



Hazai mutáns transztiretin tetramerizációjának vizsgálata *in silico* módszerekkel a jobb terápiás stratégiáért

OTDK dolgozat

Szerző: Tar-Pálfi Helga

I. évfolyam Kémia BSc

Témavezetők: Dr. Perczel András, Bódy István, Fazekas Zsolt

Egyetemi tanár, Szerves Kémiai Tanszék

PhD hallgató, Szerves Kémiai Tanszék

PhD jelölt, Tudományos segédmunkatárs, Szerves Kémiai Tanszék

Lezárva: 2025.01.08.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Perczel Andrásnak a témavezetésért, valamint hálás vagyok a lehetőségért, hogy a szakmai fejlődésemet biztosította.

Hálásan köszönöm Bódy Istvánnak, hogy bevezetett a tudományos munka világába, továbbá a témavezetést, illetve, hogy mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel. Köszönettel tartozom, amiért mindig mélyen, részletekbe menően tanulhattam tőle. A kutatási téma iránti szeretetemet is neki köszönhetem.

Köszönetemet fejezem ki továbbá Fazekas Zsoltnak, aki rengeteg időt és munkát fektetett abba, hogy megtanulhassam a molekuladinamikai szimulációk alapjait. Köszönöm a témavezetést, továbbá azért is köszönettel tartozom, hogy a felmerülő izgalmas matematikai kérdéseken együtt gondolkodhattunk.

Szeretnék köszönetet mondani Papp Dávidnak, aki az idejét nem kímélve segített nekünk a tömegspektrometriás mérésekben. Továbbá köszönöm azt a rengeteg tudást, amit ez alatt a kis idő alatt adott át nekem.

Szeretném megköszönni Keglevich Kristófnak, aki megszerettette velem a kémiát és rengeteg érdekességet, komplexitást csempészett mindig az óráiba. Ezen felül hálás köszönöttel tartozom neki, amiért elindított ezen az úton és lehetővé tette, hogy megismerjem ezt a kutatócsoportot.

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések, jelölések és kifejezések jegyzéke	5
2	Bevezető	9
3	Irodalmi előzmények	11
4	Elméleti háttér	13
4.1	Fehérjék feltekeredése	13
4.2	Amiloidózis	13
4.3	Transztiretin amiloidózis	15
4.4	Molekuláris dinamika	18
4.5	Kötési szabadentalpia számítás	21
5	Célkitűzések	24
6	Alkalmazott módszerek	25
6.1	Kísérleti hozzájárulások	25
6.2	A fehérje szerkezete és mutációja	25
6.3	<i>In silico</i> kísérleti körülmények	25
6.3.1	MD szimulációk	25
6.3.2	MD szimulációk analízise	26
6.4	<i>In vitro</i> kísérleti körülmények	27
6.4.1	Expresszió	27
6.4.1.1	Oltókultúra készítés	27
6.4.1.2	Termelés	27
6.4.2	Tisztítás	27
6.4.2.1	Feltárás	27
6.4.2.2	Affinitás kromatográfia	28
6.4.2.3	Gélelektroforézis	28
6.4.2.4	Dialízis és emésztés	29
6.4.2.5	Fordított módú affinitás kromatográfia	29
6.4.2.6	Preparatív méretkizárásos kromatográfia	29
6.4.3	Vegyes tetramer képzési kísérlet	30
6.4.4	Analitikai méretkizárásos kromatográfia	30
6.4.5	Tömegspektrometria	30
6.4.5.1	Előkészítés	30
6.4.5.2	Mérés	32
7	Eredmények és kiértékelésük	33
7.1	Alapadatok	33
7.2	MM/GBSA eredmények	35

7.2.1	Nyers MM/GBSA eredmények.....	35
7.2.2	MM/GBSA eredmények kiértékelése.....	36
7.2.3	Megoldás és eredmények.....	37
7.2.3.1	Az első megközelítés eredményei	38
7.2.3.2	A második megközelítés eredményei	39
7.2.3.3	A harmadik megközelítés eredményei.....	40
7.2.4	Eredmények összegzése és kiértékelése	41
7.3	<i>In vitro</i> kísérlet kiértékelése.....	46
7.3.1	Méretkizárásos kromatográfia	46
7.3.2	MS/MS mérés	47
8	Összegzés, kitekintés	49
9	Függelék	50
9.1	Modell paraméterek	50
9.2	Receptek	53
9.3	MS mérési körülmények	55
10	Irodalomjegyzék	58

1 Rövidítések, jelölések és kifejezések jegyzéke

- 0x a vad típusú TTR komplex, amelyben a mutációk száma nulla
- 1x az egy H88R mutációval rendelkező TTR komplex
- 2x, bC a *beta-cross* kölcsönhatási felületen két H88R mutációval rendelkező TTR komplex
- 2x, bE a *beta-edge* kölcsönhatási felületen két H88R mutációt tartalmazó TTR komplex
- 2x, IL a *loop-loop* kölcsönhatási felületen két H88R mutációval rendelkező TTR komplex
- 3x a három H88R mutációval rendelkező TTR komplex
- 4x a négy H88R mutációval rendelkező TTR komplex
- ACN acetonitril
- ATTR Transztiretin amiloidózis
- ATTRD18G Transztiretin amiloidózis, ahol a transztiretinben a 18-as aszparaginsav glicinre van mutálódva
- ATTRH88R Transztiretin amiloidózis, ahol a transztiretinben a 88-as hisztidin argininre van mutálódva
- ATTRv Transztiretin variáns amiloidózis
- ATTRwt vad típusú Transztiretin amiloidózis
- *beta-cross* a TTR dimerek közti egyik kölcsönhatási felület, amelyet az A:C és a B:D láncpárok alkotnak, jele: bC
- *beta-edge* a TTR dimerek közti egyik kölcsönhatási felület, amelyet az A:B és a C:D láncpárok alkotnak, jele: bE
- D18E a 18-as aszparaginsav mutációja glutaminsavra
- D18G a 18-as aszparaginsav mutációja glicinre
- DTT Ditiotritol

- FA hangyasav
- FEP szabadenergia-perturbáció
- FPLC *Fast Protein Liquid Chromatography*
- G_A a reakció A reaktánsának szabadentalpiája
- G_{AB} a reakció termékének szabadentalpiája
- G_B a reakció B reaktánsának szabadentalpiája
- GST Glutation S-Transzferáz
- H88A a 88-as hisztidin mutációja alaninra
- H88F a 88-as hisztidin mutációja fenilalaninra
- H88R a 88-as hisztidin mutációja argininre
- H88S a 88-as hisztidin mutációja szerinre
- H88Y a 88-as hisztidin mutációja tirozinra
- IPTG izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
- L55P az 55-ös leucin mutációja prolinra
- LB *Luria-Bertani* tápoldat
- *loop-loop* a TTR dimerek közti egyik kölcsönhatási felület, amelyet az A:D és a B:C láncpárok alkotnak, jele: IL
- MD Molekuladinamika
- MES puffer 2-(*N*-morfolinó) etánszulfonsav puffer
- MM/GBSA *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*
- MM/PBSA *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*
- MS *Mass Spectrometry*
- m/z tömeg / töltés arány
- NMA normál módus analízis

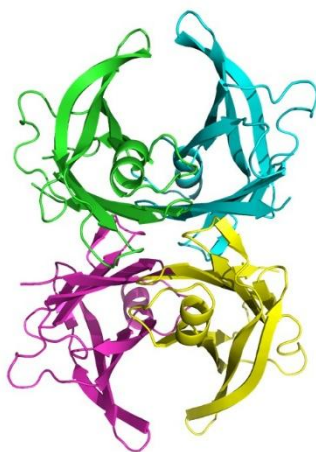
- NMR mágneses magrezonancia spektroszkópia
- NPT izoterm-izobár sokaság
- NVT kanonikus sokaság
- PBS *Phosphate-Buffered Saline*
- RING *Residue Interaction Network Generator*
- RMSD *Root Mean Squared Deviation*, az atomok átlagos eltérésének vizsgálata
- SASA *Solvent Accessible Surface Area*, oldószer hozzáférhetőség vizsgálata
- SDS-Page *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
- SEC *Size -Exclusion Chromatography*
- SpR Spearman-féle rangkorelációs együttható
- T119M a 119-es treonin mutációja metioninra
- TB *Terrific Both* tápoldat
- TFA trifluorecetsav
- TI termodinamikai integráció
- TTR transztiretin
- V122I a 122-es valin mutációja izoleucinra
- V20I a 20-as valin mutációja izoleucinra
- V30A a 30-as valin mutációja alaninra
- ΔE_{el} elektrosztatikus energia
- ΔE_{in} kötött energiatagok
- ΔE_{MM} molekuláris mechanikai energia
- ΔE_{vdw} Van der Waals energia
- ΔG_{bind} kötési szabadentalpia
- ΔG_{npol} nem poláris hidratációs szabadentalpia

- ΔG_{pol} poláris hidratációs szabadentalpia
- ΔG_{sol} hidratációs szabadentalpia

2 Bevezető

Az amiloidózisos megbetegedések a várható növekvő élettartammal egyre nagyobb kihívás elé állítják az orvostudományt. E fehérje- és peptidaggregátumok lerakódásával járó kórok körül a mai napig számos tisztázatlan kérdés van. A Parkinson- és Alzheimer-kór mellett több időskorban jelentkező megbetegedésről beszélhetünk (IgG könnyű lánc amiloidózis, Creutzfeldt-Jakob betegség, Transztiretin amiloidózis (ATTR) és mások), melyek mind amiloid aggregációval járnak.

A Transztiretin amiloidózis (ATTR) esetén a natív formában tetramer szerkezetű transztiretin (TTR) (1. ábra) disszociál monomerekké, amelyek aztán elveszíthetik helyes feltekeredésüket, és amiloid szálak formájában rakódhatnak le az egész szervezetben. Ez a betegeknél életminőségük romlását okozza és kardiális formája halálos kimenetelű lehet.



1. ábra A transztiretin tetramer szerkezetét bemutató ábra. A négy különböző lánc négy különböző színnel látható (zöld, kék, lila és sárga). Megfigyelhető a fehérje magas antiparallel β -redőzött réteg tartalma, illetve a T⁷⁵ és L⁸¹ aminosavak között elhelyezkedő rövid α -helikális szakasz.

A jelenleg rendelkezésre álló összes gyógyszeres terápia azon az elven működik, hogy a tetramer TTR-t a kóros folyamat első lépésénél, a tetramer disszociációnál megállítsa a tetramer szerkezet stabilizálása révén. A magyar populáció vizsgálata kimutatta, hogy a fehérje H88R mutációja a legtöbb magyar családot érinti. Ennek a mutációnak a legjelentősebb hatása az, hogy teljes mértékben megakadályozza a fehérje tetramerizációját. Ez súlyos aggályokat vet fel a gyógyszeres kezelések hatékonyságával kapcsolatban, mivel ezek így a H88R mutáns TTR fehérje szervezetben nem létező formáját igyekeznek stabilizálni. Ha azonban a betegekben heterozigóta módon előforduló TTR H88R fehérje képes volna a vad típusú TTR-el vegyes tetramert képezni, az az ilyen típusú gyógyszerek felhasználását indokolhatná. Erre vonatkozóan viszont eddig semmilyen kutatás nem történt.

Kutatásomban a transztiretin fehérje, H88R mutánsának tetramerizációs hajlamát vizsgáltam *in silico* módszerekkel, hogy előre jelezzem, képes lehet-e a H88R mutáns TTR vad típusú TTR-el vegyes tetramereket képezni. Az általam használt molekuladinamikai szimulációk és az ezekre épülő termodinamikai számítások ígéretes eszközök az oligomerizációs folyamat kísérleti úton nehezen megfigyelhető részleteinek vizsgálatában. Ezek *in vitro* kísérleti eredményekkel együtt az ATTR amiloidózis mélyebb megértéséhez vezethetnek.

3 Irodalmi előzmények

Transztiretin amiloidózis betegséget (ATTR) vizsgáló kutatásokat világszerte végeztek, ugyanis a betegség rendkívül összetett. A betegség kialakulásáért a TTR fehérje két különböző formája, a vad típusú TTR, vagy a variáns TTR-ek lehetnek felelősek.¹ A vad típusú TTR amiloidózis (ATTRwt) esetében, a vad típusú fehérje kis valószínűséggel letekeredik, majd amiloid száakként aggregálódik (legtöbb esetben a szívben). A tünetek 70-80 éves korban jelentkeznek általában, amikor az évek során lassan növekedő amiloid szálak kellően nagyok lesznek, hogy problémát okozzanak. Ennek gyakori eredménye szívelégtelenség, valamint bizonyos esetekben kéztőalagút szindróma. A variáns TTR amiloidózis (ATTRv) egy autoszomális domináns genetikai rendellenesség. A betegségek típusától függ, hogy mely életkorban jelentkeznek először a tünetek. A legagresszívabb variáns esetében ez lehet akár 25-30 éves kor is, de a legtöbb esetben a 60-65 éves kor közötti időszak jellemző. Több kutatás során is vizsgálták a mutációk hatását termodinamikai, kinetikai és szerkezeti szempontból, valamint az amiloidogén hatást a vad típusú TTR-hez képest. Eddig összesen több mint 150 patogén mutációt azonosítottak már. Magyarországon a leggyakoribb patogén TTR mutációk közé tartozik a H88R, I107V, V30M és a D18G. A kutatások különböző irányokból próbálták megközelíteni a különböző mutációk hatását. Megállapították, hogy a mutáció típusa minden esetben befolyásolja a betegség súlyosságát. Kiemelkedő fontosságú paraméter az adott mutáns TTR koncentrációja a vérben, agyvízben, illetve a vérplazmában. A különböző mutációk földrajzi előfordulásának vizsgálatakor azt találták, hogy a Magyarországra leginkább jellemző H88R mutáció Svédországban egy esetben, Ausztriában ugyanakkor viszonylag nagy százalékban figyelhető meg. A magyar orvosok kitüntetett figyelemmel vizsgálják a variáns TTR-ek fenotípusát.

Kutatások kimutatták, hogy a H88R és az I107V variáns is kevert fenotípusú, azaz a betegség érintheti a szívet, de az agyat is. Ebből kifolyólag megvizsgálták, hogy egyéb TTR variánsok esetében milyen szerveket érinthet még a betegség. A legérintettebb szervek a szív, a szem és a központi idegrendszer. A Magyarországon is előforduló D18G mutáns legnagyobb részben a központi idegrendszerben okoz problémákat.² A betegség mechanizmusának megértéséhez és a lehetséges terápiás kezelések kifejlesztéséhez kiemelkedő fontosságú volt az a megállapítás, hogy a disszociáció sebessége, a H88R mutáns kivételével, egyenesen arányos az amiloidogenicitással. Továbbá megállapították, hogy a natív állapotot destabilizáló mutációk hajlamosítanak a betegségre.³ A variáns TTR-ek negyedleges tetramer szerkezete általában igen instabil, azonban amennyiben a szervezetben lévő vad típusú TTR-rel vegyes tetamert tudnak

alkotni, képesek lennének ilyen formában stabilizálódni és aggregáció nélkül transzportálódni. Ezen tulajdonság vizsgálata az egyes variánsok esetében a terápiás megoldás szempontjából kiemelkedő fontosságú.

Jelenleg már több különböző terápiás eljárás közül lehet választani, azonban egyes betegségek esetében ezek nem alkalmazhatóak. Ebből kifolyólag az új módszerek fejlesztése elengedhetetlen. Súlyos esetekben, amikor már az amiloid lerakódás nagymértékben roncsolta a szervet, elkerülhetetlen a szervtranszplantáció. Más esetekben megpróbálkoztak a variáns TTR gén vad típusú TTR génre való mutációjával is, melyre a betegek szervezete hirtelen javulással válaszolt. Vannak próbálkozások bizonyos kismolekulás gyógyszerekkel is (pl. Tafamidis), amelyek az instabil tetramert próbálják meg stabilizálni. Ilyen terápiát alkalmaznak az ATTRD18G és ATTRH88R betegségek esetében.⁴ Ezeken az eljárásokon felül felvetettek egy olyan hipotézist, miszerint ha egy szupresszor alegységet kapcsolnának az amiloidogén variánsra, az stabilizálni tudná a szerkezetét. Az erre vonatkozó kutatások (amelyben a TTR T119M mutációját használták szupresszorként, ugyanis a TTR ezen mutációja méginkább stabilizálja a tetramer szerkezetet) azt mutatták ki, hogy a folyamat során az amiloid képződés 70%-ban gátolt. Az említett kísérletben V30M mutánst keverték össze T119M mutánssal, az amiloidogenicitás pedig 50%-kal csökkent a szupresszort nem tartalmazó variáns fehérjéhez képest.

A mi kutatásunk a TTR H88R mutánsának vegyes tetramer képzési hajlamát vizsgálta.

