., Ivanova, M. I., Baker, D., & Eisenberg, D. (2006). The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(11), 4074–4078.

[245] Roland, B. P., Kodali, R., Mishra, R., & Wetzel, R. (2013). A serendipitous survey of prediction algorithms for amyloidogenicity. *Biopolymers*, *100*(6), 780–789.

[246] Kühnbrandt W. (2014). Biochemistry. The resolution revolution. *Science (New York, N.Y.)*, *343*(6178), 1443–1444.

¹[247] Meier, B. H., Riek, R., & Böckmann, A. (2017). Emerging Structural Understanding of Amyloid Fibrils by Solid-State NMR. *Trends in biochemical sciences*, *42*(10), 777–787.

[248] Qiang, W., Yau, W. M., Lu, J. X., Collinge, J., & Tycko, R. (2017). Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature*, *541*(7636), 217–221.

[249] Fitzpatrick, A., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Crowther, R. A., Ghetti, B., Goedert, M., & Scheres, S. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, *547*(7662), 185–190.

- [250] Gremer, L., Schölzel, D., Schenk, C., Reinartz, E., Labahn, J., Ravelli, R., Tusche, M., Lopez-Iglesias, C., Hoyer, W., Heise, H., Willbold, D., & Schröder, G. F. (2017). Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6359), 116–119.
- [251] Fowler, S. B., Poon, S., Muff, R., Chiti, F., Dobson, C. M., & Zurdo, J. (2005). Rational design of aggregation-resistant bioactive peptides: reengineering human calcitonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), 10105–10110.
- [252] Poon, S., Birkett, N. R., Fowler, S. B., Luisi, B. F., Dobson, C. M., & Zurdo, J. (2009). Amyloidogenicity and aggregate cytotoxicity of human glucagon-like peptide-1 (hGLP-1). *Protein and peptide letters*, 16(12), 1548–1556.
- [253] Onoue, S., Ohshima, K., Debari, K., Koh, K., Shioda, S., Iwasa, S., Kashimoto, K., & Yajima, T. (2004). Mishandling of the therapeutic peptide glucagon generates cytotoxic amyloidogenic fibrils. *Pharmaceutical research*, 21(7), 1274–1283.
- [254] Hudson, F. M., & Andersen, N. H. (2004). Exenatide: NMR/CD evaluation of the medium dependence of conformation and aggregation state. *Biopolymers*, 76(4), 298–308.
- [255] Clodfelter, D. K., Pekar, A. H., Rebhun, D. M., Destrampe, K. A., Havel, H. A., Myers, S. R., & Brader, M. L. (1998). Effects of non-covalent self-association on the subcutaneous absorption of a therapeutic peptide. *Pharmaceutical research*, 15(2), 254–262.
- [256] Gelenter, M. D., Smith, K. J., Liao, S. Y., Mandala, V. S., Dregni, A. J., Lamm, M. S., Tian, Y., Xu, W., Pochan, D. J., Tucker, T. J., Su, Y., & Hong, M. (2019). The peptide hormone glucagon forms amyloid fibrils with two coexisting β -strand conformations. *Nature structural & molecular biology*, 26(7), 592–598.
- [257] Farkas, V., Csordás, B., Hegyi, O., Tóth, G.K. and Perczel, A. (2013), Foldamer Stability Coupled to Aggregation Propensity of Elongated Trp-Cage Mini-proteins. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013: 3513-3522.
- [258] Schwarzingher, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2000). Random coil chemical shifts in acidic 8 M urea: implementation of random coil shift data in NMRView. *Journal of biomolecular NMR*, 18(1), 43–48.

- [259] Bundi, A. and Wüthrich, K. (1979), ^1H -nmr parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L -Ala-OH. *Biopolymers*, 18: 285-297.
- [260] Aue, W. P., Bartholdi, E., Ernst R. R., (1976) Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *The Journal of Chemical Physics*, 64: 2229–2246.
- [261] Piantini, U., Sorensen, O. W., and Ernst R. R., (1982) Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *Journal of the American Chemical Society*, 104:6800–6801.
- [262] Braunschweiler, L., Ernst, R.R. (1983) Coherence transfer by isotropic mixing - application to proton correlation spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 53:521–528.
- [263] Overhauser, A. W. (1953) Paramagnetic relaxation in metals. *Physical Review*, 89:689–700.
- [264] Jeener, J., Meier B. H., Bachmann, P., Ernst, R. R., (1979) Investigation of exchange process by two-dimensional NMR spectroscopy, *Journal Chemical Physics*, 64: 4546–4553.
- [265] Aksel A. Bothner-By, Stephens, R. L., Jumea, L., Warren, C.D., and Jeanloz R. W., (1984) Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame. *Journal of the American Chemical Society* 106 (3), 811-813
- [266] Neuhaus, D. Williamson, M. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCH Publishers, Inc., New York, 1989.
- [267] Rule G. S., Hitchens, T. K. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*, Springer, New-York, 2006: Chapter 16.2.4 EXPERIMENTAL DETERMINATION OF INTER-PROTON DISTANCES
- [268] Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., & Laue, E. D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins*, 59(4), 687–696.
- [269] Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Malliavin, T. E., & Nilges, M. (2007). ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(3), 381–382.

[270] Brunger A. T. (2007). Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. *Nature protocols*, 2(11), 2728–2733.

[271] Rule G. S., Hitchens, T. K. Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy, Springer, New-York, 2006: Chapter 17 PROTEIN STRUCTURE DETERMINATION

[272] Laskowski, R. A., Rullmannn, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of biomolecular NMR*, 8(4), 477–486.

[273] Vriend G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of molecular graphics*, 8(1), 52–29.

[274] Barua, B., Lin, J. C., Williams, V. D., Kummmler, P., Neidigh, J. W., & Andersen, N. H. (2008). The Trp-cage: optimizing the stability of a globular miniprotein. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 21(3), 171–185.

[275] Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., & Sykes, B. D. (1995). ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of biomolecular NMR*, 5(1), 67–81.

[276] https://spin.niddk.nih.gov/bax/nmrserver/Poulsen_rc_CS/ Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.05.17

[277] Kjaergaard, M., & Poulsen, F. M. (2011). Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *Journal of biomolecular NMR*, 50(2), 157–165.

[278] Kjaergaard, M., Brander, S., & Poulsen, F. M. (2011). Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: effects of temperature and pH. *Journal of biomolecular NMR*, 49(2), 139–149.

[279] Schwarzinger, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Chung, J., Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2001). Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *Journal of the American Chemical Society*, 123(13), 2970–2978.

[280] Maltsev, A. S., Ying, J., & Bax, A. (2012). Deuterium isotope shifts for backbone ^1H , ^{15}N and ^{13}C nuclei in intrinsically disordered protein α -synuclein. *Journal of biomolecular NMR*, 54(2), 181–191.

[281] Sreerama, N., Manning, M. C., Powers, M. E., Zhang, J. X., Goldenberg, D. P., & Woody, R. W. (1999). Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular

dichroism of proteins: circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 38(33), 10814–10822.

[282] Farkas, V., Jákli, I., Tóth, G. K., & Perczel, A. (2016). Aromatic Cluster Sensor of Protein Folding: Near-UV Electronic Circular Dichroism Bands Assigned to Fold Compactness. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 22(39), 13871–13883.

[283] Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M., & Kardos, J. (2015). Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), E3095–E3103.

[284] Dawson, N. L., Lewis, T. E., Das, S., Lees, J. G., Lee, D., Ashford, P., Orengo, C. A., & Sillitoe, I. (2017). CATH: an expanded resource to predict protein function through structure and sequence. *Nucleic acids research*, 45(D1), D289–D295.

[285] Perczel, A., Hollósi, M., Tusnády, G., & Fasman, G. D. (1991). Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein engineering*, 4(6), 669–679.

[286] Jákli, I., & Perczel, A. (2009). The inherent flexibility of peptides and protein fragments quantitized by CD in conjunction with CCA+. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 15(11), 738–752.

[287] Buday L.; Nyitray L.; Perczel A.; Ezerarcú fehérjék. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, 2018: 9. fejezet Elektron- és rezgési spektroszkópia a fehérje kutatásban

[288] Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Lee, C., Pahle, J., Simus, N., Singhal, M., Xu, L., Mendes, P., & Kummer, U. (2006). COPASI--a COMplex PATHway Simulator. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(24), 3067–3074.

[289] <https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool> Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.08.26

[290] Singh J., Thornton J. M., Atlas of Protein Side-Chain Interactions, Vols. I & II, IRL press, Oxford, 1992.

[291] Tollinger, M., Skrynnikov, N. R., Mulder, F. A., Forman-Kay, J. D., & Kay, L. E. (2001). Slow dynamics in folded and unfolded states of an SH3 domain. *Journal of the American Chemical Society*, 123(46), 11341–11352.

[292] Umemoto, A., Yagi, H., So, M., & Goto, Y. (2014). High-throughput analysis of ultrasonication-forced amyloid fibrillation reveals the mechanism underlying the large fluctuation in the lag time. *The Journal of biological chemistry*, 289(39), 27290–27299.

[293] Verhoorck, S., Killoran, P. M., & Coxon, C. R. (2018). Fluorinated Prolines as Conformational Tools and Reporters for Peptide and Protein Chemistry. *Biochemistry*, 57(43), 6132–6143.

[294]<https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledgecenter/whitepapers/WP120620BasicGuidePartChar> Hozzáférés dátuma: 2020.05.18

[295] Tartaglia, G. G., & Vendruscolo, M. (2008). The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chemical Society reviews*, 37(7), 1395–1401.

[296] Doig, A. J., & Baldwin, R. L. (1995). N- and C-capping preferences for all 20 amino acids in alpha-helical peptides. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 4(7), 1325–1336.

[297] Evers, A., Bossart, M., Pfeiffer-Marek, S., Elvert, R., Schreuder, H., Kurz, M., Stengelin, S., Lorenz, M., Herling, A., Konkar, A., Lukasczyk, U., Pfenninger, A., Lorenz, K., Haack, T., Kadereit, D., & Wagner, M. (2018). Dual Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1)/Glucagon Receptor Agonists Specifically Optimized for Multidose Formulations. *Journal of medicinal chemistry*, 61(13), 5580–5593.

[298] Dmitrenko, O., Thorpe, C., & Bach, R. D. (2007). Mechanism of SN2 disulfide bond cleavage by phosphorus nucleophiles. Implications for biochemical disulfide reducing agents. *The Journal of organic chemistry*, 72(22), 8298–8307.

[299] Overman L. E., Oconnor E. M., (1976). Nucleophilic cleavage of the sulfur-sulfur bond by phosphorus nucleophiles. IV. Kinetic study of the reduction of alkyl disulfides with triphenylphosphine and water. *Journal of the American Chemical Society*, 98, 771-775.

[300] Wu, C., Belenda, C., Leroux, J. C., & Gauthier, M. A. (2011). Interplay of chemical microenvironment and redox environment on thiol-disulfide exchange kinetics. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 17(36), 10064–10070.

[301] Snyder, G. H., Cennerazzo, M. J., Karalis, A. J., & Field, D. (1981). Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry*, 20(23), 6509–6519. <https://doi.org/10.1021/bi00526a001>

[302] Tailhades, J., Patil, N. A., Hossain, M. A., & Wade, J. D. (2015). Intramolecular acyl transfer in peptide and protein ligation and synthesis. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 21(3), 139–147.

[303] Buell, A. K., Hung, P., Salvatella, X., Welland, M. E., Dobson, C. M., & Knowles, T. P. (2013). Electrostatic effects in filamentous protein aggregation. *Biophysical journal*, 104(5), 1116–1126.

[304] Marek, P. J., Patsalo, V., Green, D. F., & Raleigh, D. P. (2012). Ionic strength effects on amyloid formation by amylin are a complicated interplay among Debye screening, ion selectivity, and Hofmeister effects. *Biochemistry*, 51(43), 8478–8490.

11. 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.

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Prof. Perczel Andrásnak, amiért biztosította az anyagi, tárgyi és szakmai háttérrel a PhD kutatómunkám megvalósításához és hogy az évek során megtanulhattam mellette az önálló gondolkodást és munkavégzést, illetve ennek jelentőségét.

Külön köszönettel tartozom Taricska Nóra munkatársamnak, akinek segítségével, precizítására, kritikus szemléletmódjára mindig számíthattam a munkám során.

Szeretném külön megköszönni Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dórának azt a számtalan altruista segítségnyújtást, amelyet a munkám során kaptam tőle, illetve azt a pragmatikus gondolkodásmódot, amelyet sajnos még mindig nem sikerült teljes mértékben elsajátítanom.

Szeretném megköszönni Dr. Bodor Andreának és Dr. Farkas Viktornak azt a számtalan praktikus elméleti és gyakorlati spektroszkópiai tanácsot és szakmai tanítást, amelyet az évek során elsajátíthattam Tőlük.

Köszönöm Stráner Pálnak, hogy Ő Stráner Pali.

Szeretném megköszönni Ákontz-Kiss Hannának a közös gondolkodásokat és az együttes munkát, Sebák Fanninak, pedig, hogy szinte bármilyen problémával fordulhattam hozzá.

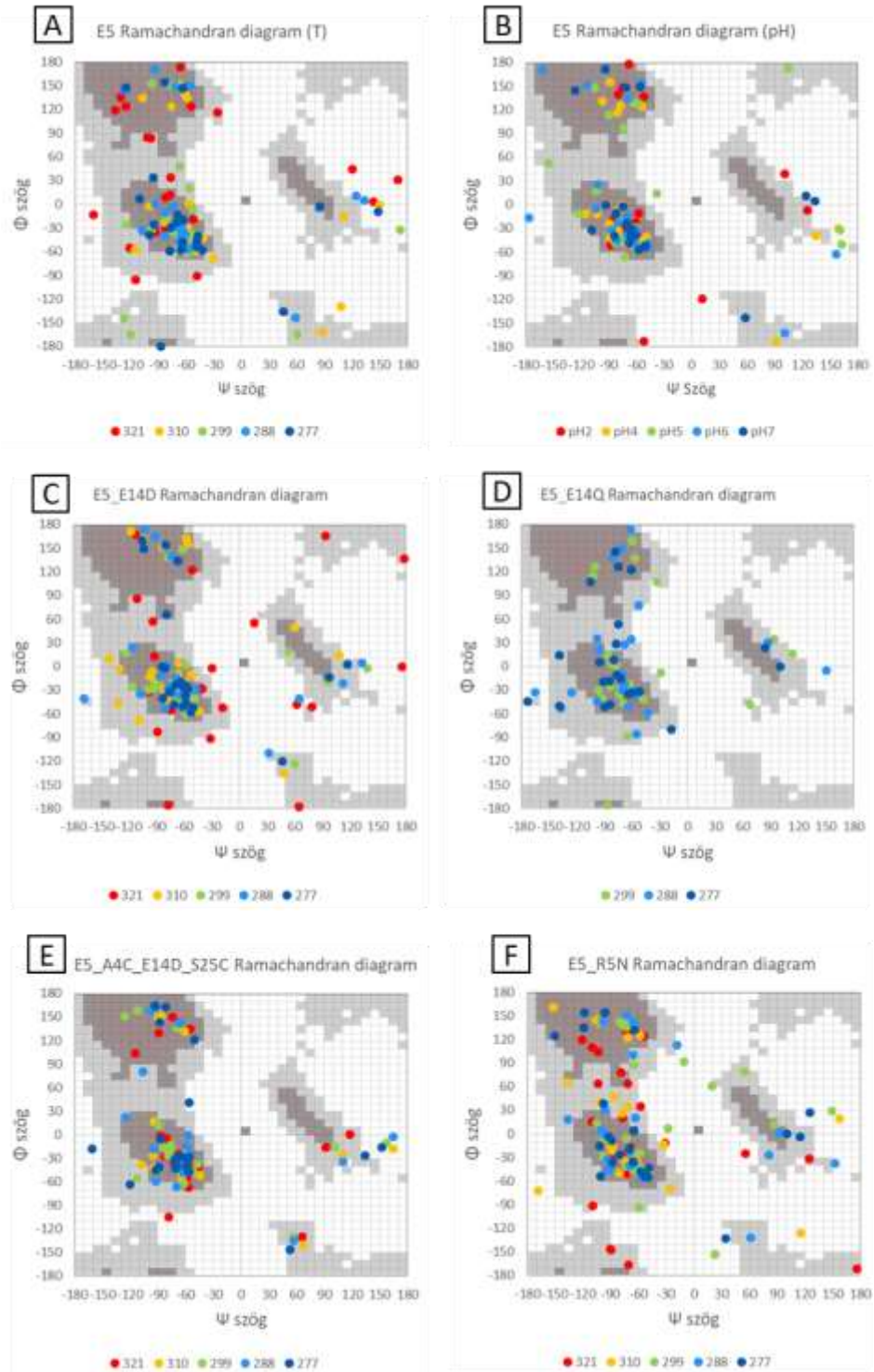
Szeretném megköszönni kooperáló partnereinknek a mérések kivitelezésében nyújtott segítséget, illetve a Sanofi-nak, hogy doktori programjukban részt vehettem és anyagilag támogatták a munkámat.

Szeretném megköszönni a csoport minden jelenlegi és korábbi tagjának azt a kellemes, segítőkész és baráti munkahelyi légkört, amelyet jelenlétükkel biztosítottak számomra a hétköznapi munka során.

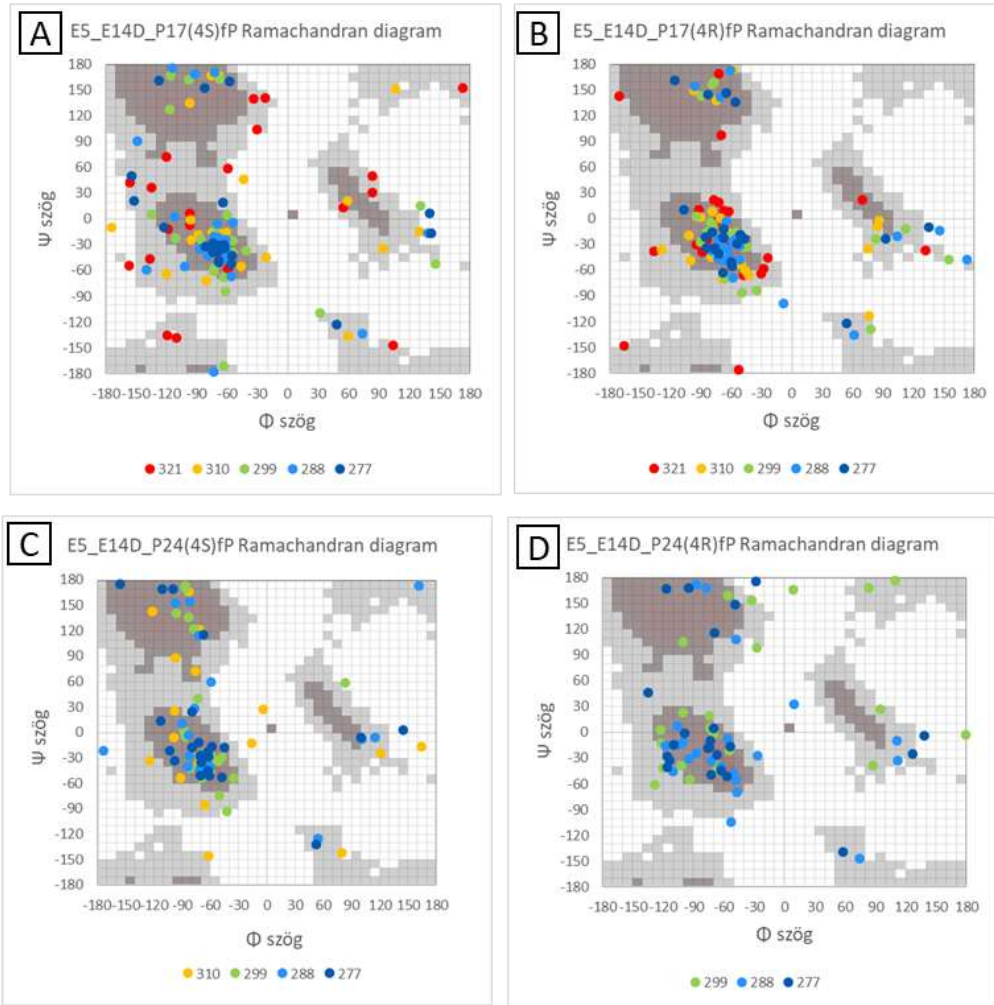
Mérhetetlenül hálás vagyok, hogy a családom a Családom. Köszönöm, hogy minden helyzetben számíthattam Rátok, hogy ott álltatok mellettem és folyamatosan támogattok az utam során. Köszönöm Páromnak, hogy türelemmel fogadta a munkából eredő frusztráció kitöréseimet és végig támogott és biztatott a disszertáció írása során.

Végül külön szeretném megköszönni Édesapámnak, amiért segített irányt mutatni tanulmányaim során és mindig érdeklődéssel követte és támogatta szakmai fejlődésemet.

