

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A PAPAIN ENZIMMECHANIZMUSÁNAK ELMÉLETI VIZSGÁLATA ÉS A  
HUMÁN TRANSZGLUTAMINÁZOK AKTIVÁCIÓJÁNAK KORAI ESEMÉNYEI**

Fekete Attila

Témavezető: Dr. Komáromi István<sup>†</sup>



DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

**A papain enzimmechanizmusának elméleti vizsgálata és a  
humán transzglutaminázok aktivációjának korai eseményei**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Fekete Attila** okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája  
Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja keretében

Témavezető: **Dr. Komáromi István**

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora  
tagok: Dr. Balajthy Zoltán, PhD  
Dr. Bogár Ferenc, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, LMI, Klinikai  
Laboratóriumi Kutató Tanszék könyvtára, 2019. május 9. (csütörtök), 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Ferenczy György, az MTA doktora  
Dr. Szóri Milán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora  
tagok: Dr. Ferenczy György, az MTA doktora  
Dr. Balajthy Zoltán, PhD  
Dr. Bogár Ferenc, PhD  
Dr. Szóri Milán, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati  
Intézet „A” épület tanterme, 2019. május 9. (csütörtök), 13:00 óra

## BEVEZETÉS

A Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet, Klinikai Laboratóriumi Tanszékén végzett kutatómunkáim közül, a doktori disszertációm alapjául két téma szolgált. Az első a cisztein proteázok enzimechanizmusának elméleti kémiai módszerekkel történő vizsgálata a papain enzim példáján keresztül, míg a második téma a papain-szerű katalitikus doménnel rendelkező, humán transzglutaminázok aktivációjának vizsgálata a véralvadási kaszkád XIII-as faktorának A alegységén és a szöveti transzglutaminázon keresztül klasszikus molekuladinamikai módszerek segítségével.

Jóllehet, az utóbbi évtizedekben óriási fejlődésen esett át a sűrűségfüggő kémia, melynek oka részben az, hogy a meglehetősen intenzív számítási időt, amit a poszt Hartree-Fock módszerek által szolgáltatott szerkezeti, termodinamikai, spektroszkópiai és más tulajdonságokra kellene szánni, jó közelítéssel redukált számítási idő mellett tudjuk előállítani. Munkámhoz ideális alapul szolgált a papain enzim, mivel mind kísérletesen, mind pedig elméleti módszerekkel széles körben tanulmányozott, azonban több szempontból is a teljesség igénye nélkül. Modern sűrűségfüggő módszerek alkalmazásával, a báziskészletek méretének szisztematikus növelésével, geometria optimalizálással, frekvenciaanalízissel igazolt stacionárius pontokat állítottunk elő az enzimreakció potenciális energiafelületeit. Az ONIOM-EE típusú kombinált kvantummechanikai/molekulamechanikai (QM/MM) számításainkban, az enzimechanizmust az enzim nyugvó állapotából kiindulva az acil-enzim intermedier képződésén át annak hidrolíziséig vizsgáltuk.

Nem lehetünk éréktelenek a természetben lejátszódó folyamatok dinamikus viselkedésével szemben. A klasszikus mechanika jó segítséget nyújthat az olyan időtől függő jelenségek vizsgálatában, melyeket egyelőre máshogyan egyáltalán nem, vagy csak körülményesen tudnánk vizsgálni. Célszerűen, a makromolekulák esetében pikoszekundum és miliszekundum közötti időskálán lejátszódó események tanulmányozásánál alkalmazható módszer a molekuladinamika (MD). Jelenleg ezen módszer határát az elérhető számítási kapacitás, a klasszikus erőterek jósága, a számítási problémák skálázhatósága, valamint a tanulmányozni kívánt rendszer mérete szabja meg. Ezek együttesen definiálják azt az eseményablakot, mely számunkra információval szolgálhat a tanulmányozni kívánt atomi szintű változásokról. Figyelembe véve a számítási erőforrások növekedését és az elérhető szoftverek intenzív fejlesztését, feltehetően ezen módszerek jelentősége a jövőben még inkább nőni fog.