4 Elméleti háttér

4.1 Fehérjék feltekeredése

A fehérjék feltekeredése egy spontán folyamat, melyet a fehérjében lévő intramolekuláris hidrogénkötések, hidrofób effektus, Van der Waals erők és az elektrosztatikus kölcsönhatások irányítanak.⁵ Ezen összetett folyamatra a köztes állapotok kialakulási mechanizmusa szerint három klasszikus modell létezik; a hierarchikus -, a hidrofób összeomlás -, és a nukleációs-kondenzációs mechanizmus. A hierarchikus modell szerint a fehérje feltekeredésének első lépése a másodlagos szerkezeti elemek kialakulása a polipeptid láncban hidrogénkötések által, melyek utána elsősorban hidrofób kölcsönhatások segítségével kialakítják a harmadlagos és negyedleges szerkezeteket. A hidrofób összeomlás-modell szerint a nem poláros oldalláncok közötti hidrofób kölcsönhatások indítják el a feltekeredés folyamatát. A peptidlánc spontán összeomlása révén egy kompakt állapot jön létre, melyben a hidrofób mag gyorsan kialakul, még a másodlagos struktúrák létrejötte előtt. A nukleációs-kondenzációs modell a hierarchikus- és a hidrofób összeomlás-modell ötvözeteként értelmezhető. Ezen elmélet szerint a harmadlagos szerkezet a másodlagos szerkezet és a hidrofób letekeredés szükségszerű következménye.

A fehérjék feltekeredése követheti a natív útvonalat (*on pathway*), azonban el is térhet tőle hibás feltekeredés (*off pathway*) esetén.⁵ A helyesen feltekeredett fehérje hidrofób aminosav oldalláncai általában a fehérje belsejében eltemetve egy kompakt magot képeznek. A hibásan feltekeredett fehérjében ezek a hidrofób oldalláncok a fehérje felületére kerülhetnek, így a hidrofób hatás csak intermolekulárisan, aggregáció révén tud érvényesülni. A hibás feltekeredésnek nem következménye a kizárólag rendezetlen konformáció. Amennyiben a feltekeredés hibás, azonban rendezett útvonalat követ, erősen strukturált aggregátumok jönnek létre. Ennek klasszikus példái az amiloid fibrillumok.

4.2 Amiloidózis

Az amiloidózis egy olyan folyamat, mely során egy fehérje natív szerkezete destabilizálódik, letekeredik és β -redőkben gazdag fibrilláris aggregátumokba tömörül.⁶ Az amiloid képződési mechanizmus első lépéseként, általában nem specifikus kölcsönhatások eredményeként, vízzoldékony oligomerek keletkeznek. Ezt követően, a második lépésben, ezen oligomerek rövid, vékony protofibrillumokká alakulnak. Ezen protofibrillum az amiloid szál β -redős szerkezetének redők alkotta síkjára merőleges tengelyű. A protofibrillumok olyan kezdetleges struktúrát jelölnek, melyek később képesek stabil fibrillumokká alakulni. Az utolsó lépésben a

protofibrillumok oldalirányban összekapcsolódnak, illetve érett amiloid fibrillumokká tekerednek össze. Az amiloid fibrillumok kiemelkedő stabilitása a fehérjegerinc atomjai között létrejövő hidrogénkötéseknek és az apoláris oldalláncok oldószert kizárással járó tömör rendeződése során érvényesülő hidrofób effektusnak tulajdonítható.⁷ Az amiloid fibrillumokban a β -lemezek síkja párhuzamosan helyezkedik el a fibrillum tengelyével, a lemezeken belüli β -szálak pedig a tengelyre merőlegesen.⁸ Az amiloid fibrillumok rendkívüli stabilitásának kísérlettel alátámasztott oka a β -redőket alkotó β -szálak közti intramolekuláris kölcsönhatás. Ez azonban nem egyezik az elméleti munkák által leírt teóriával, mely szerint az oldalláncok közti erősen rendezett hidrogénkötések adják a nagyfokú stabilitást.

Az amiloid fibrillizáció időbeli lezajlását *in vitro* körülmények közt három fázis jellemzi. A késleltetési fázis hosszú és mindaddig tart, amíg el nem kezdődik az amiloid fibrillumok kialakulása. Ezt egy gyors exponenciális növekedési fázis követi, ahol az amiloid fibrillumok száma megsokszorozódik. Az utolsó, telítődési fázis során az amiloid fibrillumok száma egy állandó érték köré áll be. A fehérjék feltekeredésének és aggregációjának energetikájának leírásában az a közös, hogy mind a kettő az úgynevezett *energy landscape* (energia felszín) elmélettel magyarázható meg.⁹ A termodinamikailag kedvező natív állapot felé különböző, jelentős kinetikai gátakon át vezet az út. A natív állapotból tovább indulva azonban el lehet jutni olyan újabb, és még kisebb energiával rendelkező állapotokba, amelyekben a fehérjék letekeredett és aggregált formátumban találhatók meg. Letekeredés során az intermolekuláris kölcsönhatások és az intramolekuláris kölcsönhatások közötti verseny megnő, ezzel növelve a kinetikai gátak nagyságát. Ezen kinetikai gátak egyes esetekben csak nagy energiabefektetéssel léphetők át, így a letekeredett szerkezet megragad egy adott lokális minimumban. Erre tökéletes példa az amiloid fibrillumok kialakulása. A folyamat során a konformációs állapotok száma, az entrópia és a szabadentalpia is csökken, a legkisebb energiájú minimum felé, amely biztosítja a letekeredett állapot szükséges konformációs stabilitását.

Egyes fehérjék azonos körülmények között eltérő mértékben amiloidogének, melyet számos tényező befolyásol. A legtöbb globuláris fehérje esetében kijelenthető, hogy akkor válnak amiloidogénné, amikor a natív szerkezet felbomlik, ezzel felszínre kerülnek a fehérje hidrofób oldalláncjai és a fehérje gerince. Ezen felül akár egy aminosav cseréje, pontmutációja is amiloidogénné tehet egy fehérjét, amely azelőtt nem, - vagy csak kis mértékben – volt amiloidogén.

A transztiretin (TTR) is amiloid képzésre hajlamos. Érdekes, hogy a TTR fehérjének eddig több mint 150 mutációja¹⁰ fordult elő az emberi szervezetben. Ezek között akadnak

amiloidogének, amikben a mutációk destabilizálják a fehérje natív szerkezetét, elősegítve ezzel a *misfolding* állapotot. Továbbá léteznek olyan mutációk, melyek nem hajlamosítanak az amiloidózisra és olyanok is, melyek védelmet nyújtanak az amiloidózissal szemben.

A fehérjék amiloidózisa az emberi szervezetben súlyos állapotokat képes kialakítani az által, hogy az amiloid szálak egyes szövetekben, szervekben képesek lerakódni, ezzel visszafordíthatatlan károsodást idézve elő.⁸ Három féle amiloidózist különböztetünk meg. A szisztémás amiloidózis (ezen belül az öröklött amiloidózisok közé tartozik a TTR amiloidózis), a lokális amiloidózis (melynek ismert képviselője az Alzheimer-kór) és az átvihető agyi amiloidózis, amely szivacsos agyvelőgyulladást okoz. Az amiloid szálak *in vivo* képződésének általános mechanizmusa jelenleg még nem ismert, ennek következtében ezen betegségekre csak tüneti kezelés létezik, valódi gyógymód még nem. Azonban az amiloid fibrillumok nem csak patológiai ágensként fordulnak elő, hanem normális biológiai aktivitással is rendelkeznek. Ez jelenik meg peptidhormonok tárolása esetében is, amelyek fibrilláris struktúrákban tárolódnak az emberi szervezetben.

4.3 Transztiretin amiloidózis

A transztiretin (TTR) fehérje egy plazmafehérje, melyet elsősorban a máj szintetizál.¹¹ Homotetramer szerkezetű molekula, amely azonos alegységekből épül fel és kiterjedt β -redős szerkezettel rendelkezik, melyben nyolc β -szál két β -lemezt alkot.¹² A fehérje tetramer szerkezete dimerek-dimerjeként értelmezhető, ahol a dimeralegységeit egy kiterjedt hidrogénkötés-hálózat tartja össze. Ez a hálózat egy intermolekuláris β -redőt stabilizál (ezt nevezzük *β -edge* kölcsönható felületnek, amelyet az A és a B lánc és C és a D lánc által alkotott dimerek alkotnak). A két dimer másik két típusú kölcsönható felület révén tetramerizálódik. Az egyik felület fő összetartó kölcsönhatásai hidrofób kontaktusok (ez a *β -cross* kölcsönhatási felület, A:C láncpár, valamint B:D láncpár), míg a másik felületet pár további hidrogénkötés alakít ki (ez a *loop-loop* kölcsönhatási felület, amelyet az A:D láncpár, valamint B:C láncpár). A fehérje szerkezetében megfigyelhető két kötőzseb a hidrofób *β -cross* kölcsönhatási felületen, melyek a tiroxin hormon számára állnak rendelkezésre.

A TTR fehérje által kialakult amiloidózis betegségeknek két nagy csoportját különböztetjük meg. Az időskori szisztémás amiloidózist, illetve az örökletes amiloid polineuropátiát és kardiomiopátiát.¹³

Az időskori szisztémás amiloidózis során a vad típusú TTR fehérje spontán letekeredése, majd aggregációja zajlik.¹⁴ Az egyik leggyakoribb eset, amikor TTR fehérje a szívben képez amiloid

fibrillumokat. Az örökletes amiloid polineuropátia és kardiomiopátia során a TTR fehérje valamilyen módon mutálódik, majd ennek hatására szerkezete destabilizálódik és hamarabb disszociál, majd alakul át amiloid fibrillumokká.¹⁵ Jelenleg több mint 150 ismert TTR mutáns létezik, melyek között nem mindegyik szerkezet amiloidogén. Erre példa a T119M mutáns, melynek esetében a fehérje 119-es treoninja metioninra mutálódik. A megjelent mutációk közül többek között a V30M amiloidogén szerkezetű, ez az a leggyakoribb mutáció, melyet több országban is megfigyeltek már. Ide sorolható a D18E, a V30A, a V20I, és a L55P mutáció is, valamint a V122I, amely az afroamerikai populáció 3%-nál van jelen. A legagresszívabb mutánsként ismert L55P-nél a mutáció megváltoztatja a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetét, növeli a tetramer disszociációs hajlamát. A fehérje pontmutációs variánsainak szerkezeti vizsgálatai során kiderült, hogy a legtöbb esetben ezek a mutációk a fehérje tetramerizációs kölcsönható felületeit befolyásolják, illetve a fehérjék harmadlagos szerkezetének módosulásához vezetnek. Így tehát nem jellemző, hogy a mutáció az amiloid szerkezetének stabilizációja révén gyorsítja az amiloid képződést.

A fehérje különböző mutációinak amiloidogén hajlamát nagymértékben befolyásolja a mutáció típusa is. Neutronkrisztallográfiás vizsgálatokkal kimutatták, hogy a 88-as hisztidin, a 75-ös treonin, a 79-es triptofán, a 112-es szerin, a 113-as prolin és még három vízmolekula egy olyan hidrogénkötés-hálózat tagjai, amelynek fontos szerepe lehet a tercier és a kvaterner szerkezet stabilitásában.¹⁶ A vizsgálatok során az is kiderült, hogy a 88-as hisztidinnak igen nagy szerepe van ezen hidrogénkötés-hálózat fenntartásában. A tanulmány során több azonos pozíciójú mutánst is vizsgáltak: a H88R-t (amely az amiloid kardiomiopátiáért felelős), a H88S-t, a H88Y-t, a H88A-t és a H88F-t. A vizsgálatok során a H88R bizonyult a leginstabilabbnak és a vad típusú TTR-hez képest a legamiloidogénebbnek. A H88R mutáns a TTR többi mutánsához képest is nagyfokú instabilitást mutat, ugyanis nem képes tetramert képezni. A mutációk vizsgálatának eredményeképpen megállapítható, hogy a hidrogénkötés-hálózatot egy hidrofób oldallánc bevezetése (úgy mint a H88A és a H88F esetében) jelentősen stabilizálja a vad típusú fehérjével szemben, míg a poláris hidroxilcsoport (például a H88S esetében) destabilizációt eredményez.

A TTR amiloidózis folyamata a tetramer disszociációjával kezdődik, majd hibásan feltekeredett szerkezetet vesz fel és végül aggregálódik. Az utóbbi években sok tanulmány foglalkozott a TTR állapotainak vizsgálatával, illetve a TTR aggregációs útvonalának feltárásával. Ezek közé tartoznak a TTR aggregációs útvonal oligomerikus állapotainak vizsgálata, proteolízis által kiváltott új aggregációs mechanizmusának vizsgálata, valamint a

köztes struktúrák feltárása. A TTR aggregációs útvonalának oligomerikus állapotainak vizsgálatakor az amiloidózis folyamatát, illetve a kialakult köztes termékek struktúráját kívánták jobban megérteni. A tanulmány során tisztázták, hogy a TTR amiloidózis folyamatának első lépése a tetramer monomerekké bomlása, majd ezt követően ezen monomerek hibás letekeredése nem natív oligomerekké, majd végül amiloid fibrillákká egyesülnek. Ezt követően NMR spektroszkópiával vizsgálták a TTR monomerek strukturális jellemzőit. Ennek során arra a következtetésre jutottak, hogy a monomer TTR is dinamikus szerkezeti jellemzőkkel rendelkezik, amelyek függenek a kísérleti körülményektől. Ezen felül több vizsgálat során, több amiloidogén fehérjében is megfigyeltek aggregációra hajlamos állapotban bizonyos α -lemezeket, melyeket átmeneti másodlagos szerkezeteknek véltek a TTR monomerek aggregációja során.^{17,18} Később molekuladinamikai (MD) szimulációk alátámasztották, hogy a TTR tetramer disszociációja elősegíti az α -lemez struktúrák kialakulását a TTR monomerben. A köztes struktúrák vizsgálatakor egyértelművé vált, hogy a disszociáció során létezik egy dimer állapot, ahol főként hidrogénkötések tartják össze a két dimert, vagyis a korábban már említett β -edge kölcsönható felület valósul meg.¹³ Az eredményekből egyértelműen látszik, hogy a monomerek képződése közvetlenül a tetramerből igen valószínűtlen. Néhány tanulmányban azonban az olvasható, hogy az aggregáció során a TTR monomerré válása után szintén dimerek képződnek, majd ezen dimerek hajlamosak a további aggregációra. A TTR dimerek méretkizárásos kromatográfiás vizsgálatakor azt is észrevették, hogy a dimerek hexamerikus oligomerekké alakulnak, majd később nagyobb heterogén oligomerekké. Cirkuláris dikroizmus-spektroszkópiával is vizsgálták a dimereket és azt állapították meg, hogy rendezetlenebbek mint a vad típusú TTR. Ezen vizsgálatok során egyértelművé vált, hogy a megfigyelt dimer állapot a tetramer disszociációs vagy oligomerizációs folyamatának köztes állapotaként jön létre, azonban a dimerek struktúrája, illetve funkciója még csupán részben ismert.

Ahhoz, hogy érthetőbbé váljon a folyamat mechanizmusa, érdemes lehet a szerkezet stabilizációját és destabilizációját jobban megérteni, azonban a TTR amiloidózis kialakulása és a kialakult amiloid fibrillumok szerkezete kapcsán még rengeteg kérdés merül fel. Bár az amiloidózist kiváltó tényezők közül a fehérje destabilizációjának útvonala sem teljesen tisztázott, azonban a mutációk amiloidózist befolyásoló hatására vonatkozólag vannak eredmények.

Úgy vélik, hogy a mutációk elősegíthetik a fehérje kvaterner szerkezetének destabilizációját. Ezen felül felmerült az a hipotézis is, hogy a mutációk képesek befolyásolni

a tetramer-dimer-monomer egyensúlyokat, melynek következtében amiloidogén köztes termékek alakulhatnak ki, amelyek fibrillumokba rendeződhetnek. A V30M, az L55P és a V122I mutációk esete alátámasztotta ezt az elméletet. A konformációs hipotézis értelmében a molekula kvaterner szerkezete felbomlik és megtörténik az amiloidogén intermedierek képződése. Megállapították azt is, hogy az amiloidogén mutánsok gyorsabb oligomerizációs sebességgel rendelkeznek.

A TTR fibrillek szerkezetének vizsgálata során, amelyek legtöbb esetben a szemből, a szívből és kötőszövetekből eredeztethetőek, azt a megállapítást vonták le, hogy a különböző fibrillek nagyfokú hasonlóságot mutatnak. A megállapítás azért érdekes, mert túlnyomó részben az egy fehérjéhez tartozó amiloid fibrillek között viszonylagosan nagy morfológiai eltérések lehetnek. Ezekre példák a tau¹⁵ és a szinuklein¹⁹ fibrillek.