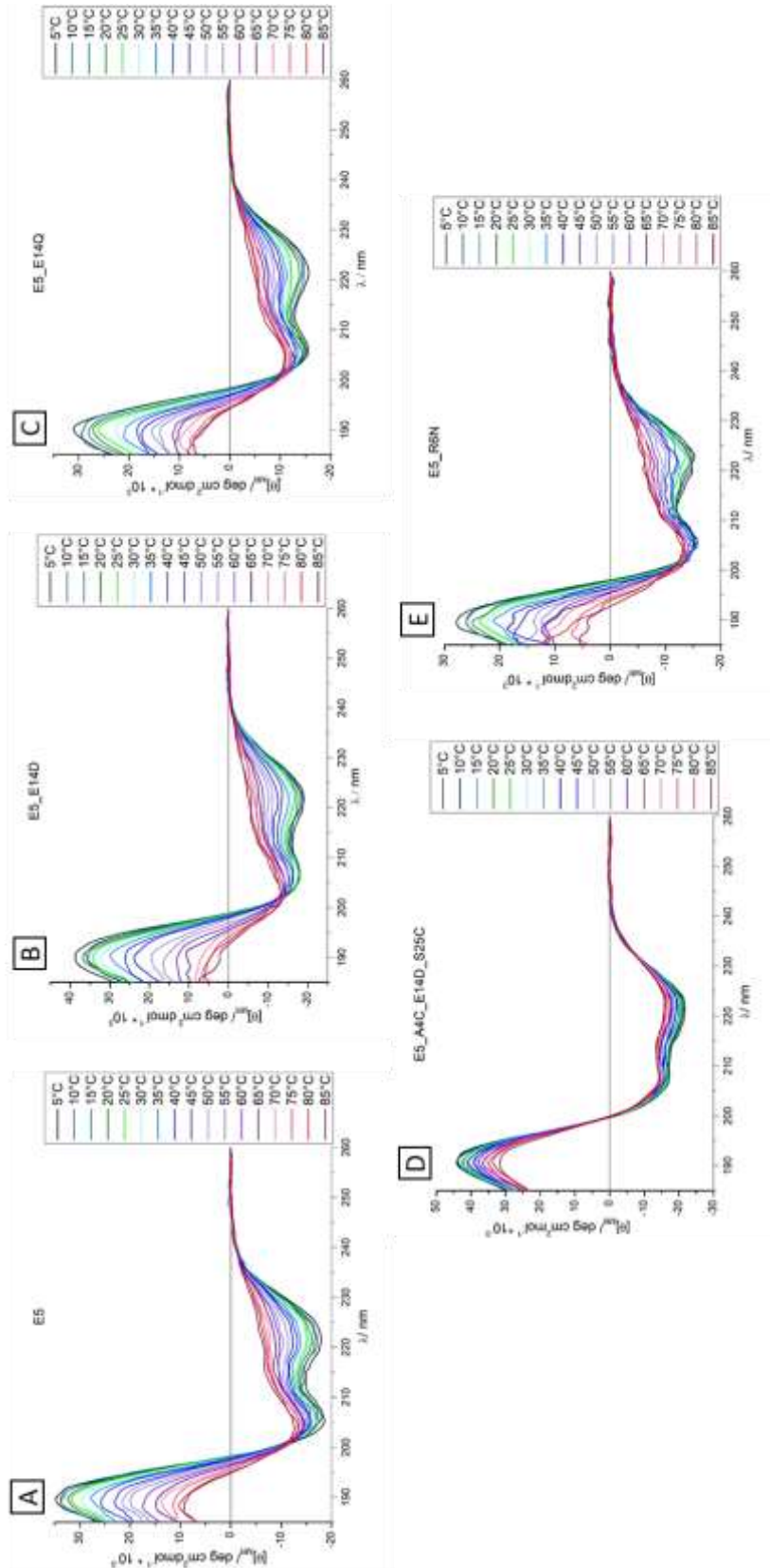
Függelékek



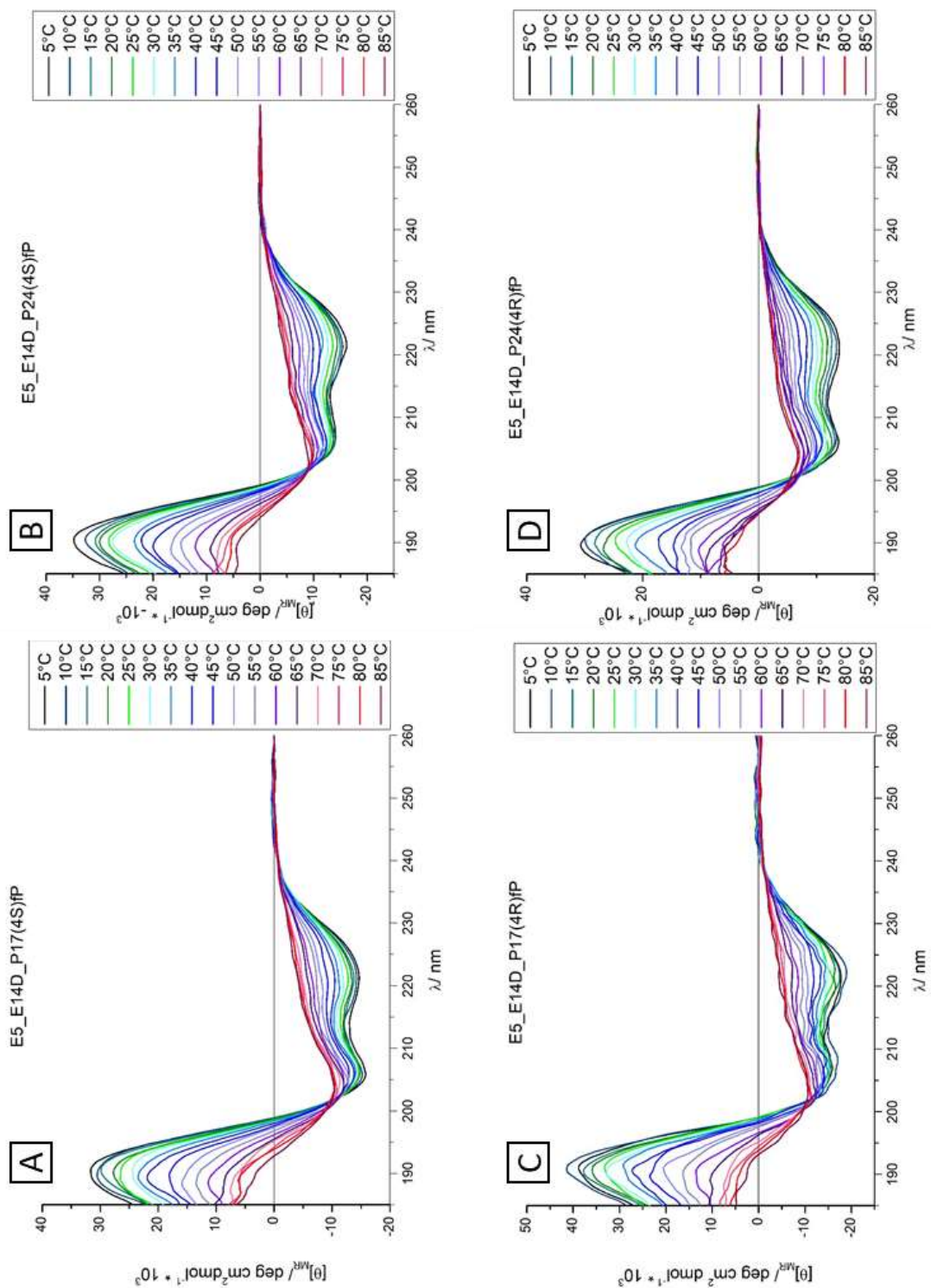
1. kiegészítő ábra. A-F) A vizsgált átlagszerkezet ϕ - ψ torziós szögparjainak az ábrázolása a Ramachandran diagramon. A sötétebb barna régiók jelölik az előnyös konformációjú területeket, a szürke a megengedett területet jelöli, míg a fehér a nem vagy épphogy megengedett régiót.



2. kiegészítő ábra. A-F) Fluor szubsztituált E5 származékok átlagszerkezet ϕ - ψ torziós szögparjainak az ábrázolása a Ramachandran diagramon. A sötétebb barna régiók jelölik az előnyös konformációjú területeket, a szürke a megengedett területet jelöli, míg a fehér a nem vagy épphogy megengedett régiót.



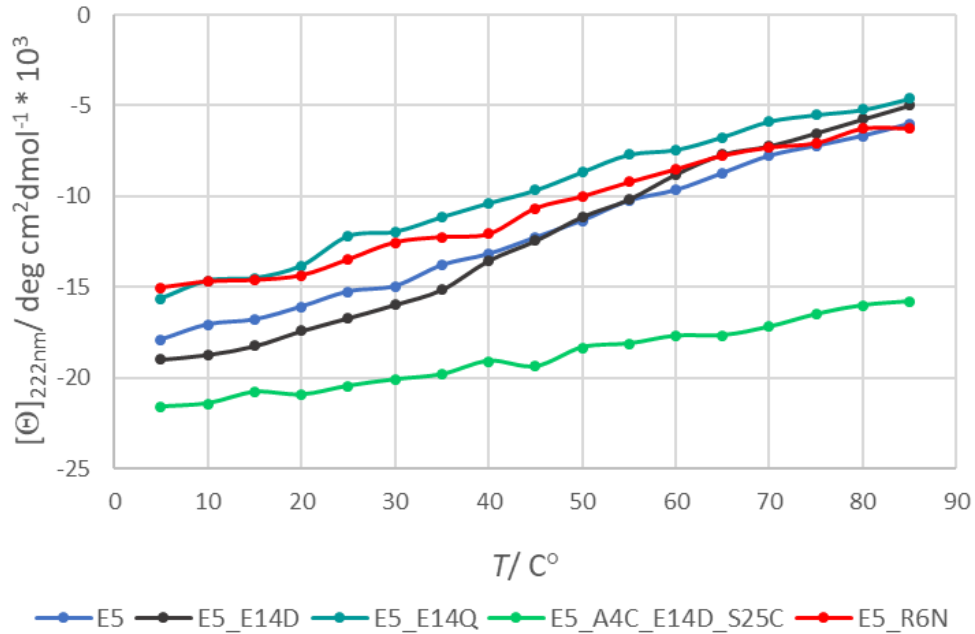
3. kiegészítő ábra. A-E) E5 variánsok hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrum-sokaságai a távoli UV-tartományban (185-260 nm) $pH = 7$ -en.



4. kiegészítő ábra. A-F) Fluor szubsztituált E5 variánsok hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrumsokaságai a távoli UV-tartományban (185-260 nm) $pH = 7$ -en.

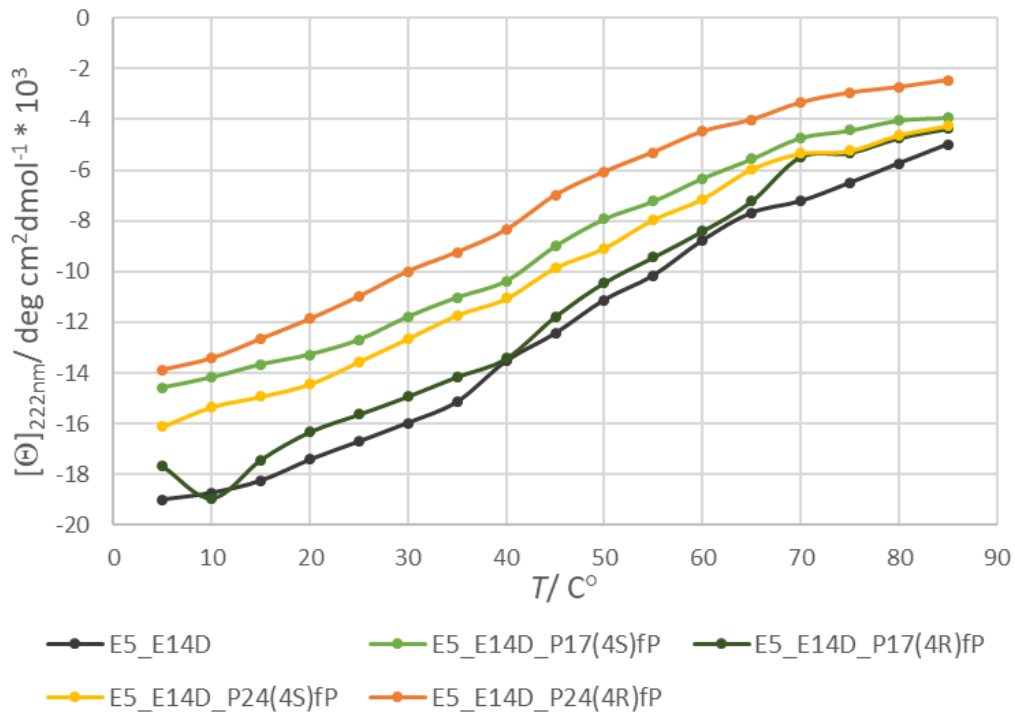
A

E5 variánsok olvadásgörbéje 222 nm-en mért ellipticitások alapján

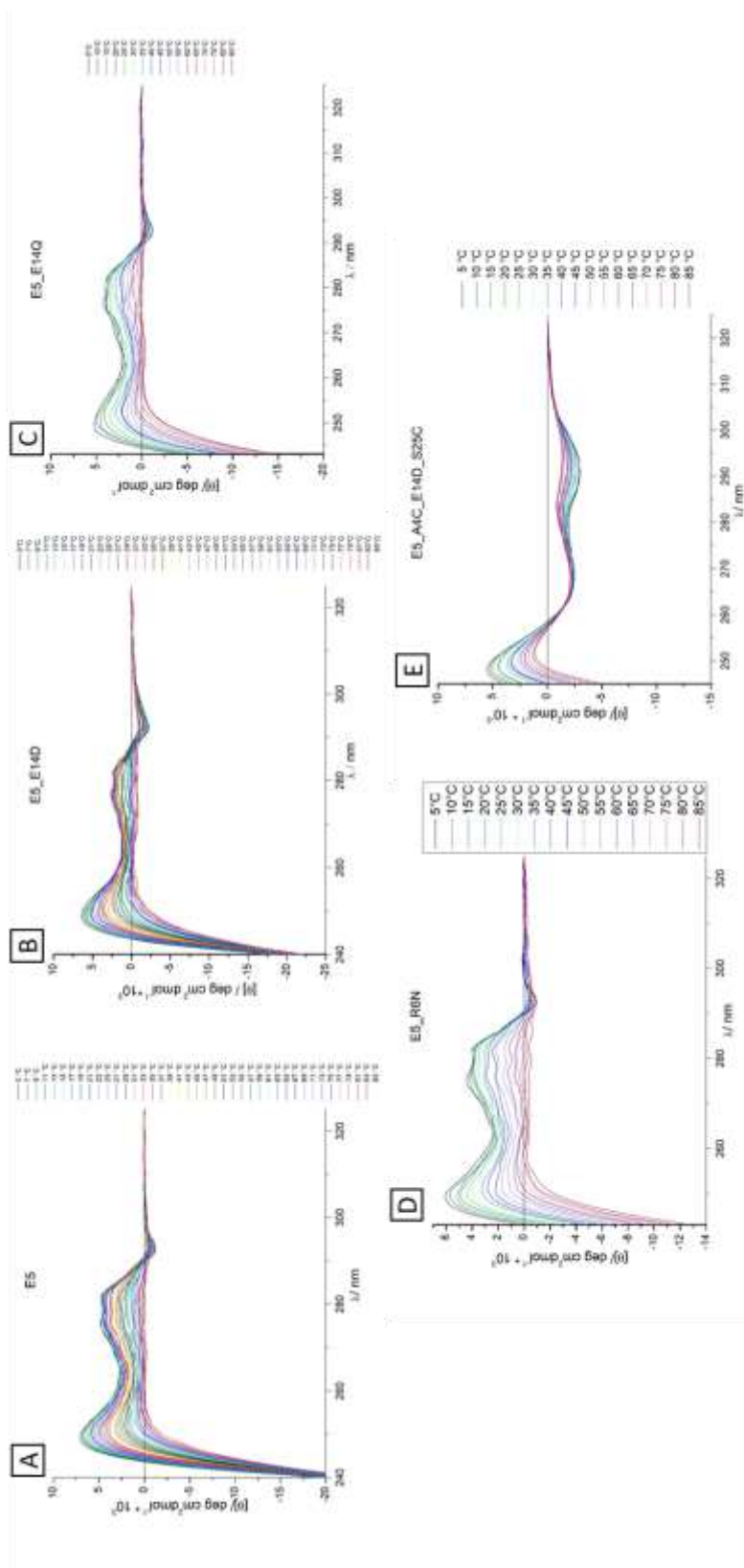


B

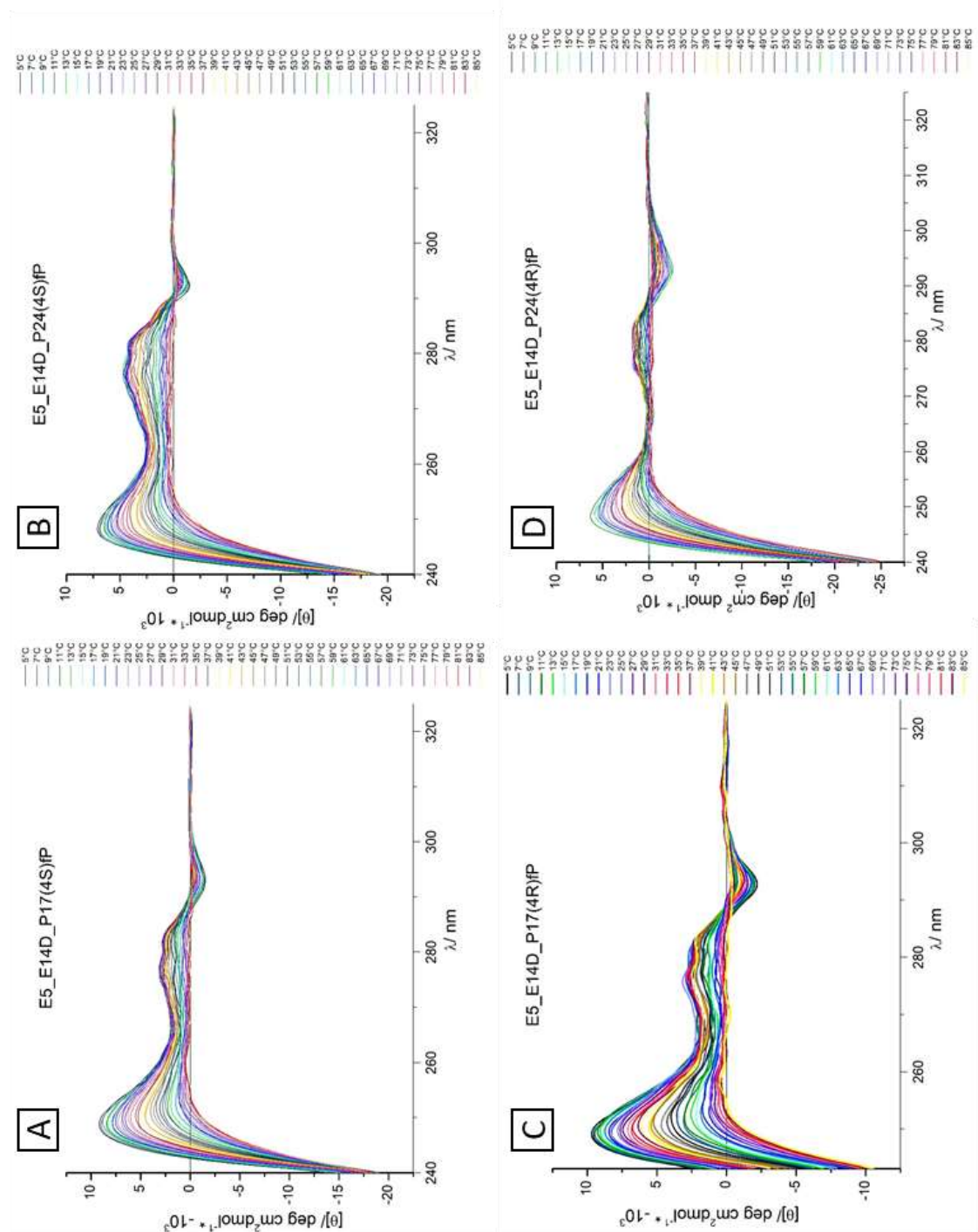
Fluor szubsztituált E5 variánsok olvadásgörbéje 222 nm-en mért ellipticitások alapján



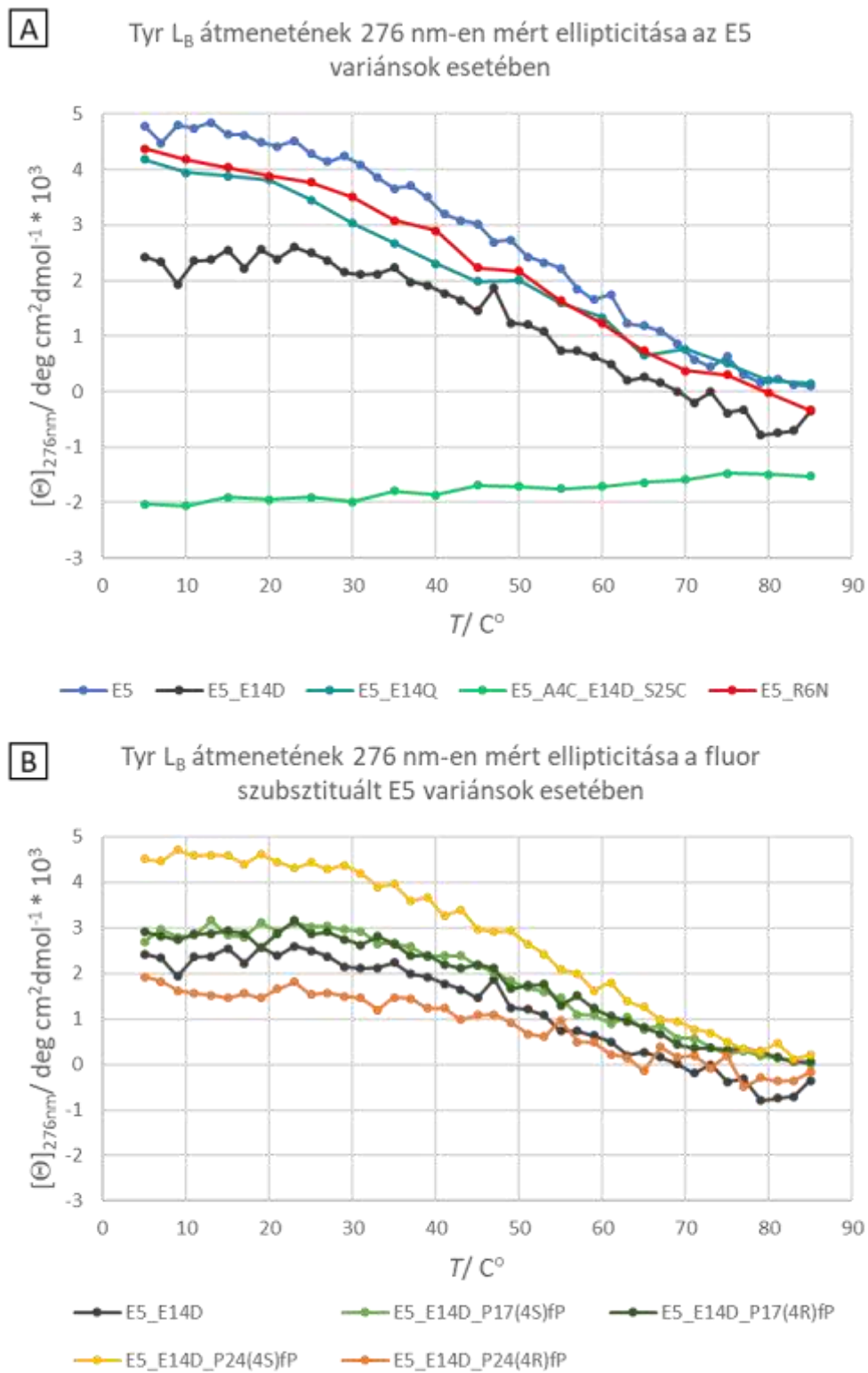
5. kiegészítő ábra. 222 nm-en mért moláris ellipticitás értékek a hőmérséklet függvényében A) az E5 variánsok, B) Fluor szubsztituált E5 variánsok esetében.