A XIII-as véralvadási faktor A alegysége (FXIII-A) és a szöveti transzglutamináz (TG2) kapcsán azon dinamikus jelenségek kerülnek tárgyalásra, melyek az aktivációjuk során

bekövetkező nagy szerkezeti változásokhoz vezetnek, és amelyeket feltehetően a kalciumionok kötődése indukál mikroszekundumos időskálán. Molekuladinamikai szimulációkat ezen rendszerekre nem, vagy csak nagyságrendekkel rövidebb időskálán végeztek. Kiemelendő, hogy magát, az ionok kötődését és azok jelenlétének tulajdonítható dinamikus változásokat még egyáltalán nem tárgyalták elméleti módszerek segítségével.

## **IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### ***A papain elméleti vizsgálatának előzményei***

A papain enzim (EC 3.4.22.2) a cisztein endopeptidázok C1 szupercsaládjának tagja. 1970-ben, részben az akkor újonnan nyert krisztallográfiai adatok alapján, Lowe javasolt egy mechanizmust a peptidkötés hasítására a szerin proteázok analógiáján. Ugyanakkor a közölt eredmények alapján nyilvánvaló, hogy egyetlen, általánosan érvényes reakciómechanizmus nem írható fel ezen enzimekre.

Mind a szerin, mind a cisztein proteázok acil-enzim (AE) köztitermék képződésén keresztül hasítják a peptidkötést (ami rendre észter vagy tioészter). Lényeges különbség a kimotripszin és a papain között, hogy míg az első esetben a katalitikus triádot az Asp102, His57 és a Ser195 aminosavak alkotják, úgy a második esetben az Asn175, His159, Cys25 aminosavak találhatóak az katalitikus üregben. A nukleofil centrumot alkotó aminosavon túl lényeges különbség, hogy az Asp102-nek megfelelő aminosav a papainban a megfelelő amid, azaz aszparagin (Asn), amely hozzájárul az enzim nyugvó állapotában jelen lévő tiolátimidazólium ionpár forma stabilizálásához. Ugyanakkor az aszparagin hatása kevésbé szignifikáns, mint a szerin proteázok esetében az aszpartáté. Másik lényeges különbség, hogy a cisztein aminosav 4-8 pH tartományban deprotonált formában van jelen, mely a mechanizmus szempontjából fontos, hiszen a deprotonált cisztein jelenléte esszenciális a nukleofil támadás szempontjából.

Ha feltételezzük, hogy az aktív hely Cys25 és His159 aminosav-oldalláncai ionpárt formálnak a papain-szerű cisztein peptidázok nyugvó állapotában, az oxianionos köztitermék (OI) szerepe már kevésbé fontos (ha egyáltalán létezik). A cisztein proteázok esetében az acil-enzim intermedierben a formális töltés centrumok elmosódhatnak szemben a szerin proteázokkal, ahol az oxianionos köztitermék valóban kialakul. A Gln19 aminosav mely fontos szerepet tölt be a tetraédes köztitermék stabilizálásában is, cseréje viszont csekély mértékben befolyásolja az első (acilezési) lépést a reakciókban.

Az elmúlt négy évtized alatt számos elméleti tanulmány született az említett mechanizmus részleteinek tisztázására. Az eredetitől eltérő javaslatok is születtek,

melyekben a protonátmenet a hisztidin imidazol gyűrűjéről a peptidkötés nitrogénjére koncertikusan történik a cisztein kenének támadásával, vagy megelőzi azt. Több ízben javaslatot tettek arra is, hogy az aktív centrum ciszteinje protonált formában is jelen lehet. Suhai és munkatársai, HF/B3LYP:AMBER hibrid potenciál segítségével végzett hibrid számításaikban úgy találták, hogy a tetraédes intermedier csak abban az esetben stabil, ha az amid nitrogén már protonálódott az imidazólium oldallánchról.