4.4 Molekuláris dinamika

A molekuláris dinamika (MD) alap gondolata egy molekuláris rendszerben az összes atom pozíciójának, mozgásának és az atomok által egymásra kifejtett erők feltérképezése.²⁰ Az MD szimulációk algoritmusai többek között Newton mozgástörvényeit veszi alapul, melyek segítségével a rendszerben lévő atomok térbeli elhelyezkedése vizsgálható az idő függvényében. A szimuláció során bizonyos időközönként az atomokra ható erőket kiszámítják, majd az erőkből számítható új helyzetekkel és sebességekkel frissül a rendszer. A kapott trajektória értelmezhető háromdimenziós filmként is, mely a rendszerben lévő atomok pozícióját és sebességét tartalmazza a szimulált időintervallum összes időpillanatában.

A legelterjedtebb numerikus differenciálegyenlet-megoldó algoritmusok az MD-ben a Verlet-integrátor és a Velocity-Verlet-integrátor. A Verlet algoritmus alkalmazása során a következő pozíciót az aktuális és az azt megelőző pozíciókból következtetjük ki. Fontos megemlíteni, hogy a részecskék sebessége az aktuális időpillanatban a centrális differencia módszerének segítségével számítható ki. Az ugyanakkor végzett pozíció- és sebességszámítás azonban nem egy azon lépésben értendő, ugyanis a sebesség számítása mindig egy lépéssel lemarad. A folyamatot a szimulációt végző program addig ismétli, amíg a kívánt szimulációs időt el nem érjük. A Verlet algoritmus előnyei közé tartozik az egyszerűsége, a gyorsasága és az, hogy jól képes megőrizni az energiát. A Velocity-Verlet és a *leapfrog* algoritmusok a Verlet algoritmussal szemben explicit módon tartalmazzák a részecskék sebességét. A két módszer azonos pozíció- és sebességfrissítési képlettel operál, azonban a *leapfrog* algoritmusban ez a két mennyiség aszinkronban van egymáshoz képest. A Velocity-Verlet algoritmusban tehát a

sebesség- és pozícióvektorok ugyanazon időpillanatban kerülnek kiszámításra. Ezen algoritmusok előnyei közé sorolható, hogy az egyszerűbb explicit- és implicit-Euler algoritmusokhoz képest jobb numerikus stabilitással rendelkeznek.

Az MD szimuláció elindítása előtt a molekuláris rendszer előkészítése zajlik. Ahhoz, hogy a szimulált rendszer leginkább hasonlítson a kísérleti körülményekhez, figyelembe kell venni különböző fizikai paramétereket (például hőmérséklet és nyomás).^{21,22} Ennek következtében a szimulációkban általában kétféle sokaságot szoktak alkalmazni; a kanonikus (NVT) és az izoterm-izobár (NPT) sokaságot. A szimuláció előkészítésének első lépésében a fehérje kiindulási szerkezetének kiválasztása, illetve a szimuláció paramétereinek beállítása történik. Ekkor határozzuk meg, hogy milyen vízmodellt, illetve milyen erőteret szeretnénk alkalmazni a szimuláció során. A szimuláció indítása előtt a fehérjét egy egységcellába helyezzük és explicit oldószerrel hidratáljuk. Az explicit oldószerrel történő hidratálás előnye az implicit oldószerrel történő hidratálással szemben, hogy pontosabb végeredményt ad. Ezen vízmodellekre példák a TIP3P, a TIP4P, a TIP5P, az SPC, az SPC/E és az OPC. A vízmodellek feladata, hogy valósághűen visszaadják a molekulák hidratburkának tulajdonságait, viselkedését és összetettségét. Emiatt fontos az oldószer dipólusmomentumának, elektrosztatikus árnyékolóképeségének, és a hidrogén-kötés hálózatszerkezetének megfelelő kialakítása. Az explicit oldószer azonban nem minden esetben alkalmazható, ugyanis nagyobb a számítási igénye, mint az implicit szolvatációs eljárásoknak.

Az MD szimulációk során a molekuláris (biomolekuláris) rendszerre ható erőket egy molekuláris mechanikai erőtermodell számításaiból tudhatjuk meg. Többféle erőtermodell alkalmazható, melyek alapjai lehetnek kvantummechanikai számítások, valamint kísérleti mérések. Ezen módszer során azzal a feltételezéssel élünk, hogy a meghatározott erőtérparaméterek nagyobb molekulákra, rendszerekre is interpretálhatóak. Az erőtermodellekkel kapcsolatban fontos megemlíteni, hogy egyik sem alkalmazható univerzálisan minden rendszerre, ezért az eredmények elemzésekor figyelembe kell venni a közelítések következményeként létrejött bizonytalanságokat. A szimuláció során használt erőket két kategóriába sorolhatjuk, aszerint hogy a kölcsönhatás, amit vizsgálunk, kötött vagy sem. A kötött kölcsönhatások belső koordinátái közé tartoznak a kötési hosszúságok, a kötési szögek és a dihedrális szögek. A kötött potenciális tagok jellemzésére általában alkalmazható a harmonikus potenciállal történő megközelítés. A nem kötött kölcsönhatások között szerepelnek a Van der Waals kölcsönhatások és az elektrosztatikus kölcsönhatások. A Van der Waals

kölcsönhatásokat a Lennard-Jones potenciál írja le, míg az elektrosztatikus kölcsönhatások leírására a Coulomb-potenciál szolgál.

A kiindulási szerkezet kiválasztása, illetve az erőter és vízmodell beállítását követően a molekulát elhelyezzük egy korábban már említett egységcellában. A rendszer határán fellépő interakciós problémák elkerülése végett a leggyakrabban periodikus határfeltételt alkalmazunk. A módszer azon alapul, hogy egy végtelen rendszer közelítésére egy kis egységcellát alkalmazunk, mellyel a tér tökéletesen lefedhető. Abban az esetben, ha az egységcellában lévő részecskék valamelyike áthalad az egységcella egyik oldalán, akkor megjelenik a másik oldalon. Így kiküszöbölhető, hogy a részecskék és az őket magába foglaló cella között ne keletkezzenek kölcsönhatások, illetve hogy a részecskék ne érintkezzenek vákuummal. A módszer hátránya azonban az, hogy anizotróp környezetet hoz létre a szimulált fehérje körül. Ezt követően a rendszer össztöltését különböző ionok bevitelével nullára egyenlítjük, valamint a megfelelő ionerősség elérése érdekében beállítjuk a kívánt sókoncentrációt.

A következő két lépésben a rendszer energia-minimalizálása és ekvilibrálnálása, tehát a termosztálása (hőmérséklet beállítása) és barosztálása (nyomás beállítása) történik. Ezen felül a két folyamat alatt zajlik az atomok pozícióinak lekötése is. Az energia-minimalizálásra leggyakrabban alkalmazott módszer a konjugált gradiens módszer, mely a potenciális energiafelület gradiensét alkalmazza. A potenciális energia minimalizáláskor a szögek, illetve a távolságok optimalizálása történik, hogy elkerüljük az irreális kezdeti konfigurációk miatti instabilitásokat. A rendszer ekvilibrálnáláskor a hőmérséklet és a nyomás beállítása zajlik. A rendszer termosztáláskor a rendszer átlaghőmérsékletét állítjuk állandó értékre, amelyet úgy végzünk, hogy az atomok átlagos kinetikus energiáját próbáljuk meg a sebességek változtatásával egy adott érték körül tartani. A termosztálási módszerek kiválasztásakor érdemes figyelembe venni azok pontosságát, ergodicitását, sztochaszticitását, és számítási igényét. Ilyen termosztálási algoritmusokra példák az Andersen-, Berendsen-, Nosé-Hoover-, Langevin-, és a Bussi-Donadio-Parrinello termosztátok. Működésükre példa az atomok sebességeinek periodikus újra-mintavételezése véletlenszerűen a Maxwell-Boltzmann eloszlásból (Andersen-termosztát), vagy a mozgásegyenletek módosítása új tagokkal (Nosé-Hoover termosztát). Az NVT szimulációkor (illetve az ezt megelőző energia-minimalizáláskor is) a hőmérséklet beállítását egyre kevésbé szigorú pozíció-kényszerfeltételek mellett tesszük, hogy elkerüljük az atomok helyvektorainak hirtelen változását. A barosztálás célja a rendszer állandó nyomáson tartása olyan módszerekkel, melyek képesek elérni az izoterm-izobár sokaságot. Ezek kiválasztásánál is fontos figyelembe venni a pontosságot, ergodicitást,

sztochaszticitást és a számítási igényt. Például a Berendsen-barosztatot ezért sem használják túl gyakran, mert csak közelíti az izoterm-izobár sokaságot.

Ezt követően történik a szimuláció elindítása, majd a szimuláció végeztével az eredmények kiértékelése. A kiértékelés során - a kutatás céljától függően - sokféle információt nyerhetünk ki a szimulációból előállított trajektóriából. Vizsgálhatjuk például a szimuláció során a molekula oldószer-hozzáférhetőségét, a szerkezetek egymáshoz képest vett hasonlóságát, az aminosavak mozgékonyágát, hidrogénkötések és egyéb kölcsönhatások jelenlétét, valamint a rendszer teljes energiáját.

Az MD szimulációknak rengeteg felhasználási területe létezik, ezen belül a biomolekuláris dinamikai szimulációk igen nagy csoportot alkotnak. A szimulációk alkalmazási területei közé tartozik a biomolekulák szerkezeti sokszínűségének megismerése, a molekuláris rendszerek termodinamikai tulajdonságainak meghatározása vagy egy adott molekula konformációs sokaságainak feltérképezése.^{23,24} A molekulák szerkezetének megismerése során különböző időskálákon ismerhetjük meg az oldatban lévő molekulák természetes dinamikáját. Feltérképezhetjük továbbá a molekula különböző régióinak mobilitását, rugalmasságát is. A molekulák termodinamikai tulajdonságainak meghatározásakor az ergodikus hipotézis szerint, ha egy molekulát a környezetével egy bizonyos ideig szimulálunk, akkor a szimuláció során keletkezett, időben átlagolt molekuláris tulajdonságok megközelítik a kísérletileg mérhető, sokaságra jellemző egyensúlyi átlagokat. Ezt a módszert használják például a ligandkötések szabadentalpia meghatározásakor. Ezekén túl, az MD szimulációk feltárhatják egy molekula vagy komplex konformációinak termikus stabilitásait is. Például megmutathatja, hogyan reagál a rendszer valamilyen kisebb változtatásra, például mutációra.

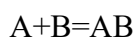
Az MD szimulációk célja a biomolekuláris folyamatok időbeli megfigyelése, valamint ezeknek a szerkezeti alapú megértése olyan eseményekkel kapcsolatban, amelyek kísérleti úton nehezen vizsgálhatóak. Az MD szimulációknak ezen tulajdonságuk miatt nagy szerepük van a gyógyszerfejlesztésben is, ahol a ligandum és a kötőzseb közötti legfontosabb kölcsönhatásokról szerezhető információ.

4.5 Kötési szabadentalpia számítás

A kötődési szabadentalpia számítást a gyógyszer-, illetve a fehérjekutatások során gyakran alkalmazzák, ugyanis ezen módszer segítségével közelíthető a ligand-receptor kölcsönhatás, illetve a több alegységből álló fehérjék kötődési affinitása is.²⁵ A kötődési szabadentalpia számítás során használható módszerek két külön kategóriába sorolhatók:

megkülönböztetjük az egzakt és a végpont-alapú módszereket. Az egzakt módszerek alkalmazásakor a kötődési szabadentalpia számítás közvetlenül a molekuláris dinamikai (MD) szimulációval történik, vagyis minden paraméter az eredeti szimulációból származik. A módszer során lehetőség van a rendszert mind fizikai, mind nem fizikai utakon vezetni egyik termodinamikai állapotból a másikba. A rendszer fizikai úton való vezetését alkalmazzák az ernyőmintavétel és a metadinamikai módszerek esetén, melyek során a mintavételezési úton a ligandum-kötött és -kötetlen állapotok között haladunk. Nem fizikai úton való vezetés történik a termodinamikai integráció (TI) és a szabadenergia-perturbáció (FEP) esetében. Mind a két módszer a pontos kötődési szabadentalpia számítás legszigorúbb megközelítései közé tartozik. Hátrányuk, hogy az ezen módszerekkel történő számítások rendkívül számításigényesek, ezen felül nagyon nehezen konvergálnak numerikusan. Emiatt sok, nem fizikai köztes állapotot kell szimulálni.^{26,27} Ezekkel kontrasztban állnak a pontatlanabb, de kisebb számításigényű, végpont alapú módszerek. Közéjük tartozik a lineáris kölcsönhatási energia (LIE) módszere²⁸, ezen felül a félempirikus és az implicit oldószer alapú *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area* (MM/GBSA) és *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM/PBSA) módszerek²⁹. A végpont-alapú módszerek csak a szabad és a kötött állapotok konformációit mintavételezik, majd különböző utófeldolgozási stratégiákkal számítják a két állapot közti szabadentalpia különbséget. Összességében elmondható, hogy az egzakt módszerek szigorúbbak, ebből kifolyólag időigényesebbek is, ami hátráltatja a gyakorlati alkalmazásukat. A végpont-alapú módszerek ezzel szemben kevésbé pontosak, viszont könnyebben alkalmazhatók.

Az MM/PBSA és az MM/GBSA módszer során a kötési szabadentalpia ΔG_{bind} számítása több konformáción keresztül zajlik, amelyek MD szimuláció során keletkeztek.³⁰ A kötési szabadentalpia számítása történhet a reakció reaktánsainak és termékének szabadentalpiájából:



$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{AB} - (G_A + G_B)$$

valamint közelíthető az alábbi módon:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S$$

A közelítés három komponensre bontható: a molekuláris mechanikai energiára (ΔE_{MM}): amely tartalmazza a kötött energiatagok ΔE_{in} energiáját (azon belül is a kötési-, szög-, és diéderes-

szög hozzájárulásokat), valamint tartalmazza az elektrosztatikus energiát ΔE_{el} , és a Van der Waals energiát ΔE_{vdw} :

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{in} + \Delta E_{el} + \Delta E_{vdw}$$

A ΔG_{sol} becsült hidratációs szabadentalpia-komponensre teljesül, hogy:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{pol} + \Delta G_{npol}$$

amely a poláris hidratációs szabadentalpia (ΔG_{pol}), és a nem poláris hidratációs szabadentalpia (ΔG_{npol}) összegeként kapható. Ezen felül az entrópius hozzájárulás ($-T\Delta S$) a translációs, rotációs és vibrációs szabadsági fokok változásaiból származik.

Az entrópia számítása általában normál módus analízissel történik. A normál módus analízis (NMA) egy olyan technika, amely a fehérjék egyensúlyi szerkezete körüli flexibilis állapotokat írja le.³¹ A módszer alapgondolata, hogy egy egyensúlyi állapotban lévő rezgő rendszer (például egy fehérje az energiaminimum konformációjában) kismértékű perturbációjakor helyreállító erő lép fel, amely visszahozza az elmozdított rendszert az egyensúlyi konformációba. A módszer hátrányai közé tartozik, hogy a kívánt szerkezetet energia-minimalizálni kell, hogy a kezdeti konformáció valóban lokális minimum legyen. A módszer másik hátránya, hogy viszonylag alacsony a prediktív ereje.

A poláris hidratációs szabadentalpiát, attól függően hogy MM/PBSA-t vagy MM/GBSA-t alkalmazunk, a Poisson-Boltzmann egyenlettel vagy az általános Born modellel számítják. A nem poláris hidratációs szabadentalpia-számításakor az oldószer hozzáférhető felület (SASA) alapú megközelítést alkalmazzák. A szolvatációs energiák becslése során implicit oldószermodellt alkalmaznak, ezért minden explicit oldószermolekulát eltávolítanak a trajektóriából. Ahhoz, hogy ez ne okozzon inkonzisztenciát, érdemes lenne a szimulációt ugyanazzal az implicit oldószermodellel végezni, amelyet a szabadenergia kiértékelésekor is használunk, azonban az implicit oldószer hátrányai miatt az inkonzisztencia elkerülhetetlen.

Összességében elmondható, hogy az MM/GBSA és az MM/PBSA kevésbé számításigényesen kezeli a nagyobb rendszereket, mint a TI vagy a FEP, azonban sokkal pontatlanabban is. Egyes tanulmányokban vizsgálták a befolyásoló tényezőket és azt találták, hogy számos paramétertől függ az MM/PBSA és MM/GBSA módszerek előrejelzéseinek pontossága. Többek között az erőtértől, a szerkezetek méretétől, valamint a trajektória hosszától is. A módszerek pontatlanságát nagymértékben befolyásolja az entrópia számításából eredő pontatlanság is.²⁷

5 Célkitűzések

Arra a kérdésre szerettünk volna választ kapni, hogy lehetséges-e vegyes, vad típusú és H88R mutációt is hordozó TTR tetramer kialakulása.

Az is foglalkoztatott bennünket, hogy ha keletkezik is vegyes tetramer, akkor milyen arányban találunk majd benne H88R mutációt, továbbá, hogy mennyire lesz energetikailag stabil ez a tetramer.