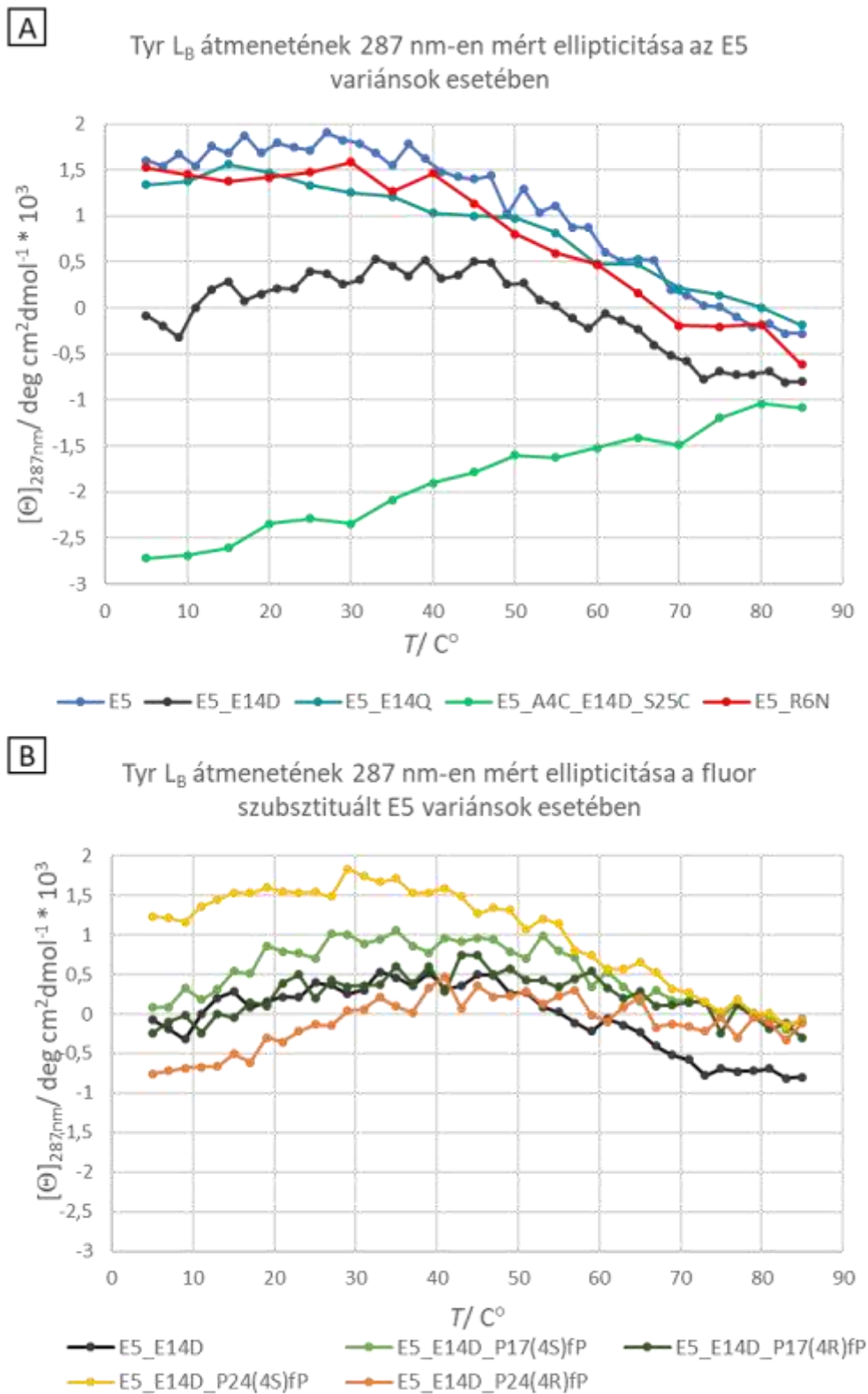
6. kiegészítő ábra. A-E) E5 variánsok hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrum-sokaságai a közeli UVtartományban (240-320 nm) $pH=7$ -en.



7. kiegészítő ábra. A-F) Fluor szubsztituált E5 variánsok hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrumsokaságai a közeli UV-tartományban (240-320 nm) $pH = 7$ -en.



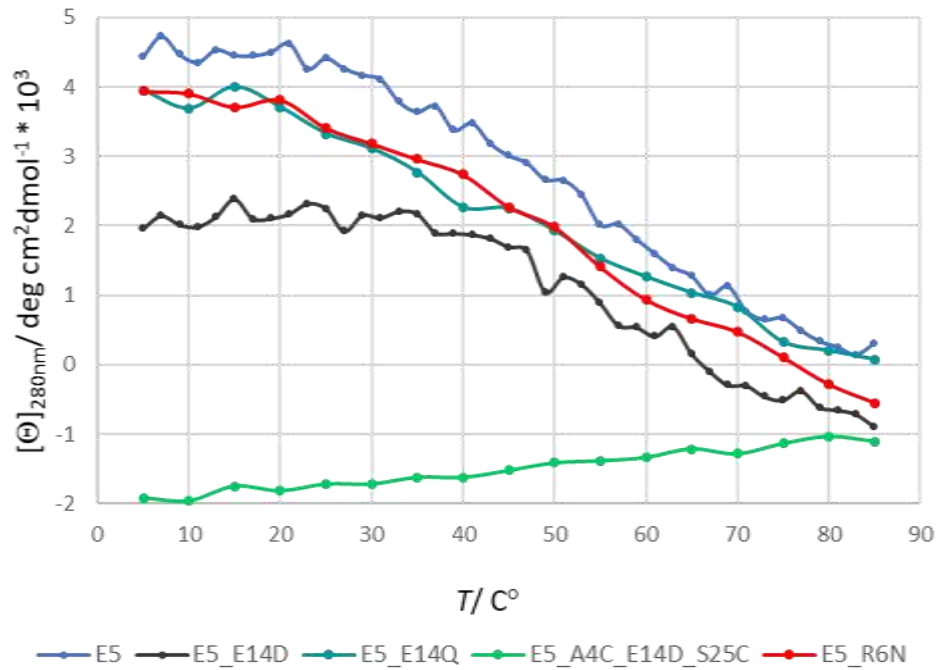
8. kiegészítő ábra. 276 nm-en mért ellipticitás értékek a hőmérséklet függvényében A) az E5 variánsok, B) Fluor szubsztituált E5 variánsok esetében.



9. kiegészítő ábra. 287 nm-en mért ellipticitás értékek a hőmérséklet függvényében A) az E5 variánsok, B) Fluor szubsztituált E5 variánsok esetében.

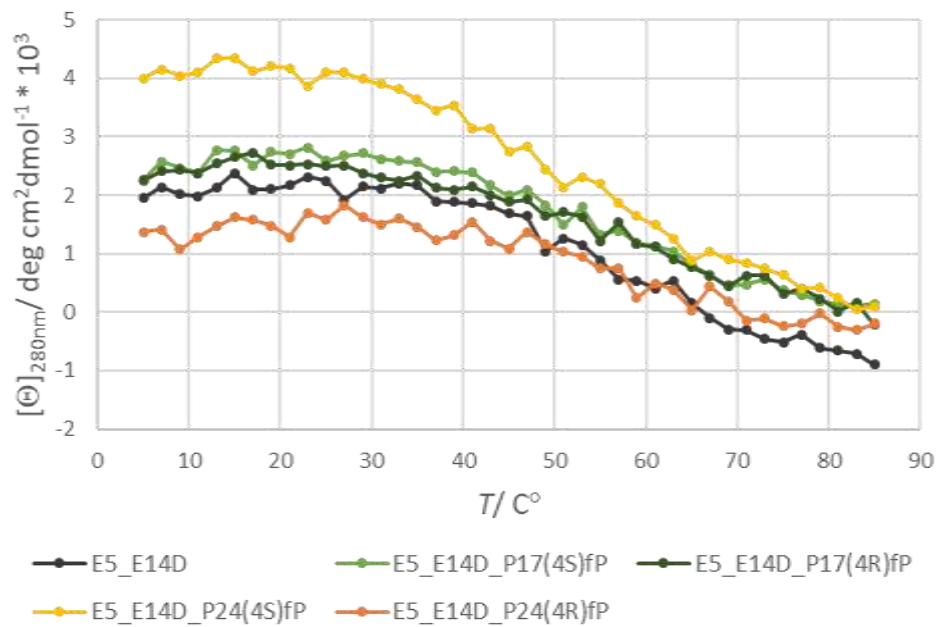
A

Trp L_B átmenetének 280 nm-en mért ellipticitása az E5 variánsok esetében

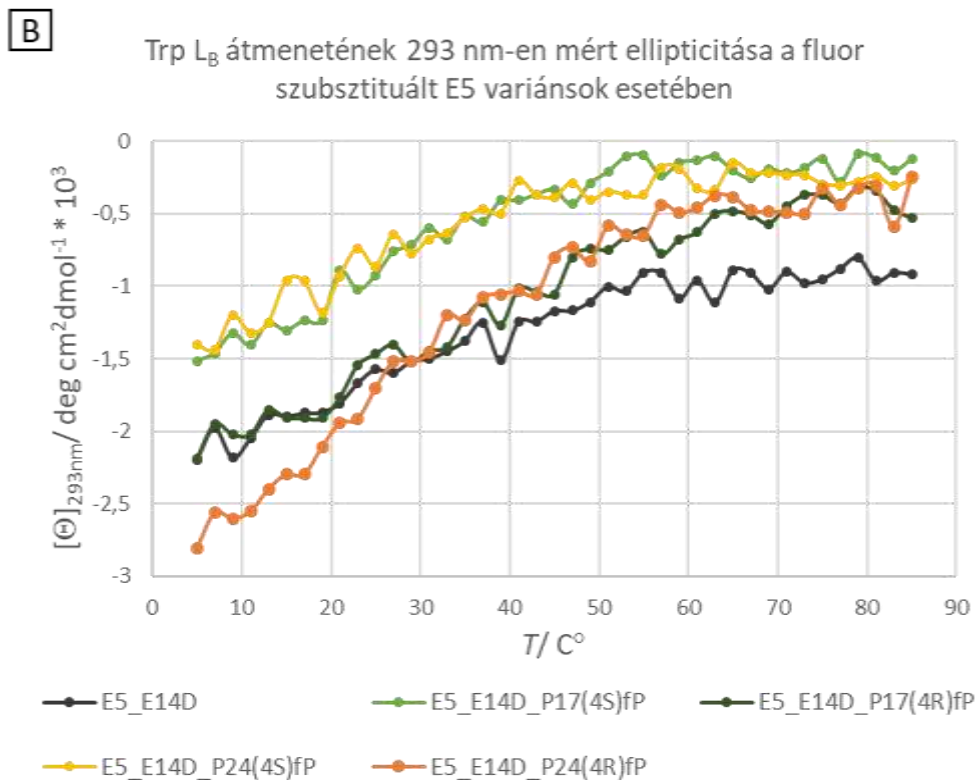
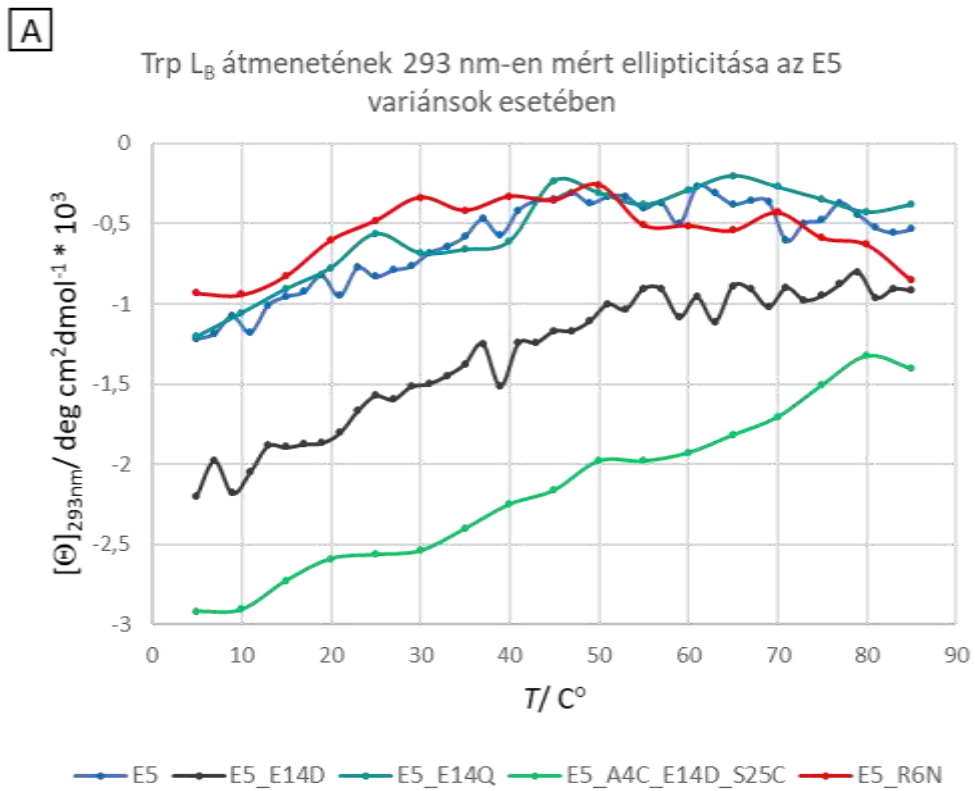


B

Trp L_B átmenetének 280 nm-en mért ellipticitása a fluor szubsztituált E5 variánsok esetében



10. kiegészítő ábra. 280 nm-en mért ellipticitás értékek a hőmérséklet függvényében A) az E5 variánsok, B) Fluor szubsztituált E5 variánsok esetében.



11. kiegészítő ábra. 293 nm-en mért ellipticitás értékek a hőmérséklet függvényében A) az E5 variánsok, B) Fluor szubsztituált E5 variánsok esetében.

Kiegészítő táblázat 1-3. A következő három oldal a következő táblázatokat tartalmazza:

1. kiegészítő táblázat: NMR és ECD-spektroszkópia által meghatározott helicitást és Tc rendezettségét jellemző mért adatok. A 222 nm-en mért ellipticitás abszolút értékei vannak a táblázatban feltüntetve. Az NMR adatok 4-15-26-37-48°C-on lettek párba állítva az ECD 5-15-25-37-48°C-on mért adataival, illetve mint végpont, a 85°C-hoz tartozó ECD adatok is szerepelnek.

2. kiegészítő táblázat: NMR és ECD-spektroszkópia által meghatározott helicitást és Tc rendezettségét jellemző adatsorozatok, amelyek az egyes fehérjék esetében az adatsorozat 4°C-on mért értékére normalva van. Emiatt egy fehérjéhez tartozó adatsorozat 4°C-os értéke 100%-ként szerepel. Az adatsorok elemzésével megállapítható, hogy a natív térszerkezetet (4°C) jellemző spektrális paraméter a denaturáció során milyen mértékben csökkent, ezzel jelezve a rendezettség elvesztését.

3. kiegészítő táblázat: NMR és ECD-spektroszkópia által meghatározott helicitást és Tc rendezettségét jellemző adatsorozatok, amelyek az egyes fehérjék esetében az E5 anyavegyület 4°C-on mért értékeire vannak normalva. Emiatt az E5 minifehérje adatsorozatának 4°C-os elemei 100%-ként szerepelnek. Az adatsorok elemzésével megállapítható, hogy az egyes E5 mutánsok az adott körülmények között mennyivel rendezettebbek ($X'' > 100\%$) vagy rendezetlenebbek ($X'' < 100\%$) mint az E5 natív térszerkezete. (vagy az arra jellemző paraméterek)

n.a. = nincs adat, keresztcsúcsok hiányában az egyes ^1H rezonanciafrekvenciák asszignálását nem lehetett végrehajtani

* = A diszulfidhidas minifehérje közeli UV-tartományú ECD spektrális tulajdonságai a diszulfidhíd hozzájárulása miatt nagymértékben eltérnek a diszulfidhidat nem tartalmazó mutánsoktól, emiatt a hőmérsékletfüggő ECD-spektrum sorozata nem lett belevéve a két komponensű felbontásba.

** = A diszulfidhidas minifehérje közeli UV-tartományú ECD spektrális tulajdonságai a diszulfidhíd hozzájárulása miatt nagymértékben eltérnek a diszulfidhidat nem tartalmazó mutánsoktól, emiatt nem célszerű az E5 értékeivel az összehasonlítás, normalálás.

1. Kiegészítő táblázat		Mért adatok (X)								
		Helicitás mérése			Triptofán kalitka jellemzése					
minifehérje		CSD _{hélix 2-13}	∣∅ _{222nm} ∣	F % FUV	CSD _{cage}	∅ _{276nm}	∅ _{287nm}	∅ _{280nm}	∅ _{293nm}	F % NUV
E5	4/5°C	3,367	17,905	76,20	9,14	4,788	1,603	4,430	-1,217	91,70
	10/11°C	3,467	16,796	73,10	8,74	4,639	1,683	4,449	-0,953	85,40
	25/26°C	3,386	15,252	67,90	8,12	4,289	1,712	4,411	-0,831	77,50
	37°C	3,148	13,494	58,15	7,13	3,712	1,783	3,724	-0,471	64,60
	48°C	2,671	11,808	48,70	5,74	2,720	1,229	2,783	-0,339	49,55
	85°C	n.a.	6,009	19,10	n.a.	0,100	-0,276	0,307	-0,536	6,60
E5_E14D	4/5°C	3,585	18,994	87,20	9,65	2,426	-0,079	1,955	-2,199	66,60
	10/11°C	3,627	18,249	82,10	9,35	2,550	0,285	2,381	-1,895	65,00
	25/26°C	3,575	16,705	76,00	8,83	2,495	0,400	2,247	-1,573	62,50
	37°C	3,350	14,340	63,10	7,90	1,980	0,351	1,896	-1,248	53,60
	48°C	2,869	11,786	49,25	6,41	1,554	0,378	1,343	-1,138	42,55
	85°C	n.a.	4,990	8,60	n.a.	-0,357	-0,801	-0,895	-0,918	3,30
E5_E14Q	4/5°C	3,191	15,643	67,20	8,23	4,183	1,336	3,952	-1,207	71,30
	10/11°C	3,185	14,513	62,20	7,70	3,887	1,558	3,999	-0,909	65,00
	25/26°C	3,064	12,202	54,80	6,95	3,456	1,334	3,328	-0,565	53,20
	37°C	2,740	10,769	43,60	6,01	2,487	1,122	2,519	-0,637	45,60
	48°C	n.a.	9,172	35,70	n.a.	1,999	0,987	2,089	-0,271	37,05
	85°C	n.a.	4,617	13,00	n.a.	0,148	-0,185	0,074	-0,382	2,60
E5_A4C_E14D_S25C	4/5°C	3,446	21,613	100,00	9,70	-2,032	-2,721	-1,914	-2,920	*
	10/11°C	3,577	20,810	97,50	9,60	-1,907	-2,608	-1,748	-2,729	*
	25/26°C	3,609	20,463	95,70	9,49	-1,909	-2,292	-1,718	-2,566	*
	37°C	3,653	19,460	92,30	9,33	-1,828	-1,995	-1,622	-2,328	*
	48°C	3,640	18,863	88,95	9,14	-1,698	-1,694	-1,468	-2,072	*
	85°C	n.a.	15,800	74,10	n.a.	-1,521	-1,085	-1,103	-1,405	*
E5_R6N	4/5°C	2,891	15,045	60,90	9,03	4,377	1,522	3,940	-0,932	84,00
	10/11°C	2,932	14,625	57,90	8,69	4,042	1,378	3,713	-0,825	79,10
	25/26°C	2,873	13,481	52,00	8,00	3,771	1,473	3,412	-0,482	71,50
	37°C	2,621	12,166	44,10	6,92	2,994	1,362	2,849	-0,375	64,05
	48°C	2,255	10,339	35,65	5,53	2,197	0,971	2,128	-0,306	46,15
	85°C	n.a.	6,260	10,90	n.a.	-0,334	-0,615	-0,549	-0,854	10,40
E5_E14D_P17(4S)FP	4/5°C	3,605	14,588	70,80	9,65	2,689	0,086	2,244	-1,513	98,60
	10/11°C	3,643	13,672	65,80	9,32	2,837	0,539	2,756	-1,302	93,70
	25/26°C	3,553	12,694	60,10	8,72	3,025	0,705	2,584	-0,924	82,90
	37°C	3,252	10,699	49,40	7,61	2,577	0,864	2,398	-0,556	68,80
	48°C	2,750	8,466	37,60	5,98	1,922	0,866	1,961	-0,361	52,05
	85°C	n.a.	3,924	8,10	n.a.	0,002	-0,059	0,143	-0,117	10,50
E5_E14_P17(4R)FP	4/5°C	3,668	17,688	85,70	9,93	2,913	-0,239	2,256	-2,190	100,00
	10/11°C	3,732	17,426	81,40	9,69	2,931	-0,046	2,656	-1,903	95,70
	25/26°C	3,654	15,637	74,60	9,24	2,852	0,194	2,496	-1,467	88,80
	37°C	3,440	13,789	62,30	8,39	2,377	0,383	2,130	-1,109	76,10
	48°C	2,943	11,111	49,15	6,77	1,878	0,534	1,790	-0,769	60,60
	85°C	n.a.	4,356	8,70	n.a.	0,061	-0,303	-0,220	-0,527	13,10
E5_E14D_P24(4S)FP	4/5°C	3,433	16,109	76,50	9,48	4,507	1,237	3,997	-1,405	92,10
	10/11°C	3,531	14,924	69,20	9,21	4,578	1,538	4,350	-0,964	88,20
	25/26°C	3,451	13,551	63,20	8,71	4,435	1,546	4,113	-0,863	79,90
	37°C	3,230	11,387	51,05	7,80	3,586	1,528	3,453	-0,469	65,60
	48°C	n.a.	9,459	40,85	n.a.	2,922	1,329	2,639	-0,347	52,00
	85°C	n.a.	4,249	10,30	n.a.	0,213	-0,084	0,099	-0,263	8,20
E5_E14D_P24(4R)FP	4/5°C	3,480	13,876	66,80	9,21	1,923	-0,753	1,370	-2,810	68,90
	10/11°C	3,500	12,657	61,70	8,75	1,457	-0,502	1,625	-2,297	64,40
	25/26°C	3,345	10,988	53,70	7,93	1,536	-0,133	1,574	-1,707	58,00
	37°C	n.a.	8,798	41,40	n.a.	1,449	0,019	1,231	-1,075	46,00
	48°C	n.a.	6,535	30,80	n.a.	1,003	0,223	1,271	-0,779	33,20
	85°C	n.a.	2,461	10,00	n.a.	-0,171	-0,113	-0,194	-0,242	0,00