Különböző protein környezetekben vizsgálták a cisztein-hisztidin diád protonáltsági állapotát is. Bizonyos esetekben észszerű volt megvizsgálni, az aktív helyet környező vizek szerepét a protontranszferben. Ez alapján tanulmányozták a szubsztrát hatását a protonátmenet aktiválási gátjára és egyensúlyára vonatkozóan. Összehasonlító QM/MM számítások segítségével vizsgálták az oldószer hatását implicit modell segítségével is. Egyszerű modell rendszerek kondenzált fázisban történő vizsgálatánál úgy találták, hogy a hemi-tioacetál anion mely megfelel a tetraédes intermediernek, a szerin proteázok esetében nem stabil köztitermék. Ma és munkatársai kimutatták, hogy a katepszin K esetében az acilezési lépés potenciális energiatartományában a tetraédes köztitermék lokális minimumot képvisel, míg a dezacilezési lépésre nem találtak ilyet. Wei és munkatársai az első (acilezési) és a második (dezacilezési) folyamatra is két lépéses reakciókat írtak fel.

A cisztein peptidázok esetében a legmagasabb szintű számításokat B3LYP, B-LYP, sűrűségfüggvény (DFT) módszerekkel végezték vegyérték dupla vagy tripla zéta típusú báziskészletekkel, polarizációs és diffúz függvényekkel kiegészítve az energiák számítására. Geometriai optimalizálásra általánosságban alacsonyabb szintű elméletet alkalmaztak. A QM/MM típusú számításokban a kvantummechanikai rétegre alkalmazott elmélet szintén alacsonyabb volt.

A DFT módszer ideális választás a hibrid számítások kvantumkémiai komponenseként, mivel a relatív és aktiválási energiákat, valamint a szerkezeteket a nagy teljesítőképességű és költséges poszt-Hartree-Fock módszerekkel összemérhetően képesek jósolni. Ugyanakkor a klasszikus sűrűségfüggvények hiányossága a diszperziós kölcsönhatások megfelelő leírása, a hosszú távú kicserélődési tag hiánya vagy tapasztalati úton történő paraméterezése.

Jelenleg számos olyan DFT módszer elérhető, melyekben a London-féle diszperziós korrekciót figyelembe vették. Ezen energiatag egyszerűen és kielégítően számítható a  $C_6/r^6$  pár tagokon keresztül, melyeken megfelelő csillapító függvényt alkalmazva a van der Waals (vdW) párkölcsönhatások helyes aszimptotikus viselkedése megkapható. Ilyen tagot alkalmaznak például az  $\omega$ B97X-D és a B97-D funkcionálokban. Az  $\omega$ B97X-D funkcionál tartalmaz továbbá egy hosszú távú elektron kicserélődési tagot is, amely magyarázhatja jó

teljesítőkéességét vdW komplexekben. Az egyszerű empirikus diszperziós párkorrekció is jelentősen javítja a reakciók aktiválási gátjának számítását biokémiai reakciók DFT alapú QM/MM számításaiban.

Szintén megoldás lehet olyan funkcionálok használata is, melyek paramétereit nagy pontosságú energiaadatok felhasználásával optimalizálták. Az M06-2X funkcionál harmincöt finomhangolt paramétert tartalmaz, így tipikus példa ezen funkcionálokra. Ilyen értelemben az M06-2X nem tartalmaz direkt tagot a diszperziós korrekcióra, ugyanakkor paraméterein keresztül felfogható egyfajta diszperzió-korrigált DFT módszernek. Maga a funkcionál jól teljesít az aktiválási energiák és átmeneti állapotok geometriájának számításánál is.

Nemrégiben megjelent munkákban kimutatták, hogy a megfelelő aktiválási gátak, átmeneti állapot geometriák és az asszinkronitás nagy mértékben függ a sűrűségfunkcionál módszerek és a báziskészletek megválasztásától.