Amellett, hogy megpróbáltunk alkalmas *in silico* módszereket alkalmazni, szerettünk volna a kiértékelésnél olyan támpontot meghatározni, ami *in vitro* információt is szolgáltat. Ebből kifolyólag terveztünk egy olyan kísérletet, amelynek az eredményével igazolni tudjuk a szimulációk kiértékelésekor kapott eredményeket.

6 Alkalmazott módszerek

6.1 Kísérleti hozzájárulások

A kutatás során hét molekuladinamikai szimuláció eredményét vettük alapul. Ezen szimulációk, valamint ezek kiértékelése között akadnak olyan adatok, amelyek nem az én munkámon alapulnak. A vad típusú TTR tetramer, valamint a négy H88R mutációval rendelkező TTR tetramer fehérje MD szimulációja *Karancsiné Menyhárt Dóra* és *Bódy István* munkája.

Az egy H88R mutációt tartalmazó TTR tetramer mutációja, szimulációjának kiértékelése, illetve a hozzá tartozó MM/GBSA analízis *Fazekas Zsolt* munkája.

Az *in vitro* kísérleten felváltva, illetve egyszerre dolgoztunk *Bódy Istvánnal*.

A tömegspektrometriás mérések lebonyolításában *Papp Dávid* vezetésével vehettem részt.

Munkájukat ezúton is köszönöm.

6.2 A fehérje szerkezete és mutációja

A szimulációkhoz használt TTR fehérje szerkezetét a *Protein Data Bankból*³² töltöttük le, melynek PDB kódja: 2QGB³³. A mutációk beviteléhez a *PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0.4 Schrödinger, LLC* alkalmazást használtuk.

6.3 *In silico* kísérleti körülmények

6.3.1 MD szimulációk

A fehérjék molekuladinamikai szimulációihoz a GROMACS 2022.3-as szoftvercsomagot használtuk. Ezen belül az összes szimulációnál az AMBER99SB-ILDNP-star erőter mellett végeztünk számításokat. A fehérje hidratálásakor, valamint az egységcellába tételekor OPC vízmodellt és dodekaéder alakú egységcellát alkalmaztunk. A fehérje az egységcella közepére került, a cella és a fehérje közti távolságot pedig úgy határoztuk meg, hogy az legalább 1 nm legyen. Az ionokat egy általánosan bevett *mdp* fájlal generáltuk. Nátrium- és kloridionokat tettünk a rendszerbe, melyek koncentrációja 0,15 M volt. Ezen felül arra is figyeltünk, hogy a rendszer össztöltése 0 legyen. Következő lépésként elvégeztük a rendszer energia-minimalizálását konjugált gradiens módszerrel, különböző erőállandójú pozíciókényszerek mellett: 1000, 500, 100, 0 kJ·mol⁻¹·nm⁻². Konvergencia-kritériumként a maximális erőt 50 kJ·mol⁻¹·nm⁻¹ értékre állítottuk be. A rendszer ekvilibráálásakor először kanonikus sokaságon

szimuláltunk (NVT), 310 K-en, a *leapfrog* integrátort alkalmazva. 50 000 lépést végeztünk 2 fs-os lépésközzel, illetve itt is 1000, 500, 100 és 0 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ -es pozíciókényszereket alkalmaztunk. Ezt követően a nyomás beállítására egy rövid izoterm-izobár (NPT) szimulációt futtattunk. A rendszer termosztálására a GROMACS által kínált *V-rescale*-t, a barosztálására a *Parrinello-Rahman barosztátot* alkalmaztuk. Az MD szimulációkor izoterm-izobár sokaságon (NPT) szimuláltunk 1000 ns-ig.

6.3.2 MD szimulációk analízise

Az analízis első lépéseként mindig készítettünk egy index fájlt, amelyben definiáltuk a fehérje egyes láncait, valamint egy általunk kiválasztott, viszonylag a komplex közepén elhelyezkedő atomot. Ezt követően centráltuk a fehérjét a kiválasztott atomra, ami a fehérje elhelyezését jelentette a doboz közepére minden időpillanatban. Ezt a lépést a fehérje Brown-mozgása miatt hajtottuk végre. A trajektóriát ugyanezen lépéssel vízmentesítettük is. Ezen lépéseket követően kezdtük meg az analíziseket. Minden trajektória esetében végeztünk RMSD analízist (*Root Mean Squared Deviation*, ahol az atomok átlagos eltérését vizsgáltuk), valamint SASA analízist (*Solvent Accessible Surface Area*, ahol a fehérje oldószer-hozzáférhetőségét vizsgáltuk), ezeken felül vizsgáltuk a hidrogén kötések számát, illetve MM/GBSA algoritmus segítségével számítottunk kötési szabadentalpiát dimer párok disszociációs/asszociációs reakciója mentén. Az RMSD analízis esetében *Mainchain* + C_{β} csoportot alkalmaztuk, valamint az RMSD és SASA analízis esetében is 100 ps-os mintavételezési időt határoztunk meg. A hidrogén kötések vizsgálata esetében 2,6 Å-ös maximum távolságot határoztunk meg a donor és az akceptor atomok között. A hidrogénatom, a donor és az akceptor atomok által meghatározott szögnek pedig kisebbnek kellett lennie, mint 50° (különben a program nem érzékelt hidrogénkötésnek). Itt is 100 ps-onként történt mintavételezés a szükséges analízishez. A kötési szabadentalpia számításakor a *gmX_MMPBSA* szoftver v1.6.3-s verzióját használtuk, ami az *MMPBSA.py* v.16.0 szoftveren alapul. A *Generalized Born* számításokat a GB-OBC1 formátumú módszerrel végeztük.³⁴ Erőterként az "oldff/leaprc.ff99SBildn" erőteret használtuk. A szimuláció által megkapott eredmények, 25 °C-ra vonatkoznak. Az analízist 200 ns-tól, az 50 000-dik trajektória egységtől, 1 000 ns-ig, a 250 000. trajektória egységig néztük 100 ps-os időközönként, azaz 8001 komplex trajektória egységet elemeztünk. A 200 ns-os kezdőpontot úgy határoztuk meg, hogy megvizsgáltuk az RMSD és SASA görbék alapján, hogy az egyes trajektóriák mikor konvergáltak. Emellett figyelembe vettük a kezdő időpillanat kiválasztásakor azt is, hogy ne veszítsünk el sok értékes adatot sem. Így kaptuk meg a 200 ns-os konszenzus kezdőpillanatot. Az entrópia számításhoz szükséges normálmódus analízis esetében az első trajektória-

pillanatfelvétellel kezdtük meg az elemzést, egészen a 8000. trajektória pillanatfelvételéig, 800-as lépésközzel, ezáltal 10 trajektória egységet elemeztünk. A fehérjét kölcsönhatási felületek szerint felosztottuk 3-3 dimer-dimer párra, melyek 3 különböző dimerizációs módot határoznak meg. A megegyező kölcsönhatási felülettel rendelkező dimer párokat csoportosítottuk és így indítottuk el az MM/GBSA számításokat.

6.4 *In vitro* kísérleti körülmények

A kísérletünkhöz vad típusú és H88R mutáns TTR-t állítottunk elő azonos módon, rekombináns technológiával. A fehérjét GST-TTR fúziós fehérjeként állítottuk elő. A tisztítás megfelelő pontján a GST fehérjétől trombinos hasítással szabadultunk meg. A fejezetben megjelenő egyes keverékek receptjei a függelékben találhatóak.

6.4.1 Expresszió

6.4.1.1 Oltókultúra készítés

Az előzőleg transzformált és -80 °C hőmérsékleten tárolt sejtekből egy aliquotot jégen felengedtünk, majd a sejtsuszpenzióból 100 µl mértünk be steril fülke alatt autoklávozott, 50 ml LB (Luria-Bertani) tápoldatot tartalmazó rázóflaskába. A tápoldathoz továbbá 50 µl 100 mg/ml koncentrációjú ampicillint adtunk szelekciós ágensnek. Az oltókultúrát 32 °C-on történő rázással inkubáltuk másnap reggelig.

6.4.1.2 Termelés

Az oltókultúra indításával egy napon 1 l TB („*Terrific Broth*”) tápoldatot kevertünk, majd autoklávban sterilizáltuk. A termelés reggelén a steril fülke alatt hozzáadtuk az oltókultúránkat, 1 ml 100 mg/ml koncentrációjú ampicilin oldatot, és rázóinkubátorban 37 °C-on inkubáltuk. A sejtpopuláció növekedését spektrofotométerrel követtük, a 600 nm-en mért abszorbancia értékét mérve. Addig inkubáltuk a sejt kultúrát, amíg az abszorbancia el nem érte 600 nm-en a 0,7-et. Ekkor az expresszió elindításához 1 ml 0,1 mM IPTG-t adtunk az oldathoz. Az indukált sejt kultúrát másnapig 28 °C-on ráztuk tovább.

6.4.2 Tisztítás

6.4.2.1 Feltárás

A termelés másnapján a sejtsuszpenziót lecentrifugáltuk 4500 rpm-en (3780 g), 10 percen keresztül, 4 °C-on a sejtek fermentlétől való elválasztása céljából. A centrifugálás után a felülúszót leöntve, a leülepedett sejteket 35 ml natív feltáró pufferben felszuszpendáltuk. A sejtsuszpenziót 50 ml-es főzőpohárban jégfürdőbe állítva szonikáltuk az oldatot 2×3 percig

közepes amplitúdóval, 50%-os kitöltési tényezővel. A szonikálást követően a feltárt sejteket lecentrifugáltuk 16 000 rpm-en (30 6300 g) 20 percen keresztül, 4 °C-ra hűtött rotorban. A centrifugálás végeztével a sejtízátum felülúszóját egy redős szűrőpapíron keresztül átszűrtük, majd még egyszer átszűrtük egy 0,45 µm-es fecskendőszűrőn egy Falcon csőbe.

6.4.2.2 Affinitás kromatográfia

Az affinitás kromatográfiát egy Bio-Rad NGC készülékkel végeztük, amely automata mintaszedővel rendelkezik. A minta pufferével azonos összetételű natív feltárót használtunk 2 mM DTT-vel kiegészítve az oszlop ekvillibrálására, a minta felvitelére és a mosásra (A puffer). Készítettünk ezen felül egy 100 ml elúciós puffert is, amely natív feltárót és 20 mM glutationt tartalmazott (B puffer). A méréshez 2 darab 5 ml-es GST oszlopot használtunk: GSTrap FF 5 ml, (Cytiva). A tisztítási művelet során 5 oszloptérfogatnyi A pufferrel, 5 ml/perc áramlási sebességgel ekvilibráltuk az oszlopokat, majd felvittük az oszlopra az átszűrt sejtízátumot 0,8 ml/perc sebességgel. A mintafelvitel után 5 oszloptérfogat A pufferrel mostuk az oszlopot 5 ml/perc sebességgel. Az elúció során 5 oszloptérfogat B pufferrel leszorítottuk a GST címkénél fogva kitapadt fehérjét az oszlopokról, melyeket 5 ml-es frakciónként elkülönítettünk.

6.4.2.3 Gélelektroforézis

Az affinitás kromatográfia után és a további elválasztási lépések között is denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) azonosítottuk a terméket tartalmazó frakciókat, továbbá az emésztés sikerességét, illetve termék tisztaságát vizsgáltuk. Első lépésként SDS-PAGE gél-t öntöttünk a gyártó receptje szerint (TurboMix™ Bis-Tris Del Casting Kit). Ezt követően azokból a frakciókból, melyben látszott a kromatogram alapján, hogy van fehérje, Eppendorf csövekbe pipettáztunk 10-10 µl-t, majd hozzájuk adtunk szintén 10-10 µl 2x SDS fehérjekezelőt (Laemmli-puffert). Ezeket a mintákat 70 °C-on 10 percig kezeltük. Ezalatt az idő alatt összeállítottuk a gélfuttató kádat, beleraktuk a gél-t, valamint feltöltöttük MES pufferrel. 10 perc letelte után az első zsebbe Hamilton fecskendővel 5 µl PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, (Thermo) létrát fecskendeztünk, majd ezt követően az Eppendorf csövek tartalmából is 5-5 µl-eket fecskendeztünk a gél zsebeibe. Amikor mindennel elkészültünk 140 V-os feszültséget kapcsoltunk a futtatókádra és 60 perces időzítőt állítottunk be. 5 perc elteltével 180 V-ra emeltük a feszültséget. A 60 perc végeztével ultratiszta ioncserélt vízben mostuk a gél-t és ReadyBlue Protein Gel Stain festékben megfestettük. A fúziós terméket a gélképen 40 kDa-nál vártuk.

6.4.2.4 Dialízis és emésztés

Mivel a később lehasított GST címkétől szintén affinitás kromatográfiával kívántunk megszabadulni, ezért el kellett távolítani a mintából a glutationt a GST sikeres kötődése érdekében. A GST nagy glutation affinitása miatt ($K_d < 10^{-9}$) jelentős hígulás elérése volt a cél a glutationra nézve. A fúziós fehérjét tartalmazó frakciók összeöntésével kapott fehérje oldattal (~50 ml) összesen 5 dialízist végeztünk, ehhez 5 l natív feltárási puffert kevertünk, és 2 mM DTT-t adtunk hozzá, valamint az aggregáció lassítása érdekében 50-50 mM L-glutaminsavat és L-Arginint. Egy dialízis legkevesebb 2, maximum 16 óráig tartott intenzív kevertetés közben. Az utolsó, vagyis az 5. dialízis előtt megmértük az oldat koncentrációját spektrofotométerrel, 280 nm-en mért abszorbancia alapján. Ez után 1/500 térfogatrésznyi trombint (marhaszérumból származó; Thermo; 1 U/μl aktivitású) adtunk a fehérje oldatunkhoz, abból a célból, hogy specifikusan elhasítsuk fúziós termékünket a GST és TTR között található kapocs szekvenciánál. Ezt követően ismét dializálni kezdtük az oldatot. Az utolsó dialízist követően ismét SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztük a hasítás eredményességét.

6.4.2.5 Fordított módú affinitás kromatográfia

A lehasított GST címkétől affinitás kromatográfiás lépésben szabadultunk meg az első affinitás kromatográfiás lépésnél leírt módon azzal a különbséggel, hogy ezúttal a TTR termékünk a mintafelvétel során átesett az oszlopon, így ezeket a frakciókat gyűjtöttük.

6.4.2.6 Preparatív méretkizárásos kromatográfia

A méretkizárásos kromatográfiát, SEC-et (*size-exclusion chromatography*) a tisztítás utolsó lépéseként használtuk. Ismételt FPLC készüléken dolgoztunk, viszont ebben az esetben HiLoad 16/600 Superdex 75pg oszlopot alkalmaztunk. Az oszlopot foszfát pufferelt sóoldattal (PBS) ekvilibráltuk és 1 ml/perc áramlással használtuk. A TTR-t tartalmazó mintát ultraszűrő centrifugálással töményítettük be (5000 g; 10 kDa-os vágású 15 ml-es cső; Merck) 3 ml alá, amelyet mintahurokból injektáltunk az oszlopra. 1,5 oszloptérfogatnyi PBS-sel kromatografáltunk, 0,3 és 1 oszloptérfogat között 4 ml-es frakciókat szedve. A 280 nm-en detektált kromatogram alapján fehérjét tartalmazó frakciókat SDS-PAGE gélelektroforézissel vizsgáltuk. A tisztán TTR-t tartalmazó, natív méretű (wt tetramer, H88R monomer), nem aggregált frakciókat összeöntöttük, aliquotoltuk, folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk a használatig.

6.4.3 Vegyes tetramer képzési kísérlet

A vegyes tetramer képződés vizsgálatához H88R és vad típusú TTR-t egyenként 0,6 mg/ml koncentrációban tartalmazó oldatot készítettünk PBS pufferben, és kiegészítettük 50 μ M nátrium-aziddal és 1 μ M DTT-vel, 1,67 ml végtérfogatban. Kontrollkísérletnek azonos körülmények között csak vad típusú és csak H88R mutáns tartalmazó oldatokat készítettünk. A mintákat 37 °C-on egy hétig inkubáltuk. Ennek meghatározása abból az adatból indult ki, miszerint a vad típusú TTR tetramerben megközelítőleg 48 óra alatt képes egy vad típusú lánc H88R mutált láncra kicserélődni. Annak érdekében, hogy a háromszorosan H88R mutált TTR is létrejöhessen ezt az időértéket megszoroztuk hárommal, így kaptuk meg a közel egy hetes inkubálási időt. Az inkubálást követően méretkizárásos kromatográfiával elválasztottuk az aggregátum, monomer és tetramer frakciókat.

6.4.4 Analitikai méretkizárásos kromatográfia

A vegyes tetramer képződés vizsgálatánál a kisebb fehérjeminták miatt Superdex 75 pg 10/300 oszlopot használtunk. A PBS puffer áramlási sebességét 0,75 ml/percnek választottuk. A mintákat 10 kDa-os ultraszűrő centrifuga csövekkel töményítettük 0,3 ml-re, ezt injektáltuk az oszlopra. A legnagyobb anyagvisszanyerés és töménység eléréséhez a frakciókat 280 nm-en detektált kromatogram alapján, kézi vezérléssel határoztuk meg (ezzel kompenzáltuk a frakciószedő holt térfogatát).