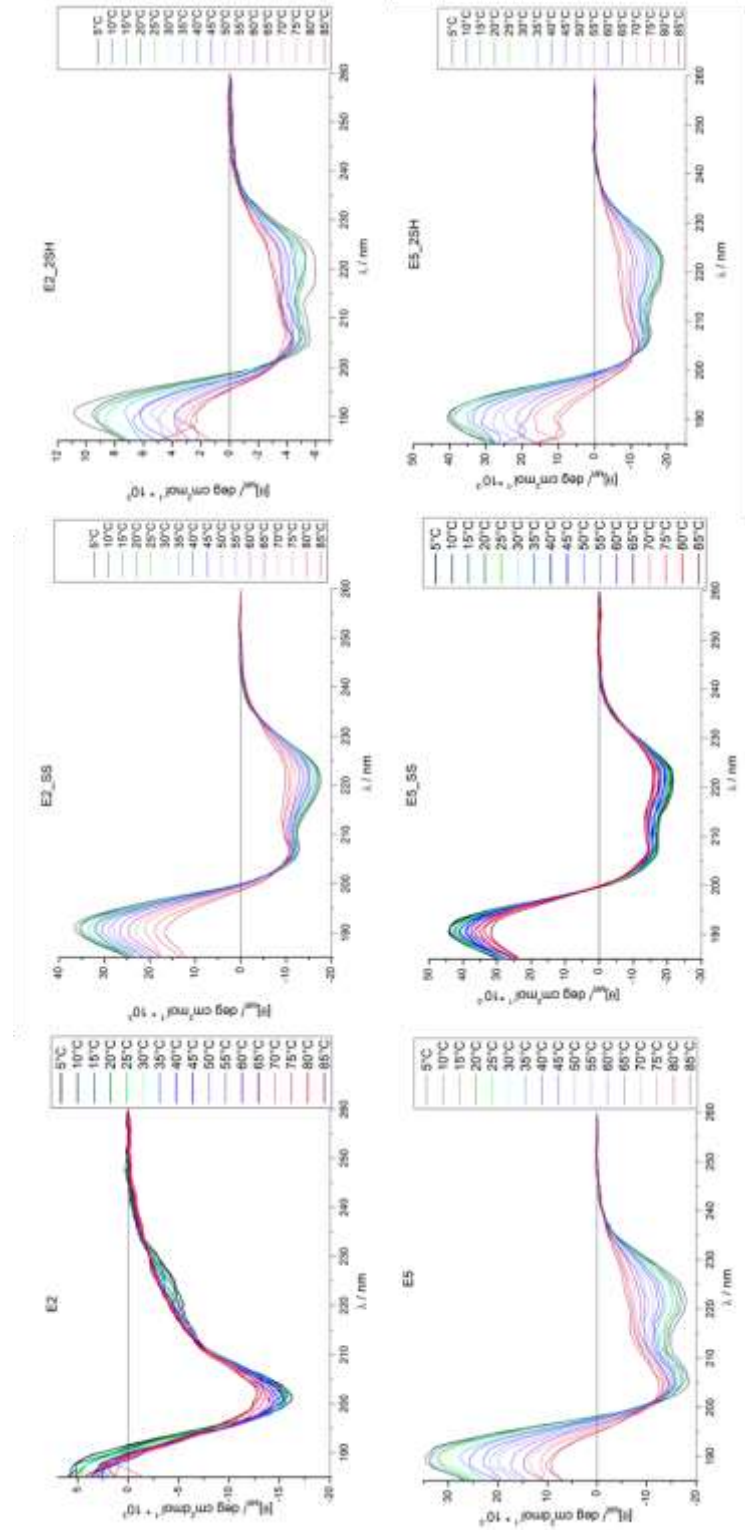
2. Kiegészítő táblázat		Mért adatok a 4°C-os értékre normálva (X')								
		Helicitás mérése			Triptofán kalitka jellemzése					
minifehérje		CSD _{hélix 2-13} '	Θ_{222nm} '	F % _{FUV} '	CSD _{cage} '	Θ_{276nm} '	Θ_{287nm} '	Θ_{280nm} '	Θ_{293nm} '	F % _{NUV} '
E5	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	102,97	93,81	95,93	95,62	96,89	105,03	100,43	78,35	93,13
	25/26°C	100,56	85,18	89,11	88,84	89,57	106,81	99,58	68,31	84,51
	37°C	93,50	75,36	76,31	78,01	77,52	111,27	84,05	38,74	70,45
	48°C	79,33	65,95	63,91	62,80	56,80	76,70	62,81	27,84	54,03
	85°C	n.a.	33,56	25,07	n.a.	2,09	-17,22	6,93	44,04	7,20
E5_E14D	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	101,17	96,08	94,15	96,87	105,11	-361,91	121,80	86,17	97,60
	25/26°C	99,72	87,95	87,16	91,48	102,86	-506,66	114,95	71,56	93,84
	37°C	93,44	75,50	72,36	81,86	81,63	-444,92	96,99	56,76	80,48
	48°C	80,03	62,05	56,48	66,40	64,06	-479,86	68,72	51,73	63,89
	85°C	n.a.	26,27	9,86	n.a.	-14,73	1016,26	-45,81	41,73	4,95
E5_E14Q	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	99,81	92,77	92,56	93,62	92,93	116,62	101,18	75,28	91,16
	25/26°C	96,02	78,00	81,55	84,48	82,62	99,84	84,20	46,77	74,61
	37°C	85,87	68,84	64,88	73,00	59,45	83,96	63,73	52,81	63,96
	48°C	n.a.	58,63	53,13	n.a.	47,79	73,85	52,85	22,43	51,96
	85°C	n.a.	29,52	19,35	n.a.	3,53	-13,88	1,87	31,63	3,65
E5_A4C_E14D_S25C	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	*
	10/11°C	103,80	96,28	97,50	99,00	93,85	95,84	91,31	93,44	*
	25/26°C	104,73	94,68	95,70	97,82	93,92	84,22	89,75	87,86	*
	37°C	106,01	90,04	92,30	96,19	89,93	73,31	84,71	79,72	*
	48°C	105,63	87,28	88,95	94,23	83,55	62,26	76,68	70,96	*
	85°C	n.a.	73,11	74,10	n.a.	74,85	39,88	57,60	48,10	*
E5_R6N	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	101,42	97,21	95,07	96,24	92,35	90,52	94,25	88,50	94,17
	25/26°C	99,38	89,61	85,39	88,53	86,16	96,74	86,60	51,77	85,12
	37°C	90,66	80,86	72,41	76,61	68,41	89,46	72,30	40,21	76,25
	48°C	78,00	68,72	58,54	61,18	50,21	63,78	54,02	32,88	54,94
	85°C	n.a.	41,61	17,90	n.a.	-7,62	-40,38	-13,94	91,62	12,38
E5_E14D_P17(4S)fp	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	101,05	93,73	92,94	96,52	105,48	628,75	122,79	86,03	95,03
	25/26°C	98,56	87,02	84,89	90,31	112,49	822,51	115,12	61,04	84,08
	37°C	90,21	73,34	69,77	78,87	95,81	1007,70	106,85	36,77	69,78
	48°C	76,28	58,04	53,11	61,94	71,45	1009,79	87,37	23,87	52,79
	85°C	n.a.	26,90	11,44	n.a.	0,06	-68,59	6,37	7,72	10,65
E5_E14_P17(4R)fp	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	101,74	98,52	94,98	97,61	100,62	19,19	117,77	86,89	95,70
	25/26°C	99,62	88,40	87,05	93,05	97,93	-81,45	110,66	67,02	88,80
	37°C	93,78	77,96	72,70	84,47	81,59	-160,56	94,46	50,64	76,10
	48°C	80,23	62,82	57,35	68,22	64,48	-223,87	79,34	35,12	60,60
	85°C	n.a.	24,63	10,15	n.a.	2,10	127,06	-9,77	24,09	13,10
E5_E14D_P24(4S)fp	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	102,85	92,65	90,46	97,17	101,57	124,25	108,85	68,62	95,77
	25/26°C	100,52	84,12	82,61	91,85	98,40	124,90	102,91	61,38	86,75
	37°C	94,09	70,69	66,73	82,31	79,56	123,47	86,40	33,34	71,23
	48°C	n.a.	58,72	53,40	n.a.	64,84	107,40	66,04	24,71	56,46
	85°C	n.a.	26,38	13,46	n.a.	4,73	-6,79	2,47	18,73	8,90
E5_E14D_P24(4R)fp	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	100,57	91,22	92,37	95,00	75,77	66,73	118,61	81,73	93,47
	25/26°C	96,12	79,19	80,39	86,02	79,88	17,73	114,89	60,73	84,18
	37°C	n.a.	63,41	61,98	n.a.	75,36	-2,55	89,82	38,25	66,76
	48°C	n.a.	47,10	46,11	n.a.	52,18	-29,67	92,74	27,71	48,19
	85°C	n.a.	17,74	14,97	n.a.	-8,87	15,05	-14,16	8,63	0,00

3. Kiegészítő táblázat		Mért adatok a 4°C-os E5 értékeire normálva (X'')								
		Helicitás mérés			Triptofán kalitka jellemzése					
minifehérje		CSD _{hélix 2-13} ''	Θ_{222nm} ''	F % _{FUV} ''	CSD _{cage} ''	Θ_{276nm} ''	Θ_{287nm} ''	Θ_{280nm} ''	Θ_{293nm} ''	F % _{NUV} ''
E5	4/5°C	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	10/11°C	102,97	93,81	95,93	95,62	96,89	105,03	100,43	78,35	93,13
	25/26°C	100,56	85,18	89,11	88,84	89,57	106,81	99,58	68,31	84,51
	37°C	93,50	75,36	76,31	78,01	77,52	111,27	84,05	38,74	70,45
	48°C	79,33	65,95	63,91	62,80	56,80	76,70	62,81	27,84	54,03
	85°C	n.a.	33,56	25,07	n.a.	2,09	-17,22	6,93	44,04	7,20
E5_E14D	4/5°C	106,47	106,08	114,44	105,56	50,67	-4,92	44,12	180,70	72,63
	10/11°C	107,72	101,92	107,74	102,25	53,26	17,81	53,74	155,71	70,88
	25/26°C	106,18	93,30	99,74	96,56	52,11	24,93	50,72	129,31	68,16
	37°C	99,50	80,09	82,81	86,41	41,36	21,89	42,79	102,57	58,45
	48°C	85,21	65,82	64,63	70,09	32,45	23,61	30,32	93,48	46,40
	85°C	n.a.	27,87	11,29	n.a.	-7,46	-50,01	-20,21	75,41	3,60
E5_E14Q	4/5°C	94,77	87,37	88,19	90,01	87,35	83,39	89,21	99,19	77,75
	10/11°C	94,59	81,05	81,63	84,27	81,18	97,25	90,26	74,67	70,88
	25/26°C	91,00	68,15	71,92	76,04	72,17	83,26	75,12	46,39	58,02
	37°C	81,38	60,14	57,22	65,71	51,94	70,01	56,86	52,38	49,73
	48°C	n.a.	51,23	46,85	n.a.	41,75	61,58	47,15	22,25	40,40
	85°C	n.a.	25,79	17,06	n.a.	3,08	-11,57	1,67	31,37	2,84
E5_A4C_E14D_S25C	4/5°C	102,35	120,71	131,23	106,09	**	**	**	**	*
	10/11°C	106,24	116,22	127,95	105,03	**	**	**	**	*
	25/26°C	107,19	114,29	125,59	103,79	**	**	**	**	*
	37°C	108,49	108,68	121,13	102,06	**	**	**	**	*
	48°C	108,11	105,35	116,73	99,97	**	**	**	**	*
	85°C	n.a.	88,24	97,24	n.a.	**	**	**	**	*
E5_R6N	4/5°C	85,86	84,03	79,92	98,82	91,40	95,00	88,94	76,57	91,60
	10/11°C	87,08	81,68	75,98	95,10	84,41	86,00	83,82	67,76	86,26
	25/26°C	85,33	75,29	68,24	87,48	78,75	91,90	77,02	39,64	77,97
	37°C	77,84	67,95	57,87	75,70	62,53	84,99	64,30	30,79	69,85
	48°C	66,97	57,74	46,78	60,46	45,89	60,59	48,04	25,17	50,33
	85°C	n.a.	34,96	14,30	n.a.	-6,97	-38,36	-12,40	70,15	11,34
E5_E14D_P17(4S)fp	4/5°C	107,07	81,47	92,91	105,62	56,16	5,35	50,66	124,33	107,52
	10/11°C	108,20	76,36	86,35	101,95	59,24	33,64	62,21	106,97	102,18
	25/26°C	105,52	70,89	78,87	95,39	63,18	44,01	58,32	75,90	90,40
	37°C	96,58	59,76	64,83	83,30	53,81	53,92	54,13	45,72	75,03
	48°C	81,68	47,28	49,34	65,43	40,13	54,03	44,26	29,68	56,76
	85°C	n.a.	21,91	10,63	n.a.	0,04	-3,67	3,23	9,60	11,45
E5_E14_P17(4R)fp	4/5°C	108,94	98,79	112,47	108,64	60,83	-14,89	50,91	179,94	109,05
	10/11°C	110,84	97,33	106,82	106,05	61,21	-2,86	59,96	156,35	104,36
	25/26°C	108,52	87,33	97,90	101,09	59,57	12,12	56,34	120,59	96,84
	37°C	102,17	77,01	81,76	91,77	49,64	23,90	48,09	91,11	82,99
	48°C	87,41	62,06	64,50	74,11	39,23	33,33	40,40	63,19	66,09
	85°C	n.a.	24,33	11,42	n.a.	1,28	-18,92	-4,97	43,34	14,29
E5_E14D_P24(4S)fp	4/5°C	101,96	89,97	100,39	103,73	94,13	77,22	90,22	115,50	100,44
	10/11°C	104,87	83,35	90,81	100,80	95,60	95,95	98,20	79,26	96,18
	25/26°C	102,49	75,68	82,94	95,27	92,62	96,44	92,85	70,89	87,13
	37°C	95,93	63,60	66,99	85,38	74,89	95,34	77,95	38,50	71,54
	48°C	n.a.	52,83	53,61	n.a.	61,03	82,93	59,57	28,53	56,71
	85°C	n.a.	23,73	13,52	n.a.	4,45	-5,24	2,23	21,64	8,94
E5_E14D_P24(4R)fp	4/5°C	103,36	77,50	87,66	100,80	40,16	-46,97	30,92	230,93	75,14
	10/11°C	103,95	70,69	80,97	95,75	30,43	-31,35	36,68	188,73	70,23
	25/26°C	99,35	61,37	70,47	86,71	32,08	-8,33	35,53	140,25	63,25
	37°C	n.a.	49,14	54,33	n.a.	30,27	1,20	27,78	88,34	50,16
	48°C	n.a.	36,50	40,42	n.a.	20,96	13,94	28,68	64,00	36,21
	85°C	n.a.	13,75	13,12	n.a.	-3,56	-7,07	-4,38	19,92	0,00

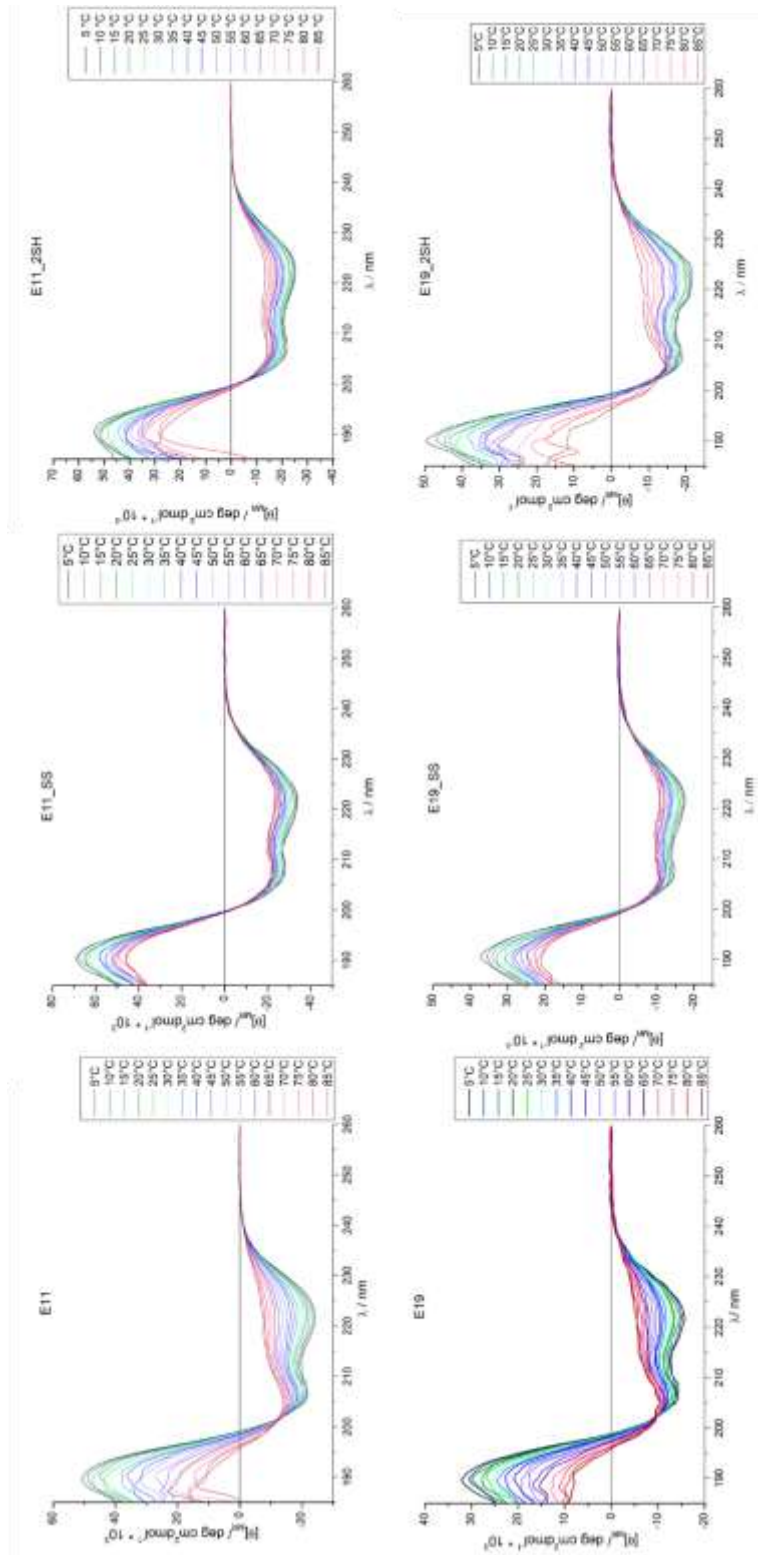
minifehérje	Triptofán kalitka 8Tyr-11Trp térállásának jellemzése				
	T/°C	távolság <i>d</i> (Å)	azimutális szög φ (°)	dőlésszög ϑ (°)	síkok által bezárt szög α (°)
E5	5	5,9±0,4	311,3±41,7	20,3±10	18,1±11,2
	15	5,4±0,4	313,3±5,1	18,9±9,9	43,2±20,1
	25	5,9±0,4	312,8±57,7	17±12,8	24,5±9,2
	37	5,3±0,6	316,1±8,6	28,2±6,4	33,9±8,5
	48	6,6±1,5	253,9±103,9	23,3±24,5	54,1±20,1
E5_E14D	5	5,6±0,1	327,8±0,9	23,2±1,9	24,7±1,8
	15	6±0,1	323,2±0,6	15,3±1,4	21,6±3,7
	25	5,3±0,1	313,7±1	38,3±3,6	78,7±3,9
	37	6,1±0,1	316,1±1,4	14,1±2,2	16,6±8
	48	6,1±0,2	323,2±1,7	13,6±6,6	44,3±7,3
E5_E14Q	5	5,5±0,4	315,6±41,3	35,2±6,4	45,5±18,3
	15	5,6±0,2	323±2,1	22,2±4,9	37,8±15,3
	25	5,8±0,1	322,9±2,4	17,7±1,9	30,2±3,5
E5_A4C_E14D_S25C	5	5,6±0,1	316,5±1,1	23±2,3	25,5±1,6
	15	5,7±0,1	322,3±1,3	16±1,7	43,1±1,8
	25	5,9±0,1	321,8±4,8	20,5±2,6	32,8±3,4
	37	5,6±0,2	320,2±1,3	16,3±3,8	42,9±4,3
	48	6±0,1	321±1,8	15,6±1,2	38,6±1,5
E5_R6N	5	5,8±0,1	326,3±1,3	27±0,7	21,9±1,2
	15	5,7±0,4	319,3±4,5	29±6,6	41,9±21,6
	25	6,2±0,4	319,1±4,3	21,4±9,6	61,1±21,6
	37	5,5±0,3	313,8±2,2	23,5±4,7	50,2±7
	48	6,5±0,9	183,6±152,9	19,5±28,5	60,5±24,6
E5_E14D_P17(4S)fp	5	4,7±0,1	318,4±1,3	34,7±3,1	71,8±1,9
	15	6,4±0	322,1±1,1	15,1±0,6	16,6±2
	25	5,8±0	314,7±1,1	16,2±1,6	14,9±9,9
	37	5,8±0,1	316,7±1,3	13,2±2,7	34,6±6
	48	6±0,3	297±8,5	-7,1±7,7	73±18,9
E5_E14D_P17(4R)fp	5	5,9±0,1	323±0,8	22,5±1,9	17,5±2,3
	15	6,5±0,1	318±1,3	9,4±2,8	23,5±6
	25	5,8±0,1	308±1,3	30±1	74,2±4,4
	37	6,7±0,3	309,2±3	19,1±2	71,4±4,5
	48	6,1±0,3	309,9±3,8	18,1±5,4	60,2±18,7
E5_E14D_P24(4S)fp	5	5,5±0,1	318,9±0,6	11,7±2,5	49±4,5
	15	6,2±0,1	323,7±1,2	8,1±2,3	32,4±2,7
	25	6,4±0,2	317,6±2,5	5,8±2,1	37,5±8,5
	37	6,1±0,1	317,3±2,5	8,8±2,3	37,1±3,2
E5_E14D_P24(4R)fp	5	5,7±0,3	313,9±3,2	34,1±3,2	67,7±12,5
	15	6,2±0,1	316,8±1,4	23,2±1,9	52,3±6,8
	25	5,9±0,1	317,2±1,1	-10,7±5,2	61,5±4,5

4. kiegészítő táblázat.