### ***A transzglutaminázok vizsgálatának előzményei***

Mind a XIII-as véralvadási faktor A alegysége, mind a szöveti transzglutamináz a protein-glutamin gamma-glutamintranszferáz enzimek családjába tartozik (EC 2.3.2.13). A plazmában az FXIII (pFXIII) A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> heterotetramerként van jelen, melyben a B alegységek hordozó szerepet töltenek be, míg a celluláris forma (cFXIII) homodimerként van jelen (FXIII-A<sub>2</sub>) a monociták és vérlemezkék citoplazmájában. A pFXIII-A<sub>2</sub> proteolitikus aktivációja során a trombin elhasítja az Arg37 és Gly38 közötti peptidkötést, így szolgáltatva az aktivációs peptideket (AP). A szarvasmarha α-trombin által aktivált formában a krisztallográfiai tanulmányok alapján az elhasított N-terminális peptidek továbbra is asszociáltak maradnak a homodimer felszínhez, elzárva azon üreg bejáratát, ahol a katalitikus aminosavak találhatóak (Cys314, His373, Asp396). A placentából vagy plazmából származó pFXIII-A<sub>2</sub> aktiválható proteolitikus hasítás nélkül, magas, fiziológiailag nem releváns kalcium koncentráció (≥ 50 mM) segítségével. Ugyanakkor ezen zimogén forma aktiválható magas nátrium-klorid vagy kálium-klorid valamint 2 mM Ca<sup>2+</sup> jelenlétében is, habár kalciumionok jelenléte nélkül lassú, progresszív aktiváció figyelhető meg. Fiziológiailag releváns körülmények között, a proteolitikus aktivációt követően az aktivációs peptideknek disszociálniuk kell a homodimer felszínéről, valamint nagy konformációs változásnak kell bekövetkeznie annak érdekében, hogy a protein enzimatikusan aktív konformációt (FXIII-A\*<sub>2</sub>) vehessen fel. Ilyen nagy mértékű konformációs változás látható azon rekombináns cFXIII krisztallográfiai szerkezetében, melyet 300 mM NaCl és 3 mM Ca<sup>2+</sup> segítségével aktiváltak

proteolitikus hasítás nélkül. Ezen munka alapján az 1-es, valamint a 2-es  $\beta$ -hordó domén térbeli helyzete jelentősen megváltozik, az aktív hely pedig megközelíthetővé válik szubsztrátok számára, miközben maguk a hordó domének változatlanok maradnak. Mindazonáltal ezen doménmozgások alapvetően különböznek attól, melyet a szöveti (TG2) és az epidermális (TG3) transzglutamináz enzimek esetében láthatunk, illetve szerkezeti homológia alapján feltételezték az FXIII-A<sub>2</sub> esetében is. Összefoglalva elmondható, hogy a kalciumionok egyszerre felelősek a B alegységek és az aktivációs peptidek egymást követő disszociációjáért, valamint az aktív konformáció felvételéért. Bebizonyították, hogy valóban az FXIII-A alegységei felelősek a kalciumionok kötődéséért. A fluoreszcencia mérések alapján a kalciumkötődésének egyensúlyi állandója ( $K_m$ ) 0,12 mM-nak adódott. Továbbá alsó becslést adtak a dimerenként kötött kalciumionok számára vonatkozóan (1,2-1,5 egyensúlyi dialízis kísérletek alapján) és feltételezték dimerenként egy-egy erős kötőhely létezését. Szerkezeti információk fellelhetők olyan FXIII-A<sub>2</sub> szerkezetekről is, ahol Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> és Yb<sup>3+</sup> ionok kötődnek a dimerhez. Mindhárom ion vdW sugara nagyon közel esik egymáshoz (~200 pm), ami magyarázhatja, hogy a fő kötőhelyek (Ala457, Asn436, Asp438, Glu485 és Glu490) mindhárom kation esetében betöltöttek. Az itterbium(III) (Yb<sup>3+</sup>) esetében láthatóak a legszembetűnőbb különbségek, ahol fő kötőhelyeken kívül az alegységek Asp270, Asp271, Glu272 aminosavai együttesen négy Yb<sup>3+</sup> ion számára formálnak kötőhelyet. Ez korábban nem volt megjelölve kalciumkötőhelyként, viszont a Stieler és munkatársai által közölt és aktívnek vélt monomer FXIII-A<sup>0</sup> szerkezet már tartalmaz kalciumiont ezen a helyen. Helyspecifikus mutagenézis kísérletekkel igazolták, hogy a Glu485 és Glu490 valóban esszenciális a katalitikus működés szempontjából, továbbá azt is kimutatták, hogy az Asp476 és Asp479 aminosavak szerepet játszanak az FXIII-A<sub>2</sub> szerkezet konformációs változásaiban azáltal, hogy „kapcsolónak” tekinthetőek a proteáz-érzékeny és proteáz-ellenálló szerkezeti formák között. Felületi polaritás analízis és <sup>43</sup>Ca mágneses magrezonancia (NMR) kísérletek alapján feltételezhető, hogy gyengébb kötőhelyek is találhatóak a dimeren, illetve az NMR kísérletek alapján a kalciumkötődés disszociációs állandójára 0,51 mM adódott. Később Turner és munkatársai kifogásolták az NMR módszerek alkalmazhatóságát azok limitált teljesítőképessége miatt, ezért H/D kicserélődési kísérleteket végeztek, majd proteolitikus emésztésnek vetették alá a fehérjét, és MALDI-TOF/MS technikával detektáltak peptideket. Az eredmények alapján következtetni lehetett a különböző kísérleti körülmények (zimogén, trombin-hasított enzimek, trombin-hasított + 1 mM Ca<sup>2+</sup> és zimogén + 50 mM Ca<sup>2+</sup>) által indukált, szerkezeti változásokra, amelyek az adott peptid régiók megnövekedett deuterálódásában nyilvánultak meg. Az *in vitro* aktivált rekombináns zimogén FXIII-A szerkezetét Stieler és munkatársai közölték és ahogyan azt korábban említettük, nagy