6.4.5 Tömegspektrometria

6.4.5.1 Előkészítés

Összesen négy mintát mértünk meg, két H88R és vad típus keverékéből származó tetramer frakciót (3), (4), egy csak vad típust tartalmazó tetramer frakciót (66), illetve egy nem inkubált H88R mintát is (0). A minták előkészítése során megmértük ezek koncentrációját, majd mindegyiknek 10 μ g-nak megfelelő mennyiségű fehérjeoldatot mértünk ki (1. táblázat).

1. táblázat A különböző fehérjeminták koncentrációját, valamint térfogatát tartalmazó táblázat.

Minták	Koncentráció	Kimért térfogat
H88R, nem inkubált (0)	1 mg/ml	10µl
H88R-t és vad típust is tartalmazó frakció (3)	0,331 mg/ml	30 µl
H88R-t és vad típust is tartalmazó frakció (4)	0,594 mg/ml	17µl
vad típus frakció (66)	0,367 mg/ml	27 µl

A minták térfogatát szükség szerint 30 µl-re egészítettük ki. A megfelelő térfogatok kimérése után mindegyik oldathoz 3 µl 0.5 %-os *Rapigest* detergens oldatot adtunk. A mintákat ezt követően (mivel a fehérjék nem tartalmaztak diszulfidhidakat) közvetlenül emésztettük úgy, hogy 1:25 enzim : fehérje tömegarányban tripszint adtunk a mintákhoz. Ezt követően 37 °C-on 300 rpm-en ráztuk egy Eppendorf Thermomixer C készülékben a mintákat egy éjszakán át (*overnight*), ezzel elősegítve az emésztést. Az emésztést követően 3,5 µl 10 V/V%-os hangyasavoldatot adtunk az összes fehérjeoldathoz. Ezt követően ekvibráltuk a mintákat 2 % TFA (trifluorecetsav)-t és 20 % ACN (acetonitril) tartalmazó minta puffer oldattal 0,5 % TFA és 5 % ACN összetételre előkészítve őket a spin oszloposításra. A Thermo Scientific™ Pierce™ C18 Spin oszlopokat aktiváltuk 150 µl 50 % ACN-t tartalmazó aktiváló folyadékkal, centrifugával, 1 percen keresztül, 20°C-on 1500 rcf-en. Ezt megismételtük, majd ekvibráltuk az oszlopot 0,5 % TFA-t és 5 % ACN-t tartalmazó ekvibráló/mosó folyadékkal, szintén centrifugálással, a fellebb említettek szerint, kétszer ismételve. Ezt követte a minta felvitele az oszlopra, szintén centrifugálással, majd az eluált oldatokat újra felvittük és centrifugáltuk. A mintafelvétel után jött a mosási lépés 150 µl 0,5 % TFA-t és 5 % ACN-t tartalmazó ekvibráló/mosó folyadékkal, centrifugával, kétszeres ismétléssel. Ezzel a lépéssel leeluáltuk a retencióval nem rendelkező komponenseket és sóalanítottuk a mintákat. Utolsó lépésként pedig eluáltuk a peptideinket, 20 µl 70 % ACN-t tartalmazó elúciós pufferrel, centrifugálva, kétszer ismételve. A peptidoldatokat Eppendorf Concentrator plus vákuumbepárló segítségével bepároltuk 45°C-on.

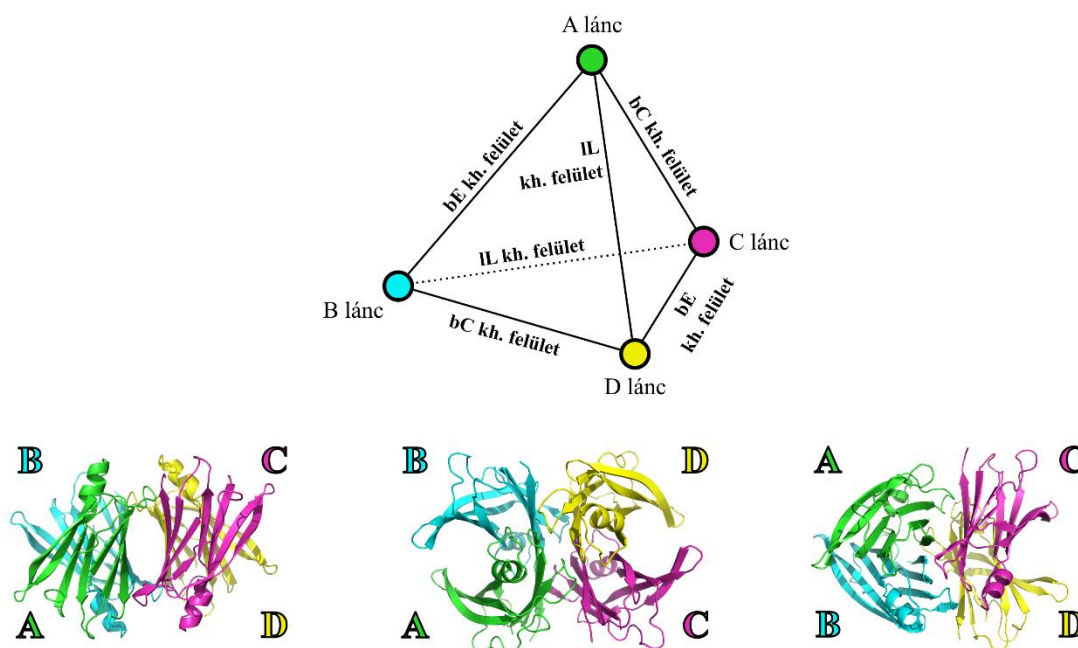
6.4.5.2 Mérés

A peptidtérképezéshez a bepárolt mintákat újraoldottuk 20 μ l 5% ACN/H₂O-ben és 10 μ l-t injektáltunk. Az LC-ESI-MS (Q-TOF) mérési paraméterek a függelékben (7. táblázat), a gradiens táblázat és a gradiens a (8. táblázat) látható. A méréseket egy Waters Acquity I-Class Plus UPLC-vel kapcsolt Waters SELECT Series Cyclic IMS (Waters Corporation, Milford, MA) tömegspektrométeren végeztük. A peptidtérképezéshez használt oszlop egy Waters Acquity UPLC® Peptide CSH™ C18 130 Å 1.7 μ m 1mm x 150mm volt.

7 Eredmények és kiértékelésük

7.1 Alapadatok

A TTR tetramer különböző mutánsaiból 7 MD szimulációt indítottunk: a vad típusú homotetramerről (0x), az egy mutánst tartalmazó (1x), a két mutánst *beta-edge* kölcsönhatási felületen kapcsoló (2x, bE), a két mutánst *beta-cross* kölcsönhatási felületen kapcsoló (2x, bC), a két mutánst *loop-loop* kölcsönhatási felületen kapcsoló (2x, IL), a három mutánst tartalmazó (3x) heterotetramerről és a teljesen mutáns homotetramerről (4x). Az MM/GBSA analízisek során, mivel minden esetben mind a három kölcsönhatási felületre számoltunk ΔG értékeket, összesen $7 \cdot 3 = 21$ eredményünk lett. A számított szabadentalpia értékek a dimerek tetramerré való asszociációjára vonatkoztak. Ezeken felül fontos még megemlíteni a nómenklatúrát, amelyet a mérések kiértékelése során alkalmaztunk. A kölcsönhatási felületekre vonatkozó elnevezések a következők: *beta-edge* = bE, *beta-cross* = bC, *loop-loop* = IL (2. ábra).



2. ábra A TTR fehérjében lévő kölcsönhatási felületek kapcsolata látható a felső tetraéder ábrán. Az alsó sorban a TTR fehérje láncai láthatók különböző színekkel, továbbá a láncpárok által alkotott interfészek. Az A lánc zöld, a B lánc kék, a C lánc lila és a D lánc sárga színű. A láncokat az alábbi ábrán látható módon párokba rendeztük. Ezen párosítások által meghatároztuk a fehérje szerkezetében megfigyelhető 3 különböző kölcsönhatási felületet. Az A-B, valamint a C-D lánc alkotja a *beta-edge* kölcsönhatási felületet, az A-C és a B-D hozza létre a *beta-cross* kölcsönhatási felületet, illetve az A-D és a B-C láncpárokból áll a *loop-loop* kölcsönhatási felület, melyek ebben a sorrendben az ábrán is láthatóak.

Annak érdekében, hogy ki tudjuk fejezni, hogy az adott kölcsönhatási felületen, illetve a tetramerben mennyi mutáció helyezkedik el, további jelöléseket vezettünk még be. Megkülönböztettük a mutációval nem-, az egy mutációval- és a két mutációval rendelkező kölcsönhatási felületeket, valamint a mutációval nem-, egy, két, három és négy mutációval rendelkező tetramereket. Így a kölcsönhatási felületek esetében feltüntettük a kölcsönhatási felület nevét, majd a mutációk számát (például: a vad típusú TTR *beta-edge* kölcsönhatási felülete = bE0x). A dimerek tetramerré történő asszociációs reakciók esetében a jelölésünk a következő volt:

[dimerekben lévő kölcsönhatási felület neve]: [mutációk száma a kapott tetramerben, majd, ha szükséges, akkor melyik kölcsönhatási felületen van a mutáció]

Példa ilyenre a [bE]:[2x, bC], ami két bE mentén komplexálódott dimer összeállására vonatkozó reakciót jelöl, melynek során egy bC típusú dupla mutáns tetramer keletkezik.

7.2 MM/GBSA eredmények

7.2.1 Nyers MM/GBSA eredmények

2. táblázat A táblázatban az MM/GBSA szimulációkból származó ΔH , $-T\Delta S$ és a ΔG eredményeket tüntettük fel az adott tetramer kölcsönhatási felületeire. Az adatok mellett közvetlenül a becsült hibaértékek találhatók, amelyeket a program adott meg.

Reakciók	ΔH (kcal/mol)	$\sigma(\Delta H)$ (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	$\sigma(-T\Delta S)$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	$\sigma(\Delta G)$ (kcal/mol)
[bE]:[0x]	-100,68	6,80	47,92	7,15	-52,76	9,87
[bC]:[0x]	-235,85	10,31	89,13	8,95	-146,72	13,65
[IL]:[0x]	-202,56	9,74	91,70	8,75	-110,86	13,09
[bE]:[1x]	-97,85	6,09	51,86	8,85	-45,99	10,74
[bC]:[1x]	-180,70	11,75	82,91	10,55	-97,79	15,79
[IL]:[1x]	-157,17	11,37	93,19	9,87	-63,98	15,06
[bE]:[2x, bE]	-103,17	6,88	45,72	4,34	-57,45	8,13
[bC]:[2x, bE]	-233,60	10,61	83,30	13,23	-150,30	16,96
[IL]:[2x, bE]	-205,55	9,97	89,17	11,76	-116,38	15,42
[bE]:[2x, bC]	-106,07	10,71	53,02	8,53	-53,05	13,69
[bC]:[2x, bC]	-237,30	10,58	81,19	7,08	-156,11	12,73
[IL]:[2x, bC]	-211,09	10,99	91,88	7,66	-119,21	13,40
[bE]:[2x, IL]	-102,66	6,82	46,58	5,41	-56,08	8,71
[bC]:[2x, IL]	-230,73	10,81	87,37	9,23	-143,36	14,21
[IL]:[2x, IL]	-204,75	11,27	92,05	13,05	-112,70	17,24
[bE]:[3x]	-105,07	6,97	47,93	5,69	-57,14	9,00
[bC]:[3x]	-202,11	9,68	85,52	8,76	-116,59	13,06
[IL]:[3x]	-190,63	9,69	93,31	4,38	-97,32	10,63
[bE]:[4x]	-91,75	7,36	53,89	7,70	-37,86	10,65
[bC]:[4x]	-169,39	10,71	83,22	10,03	-86,17	16,11
[IL]:[4x]	-148,23	11,92	96,12	6,34	-52,11	13,50

7.2.2 MM/GBSA eredmények kiértékelése

Az eredmények kiértékeléséhez különböző modelleket próbáltunk felállítani, amelyekkel egyre pontosabb közelítéseket kaptunk. A modellek alapját képezte az a feltételezés, miszerint a komplexképződés során képződő ΔG -t megkaphatjuk a különböző hatásokhoz, illetve komponensekhez tartozó ΔG értékek lineáris kombinációjából. Ezt követően azonosítottuk ezen komponenseket, valamint ezek számának változását a különböző reakciókra. Ezekre egy lineáris regressziós modellt oldottunk meg, melynek eredményeképp minden komponenshez hozzárendeltünk egy ΔG értéket. A modelljeink összetettségét a lineáris illesztés paramétereinek száma határozta meg, ami esetünkben maximum 21 volt, ugyanis 21 mérési adat állt rendelkezésünkre. Figyelembe vettük azonban azt is, hogy bár az egyszerűbb modellekből származó tendenciák könnyebben általánosíthatók, azonban magasabb illesztési hibát mutatnak a több paraméteres modellekhez képest. A modellek által létrejött illesztéseket az MM/GBSA szimulációból létrejött ΔG értékekhez viszonyított négyzetes átlagos hibával jellemeztük. Három modellt állítottunk fel, melyek közül az első megközelítés számított a legegyszerűbbnek, a harmadik a legösszetettebbnek.

Az első modellben három komponenst különböztettünk csak meg: a bE, a bC és a IL kölcsönhatási felület képződését, figyelmen kívül hagyva azt az információt, hogy van-e mutáció az adott kölcsönhatási felületen, vagy nincs. Az alábbi módon minden dimer asszociációs reakció leírható 2-2 különböző kölcsönhatási felület képződésével, például a [bC]:[1x] reakció során 2 bE és 2 IL kölcsönhatási felület alakul ki, az asszociációs ΔG közelíthető ezen két érték összegének a kétszeresével:

$$\Delta G([bC]:[1x]) \approx 2 \Delta G(bE) + 2 \Delta G(IL)$$

Ez a megközelítés arra használható, hogy egy átlagos becslést adjunk a kölcsönhatási felület-energiákra. A modell nem elég szofisztikált ahhoz, hogy a mutáció hatásáról bármit állítson, de a prediktív ereje sokkal nagyobb egy kölcsönhatási felület típus kötődési energiájával kapcsolatban (*bias-variance tradeoff*).

A második megközelítésben már megkülönböztettük a különböző kölcsönhatási felületeket annak függvényében, hogy az őket alkotó láncok tartalmazznak-e mutációkat és ha igen, akkor mennyit. Így már 9 különböző komponenst tudtunk definiálni: bE0x, bE1x, bE2x, bC0x, bC1x, bC2x, IL0x, IL1x, IL2x. Az előbb példaként felírt reakció ezt követően az alábbira módosul:

$$\Delta G([bC]:[1x]) \approx \Delta G(bE1x) + \Delta G(bE0x) + \Delta G(IL1x) + \Delta G(IL0x)$$

Megjegyzendő, hogy ez a közelítés pontosabban írja le a rendszert, azonban még ez a modell is figyelmen kívül hagyja az allosztérikus hatásokat, amelyeket egyik alegység egy adott kölcsönhatási felületen keresztül gyakorolhat a másakra. Ezeknek a figyelembevételét különböző megközelítésekkel meg lehetne valósítani, azonban ha csak a dimer asszociációs reakciókat tekintjük alapul, mindegyik esetben a lineáris egyenletrendszer szingulárisná válna.

A harmadik megközelítésben minden kölcsönhatási felületet csak az adott komplex kontextusában vizsgáltunk. Ez a megközelítés tekinthető az első megközelítés függetlenített változatának. Ennek során 21 paramétert kapunk, melyből következik, hogy az eredmények esetében nem kapunk becslést az illesztési hibára. Mivel a kölcsönhatási felület-energiák különböző komplextípusokhoz kötöttek, prediktív ereje nincs ennek a modellnek más komplexekre nézve. A megközelítéssel felírhatjuk a ΔG -t mind a 7 tetramer mind a három kölcsönhatási felületére, például a vad típusra:

$$\Delta G([bE]:[0x]) = 2 \Delta G(bc0x) + 2 \Delta G(IL0x)$$

$$\Delta G([bC]:[0x]) = 2 \Delta G(bE0x) + 2 \Delta G(IL0x)$$

$$\Delta G([IL]:[0x]) = 2 \Delta G(bE0x) + 2 \Delta G(bc0x)$$

ahol a $\Delta G(bE0x)$, $\Delta G(bc0x)$ és $\Delta G(IL0x)$ az adott komplexhez (itt $0x$) tartozó kölcsönhatási felület energiák.