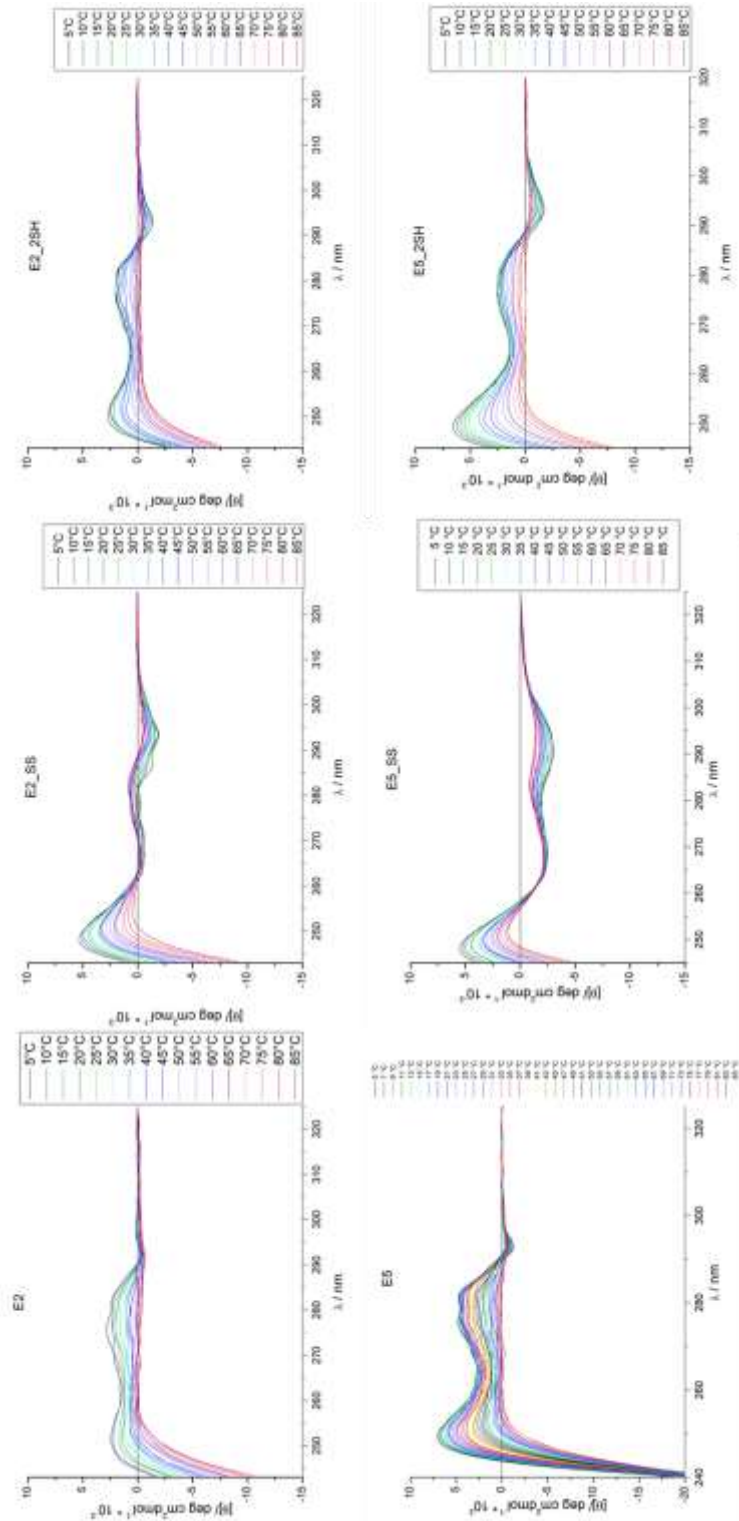
A hidrofób triptofán-kalitkát alkotó Tyr8-Trp11 aromás oldal-láncainak egymáshoz viszonyított térállását leíró paraméterek. Az egyes átlagértékek és szórások a 10/50 tagú szerkezetsokaságok alapján (14-18. ábra) lettek meghatározva.



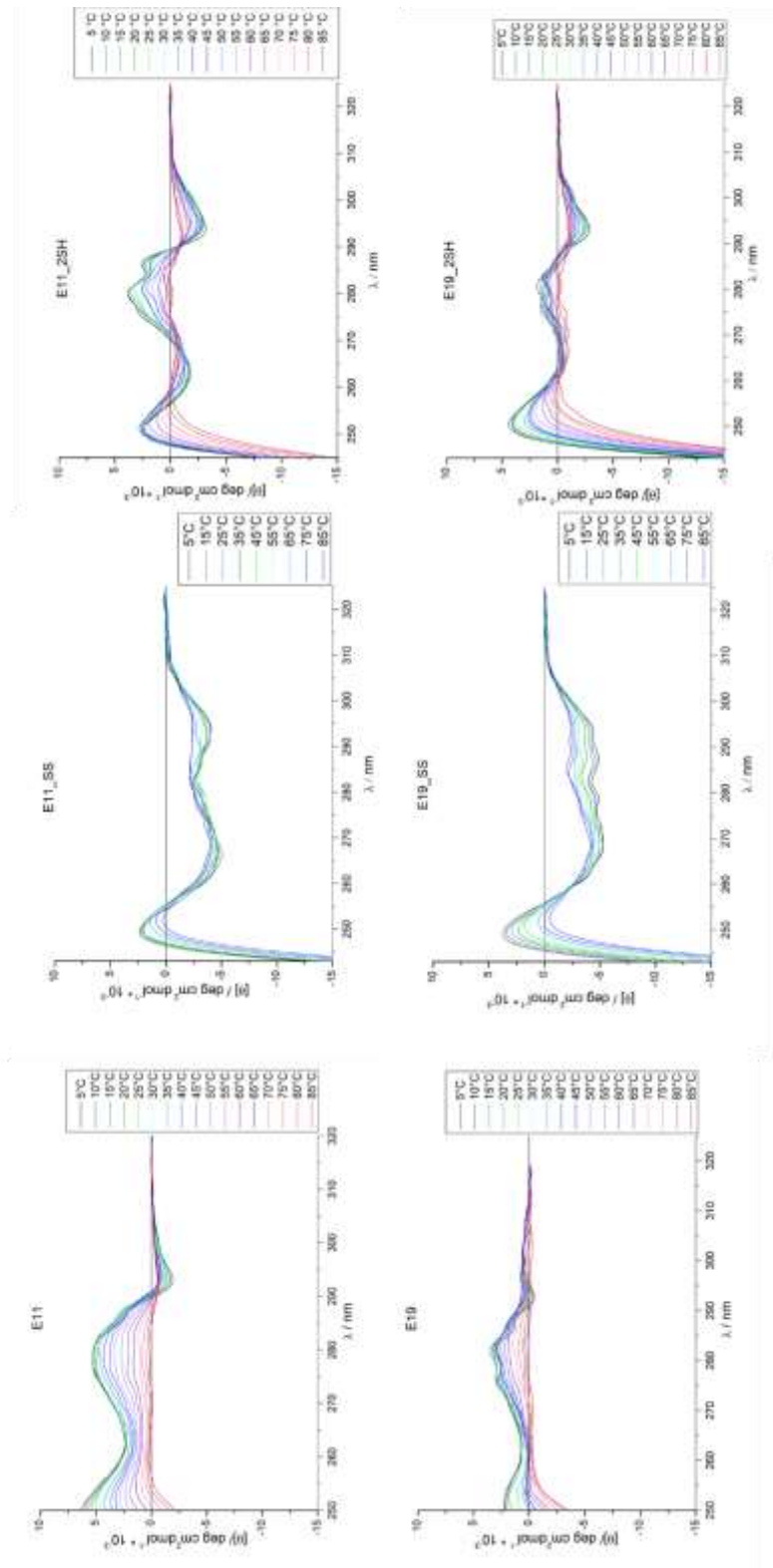
12. kiegészítő ábra. E2/E5 variánsok (SS/2SH) hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrumsokaságai a távoli UV-tartományban (185-260 nm) $pH = 7$ -en.



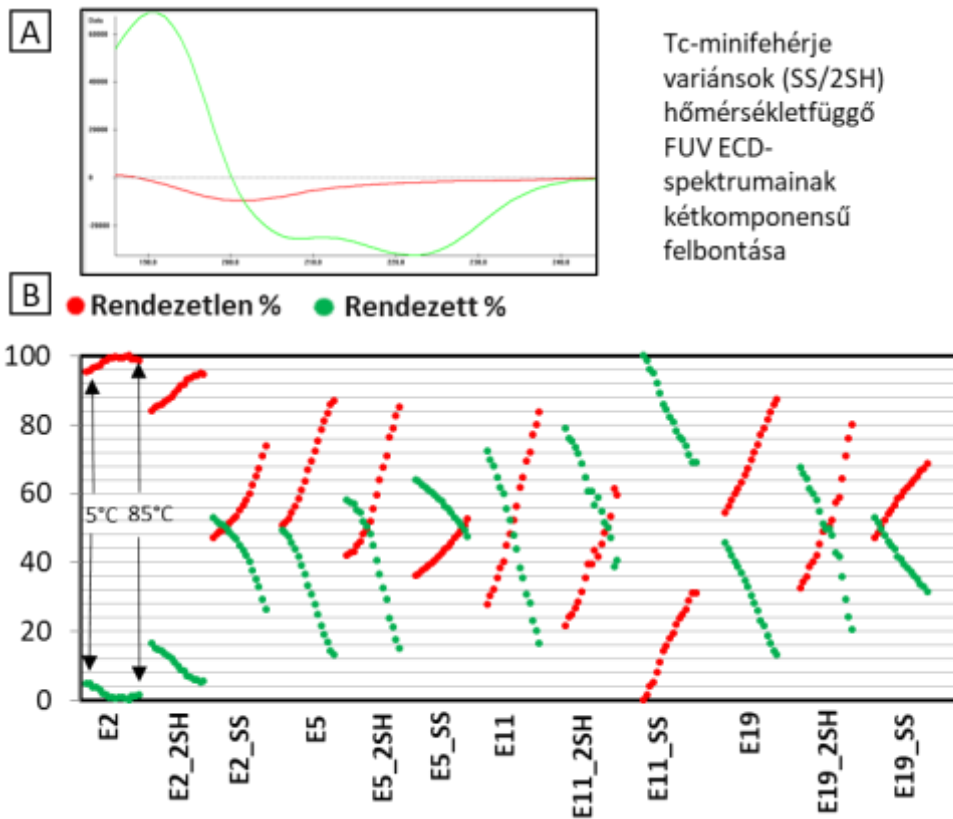
13. kiegészítő ábra. E11/E19 variánsok (SS/2SH) hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrumsokaságai a távoli UV-tartományban (185-260 nm) $pH = 7$ -en.



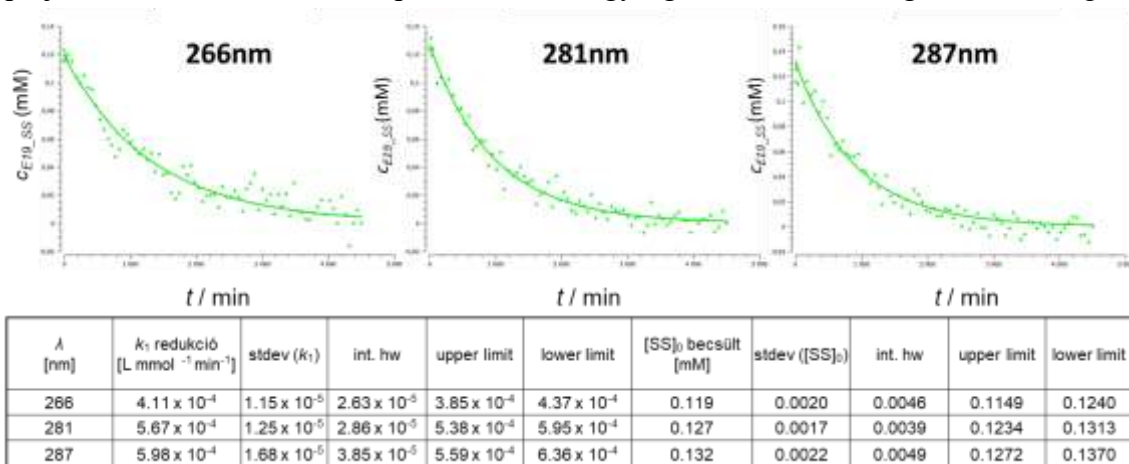
14. kiegészítő ábra. E2/E5 variánsok (SS/2SH) hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrumsokaságai a közeli UV tartományban (240-320 nm) $pH = 7$ -en.



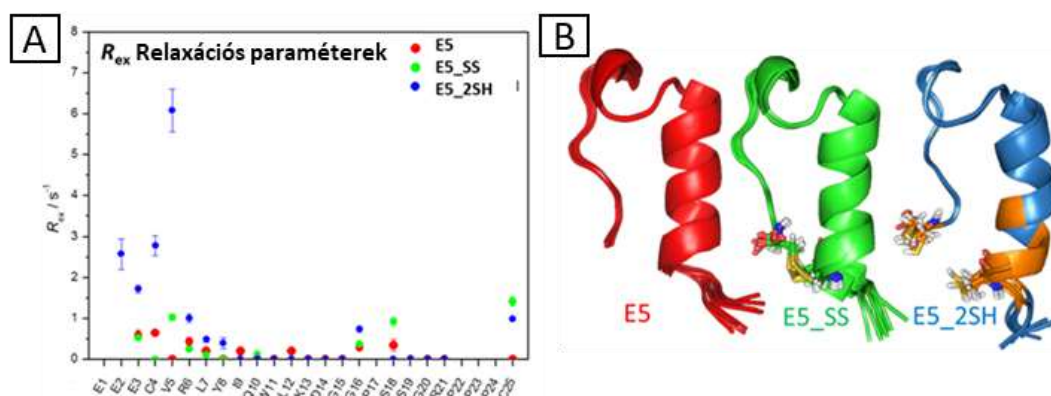
15. kiegészítő ábra. E11/E19 variánsok (SS/2SH) hőmérsékletfüggő (5-85°C) ECD-spektrumsokaságai a közeli-UV tartományban (240-320 nm) $pH = 7$ -en.



16. kiegészítő ábra. A) A dekonvolúciós folyamat során a rendezett és rendezetlen térszerkezethez meghatározott FUV ECD-bázisgörbék. B) Az egyes komponensek aránya a hőmérséklet függvényében. Egyes miniféherjék (sima/_SS/_2SH) első pont párijai az 5°C-hoz tartoznak, a pontok 5°C-os egységeként változnak egészen 85°C-ig.

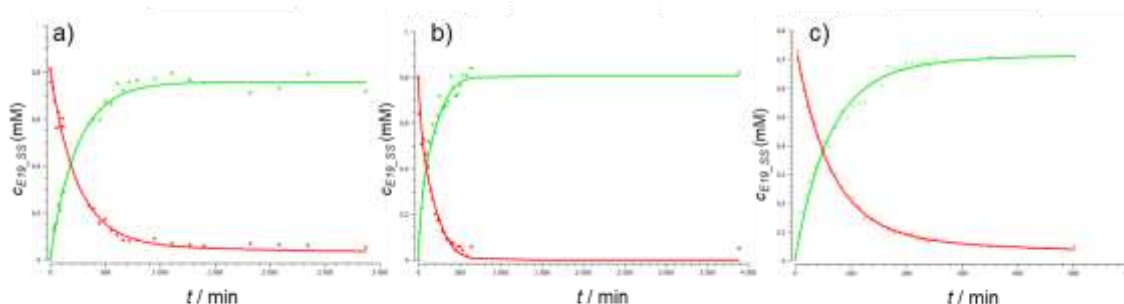


17. kiegészítő ábra. Az ellipticitás értékekből kalkulált oxidált fehérje koncentrációk három hullámhosszon az idő függvényében. A paraméter illesztéssel meghatározott redukción kinetikai görbék és statisztikai jellemzésük. Stdev = minta szórása, int. hw = 95%-os konfidencia intervallum fél érték szélessége és felső (upper limit) és alsó (lower limit) határértéke.



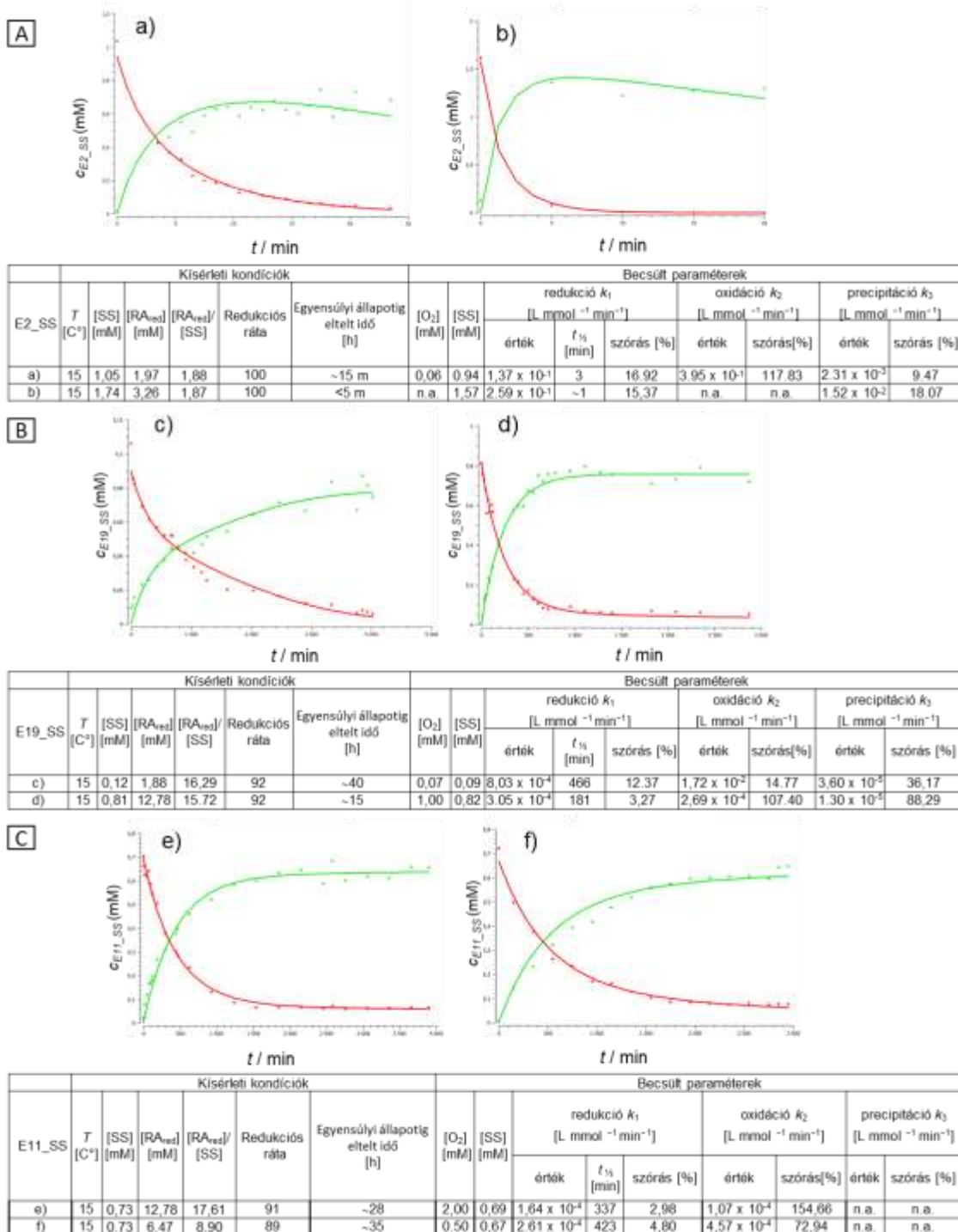
18. kiegészítő ábra. A) amid NH R_{ex} értékek a szekvencia mentén az E5, E5_SS, E5_2SH minifehérjében. B) Az egyes minifehérjék térszerkezetei, az E5_2SH esetében narancsszínnel a CPMG-effektust mutató aminosavak vannak kiemelve.

5. kiegészítő táblázat. E19_SS redukciója TCEP-el különböző hőmérsékleteken. (SS – piros, 2SH – zöld) A központi Trp H_{e1} jelintegráljaiból kalkulált oxidált fehérje koncentrációk az idő függvényében, valamint a paraméter illesztéssel meghatározott redukciós kinetikai görbék és statisztikai jellemzésük.

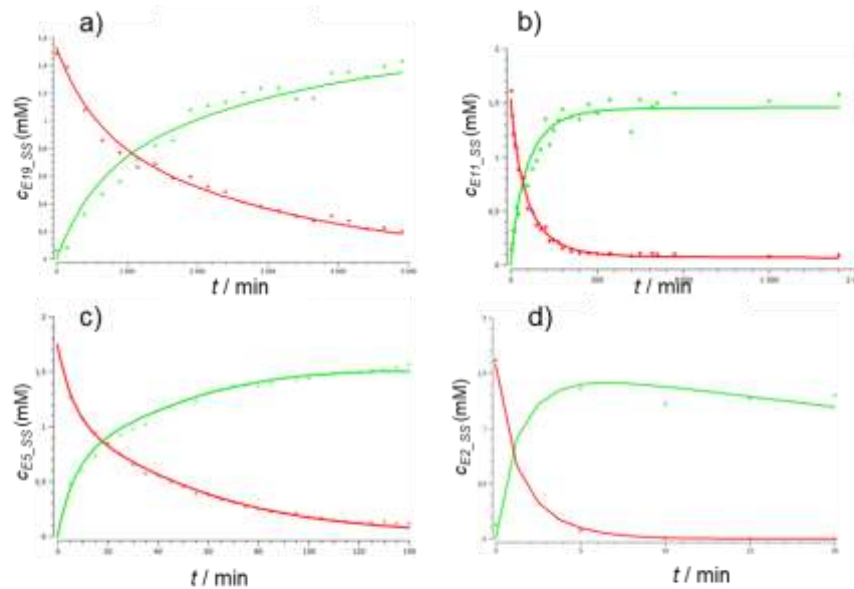


E19_SS	Kísérleti kondíciók						Becsült paraméterek								
	T [C°]	[SS] [mM]	[RA _{red}] [mM]	[RA _{red}]/[SS]	Redukciós ráta	Egyensúlyi állapotig eltelt idő [h]	[O ₂] [mM]	[SS] [mM]	redukció k ₁ [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]		oxidáció k ₂ [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]		precipitáció k ₃ [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]		
									érték	t _{1/2} [min]	szórás [%]	érték	szórás[%]	érték	szórás [%]
a)	15	0,81	12,78	15,72	92	~15	1,00	0,82	3,05 x 10 ⁻⁴	181	3,27	2,69 x 10 ⁻⁴	107,40	1,30 x 10 ⁻⁵	88,29
b)	25	0,80	12,78	16,00	94	~6	0,35	0,81	7,68 x 10 ⁻⁴	72	9,78	1,86 x 10 ⁻²	13,30	n.a.	n.a.
c)	37	0,80	12,78	15,95	94	~4	0,58	0,76	1,15 x 10 ⁻³	48	1,68	2,27 x 10 ⁻³	48,32	3,95 x 10 ⁻⁵	109,24
-	60	0,81	12,78	15,75	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

6. kiegészítő táblázat. SS-minifehérjék redukciója különböző körülmények között TCEP redukálószerrel. (SS – piros, 2SH – zöld) A) E2_SS B) E11_SS redukciója 2-2 eltérő kiindulási fehérje koncentráció mellett. C) E11_SS redukciója eltérő felelegű TCEP redukálószer jelenlétében. A központi Trp H ϵ 1 jelintegráljaiból kalkulált oxidált fehérje koncentrációk az idő függvényében, valamint a paraméter illesztéssel meghatározott redukciós kinetikai görbék és statisztikai jellemzésük.