doménmozgások figyelhetőek meg a  $\beta$ -hordók helyzetét illetően. Nemrégiben egy igen kiterjedt szerkezet-funkció tanulmány született, melyben számítási módszerekkel generáltak útvonalat az inaktív (zárt) és az aktív (nyitott) FXIII-A esetében, valamint tanulmányozták a modellezett B alegységek kölcsönhatását az A dimerekkel. A FXIII szerkezetéről és funkciójáról részletes összefoglalók találhatóak az irodalomban, melyek azonban nem képezik szorosán tárgyát jelen értekezésnek.

A transzglutaminázok családjának egy másik tagja, melyet jelen munkában vizsgálni kívántam, a szöveti transzglutamináz, ami monomer formában megtalálható különböző kompartmentekben, beleértve a plazma membránt, a citoszolt és a sejtmagot is. Mind az FXIII-A alegység, mind a TG2 esetében közös jellemző a kalciumionok által indukált nagy mértékű konformációs változás, azaz a transzglutamináz aktivitás kizárólag kalciumionok jelenlétében jelentkezik. Jóllehet számos esetben sikerült kísérletes úton eredményeket előállítani a TG2 szerkezetéről, GDP, GTP és ATP jelenlétében, sőt még az aktív (nyílt) konformációról is, azonban mind ez idáig nem érhető el olyan szórásképből feloldott szerkezet, ahol kalciumok lennének láthatóak. A szöveti transzglutamináz rendelkezik GTPáz aktivitással, és a guanozin-foszfátok kötődése negatívan hat a transzamidáz aktivitásra. Érdekes, hogy egyensúlyi dialízis kísérletek alapján a kötött kalciumok száma hatra tehető, a GTP pedig csökkenti a kötött kalciumok számát. A mérsékelt szekvencia homológia ellenére, szembevetően jól konzerválódott a másod- és harmadlagos szerkezet a nyolc humán transzglutamináz esetében. Ezen szerkezeti homológia alapján, a Yee és munkatársai által közölt FXIII-A<sub>2</sub> szerkezetet felhasználva homológiamodellezéssel előállított TG2 szerkezet 50 ps hosszúságú, szabad molekuladinamikai szimulációt végeztek, implicit oldószermodellel, és három kalciumion jelenlétében. Feltehetően az alacsony sztöchiometria és a rövid szimulációs idő miatt nem volt tapasztalható jelentős szerkezeti változás, azonban a kalciumok jelenlétében a forgási sugár növekedéséről számoltak be. Az enzim emésztése során a hurok régió a katalitikus központi és az 1-es  $\beta$ -hordó domén között hasítható. A <sup>43</sup>Ca NMR kísérletek alapján a GTP teljesen megszüntette a kalciumionok kötődését, ami meglehetősen nehezen értelmezhető szerkezeti alapon. Király és munkatársai körültekintő *in vitro* kísérleteket végeztek, ami során szisztematikusan mutálták azon aminosavakat, melyeket számítási modellezés és a szerkezeti homológia alapján potenciális kötőhelyként azonosítottak. Ez utóbbi esetben az FXIII-A<sub>2</sub> és a TG3 enzimek esetében volt információ a kalcium kötő helyekről és öt olyan helyet azonosítottak melyek mindegyike hozzájárul a kalciumionok kötődéséhez, valamint befolyásolják az enzim GTPáz és a transzglutamináz aktivitását. Fontos kiemelni, hogy a szerkezeti tanulmányok során közölt 1KV3 krisztallográfiai szerkezet glicin aminosavat tartalmaz a 224-es pozícióban, ugyanakkor a