7.2.3 Megoldás és eredmények

Az összes megközelítés során a súlyozott Moor-Penrose pszeudoinverz módszert alkalmaztuk az egyenletrendszerek megoldására. Két oszlopvektort definiáltunk, az $\mathbf{x}$ vektor a különböző komponensekhez tartozó ΔG értékeket tartalmazta, míg az $\mathbf{y}$ vektor egy 21 dimenziós oszlopvektor, amely a különböző dimer asszociációs reakciókhoz tartozó ΔG értékeket tartalmazza. Ezeken felül definiáltunk még egy $\mathbf{A}$ modellmátrixot, amely a komponens-változások számát tartalmazza. A következő súlyozott legkisebb négyzetes hiba keresésével igyekeztünk közelíteni $\mathbf{y}$ -t:

$$\mathbf{x} = \operatorname{argmin}_{\mathbf{x}'} \operatorname{Err}(\mathbf{x}', \mathbf{y}) = \operatorname{argmin}_{\mathbf{x}'} (\mathbf{Ax}' - \mathbf{y})^T \mathbf{W} (\mathbf{Ax}' - \mathbf{y})$$

ahol $\mathbf{W}$ mátrix egy diagonális mátrix, amely tartalmazza az egyes asszociációs reakciókra vonatkozó $1/\sigma^2(\Delta G)$ inverz varianciaértékeket. Ebből az alábbi vezethető le:

$$\mathbf{Ax} \approx \mathbf{y}$$

$$\mathbf{WAx} \approx \mathbf{Wy}$$

$$\mathbf{A}^T \mathbf{W} \mathbf{A} \mathbf{x} = \mathbf{A}^T \mathbf{W} \mathbf{y}$$

$$\mathbf{x} = (\mathbf{A}^T \mathbf{W} \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{W} \mathbf{y} = \mathbf{B} \mathbf{y}$$

A hibaterjedés szabályait követve levezethető a következő képlet az $\mathbf{x}$ vektor $\mathbf{S}(\mathbf{x})$ variancia-kovariancia mátrixára:

$$\mathbf{S}(\mathbf{x}) = (\mathbf{A}^T \mathbf{W} \mathbf{A})^{-1}$$

A modellilleszkedés minőségét egy χ^2_v faktorról is korrigáltuk³⁵, így az ebből következő varianciabecslés:

$$\mathbf{S}_{\text{corr}}(\mathbf{x}) = \chi^2_v (\mathbf{A}^T \mathbf{W} \mathbf{A})^{-1}$$

$$\chi^2_v = \text{Err}(\mathbf{x}, \mathbf{y}) / (n - p)$$

ahol $n = 21$ az egyenletek számát, p a modell paramétereinek számát és $v = n - p$ a szabadsági fokok számát jelöli. (Általánosságban elmondható, hogy ha $\chi^2_v > 1$, akkor az alulillesztésre, míg ha $\chi^2_v < 1$, akkor pedig túlillesztésre utal.)

7.2.3.1 Az első megközelítés eredményei

Ebben az esetben az $\mathbf{A}$ mátrix egy 21×3 -as mátrix, amely 7 azonos blokkot tartalmaz: $[[0, 2, 2], [2, 0, 2], [2, 2, 0]]$. A modell paraméterei az $\mathbf{x}$ vektorban találhatók, $\mathbf{x} = [\Delta G(\text{bE}), \Delta G(\text{bC}), \Delta G(\text{IL})]^T$. A szabadsági fokok száma, tehát $(n - p)$ értéke 18. Az alábbi eredményeket kaptuk (3. táblázat):

3. táblázat Az első közelítés ΔG eredményeit tartalmazza a megadott komponensekre vonatkoztatva, valamint ezen értékek számított hibáját.

Komponensek	ΔG (kcal/mol)	$\sigma(\Delta G)$ (kcal/mol)
bE	-43,38	3,33
bC	-4,46	3,33
IL	-21,79	3,33

A súlyozatlan asszociációs ΔG hiba 22.88 kcal/mol, míg a redukált khi-négyzetes tag $\chi^2_v = 2,54$. A Spearman-féle rangkorrelációs együttható (SpR) a prediktált és a valós ΔG értékek között 0,80 ($p = 1,38 \cdot 10^{-5}$). A $\sigma(\Delta G)$ jelű oszlop tartalmazza a χ^2_v -vel korrigált szórásértékeket.

Az eredményekből kiolvasható, hogy energetikailag a bE kölcsönhatási felület a legstabilabb, majd ezt követi a IL kölcsönhatási felület, majd a bC kölcsönhatási felület.

7.2.3.2 A második megközelítés eredményei

A második modell esetében az A mátrix egy 21×9 -es mátrix volt. A modell paraméterei:

$\mathbf{x} = [\Delta G(\text{bE0x}), \Delta G(\text{bE1x}), \Delta G(\text{bE2x}), \Delta G(\text{bC0x}), \Delta G(\text{bC1x}), \Delta G(\text{bC2x}), \Delta G(\text{IL0x}), \Delta G(\text{IL1x}), \Delta G(\text{IL2x})]^T$. A szabadságfokok száma $(n - p) = 12$. A következő eredményeket kaptuk (4. táblázat):

4. táblázat A második közelítés eredményeit tartalmazza a táblázat. A különböző számú mutánst tartalmazó kölcsönhatási felületekhez rendeli hozzá a számított ΔG értékeket, valamint a ΔG értékek hibáját.

Komponensek	ΔG (kcal/mol)	$\sigma(\Delta G)$ (kcal/mol)
bE0x	-48,20	6,84
bE1x	-49,60	5,04
bE2x	-30,12	7,02
bC0x	-3,09	6,65
bC1x	-7,56	4,43
bC2x	-3,21	6,71
IL0x	-20,95	6,56
IL1x	-23,11	4,67
IL2x	-17,24	6,65

A súlyozatlan asszociációs ΔG hiba 22,55 kcal/mol, a redukált khi-négyzetes tag χ^2_v pedig 2,28. A Spearman-féle rangkorrelációs együttható (SpR) a prediktált és a valódi asszociációs ΔG értékek között 0,86 ($p = 4,59 \cdot 10^{-7}$).

Megállapítható, hogy a bE kölcsönhatási felületen, ha mind a két lánc tartalmaz mutációt, akkor az energetikailag kedvezőtlenebb lesz, mintha csak egyet vagy egyet sem tartalmazna. Ezzel szemben az is észrevehető, hogy a IL, valamint a bC kölcsönhatási felületen nincs nagy mértékű változás energetikailag a vad típushoz képest, akkor sem ha a kölcsönhatási felület mindkét láncán megfigyelhető a mutáció. Ez arra enged következtetni, hogy kialakulhat vegyes, tehát vad típusú és H88R mutáns láncokat is tartalmazó tetramer.

7.2.3.3 A harmadik megközelítés eredményei

Ennél a megközelítésnél az **A** mátrix egy blokk-diagonális, 21×21 -es mátrix, amely a $[[0, 2, 2], [2, 0, 2], [2, 2, 0]]$ blokkból áll. Az alábbi megoldásokat kaptuk (**5. táblázat**):

5. táblázat A harmadik megközelítés eredményeit tartalmazza a táblázat: a komplexek kölcsönhatási felületeire számított ΔG értékeket, valamint ezek hibáját.

Komplex	Kölcsönhatási felület	ΔG (kcal/mol)	Nem korrigált $\sigma(\Delta G)$ (kcal/mol)
0x	bE	-51,20	5,33
	bC	-4,23	5,33
	IL	-22,16	5,33
1x	bE	-28,95	6,08
	bC	-3,05	6,08
	IL	-19,95	6,08
2x, bE	bE	-52,31	6,08
	bC	-5,88	6,08
	IL	-22,84	6,08
2x, bC	bE	-55,57	5,75
	bC	-4,04	5,75
	IL	-22,49	5,75
2x, IL	bE	-50,00	5,99
	bC	-6,36	5,99
	IL	-21,69	5,99
3x	bE	-39,19	4,77
	bC	-9,47	4,77
	IL	-19,10	4,77
4x	bE	-25,11	5,89
	bC	-0,95	5,89
	IL	-17,98	5,89

Korrigált paraméterszórások nem számíthatók. Azok a tendenciák figyelhetők meg itt is, amelyek az első megközelítésben. Az is észrevehető, hogy a bE kölcsönhatási felület stabilitása nagymértékben csökken az 1x, a 3x és a 4x esetében az előző értékekhez képest.

7.2.4 Eredmények összegzése és kiértékelése

Általánosságban elmondható, hogy legtöbb esetben energetikailag a bE kölcsönhatási felületek a legstabilabbak, illetve az is, hogy a bC kölcsönhatási felületek ΔG értékei a legnagyobbak. A nyers adatokból minden komplexre egy általános asszociációs energiát számoltunk. Minden komplex esetében összeadtuk a rá vonatkozó különböző dimerré történő disszociációs módok ΔG értékét, majd az így kapott összeget elosztottuk kettővel. Ez a módszer ugyanazt az eredményt adja, mintha a harmadik modell egyedi kölcsönható felületi energiáiból számoltuk volna ki a komplexképződés teljes energiáját. Az alábbi eredményeket kaptuk (6. táblázat):

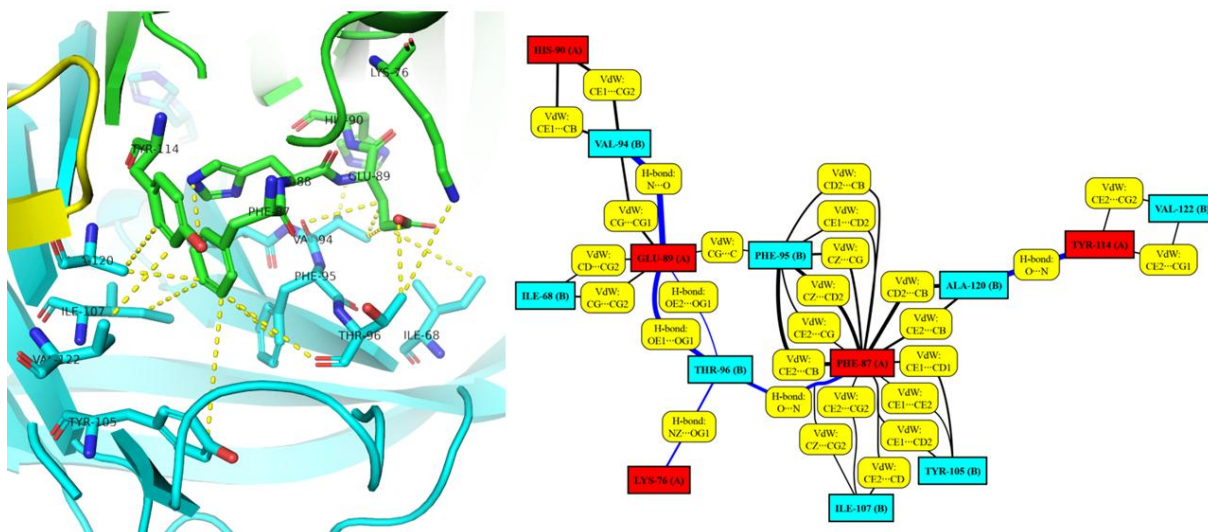
6. táblázat A táblázatban a komplexekre számított asszociációs energiák találhatók.

Komplex	ΔG (kcal/mol)	$\sigma(\Delta G)$ (kcal/mol)
0x	-155,17	10,66
1x	-103,88	12,16
2x, bE	-162,07	12,16
2x, bC	-164,19	11,50
2x, IL	-156,07	11,99
3x	-135,525	9,55
4x	-88,07	11,78

Csoportunk korábbi kísérleteiből tudjuk, hogy a vad típusú TTR csak tetramer állapotban figyelhető meg fiziológiához hasonló körülmények között, míg a H88R mutáns csak monomer formában. Ezért kijelenthető, hogy azok a komplexek, amelyeknek kisebb, vagy közelítőleg azonos a ΔG értéke, mint a vad típusú komplexnek, valószínűleg létrejöhetnek. (Amely komplexhez tartozó ΔG érték kisebb, mint a 4x mutánsé, de nagyobb, mint a vad típusé, nem jelenthető ki kísérletek nélkül.) Ebben az esetben a 2x, bE; a 2x, bC; valamint a 2x, IL komplexekről elmondható, hogy termodinamikailag hasonlóan stabilnak tűnnek, mint a vad típus, ezért a létrejöttük valószínűsíthető.

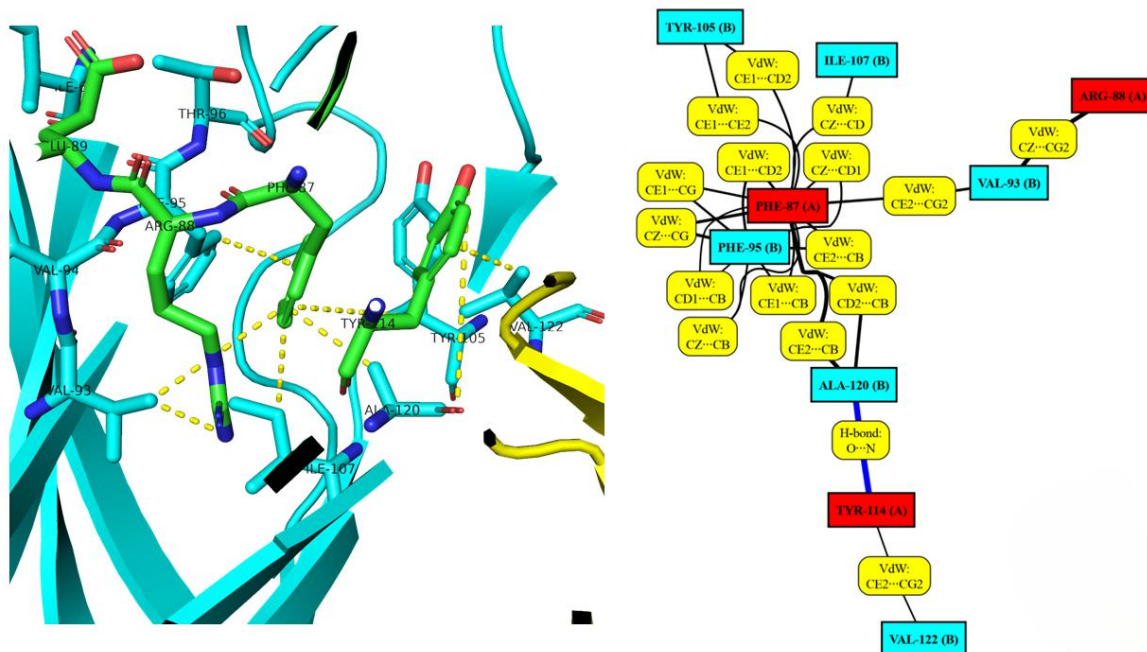
Az eredményeink alapján az 1x komplex jelentősen kevésbé stabil, mint az előbb említett három, két mutációt tartalmazó komplex, holott kevesebb mutáns alegységet tartalmaz. A jelenség szerkezeti kontextusba helyezéséhez a 7 komplex mindhárom kölcsönhatási felületére az MD trajektóriák teljes elemzésre használt hosszán készítettünk RING analízist.^{36,37} Ez egy olyan program, amely beazonosítja a kölcsönhatásokat. Ezt a kölcsönhatás-elemzést gráfok

formájában jelenítettük meg. Az eredményekből az volt kiolvasható, hogy a vad típusú tetramerhez képest az egy H88R mutációt tartalmazó komplex esetében a *beta-edge* és a *loop-loop* kölcsönhatási felületen nagymértékben csökkentek a kölcsönhatások. A legnagyobb különbség a vad típus és az egy H88R mutációt tartalmazó tetramer között a *beta-edge* kölcsönhatási felület hidrogén kötéseinek számában volt megfigyelhető (3. ábra). Ebben az esetben a H88R mutáns tetramerben csak a vad típusú tetramer hidrogénkötések számának 70%-a volt megtalálható. Ezen adatokat a szerkezeti tulajdonságok függvényében is ki szeretnénk volna értékelni, ezért a vad típus esetében a *beta-edge* kölcsönhatási felület mentén kiválasztottuk azt az aminosavat, amely a legtöbb kölcsönhatást létesíti. Ez a 87-es fenilalanin volt. Többek között ezen aminosav mentén vizsgáltuk a kölcsönhatásokat.



3. ábra Bal oldalon a vad típusú TTR *beta-edge* kölcsönhatási felületén lévő kölcsönhatások láthatóak, a jobb oldalon a RING analízis eredménye látható. Feketével a Van der Waals kölcsönhatások, kézzel a hidrogénkötések láthatóak.

A jobb oldali ábrán lévő RING analízis képen látható, hogy a vad típusú TTR tetramer esetében 13 aminosav áll kölcsönhatásban egymással. Az analízis adataiból az is kiderült, hogy a *beta-edge* kölcsönhatási felületeken átlagosan 33,0 hidrogénkötés; 31,2 Van der Waals kölcsönhatás; 8,7 pi-pi kölcsönhatás; valamint 0,1 ionos kölcsönhatás van.