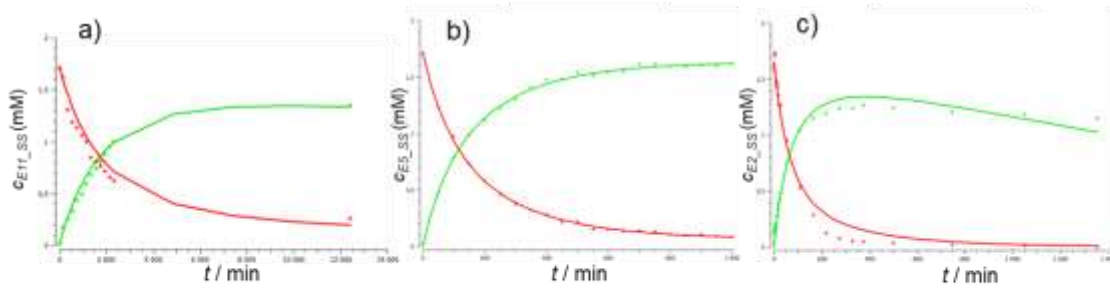


7. kiegészítő táblázat. 4 Különböző α -hélix hosszúságú SS-minifehérjék redukciója azonos körülmények között TCEP redukálószerrel. (SS – piros, 2SH – zöld) A központi Trp He1 jelintegráljaiból kalkulált oxidált fehérje koncentrációk az idő függvényében, valamint a paraméter illesztéssel meghatározott redukciós kinetikai görbék és statisztikai jellemzésük.



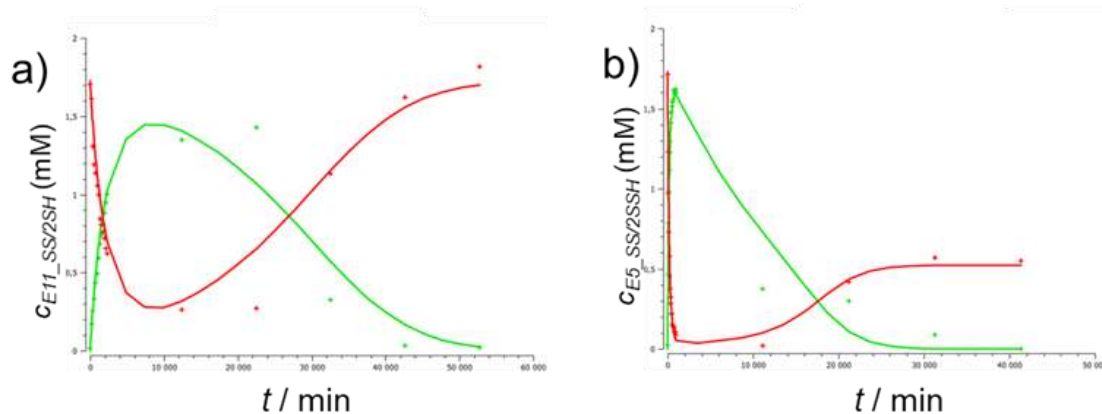
	Kísérleti kondíciók						Becsült paraméterek								
	T [C°]	[SS] [mM]	[RA _{red}] [mM]	[RA _{ox}] [SS]	Redukciós ráta [%]	Egyensúlyi állapotig eltelt idő [h]	[O ₂] [mM]	[SS] [mM]	Redukció k_1 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]			Oxidáció k_2 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]		Aggregáció k_3 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	
									érték	$t_{1/2}$ [min]	szórás [%]	érték	szórás[%]	érték	Szórás [%]
a) E19_SS	15	1,55	3,26	2,10	87	~76 h	0,33	1,53	$2,71 \times 10^{-4}$	909	7,30	$7,24 \times 10^{-4}$	26,96	n.a.	n.a.
b) E11_SS	15	1,72	3,26	1,9	94	~5–6 h	1,80	1,56	$3,68 \times 10^{-3}$	67	2,61	$1,00 \times 10^{-6}$	14,66	$1,00 \times 10^{-6}$	249,10
c) E5_SS	15	1,74	3,26	1,88	93	~1 h	0,58	1,70	$1,85 \times 10^{-2}$	14	3,35	$4,53 \times 10^{-2}$	5,71	$5,57 \times 10^{-4}$	16,47
d) E2_SS	15	1,74	3,26	1,87	100	<5 m	n.a.	1,57	$2,59 \times 10^{-1}$	~1	15,37	n.a.	n.a.	$1,52 \times 10^{-2}$	18,07

8. kiegészítő táblázat. 3 Különböző α -hélix hosszúságú SS-minifehérje redukciója azonos körülmények között DTT redukálószerrel. (SS – piros, 2SH – zöld) Az E19_SS redukciója az adott körülmények között irreálisan hosszúnak bizonyult az előzetes adatok alapján. A központi Trp H_{e1} jelintegráljaiból kalkulált oxidált fehérje koncentrációk az idő függvényében, valamint a paraméter illesztéssel meghatározott redukciós kinetikai görbék és statisztikai jellemzésük.

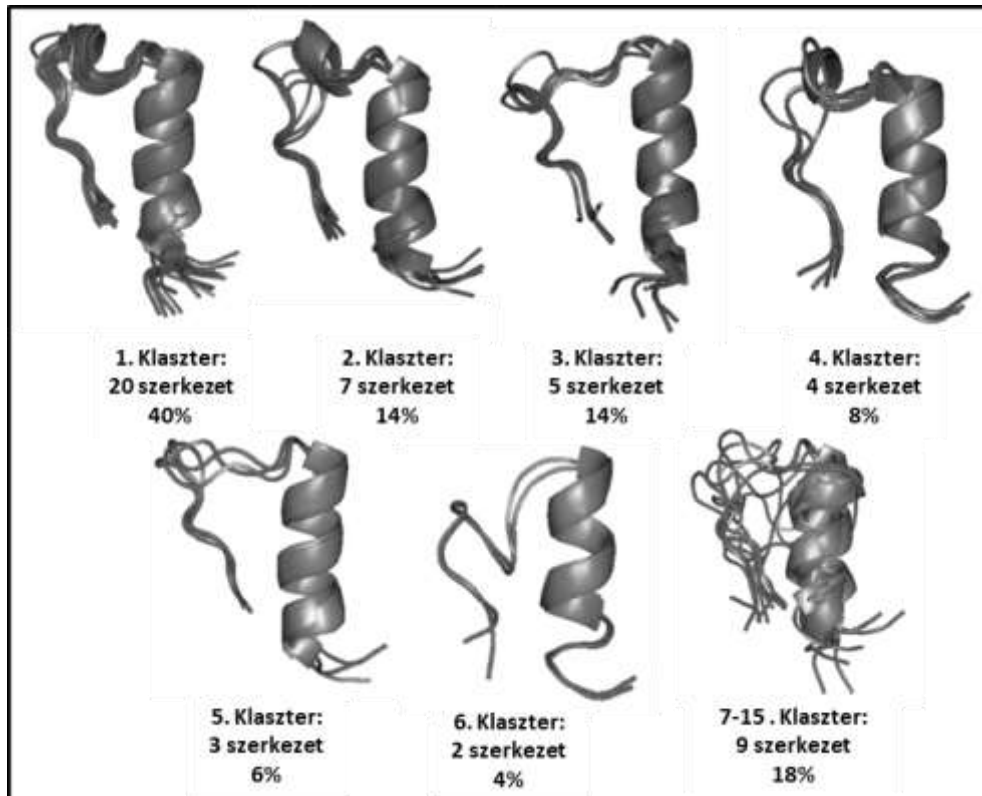


	Kíséleti kondíciók							Becsült paraméterek							
	T [C°]	[SS] [mM]	[RA _{oxi}] [mM]	[RA _{red}] [SS]	Redukciós ráta [%]	Egyensúlyi állapotig eltelt idő [h]	[O ₂] [mM]	[SS] [mM]	Redukció k_1 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]			Oxidáció k_2 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]		Aggregáció k_3 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	
									érték	$t_{1/2}$ [min]	szórás [%]	érték	szórás [%]	érték	szórás [%]
a) E11_SS	15	1,72	3,26	1,89	-84	138 h	0,024	n.a.	$1,52 \times 10^{-4}$	1659	45,152	$5,06 \times 10^{-4}$	7154,71	$3,86 \times 10^{-5}$	20,686
b) E5_SS	15	1,74	3,26	1,88	95	9–10 h	2,000	1,72	$2,18 \times 10^{-3}$	115	1,064	$6,38 \times 10^{-5}$	437,15	$1,14 \times 10^{-5}$	80,208
c) E2_SS	15	1,74	3,26	1,87	100	5h	0,334	1,65	$4,04 \times 10^{-3}$	62	5,315	$2,21 \times 10^{-3}$	98,22	$3,87 \times 10^{-4}$	9,881

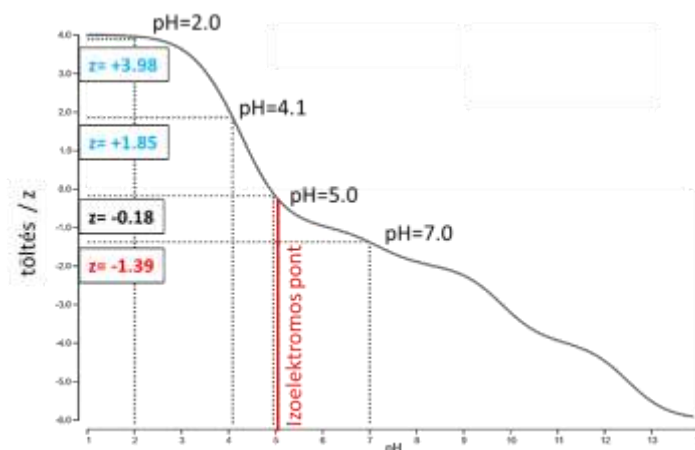
9. kiegészítő táblázat a) Az E11_SS/2SH b) E5_SS/2SH redoxi rendszer teljes redukciós ciklusa, valamint a becsült paraméterek ($pH = 7$, $15^\circ C$). (SS – piros, 2SH – zöld) DTT redukálószer használata mellett.



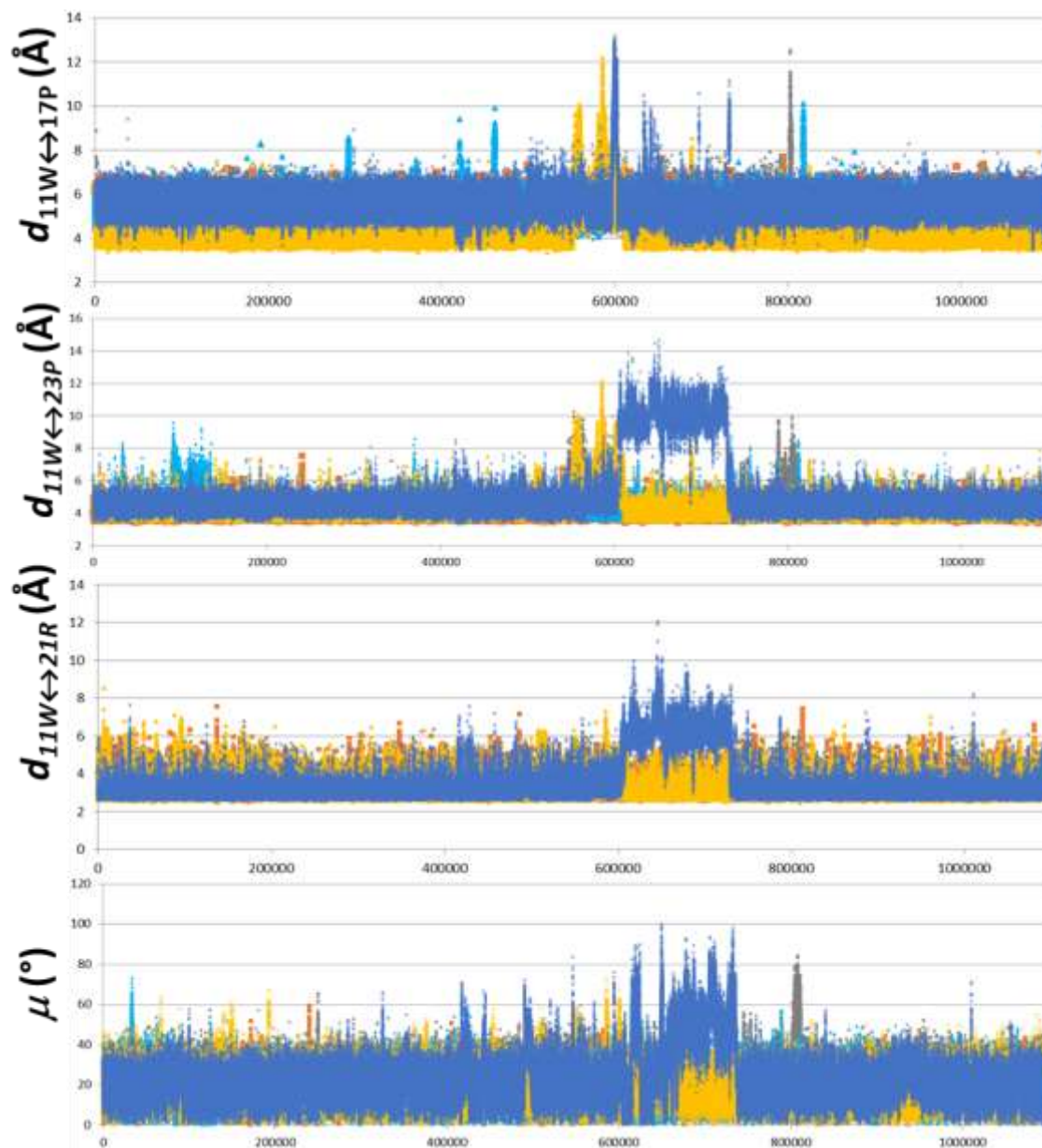
	[O ₂] [mM]	[SS] [mM]	Redukció k_1 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	Szórás [%]	Oxidáció k_2 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	Szórás [%]	Aggregáció k_3 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	Szórás [%]	O ₂ diffúzió k_4 [L mmol ⁻¹ min ⁻¹]	Szórás [%]
a) E11_SS	1,00	1,65	$1,54 \times 10^{-4}$	9,3	$1,83 \times 10^{-5}$	760,3	$1,00 \times 10^{-8}$	21071,7	$3,20 \times 10^{-4}$	538,1
b) E5_SS	1,00	1,73	$2,11 \times 10^{-3}$	2,5	$3,12 \times 10^{-5}$	5657,6	$7,11 \times 10^{-5}$	6,4	$4,75 \times 10^{-4}$	4441,9



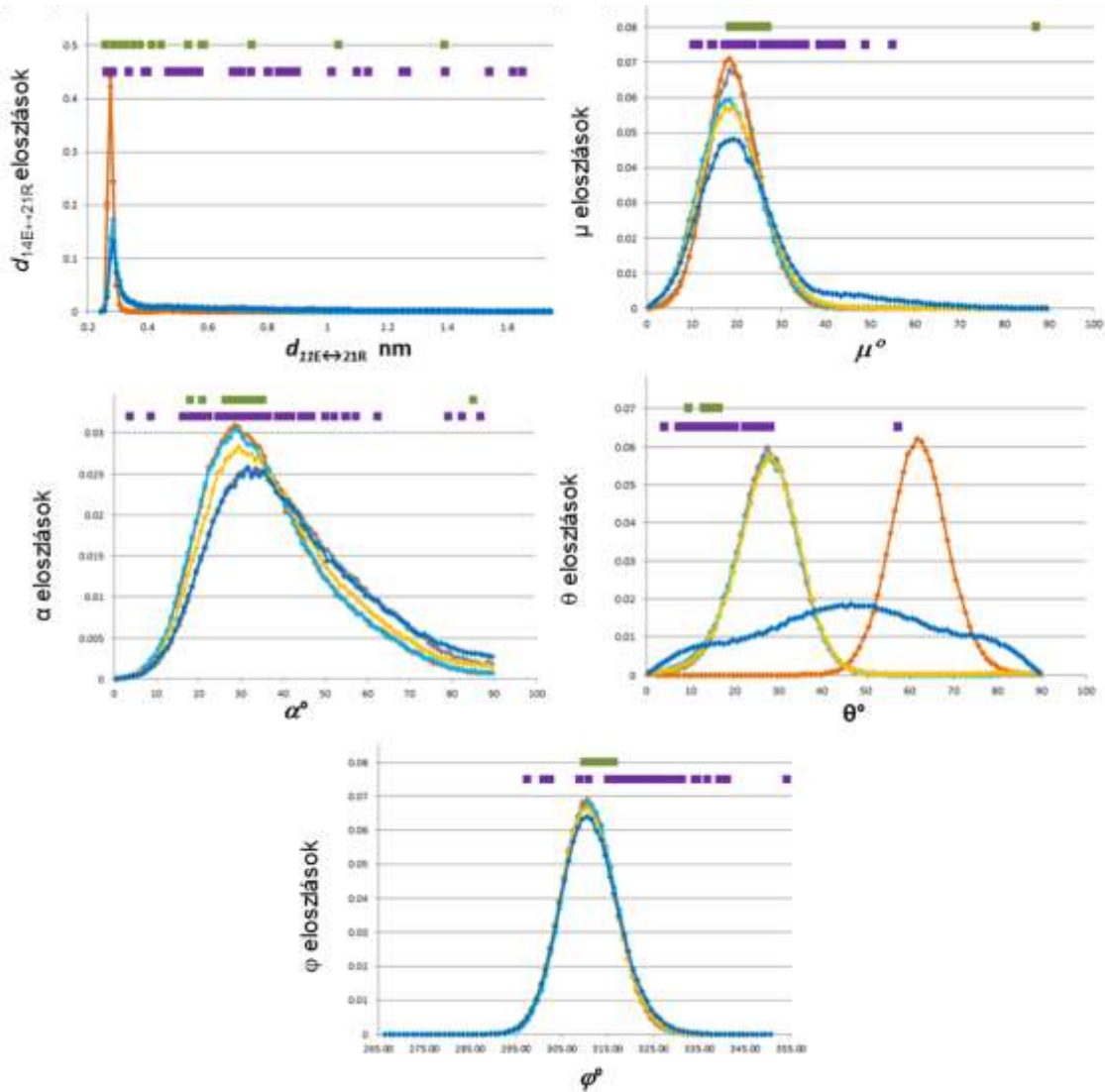
19. kiegészítő ábra. E5 ($pH = 4$, $15^\circ C$,) 50 tagú szerkezetsokasága a gerincatomok RMSD-je alapján klaszterekbe sorolva. 1.5 nm-nél kisebb eltérést mutató szerkezetek alkotnak egy klasztert.