4. ábra Az ábra bal oldalán az egy H88R mutációt tartalmazó TTR tetramer *beta-edge* kölcsönhatási felületén lévő kölcsönhatások láthatóak, a jobb oldalon a RING analízis eredménye látható. Feketével a Van der Waals kölcsönhatások, kézzel a hidrogénkötések láthatóak.

A bal oldali, szerkezeti ábrán szabad szemmel is látható (**4. ábra**), hogy az előző, vad típusú TTR tetramerhez képest sokkal kevesebb kölcsönhatás van jelen. A RING analízisből kiolvasható, hogy ebben az esetben már csak 9 aminosav van egymással kölcsönhatásban. Az is megfigyelhető, hogy az egy H88R mutációt tartalmazó fehérje esetében a *beta-edge* kölcsönhatási felületen átlagosan 23,41 hidrogénkötés; 26,37 Van der Waals kölcsönhatás; 7,98 pi-pi kölcsönhatás és 0,05 ionos kölcsönhatás van. A RING analízisből az is látható, hogy ebben az esetben nem jön létre a 87-es A láncon lévő fenilalanin és a 96-os B láncon lévő treonin, a 96-os B láncon lévő treonin és a 76-os A láncon lévő lizin, a 96-os B láncon lévő treonin és a 89-es A láncon lévő glutaminsav, valamint a 89-es A láncon lévő glutaminsav és a 94-es B láncon lévő valin közti hidrogénkötés. Azonban megfigyelhető, hogy a beillesztett 88-as, A láncon lévő arginin és a 93-as, B láncon lévő valin között kialakul egy gyenge diszperziós kölcsönhatás. A kötések szerkezeten való ábrázolásán az is látható, hogy a 87-es, A láncon lévő fenilalanin esetében nem csökkennek számottevően a kölcsönhatások a vad típusúhoz képest, azonban a 89-es, A láncon lévő glutaminsav esetében megfigyelhető, hogy míg a vad típus esetében 4 másik aminosavval alakít ki kölcsönhatást, 2 hidrogénkötést és 2 Van der Waals kölcsönhatást, addig az egy mutációt tartalmazó fehérje esetében ez az aminosav egyáltalán nem alakít ki kölcsönhatást más aminosavakkal. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a 88-as arginin beilleszkedése miatt a 89-es glutaminsav térbeli elhelyezkedése is megváltozik,

ezáltal nem képes kölcsönhatásokat létesíteni. Hasonló eset áll fenn a B láncon lévő, 96-os treonin esetében is. Míg a vad típusú tetramerben 3 aminosavval létesít hidrogénkötést, addig az egy mutánst tartalmazó komplexben nem tud kölcsönhatásra lépni más aminosavakkal. Ennek az az oka, hogy az A láncba beépült arginin megváltoztatja az A lánc térbeli szerkezetét, ezért, attól függetlenül, hogy a treonin térbeli helye számottevően nem változik meg, képtelen azokat a kölcsönhatásokat kialakítani, amikre a vad típus esetében lehetősége volt.

Összességében elmondható az egy H88R mutációt tartalmazó tetramerről, hogy az A láncon található arginin térbeli hatása megbontja a *beta-edge* kölcsönhatási felület szimmetriáját, ebből kifolyólag egyes kölcsönhatások nem képesek létrejönni.

Az egy mutációt tartalmazó komplex esetében látottakkal össze szeretnénk volna vetni a két H88R mutációt tartalmazó tetramer kölcsönhatásait is, hogy azt is lássuk, vajon a számítások szerint a vad típushoz hasonló stabilitású tetramerben milyen a kölcsönhatások minősége és mennyisége.

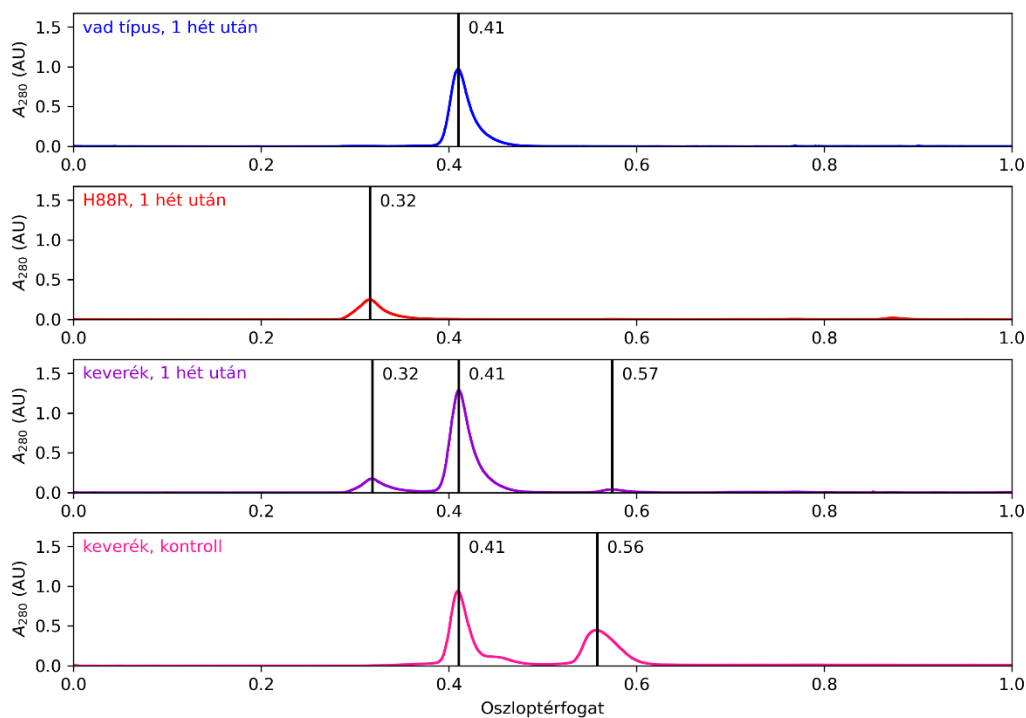
Az ábrán a *beta-edge* kölcsönhatási felületen két H88R mutációval rendelkező tetramer szerkezeti, valamint az általa kialakított kölcsönhatásokra vonatkozó RING analízis kép szolgál a két mutációval rendelkező tetramerek példaként (5. ábra). A rendelkezésre álló adatainkból azt a fő következtetést tudtuk levonni, hogy a tetramer számára stabilabb szerkezetnek bizonyulnak azok esetek, amelyekben nagyfokú szimmetria figyelhető meg a mutációk elhelyezkedésének függvényében (kivéve a négy mutációval rendelkező tetamert, ugyanis abban a mutációk instabilizáló hatása már sokkal nagyobb mértékű, mint a két mutációval rendelkező szerkezetek, illetve a vad típus esetében).

Az egy mutációval rendelkező tetramer esetében ez a szimmetria veszteség lehet a tetramer szerkezet instabilitásának okozója. Az itt felhozott szerkezeti magyarázat ellenére nem zárható ki, hogy valamilyen szimulációs műtermék játszik közre az 1x mutánsnál meghatározott kiugró instabilitási érték esetén, ezért terveink között szerepel ismételt szimulációkkal robusztusabbá tenni az erre vonatkozó megfigyeléseinket.

7.3 *In vitro* kísérlet kiértékelése

7.3.1 Méretkizárásos kromatográfia

Az alkalmazott módszerek című fejezetben leírtak szerint három különböző összetételű, egy csak H88R mutáns TTR-t tartalmazó, egy csak vad típusú TTR-t tartalmazó, valamint egy H88R mutáns és egy vad típusú TTR-t is tartalmazó oldatot inkubáltunk egy héten keresztül. A kísérlet alapjául az a korábbi megfigyelés szolgál, hogy a H88R nem képez tetramert. Az ezt bizonyító kromatogram a függelékben (8. ábra) látható. Az inkubációs idő leteltével méretkizárásos kromatográfiával választottuk el a tetramer csúcsokat az aggregátum és monomer csúcsoktól (6. ábra). Az inkubált minták mellett egy frissen készített H88R és vad típusú mintát is megvizsgáltunk kontrollként.



6. ábra Az ábrán többek között a kísérletben is szereplő fehérjeoldatok SEC kromatogramja látható.

Azokban az inkubált mintákban, amelyek H88R-t is tartalmaztak, 0,32 oszloptérfogatnál egy aggregátum csúcsa figyelhető meg, amely nem jelenik meg a vad típusú mintában. A legszembetűnőbb jelenség, hogy az inkubált H88R 0,56 oszloptérfogatnál várható monomer csúcsa eltűnik. Jól látszik ez a jelenség a keverék minták inkubált és friss kontroll kromatogramján is. A jelenséget a H88R fragmentációjával magyarázzuk, mivel a töményítés során használt 10 kDa-os szűrő nem képes ezen fragmensek megfogására, ám a jóval érzékenyebb 220 nm-es detektor csatornán kivehető volt 0,6 és 1 oszloptérfogat között több kisebb csúcs is. Jelentős különbség a H88R és keverék minták között, hogy a keverékben még látható egy kis intenzitású csúcs 0,57 oszloptérfogatnál, de ez nem látható a H88R minta esetében. Ha a H88R képes vegyes tetramert képezni a keverék mintában, akkor az védelmet nyújthat neki a hasítással szemben.

Az inkubált, keverék mintát a kontroll keverék mintával, és a vad típusú inkubált mintával összehasonlítva látható, hogy az inkubált keverék tetramer (0,41 oszlop térfogat) csúcsintegrálja jelentősen nagyobb, mint a másik két tetramer csúcsé. Ez is utalhat a vad típusú és a H88R vegyes tetramer kialakulására.

Az inkubált keverék kromatografálásából három frakciót mértünk meg az MS/MS mérések során. Az aggregátum (1 frakció) összetételét, illetve a két tetramert tartalmazó frakció (3, 4) összetételét. Az inkubált H88R mintából az aggregátum frakcióját (34) mértünk meg MS/MS-sel. A kizárólag vad típusú TTR-t tartalmazó fehérjeoldat méretkizárásos kromatogramja egyetlen tetramer frakciót mutatott ki. Az MS/MS mérés során ezt a frakciót is vizsgáltuk (66).

7.3.2 MS/MS mérés

Az MS/MS méréseket követően a kiértékelő program automatikusan meghatározta a peptidionok szekvenciáját, és módosításait az általunk megadottak közül. Ezután az adathalmazban megkerestük a H88R mutánsra, valamint a vad típusra jellemző leggyakoribb peptidfragmenseket. Ez a H88R mutáns esetében:

83-90. aminosavig (ALGISPFR)

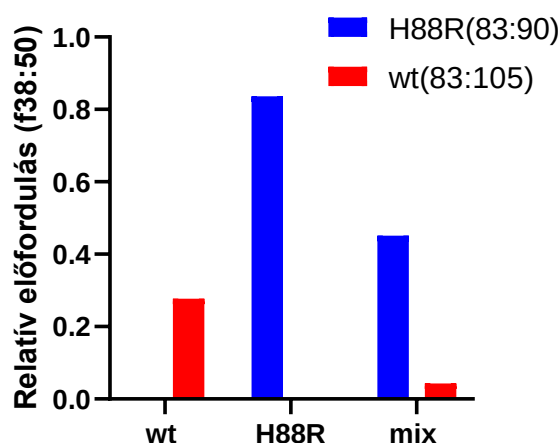
A vad típus esetében pedig:

83-105. aminosavig (ALGISPFHEHAEEVFTANDSGPR)

A fragmensek számozásakor megfigyelhető egy eltolódás. Ezt a rekombináns címkéből hátramaradó GS szekvencia okozza, amely az aminosav szekvencia elején található. Ebből kifolyólag a számozásban az eredeti szekvenciához képest egy kettő nagyságú eltolódás

figyelhető meg. Ezt követően ezen leggyakoribb fragmensek töltésvariánsainak jelösszegét normáltuk a közös régió legintenzívebben detektált fragmensének (38-50, AADDTWEPFASGK) töltésvariánsainak detektált jelösszegére. Az eredményekből az vált láthatóvá, hogy a H88R mutáns és a vad típusú TTR-t is tartalmazó oldatban lévő tetramer frakció (jelen esetben a (4)) a H88R-t és a vad típusú TTR-t is nagy mennyiségben tartalmazza (7. ábra).

Mivel a méretkizárásos kromatográfiás mérések során azt az eredményt kaptuk, hogy a szintén egy hétig inkubált, de kizárólag H88R mutáns tartalmazó oldatban nem figyelhető meg kromatográfiás csúcs a tetramer régióban (aggregátum csúcs átfedése sem), ezért ki tudtuk jelenteni, hogy az MS/MS mérés során a (4)-es frakcióban H88R és vad típusú vegyes tetramer alakult ki.



7. ábra Az ábrán a H88R, illetve a vad típus leggyakoribb fragmenseinek relatív előfordulása látható.

8 Összegzés, kitekintés

A kutatás során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a H88R mutáns TTR képes-e a vad típusú TTR-rel vegyes tetramert kialakítani. A betegség esetleges kezelhetőségében ennek kulcsfontosságú szerepe van.

A munkám során *in silico* módszereket vegyítettem *in vitro* módszerekkel. MD szimulációkból számított szabadentalpia változással prediktáltam az összes lehetséges H88R mutáns TTR tetramer stabilitását. A szabadentalpia változások szimulációiból azt az eredményt kaptuk, hogy a vad típusú TTR tetramerrel a két H88R mutációval rendelkező fehérjék képesek - stabilitás szempontjából - felvenni a versenyt. Az egy, a három, valamint a négy H88R mutációval rendelkező TTR szerkezetek instabilabbnak bizonyultak. Ezen kísérleti eredményeket azzal tudtuk magyarázni, hogy a tetramer stabilitásának szempontjából előnyösebb egy szimmetrikusabb szerkezet, ami a mutációkat illeti. Ez alól természetesen kivétel a négy H88R mutációval rendelkező TTR, ugyanis ebben az esetben már nagyobb fokú a mutációk destabilizáló hatása.

A számításainkkal alátámasztott vegyes tetramerek létezésére szerettünk volna kísérlettel alátámasztott bizonyítékot is szerezni, ezért terveztünk egy kísérletet, amelyből ki szerettünk volna mutatni a vegyes tetramer létezését. A kísérlet során egy hétig inkubáltunk vad típusú és H88R mutáns TTR fehérje keveréket. Az egy hét elteltével kapott oldat minőségi összetételét peptidtérképezéssel határoztuk meg. Ezen mérések bizonyították, hogy szignifikáns mennyiségben keletkezik valamilyen arányú (H88R : vad típus) vegyes tetramer.

Ez jó hír, hiszen az ATTR amiloidózis kezelésére jelenleg elérhető összes gyógyszermolekula (Tafamidis, Diflusinal) a tetramerek stabilizálása révén fejti ki hatását, így annak ellenére, hogy a H88R mutáns nem képez tetramert, a kezelések mégis hatásosak lehetnek, amennyiben stabilizálni tudják a vegyes tetramereket.

Ahhoz, hogy válaszolni tudjunk a kezelés hatékonyságának kérdésére, a kutatás folytatásaként *in vitro* módszerrel meg szeretnénk határozni a vegyes tetramer összetételét, hogy azután vizsgálhassuk az említett gyógyszermolekulák hatékonyságát ezeken a rendszereken. Ezen kívül a terveink között szerepel még betegek vérében előforduló H88R és vad típusú TTR koncentráció viszonyainak meghatározása, hogy ezzel is pontosabb előrejelzést adhassunk a H88R vegyes tetramer *in vivo* kialakulásának lehetőségére.

9 Függelék

9.1 Modell paraméterek

Az MM/GBSA adatokból számított közelítések eredményeit úgy kaptuk meg, hogy egy mátrix és egy vektor szorzatára bontottuk az adatokat. Az alábbiakban láthatóak lesznek az egyes megközelítéshez tartozó mátrixok és vektorok.

1. közelítés Az 1. közelítésben egy 21×3 -as mátrixot szoroztunk egy 3 dimenziós $\mathbf{x}$ vektorral.

A mátrix:

$$\begin{bmatrix} 0 & 2 & 2 \\ 2 & 0 & 2 \\ 2 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 2 \\ 2 & 0 & 2 \\ 2 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 2 \\ 2 & 0 & 2 \\ 2 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 2 \\ 2 & 0 & 2 \\ 2 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 2 \\ 2 & 0 & 2 \\ 2 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 2 \\ 2 & 0 & 2 \\ 2 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 2 \\ 2 & 0 & 2 \\ 2 & 2 & 0 \end{bmatrix}$$

Az oszlopvektor:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} \Delta G(bE) \\ \Delta G(bC) \\ \Delta G(lL) \end{bmatrix}$$

2. közelítés A második megközelítésben egy 21×9 -es mátrixot szoroztunk egy 9 dimenziós $\mathbf{x}$ vektorral.

A mátrix:

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 2 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 2 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 2 \\ 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 \\ 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

A vektor:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} bE0x \\ bE1x \\ bE2x \\ bC0x \\ bC1x \\ bC2x \\ lL0x \\ lL1x \\ lL2x \end{bmatrix}$$

3. közelítés A harmadik megközelítésben egy 21×21 -es mátrixot szoroztunk egy 21 dimenziós $\mathbf{x}$ vektorral. A mátrixot az alábbi táblázat alapján írtuk fel:

A mátrix:

$$\begin{bmatrix} 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

A vektor:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} \Delta G([bE]: [0x]) \\ \Delta G([bC]: [0x]) \\ \Delta G([lL]: [0x]) \\ \Delta G([bE]: [1x]) \\ \Delta G([bC]: [1x]) \\ \Delta G([lL]: [1x]) \\ \Delta G([bE]: [2x, bE]) \\ \Delta G([bC]: [2x, bE]) \\ \Delta G([lL]: [2x, bE]) \\ \Delta G([bE]: [2x, bC]) \\ \Delta G([bC]: [2x, bC]) \\ \Delta G([lL]: [2x, bC]) \\ \Delta G([bE]: [2x, lL]) \\ \Delta G([bC]: [2x, lL]) \\ \Delta G([lL]: [2x, lL]) \\ \Delta G([bE]: [3x]) \\ \Delta G([bC]: [3x]) \\ \Delta G([lL]: [3x]) \\ \Delta G([bE]: [4x]) \\ \Delta G([bC]: [4x]) \\ \Delta G([lL]: [4x]) \end{bmatrix}$$

9.2 Receptek

Az alkalmazott módszerek bekezdésben az *In vitro* kísérleti körülmények, Expresszió című, Oltókultúra készítés alcímű bekezdésben megemlített LB tápoldat az alábbi recept alapján készült:

1 liter LB tápoldat

Trypton	12 g
Élesztő kivonat	5 g
NaCl	10 g

Az alkalmazott módszerek bekezdésben az *In vitro* kísérleti körülmények, Expresszió című, Termelés alcímű bekezdésben megemlített TB tápoldat az alábbi recept alapján készült:

1 liter TB tápoldat

Trypton	12 g
Élesztő kivonat	24 g
Glicerín	5 g
10x TB pufferoldat	100 ml

Az alkalmazott módszerek bekezdésben az *In vitro* kísérleti körülmények, Tisztítás című, Feltárás alcímű bekezdésben megemlített natív feltáró puffer az alábbi recept alapján készült:

1 liter, pH = 7,8 natív feltáró puffer

NaCl	17,5 g
Na₂HPO₄·2H₂O	7,94 g
NaH₂PO₄·2H₂O	0,838 g

Az alkalmazott módszerek bekezdésben az *In vitro* kísérleti körülmények, Tisztítás című, Gélelektroforézis alcímű bekezdésben megemlített MES puffer az alábbi recept alapján készült:

1 liter pH = 7,3 MES puffer

MES (1 M)	195,2 g
Tris base, (1 M)	121,2 g
SDS (69,3 mM)	20 g
EDTA mentes sav (20,5 mM)	6 g
desztillált víz	1 literre egészíteni a keveréket

Az alkalmazott módszerek bekezdésben az *In vitro* kísérleti körülmények, Tisztítás című, Preparatív méretkizárásos kromatográfia alcímű bekezdésében megemlített PBS puffer az alábbi recept alapján készült:

1 liter, pH = 7,3 PBS puffer

NaCl	8,18 g
KCl	0,2013 g
Na ₂ HPO ₄	2,68 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g

Az alkalmazott módszerek bekezdésben az *In vitro* kísérleti körülmények, Tisztítás című, Gélelektroforézis alcímű bekezdésben megemlített Laemmli puffer az alábbi recept alapján készült:

Laemmli puffer

0,5 M Tris pH = 6,5	2,5 ml
glicerín	2 ml
20 % SDS	4 ml
β-merkaptóetanol	0,5 ml
brómfenolkék	0,5 ml
desztillált víz	0,5 ml

9.3 MS mérési körülmények

Az MS mérések beállításait, illetve a mérések kiértékeléséhez szükséges adatokat az alábbi táblázatok tartalmazzák:

7. táblázat Az alábbi táblázat tartalmazza a mérési paramétereket.

Ionizációs mód	ESI
Polaritás	Pozitív (+)
Kapilláris feszültség	2,7 kV
Kónusz feszültség	40 V
Porlasztógáz / Szárítógáz	N ₂
Porlasztógáz nyomása	6 bar
Szárítógáz áramlási sebesség	800 l/óra
Szárítógáz hőmérséklete	400 °C
Analizátor mód	V
Tömegtartomány	50 – 2000 m/z
Mérési mód	MSe

Scan sebesség	0,5 s
Ütközési energia (ramp)	19-45 V
LockMass	leucin-enkefalin
Mintatartó hőmérséklet	8 °C
Oszloptermosztálás	45 °C
A eluens	H ₂ O 0,1 (v/v) % TFA
B eluens	ACN 0,1 (v/v) % TFA

8. táblázat Ezen táblázat a gradiens értékeket tartalmazza.

Idő / perc	Áramlási sebesség / µl/perc	B %
0	20	5
1	20	5
46	20	35
46,5	20	85
47,5	20	85
48	20	5
60	20	5

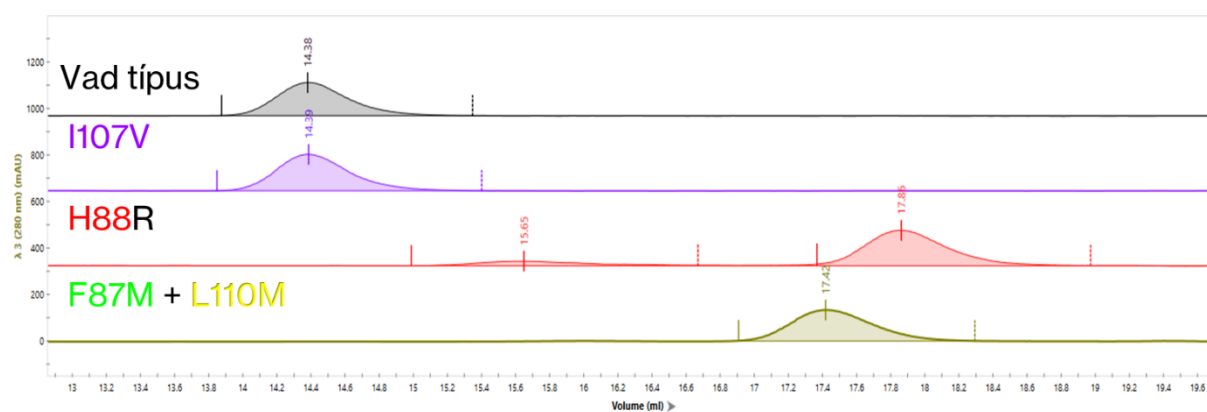
A peptidterképezés adatbázis-keresését UNIFI 1.9.13.9. szoftverrel végeztem. A keresési paramétereket a (9. táblázat) tartalmazza

9. táblázat Az alábbi táblázatban láthatóak a kiértékelés során használt keresési paraméterek.

Mód	Peptide Exact Mass
Variábilis módosítások	M, W Oxidáció 1x, 2x; SYT Foszforiláció
Maximális módosítások száma	2
Enzim	Tripszin
Kihagyott hasítási helyek száma (Missed cleavage)	1
Peptid/Fragmens tömegpontosság	10/20 ppm
Min. Fragmens találat	3
Alacsony/Nagy energiájú limit	500/100

Az MS/MS nyers adatok az alábbi linken keresztül érhetők el:

https://tarpalfih.web.elte.hu/tar-palfi_helga_dolgozat2024_ms_csatolmany.xlsx



8. ábra Az ábrán a vad típushoz viszonyított, egyes mutánsok a SEC kromatogramjai láthatók. Az ábrából egyértelműen kivehető, hogy a vad típus kizárólag tetramert képez, ahogyan az I107V mutáns TTR is. H88R mutáns TTR-ről az állapítható meg, hogy nem képez tetramert, kizárólag monomer formában van jelen (15,65 ml-nél látható minor csúcs MS analízis alapján GST szennyező.)

10 Irodalomjegyzék

- (1) Pozsonyi, Z.; Peskó, G.; Takács, H.; Csuka, D.; Nagy, V.; Szilágyi, Á.; Hategan, L.; Muk, B.; Csányi, B.; Nyolczas, N.; Dézsi, L.; Molnár, J. M.; Csillik, A.; Révész, K.; Iványi, B.; Szabó, F.; Birtalan, K.; Masszi, T.; Arányi, Z.; Sepp, R. Variant Transthyretin Amyloidosis (ATTRv) in Hungary: First Data on Epidemiology and Clinical Features. *Genes* **2021**, *12* (8), 1152. <https://doi.org/10.3390/genes12081152>.
- (2) Hammarström, P.; Sekijima, Y.; White, J. T.; Wiseman, R. L.; Lim, A.; Costello, C. E.; Altland, K.; Garzuly, F.; Budka, H.; Kelly, J. W. D18G Transthyretin Is Monomeric, Aggregation Prone, and Not Detectable in Plasma and Cerebrospinal Fluid: A Prescription for Central Nervous System Amyloidosis? *Biochemistry* **2003**, *42* (22), 6656–6663. <https://doi.org/10.1021/bi027319b>.
- (3) Hammarström, P.; Jiang, X.; Hurshman, A. R.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. Sequence-Dependent Denaturation Energetics: A Major Determinant in Amyloid Disease Diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (suppl_4), 16427–16432. <https://doi.org/10.1073/pnas.202495199>.
- (4) Hammarström, P.; Schneider, F.; Kelly, J. W. Trans -Suppression of Misfolding in an Amyloid Disease. *Science* **2001**, *293* (5539), 2459–2462. <https://doi.org/10.1126/science.1062245>.
- (5) Adamcik, J.; Mezzenga, R. Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (28), 8370–8382. <https://doi.org/10.1002/anie.201713416>.
- (6) Kyle, K. A.; Bayed, K. D. AMYLOIDOSIS: REVIEW OF 236 CASES: *Medicine (Baltimore)* **1975**, *54* (4), 271–299. <https://doi.org/10.1097/00005792-197507000-00001>.
- (7) Chatani, E.; Yuzu, K.; Ohhashi, Y.; Goto, Y. Current Understanding of the Structure, Stability and Dynamic Properties of Amyloid Fibrils. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (9), 4349. <https://doi.org/10.3390/ijms22094349>.
- (8) Merlini, G.; Bellotti, V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349* (6), 583–596. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023144>.
- (9) Oliveberg, M.; Wolynes, P. G. The Experimental Survey of Protein-Folding Energy Landscapes. *Q. Rev. Biophys.* **2005**, *38* (3), 245–288. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004185>.
- (10). <http://amyloidosismutations.com/mut-attr.php>.
- (11) Damas, A. M.; Saraiva, M. J. Review: TTR Amyloidosis—Structural Features Leading to Protein Aggregation and Their Implications on Therapeutic Strategies. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130* (2–3), 290–299. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4273>.
- (12) Benson, M. D.; Uemichi, T. Transthyretin Amyloidosis. *Amyloid* **1996**, *3* (1), 44–56. <https://doi.org/10.3109/13506129609014354>.
- (13) Si, J.-B.; Kim, B.; Kim, J. H. Transthyretin Misfolding, A Fatal Structural Pathogenesis Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (9), 4429. <https://doi.org/10.3390/ijms22094429>.
- (14) Saraiva, M. J. M. Transthyretin Amyloidosis: A Tale of Weak Interactions. *FEBS Lett.* **2001**, *498* (2–3), 201–203. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02480-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02480-2).
- (15) Hellman, U.; Lundgren, H.-E.; Westermarck, P.; Stafberg, C.; Nahi, H.; Tachlinski, S.; Guggi, M.; Flogegård, M.; Hamid, M.; Escher, S. A.; Suhr, O. B. A Genealogical and Clinical Study of the Phenotypical Variation within the Swedish Transthyretin His88Arg (p. His108Arg) Amyloidosis Family. *Eur. J. Med. Genet.* **2015**, *58* (4), 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.02.005>.
- (16) Yokoyama, T.; Hanawa, Y.; Obita, T.; Mizuguchi, M. Stability and Crystal Structures of His88 Mutant Human Transthyretins. *FEBS Lett.* **2017**, *591* (13), 1862–1871. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12704>.

- (17) Daggett, V. α -Sheet: The Toxic Conformer in Amyloid Diseases? *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39 (9), 594–602. <https://doi.org/10.1021/ar0500719>.
- (18) Bi, T. M.; Daggett, V. The Role of α -Sheet in Amyloid Oligomer Aggregation and Toxicity. *Yale J. Biol. Med.* **2018**, 91 (3), 247–255.
- (19) Bousset, L.; Alik, A.; Arteni, A.; Böckmann, A.; Meier, B. H.; Melki, R. α -Synuclein Fibril, Ribbon and Fibril-91 Amyloid Polymorphs Generation for Structural Studies. In *Protein Aggregation*; Cieplak, A. S., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2023; Vol. 2551, pp 345–355. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2597-2_23.
- (20) Patodia, S. Molecular Dynamics Simulation of Proteins: A Brief Overview. *J. Phys. Chem. Biophys.* **2014**, 4 (6). <https://doi.org/10.4172/2161-0398.1000166>.
- (21) Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, 99 (6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.
- (22) Astuti, A. D.; Mutiara, A. B. Performance Analysis on Molecular Dynamics Simulation of Protein Using GROMACS. arXiv 2009. <https://doi.org/10.48550/ARXIV.0912.0893>.
- (23) Hansson, T.; Oostenbrink, C.; Van Gunsteren, W. Molecular Dynamics Simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12 (2), 190–196. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00308-1).
- (24) Karplus, M.; Kuriyan, J. Molecular Dynamics and Protein Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102 (19), 6679–6685. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408930102>.
- (25) Sun, H.; Duan, L.; Chen, F.; Liu, H.; Wang, Z.; Pan, P.; Zhu, F.; Zhang, J. Z. H.; Hou, T. Assessing the Performance of MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 7. Entropy Effects on the Performance of End-Point Binding Free Energy Calculation Approaches. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20 (21), 14450–14460. <https://doi.org/10.1039/C7CP07623A>.
- (26) Sun, H.; Li, Y.; Tian, S.; Xu, L.; Hou, T. Assessing the Performance of MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 4. Accuracies of MM/PBSA and MM/GBSA Methodologies Evaluated by Various Simulation Protocols Using PDBbind Data Set. *Phys Chem Chem Phys* **2014**, 16 (31), 16719–16729. <https://doi.org/10.1039/C4CP01388C>.
- (27) Rastelli, G.; Rio, A. D.; Degliesposti, G.; Sgobba, M. Fast and Accurate Predictions of Binding Free Energies Using MM-PBSA and MM-GBSA. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31 (4), 797–810. <https://doi.org/10.1002/jcc.21372>.
- (28) Duan, L.; Liu, X.; Zhang, J. Z. H. Interaction Entropy: A New Paradigm for Highly Efficient and Reliable Computation of Protein–Ligand Binding Free Energy. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (17), 5722–5728. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02682>.
- (29) Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, 10 (5), 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>.
- (30) Åqvist, J.; Medina, C.; Samuelsson, J.-E. A New Method for Predicting Binding Affinity in Computer-Aided Drug Design. *Protein Eng. Des. Sel.* **1994**, 7 (3), 385–391. <https://doi.org/10.1093/protein/7.3.385>.
- (31) Bauer, J. A.; Pavlović, J.; Bauerová-Hlinková, V. Normal Mode Analysis as a Routine Part of a Structural Investigation. *Molecules* **2019**, 24 (18), 3293. <https://doi.org/10.3390/molecules24183293>.
- (32) RCSB Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org/>.
- (33) Johnson, S. M.; Connelly, S.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W. Biochemical and Structural Evaluation of Highly Selective 2-Arylbenzoxazole-Based Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (2), 260–270. <https://doi.org/10.1021/jm0708735>.
- (34) Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D. A. Exploring Protein Native States and Large-scale Conformational Changes with a Modified Generalized Born Model. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2004**, 55 (2), 383–394. <https://doi.org/10.1002/prot.20033>.

- (35) Strutz, T. *Data Fitting and Uncertainty: A Practical Introduction to Weighted Least Squares and Beyond*, 1. Aufl.; Vieweg + Teubner: Wiesbaden, 2011.
- (36) Del Conte, A.; Camagni, G. F.; Clementel, D.; Minervini, G.; Monzon, A. M.; Ferrari, C.; Piovesan, D.; Tosatto, S. C. E. RING 4.0: Faster Residue Interaction Networks with Novel Interaction Types across over 35,000 Different Chemical Structures. *Nucleic Acids Res.* **2024**, 52 (W1), W306–W312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae337>.
- (37) Nagy-Fazekas, D.; Fazekas, Z.; Taricska, N.; Stráner, P.; Karancsiné Menyhárd, D.; Perczel, A. Inhibitor Design Strategy for Myostatin: Dynamics and Interaction Networks Define the Affinity and Release Mechanisms of the Inhibited Complexes. *Molecules* **2023**, 28 (15), 5655. <https://doi.org/10.3390/molecules28155655>.