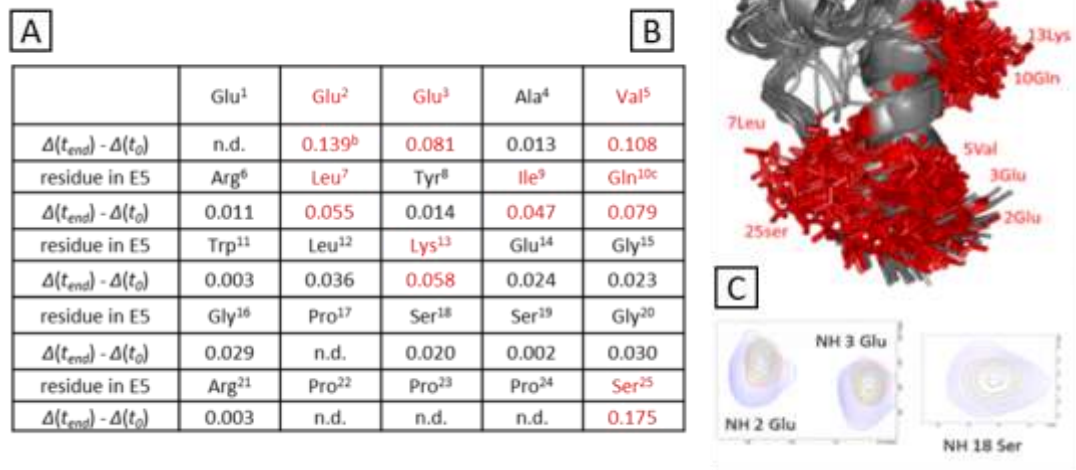
20. kiegészítő ábra. Az E5 miniféherje töltés – pH grafikonja. A grafikon a <https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool> alapján lett meghatározva



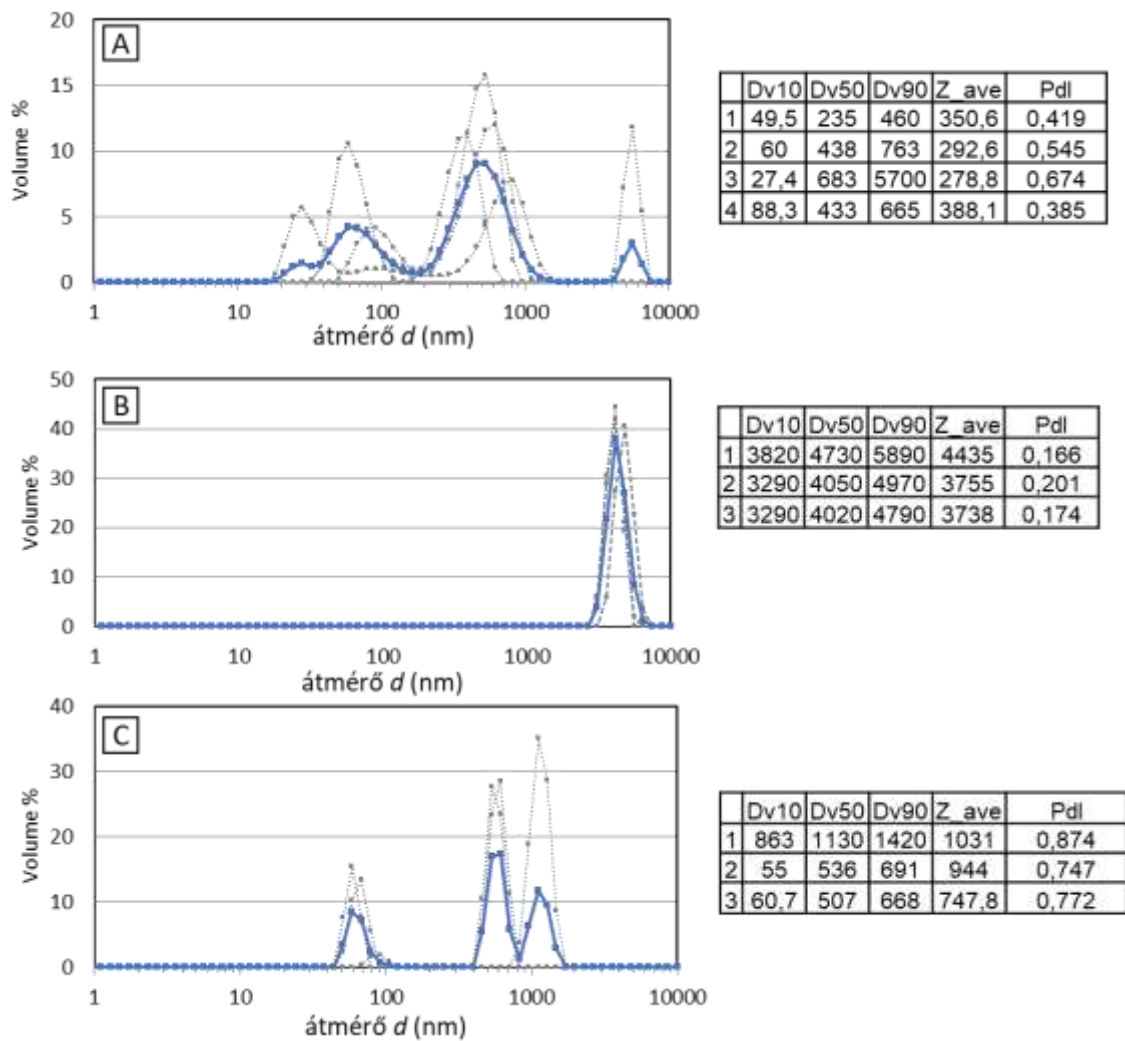
21. kiegészítő ábra. A különböző töltésmintázatú E5 minifehérjéket jellemző paraméterek fluktuációja a molekula dinamikai szimuláció ideje (1000 ns) alatt. $pH = 7$ -es $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_{-1}, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_{-1}]$. $pH = 4,1$ -es: $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_{-1}]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_{-1}, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$.



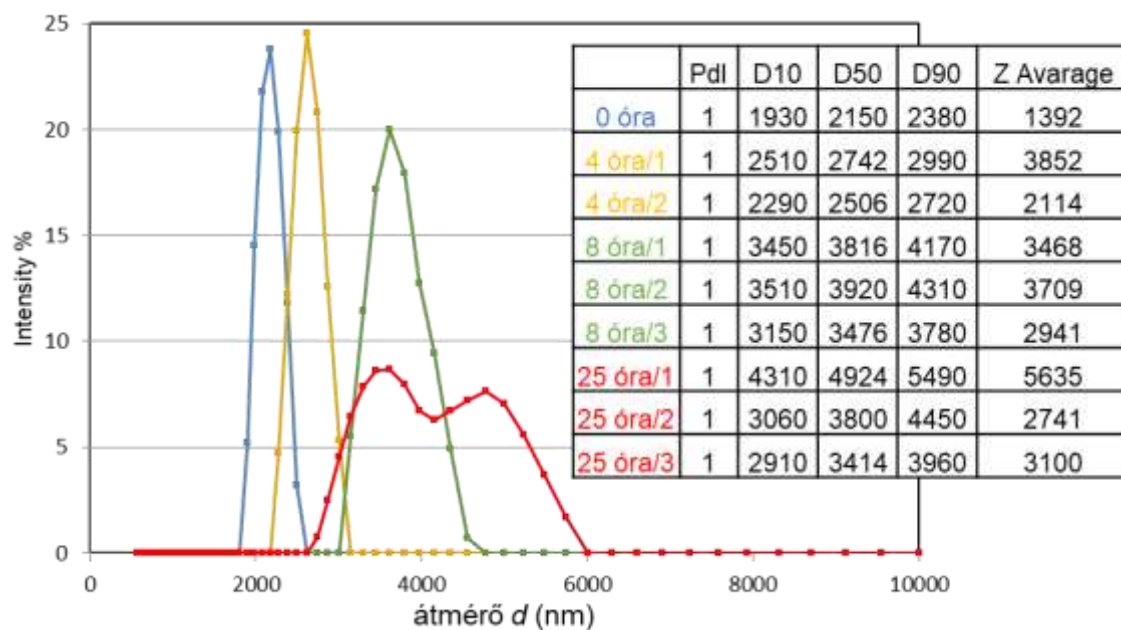
22. kiegészítő ábra. Vizsgált paraméterek eloszlása az MD-szimulációs trajektóriák alapján: $pH = 7$ -es $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_{-1}, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_{-1}]$, $pH = 4,1$ -es $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_{-1}]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_0, {}^3E_{-1}, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_0, {}^2E_{-1}, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$; $E5[{}^1E_{-1}, {}^2E_0, {}^3E_0, {}^{14}E_0]$ mikroállapotok esetében. Az eloszlás görbék felett lineáris módon az NMR alapján meghatározott 50—50 pH 7-es (zöld) és pH 4-es (lila) szerkezetsokaság paraméterei szerepelnek.



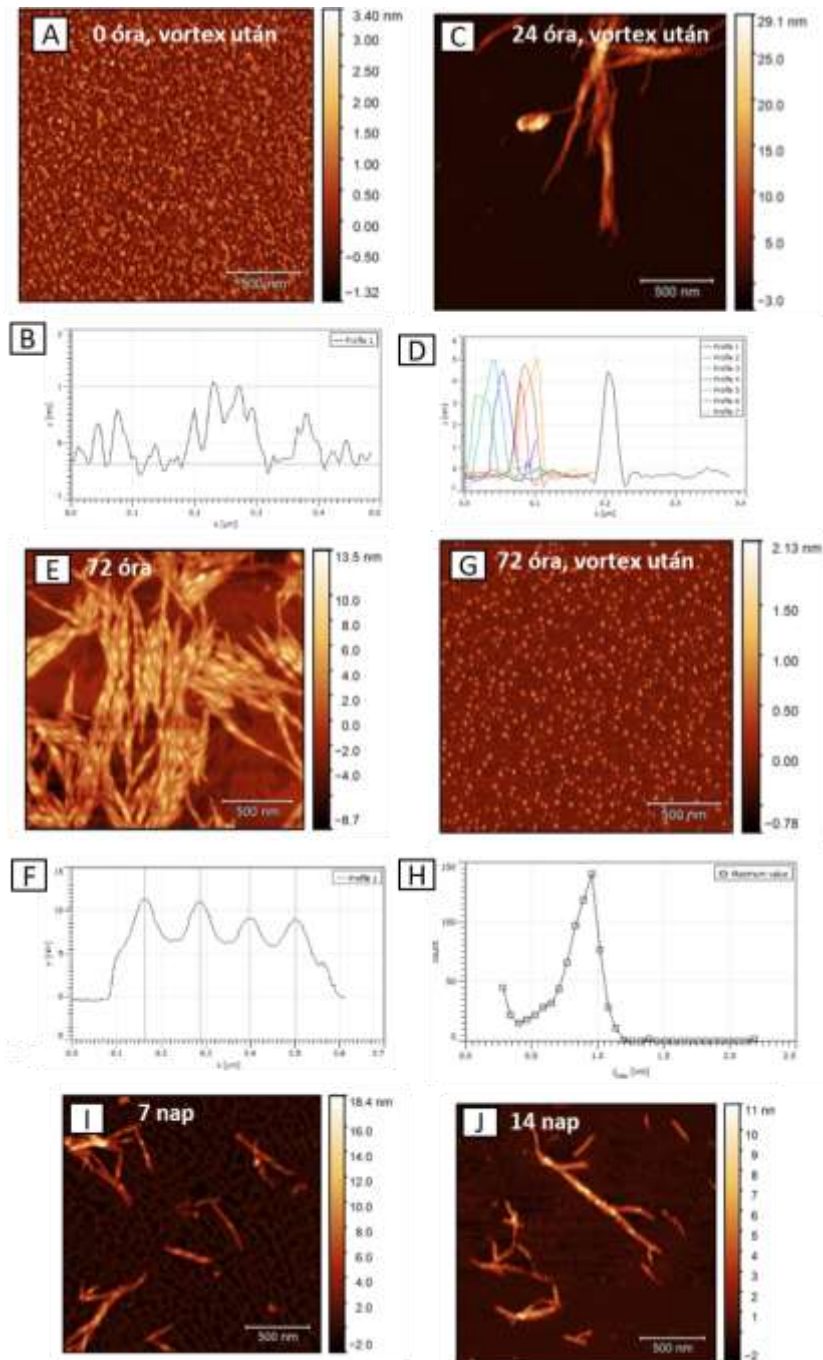
23. kiegészítő ábra. A) ^1H - ^{15}N HSQC keresztcsúcsok kombinált kémiai eltolódása 22 óra után ppm-ben kifejezve $\Delta(t) = \sqrt{\delta H_t^2 + \left(\frac{\delta N_t}{6,51}\right)^2}$ egyenlet alapján, ahol H_t a proton és N_t a nitrogén kémiai eltolódás változása. Pirossal a legnagyobb eltolódást mutató aminosavak vannak kiemelve $\rightarrow \Delta(t_{end}) - \Delta(t_0) > 0,047$ ppm. B) A legnagyobb eltolódást mutató aminosavak ábrázolása a $pH = 4,1$ -en meghatározott térszerkezeten. C) Példa nagyobb mértékben (2E,3E) és kevésbé (18S) eltolódó amid keresztcsúcsokra. (kék: pH 7, lila: pH 4, zöld: 8 óra, sárga: 22 óra)



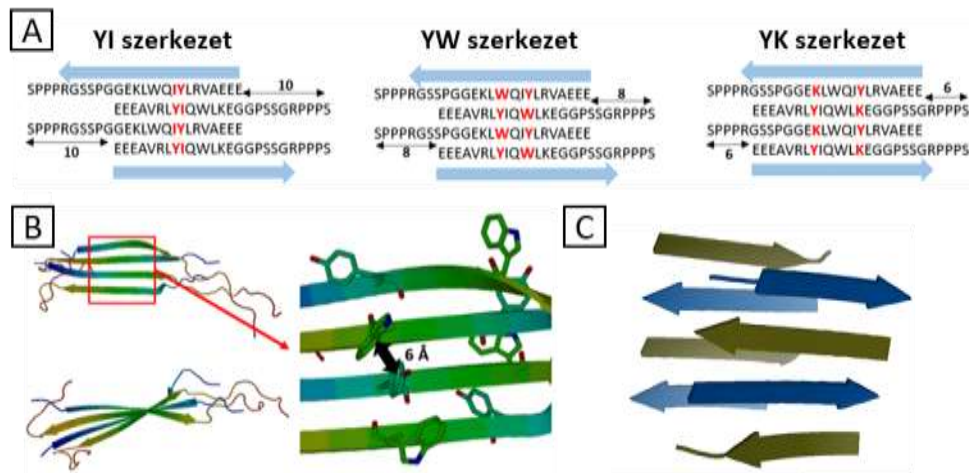
24. kiegészítő ábra. A DLS mérések összesítése. A) Frissen készített 1 mg/ml-koncentrációjú $pH = 7$ -es E5 oldat méreteloszlása 37°C -on. B) Korábban növesztett idült amyloid és C) ennek a mintának a centrifugálás után visszamaradó felülúszójának méreteloszlása. Az átlageloszlások (kék) három/négy párhuzamos mérés alapján lettek meghatározva. Az átmérő skálája logaritmusos beosztású. Dv10/50/90= A kumulatív térfogati eloszlás 10/50/90%-a.



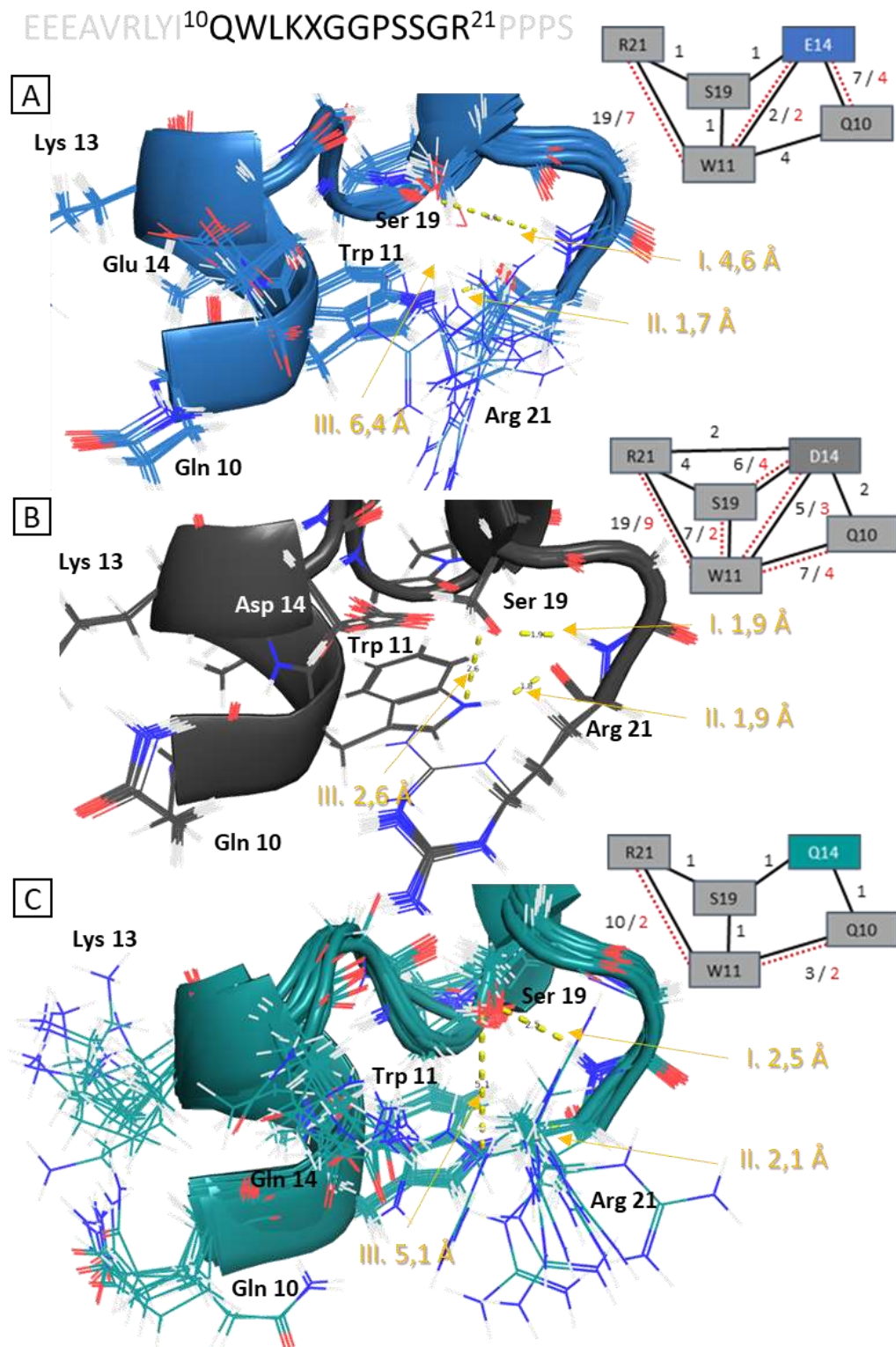
25. kiegészítő ábra. E5 oligomerizációjának nyomon követése DLS-sel. A méreteloszlás görbék a táblázatban szereplő párhuzamos mérések (1-3) átlagát mutatják.



26. kiegészítő ábra. E5 Amyloid aggregáció nyomon követése AFM-technikával. A felvételek színezése a mellettük lévő magassági skála alapján történt. Az A-C-G minták vortexelés után, míg az E-I-J minták vortexelés előtt lettek rögzítve. B-D-F ábrák a keresztmetszeti profilja az A-C-E felvételeken detektált fehérje rétegeknek. A H ábrán a G minta részecskéinek magasság szerinti méreteloszlása található. Az F ábra paraméterei: Amiloid szál hossza: ~ 500 nm; a teljes magasság: $\sim 8-12$ nm, ebből az elkülönülő csúcsok magassága: $\sim 5,2$ nm, a csúcsok egymástól való távolsága $\sim 110-130$ nm.

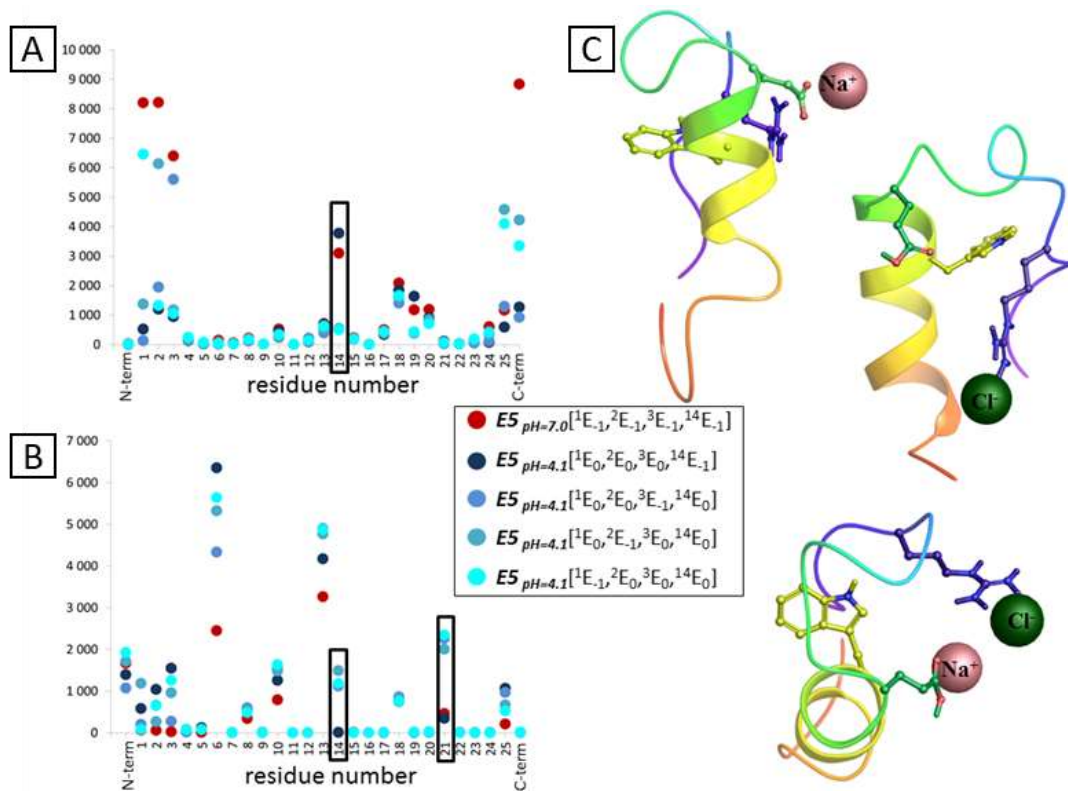


27. kiegészítő ábra. Molekuladinamikai szimulációk A)-B) az E5 és C) az LYIQWL peptidről. A) Különböző számú aminosavval eltolt lehetséges antiparallel amiloid modellek. B) Az MD szimulációk alapján a legstabilabb, YW típusú β -sík modellje. Ebben a struktúrában a Tyr-Trp oldalláncok egymás felett/alatt helyezkednek el létrehozva egy kiterjedt intermolekuláris aromás-aromás kölcsönhatás rendszert. C) Az LYIQWL peptid kristályszerkezetéből származtatott 2x4-es amiloid részlet. A kék/okker β -redő az A/B komformernek felel meg. Az MD szerkezetben már az 1 β -síkban lévő komformer dimerek nincsenek eltolva lépcsőzetesen egymáshoz képest. **(40. ábra/A)**

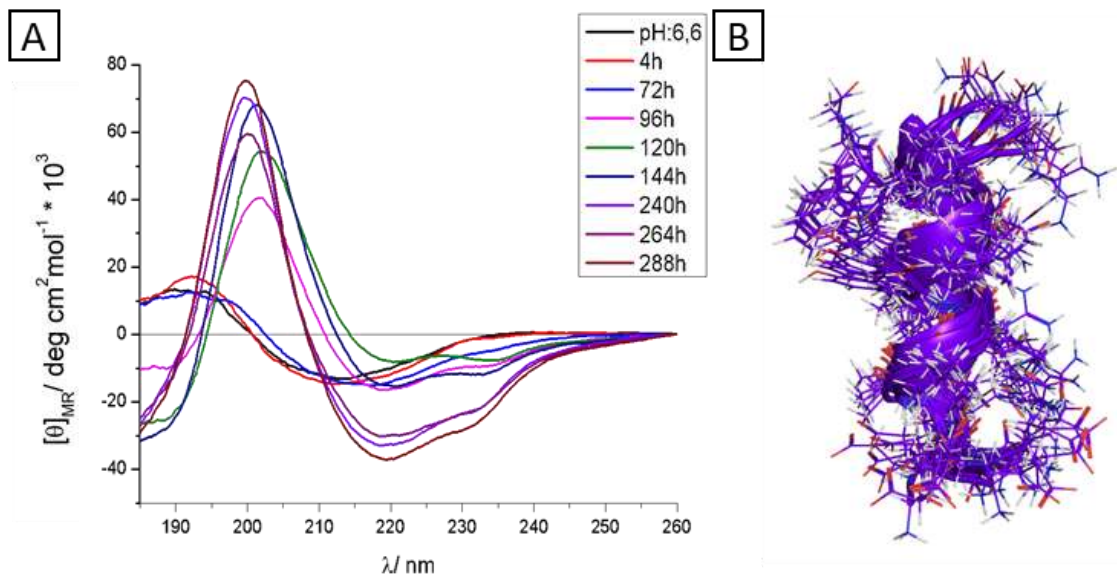


28. kiegészítő ábra. Az A) E5 (X=Glu), B) E5_E14D (X=Asp), C) E5_E14Q (X=Gln) 3₁₀-hélixének szekvenciális és szerkezeti (4°C) részlete. A jobb oldali ábrákon a megjelölt aminosavak között asszignált keresztcsúcsok száma olvasható le az éléről 4°C-on (fekete) és 26°C-on (vörös).

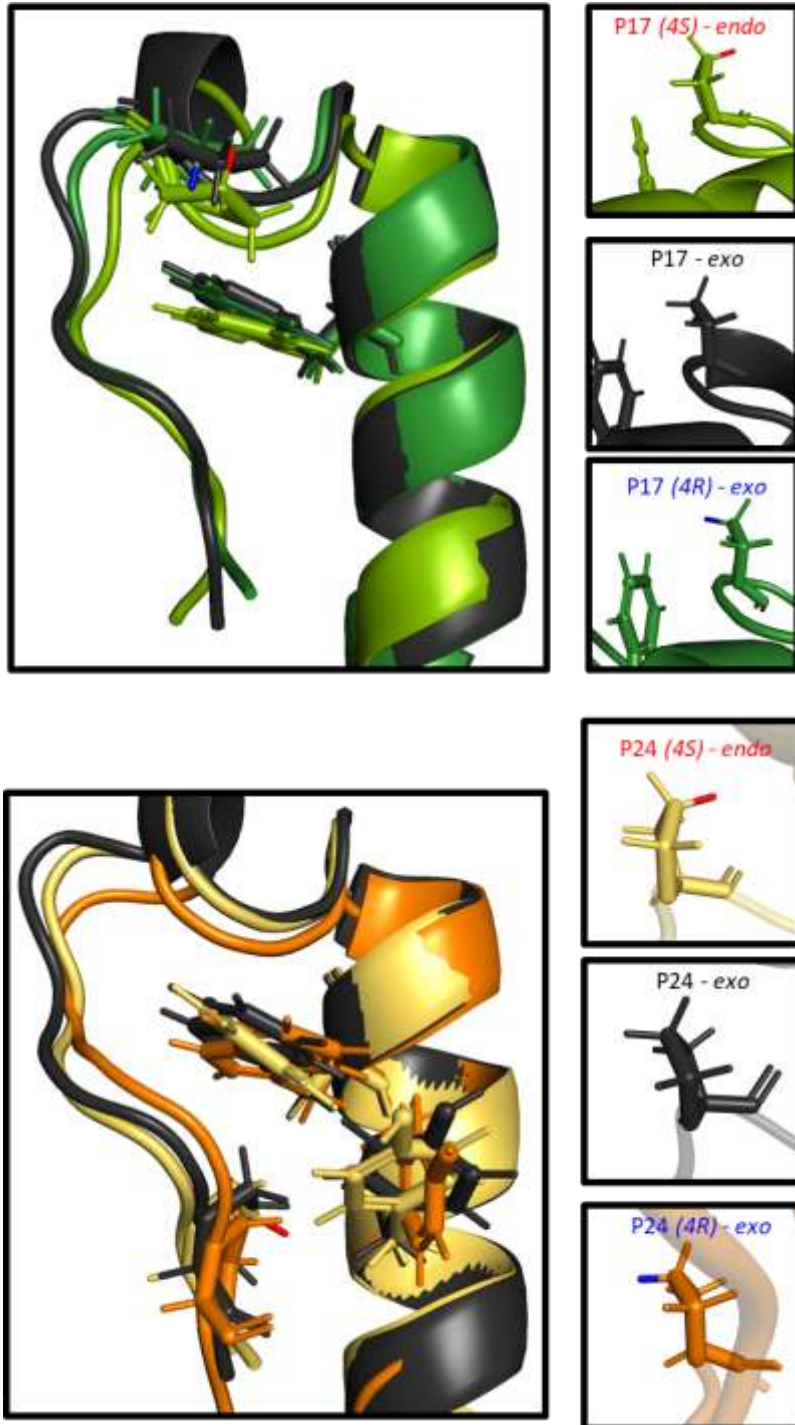
28. kiegészítő ábra folytatása. Sárgával a lehetséges H-hidak és az azokban kölcsönható atomok távolsága van megjelölve. I. H-híd 19 Ser hidroxil-csoport oxigénje és a 21 Arg gerinc amid protonja között. II. H-híd A 21 Arg gerinc amid karbonil oxigénje és a 11 Trp indol NH hidrogénje között. III. H-híd A 11 Trp indol nitrogénje és a 19 Ser hidroxil-csoportjának hidrogénje között. További dipol-dipol / H-híd kölcsönhatás figyelhető meg az E5, E5_E14Q esetében a 10 Gln és a 14 Glu oldallánca között, valamint az E14Q mutáns esetében a 10 Gln és a 13 Lys oldallánca között.



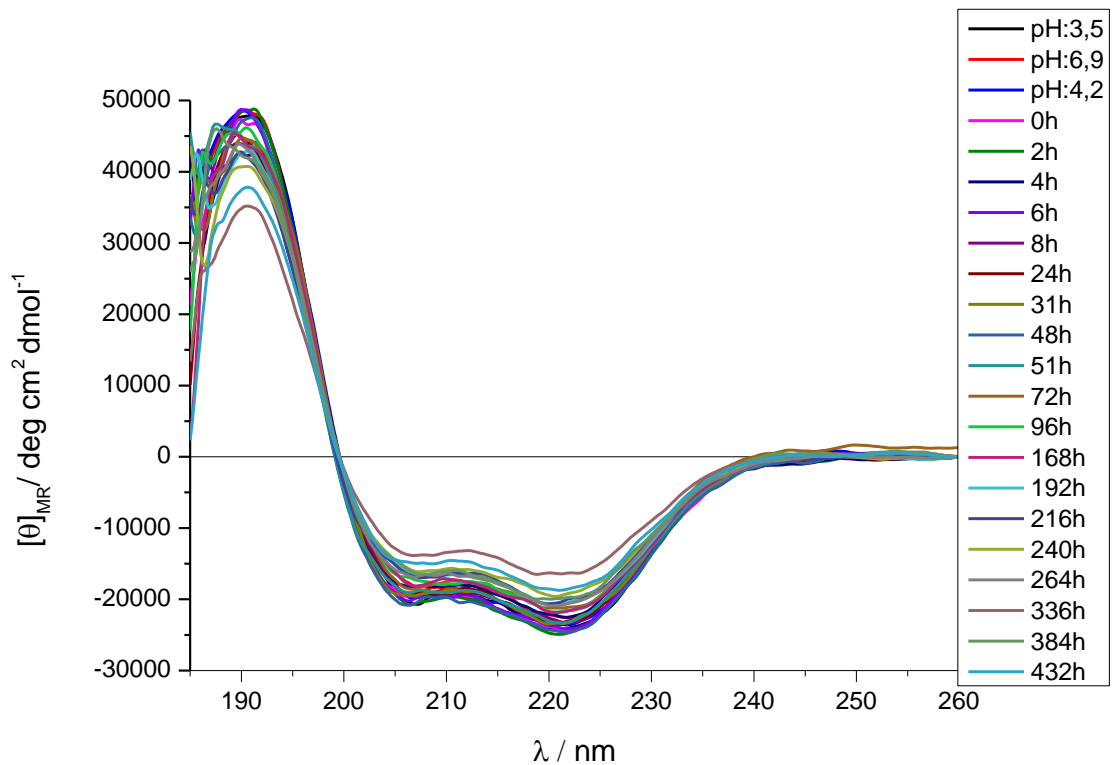
29. kiegészítő ábra. A) Na⁺ és B) Cl⁻ ionok lokalizációja (<3,5 Å) a heteroatomok mentén a különböző töltésmintázatú E5 monomerek molekuladinamikai szimulációjának utolsó 500 ns-ában. Amennyiben a vizsgált pozíció töltést hordoz a Na⁺/Cl⁻ ionok a töltés közelébe gyülekeznek semlegesítve/gyengítve az ionos intramolekuláris kölcsönhatást. (C) Az ábra Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dóra munkája.



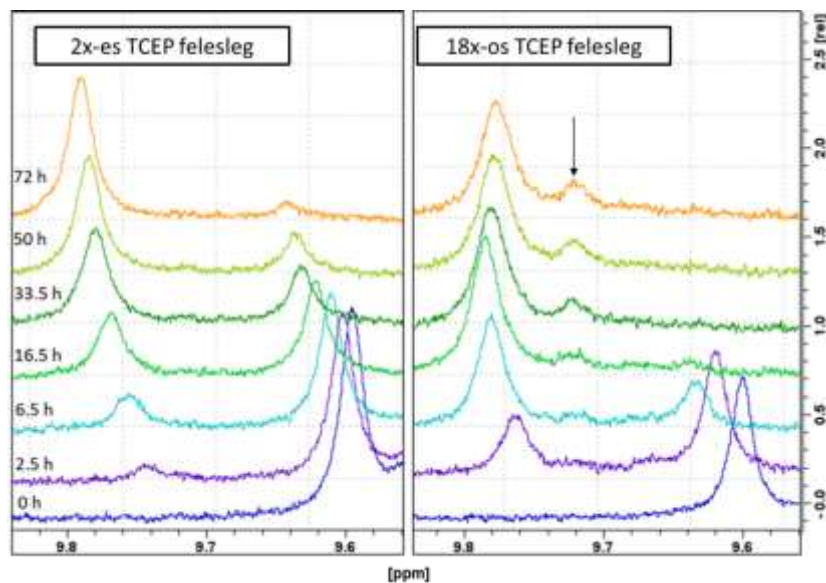
30. kiegészítő ábra. A) Az EEEAVRLYIQWLK-NH₂ peptid másodlagos szerkezeti átalakulásának (U→B típusú) nyomon követése FUV ECD-spektroszkópiával. 2 mg/ml fehérje; *pH* = 6,6 (~ 0 ösztöltés); 37°C; kevertetés mellett; hozzáadott NaCl-t nem tartalmaz. B) *pH* = 3-on (~ +3 ösztöltés) homonukleáris 2D NMR-spektrumok alapján meghatározott 10 tagú szerkezetsokaság térszerkezete.



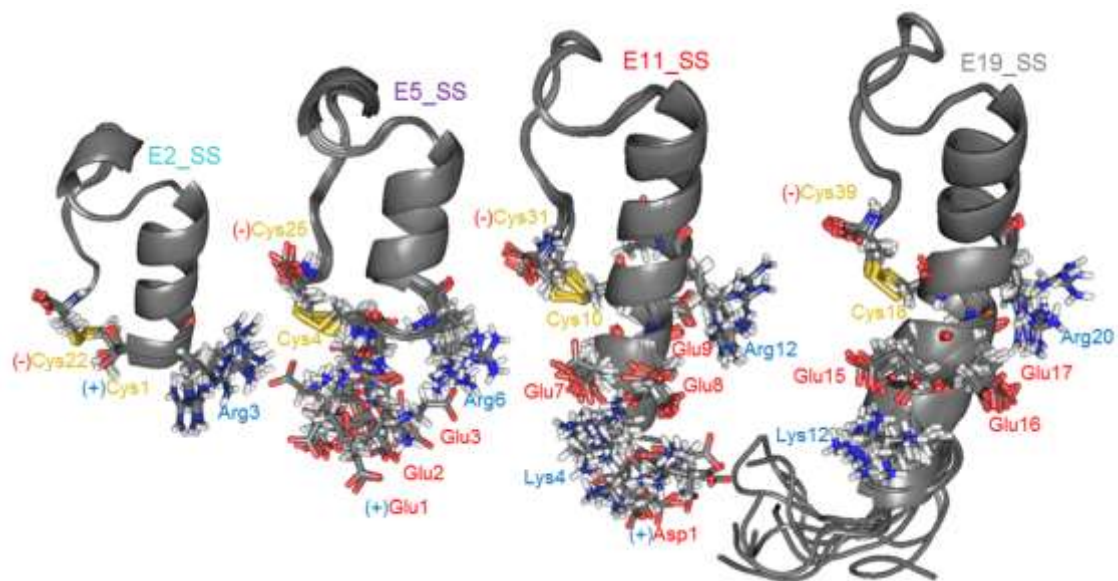
31. kiegészítő ábra. 4°C-on meghatározott átlagszerkezetek egymásra illesztése (a rendezett hélix régiók alapján 6 Arg – 13 Lys) A) Az E5_E14D, E5_E14D_P17(4S)fP és a E5_E14D_P17(4R)fP és B) E5_E14D, E5_E14D_P24(4S)fP és a E5_E14D_P24(4R)fP esetében. A fluor szubsztituált prolinok mellett a térszomszágban lévő aromás oldalláncok is fel vannak tüntetve. D, E) (4R) és (4S) fluor szubsztituált prolin *exo* vagy *endo* térállása.



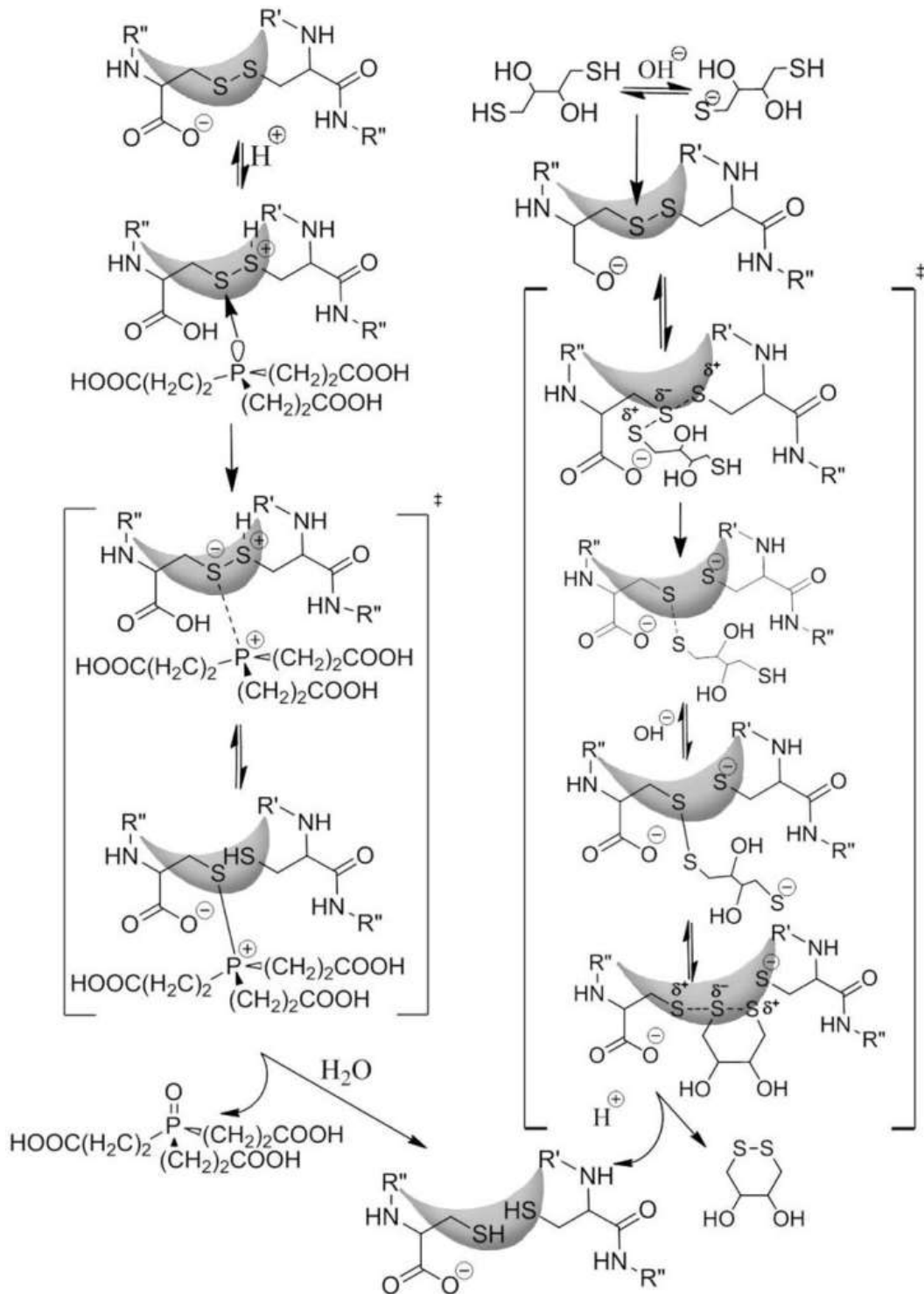
32. kiegészítő ábra. Az E5_A4C_S25C minifehérje távoli UV-tartományban megfigyelt spektrális változása 432 óra elteltével. (37°C , kevertetés, $pH = 4,2 \rightarrow +1,5$ össztöltés, 50mM NaCl)



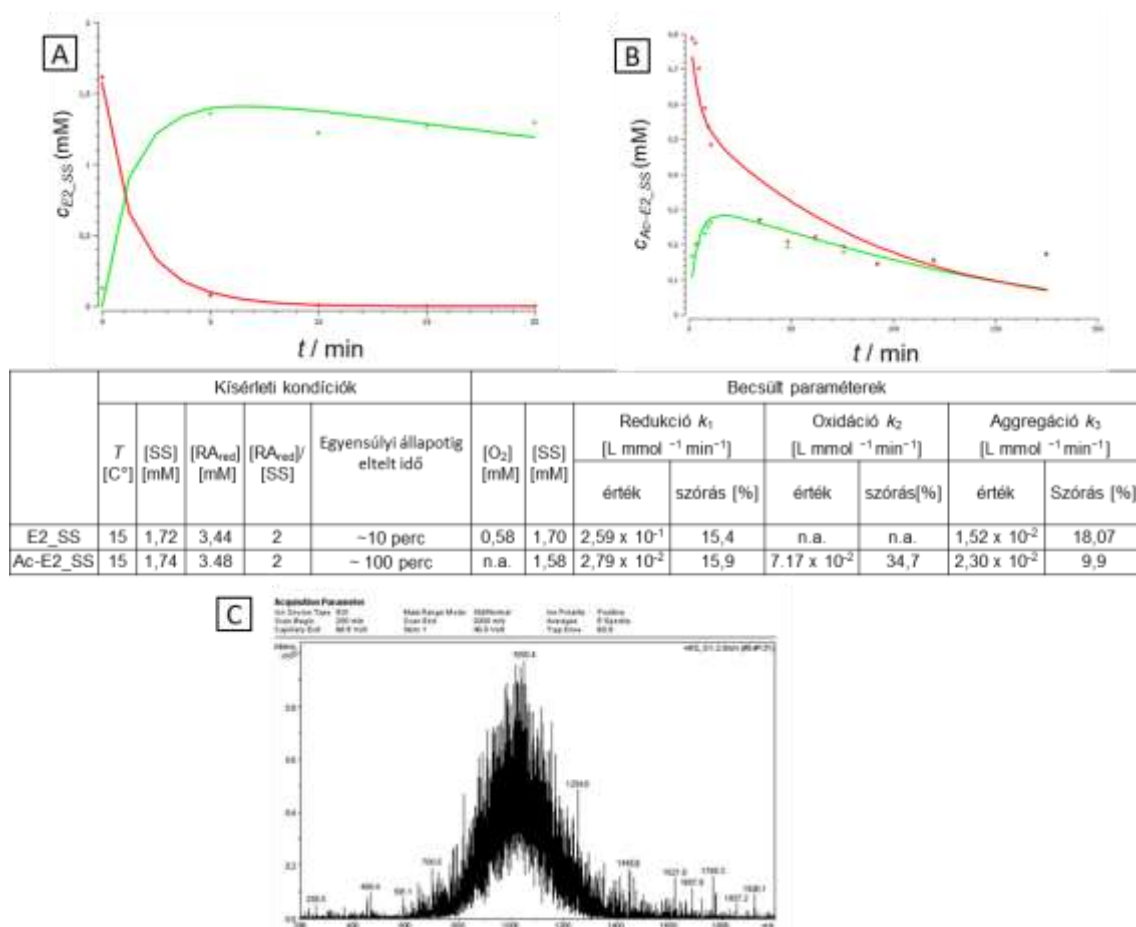
33. kiegészítő ábra. Az E19_SS \leftrightarrow E19_2SH redukciója 2x-es és 18x-os TCEP felesleg mellett. 9,60 ppm-nél az oxidált forma, 9,76 ppm-nél a redukált forma 25 Trp H ϵ 1 jele található. 18x-os TCEP felesleg mellett megjelenik 9,72 ppm-nél egy minor komponens triptofánjának H ϵ 1 jele is. (nyíllal jelölt)



34. kiegészítő ábra. Különböző hosszúságú diszulfidkötés stabilizált minifehérjék 10-tagú szerkezetsokaságai $pH = 7$ -en, 15°C -on. A szerkezetsokaságokon a diszulfidhidak és annak környezetében jelenlévő töltött oldalláncú/terminálisú aminosavak vannak kiemelve. (pozitív töltés - kék, negatív töltés - piros)



35. kiegészítő ábra. A diszulfidhíd redukciója TCEP (bal oszlop) és DTT (jobb oszlop) redukálószerrel. A szürke félhold R'' - R' csoport között a minifehérje ciklizált Trp-kalitka részletét szemlélteti.



16. kiegészítő ábra. A) Az E2_SS és B) Az Ac-E2_SS redukciója TCEP redukálószerrel. (SS – piros, 2SH – zöld). Az Ac-E2_SS esetében a redukálószer hozzáadása és az első mérési pont között (4 perc) eltelt időben az oldott fehérje ~50%-a kivált az oldatból (1,74 mM → 0,84 mM) C) ESI-MS spektruma a heterogén Ac-E2_SS aggregátumnak másfél nappal a kísérlet kezdete után.

10. kiegészítő táblázat. Az E5 minifehérje pH függő szerkezetszámolásához használt keresztcsúcsok száma és a gerincatomok RMSD értéke.

minifehérje	pH	Asszignált csúcsok				Σi	RMSD
		i = 0	i = 1	1 < i < 5	i > 5		
E5	pH 6,94	282	116	118	63	579	0,462
	pH 5,92	289	105	97	59	550	0,340
	pH 5,02	226	54	23	16	319	0,579
	pH 4,08	214	69	34	22	339	0,810
	pH 2,04	309	180	188	71	748	0,282