natív enzim szekvenciájában ez az aminosav valin (<https://www.uniprot.org/uniprot/P21980>). Ez idáig egyetlen olyan szerkezet érhető el, melyben ugyan megtalálható a natív Val224, azonban a szerkezet három egyéb pontmutációt is tartalmaz, de azok jelenlétének oka az eredeti közleményben nem került tárgyalásra (PDB ID: 4PYG). Ahogyan azt Kanchan és munkatársai kimutatták, feltehetően klónozási hiba eredménye volt a Gly224. Jelentős eltérések mutatkoztak a kalcium affinitásban és a GTPáz aktivitásban, ha a natív Val224 aminosavval expresszálták a fehérjét. Az aktív (nyílt) TG2 szerkezete Pinkas és munkatársai által lett meghatározva, ahol az enzimet 150 mM NaCl és 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , valamint egy irreverzibilisen kötődő módosított pentapeptid inhibitor jelenlétében inkubálták. A szöveti transzglutamináz protein-protein kölcsönhatásairól összefoglaló található az irodalomban.

Összefoglalva elmondható, hogy mind a XIII-as véralvadási faktor A alegysége, mind a szöveti transzglutamináz kísérletileg egyaránt széles körben vizsgált fehérjék, ugyanakkor ezidáig a kalcium-függő aktiváció számos tekintetben felderítetlen maradt. Munkámban egy sor mikroszekundum hosszúságú “*all-atom*” molekuladinamikai szimulációt végeztünk a zimogén, a proteolitikusan aktivált és az aktivációs peptidet nem tartalmazó FXIII-A<sub>2</sub> esetében. A szöveti transzglutamináz vizsgálatánál különös figyelmet szenteltünk a kalciumionok és a GDP/GTP jelenlétének egyedi, illetve azok együttes hatásának tanulmányozására. A Gly224Val pontmutáció dinamikára gyakorolt lehetséges hatásait csupán érintőlegesen kívántam tárgyalni az említett pontmutációk jelenléte miatt.

## CÉLKITŰZÉSEK

### ***A papain teljes enzimmechanizmusának vizsgálata***

A papain enzimmechanizmusa kapcsán fő célunk volt, hogy megvizsgáljuk hogyan teljesítenek az egyes diszperziós korrekciót tartalmazó funkcionálok az ONIOM típusú hibrid számítások QM tagjaként, továbbá összehasonlítottuk őket az ilyen korrekciót egyáltalán nem tartalmazó standard B3LYP módszerrel kapott eredményekkel. Megvizsgáltuk továbbá, hogy ezen funkcionálokkal esetleg jósolható-e diverz reakcióút, vagy csupán igazolásra kerülnek korábbi elméletek a papain enzimmechanizmusára vonatkozóan. A legjelentősebb ilyen eltérés lehet az oxianionos és ikerionos tetraédes intermedier létezése az acilezési lépés potenciális energiafelületén.

Annak érdekében, hogy igazoljuk azt, hogy a QM/MM (ONIOM) potenciális energia felületen valóban lokális minimumokat vagy elsőrendű nyeregpontokat határoztam meg, minden esetben kiszámoltuk a geometria szerinti második deriváltakat. A számolásokat a

Gaussian szoftverben implementált „Electronic Embedding” (EE) ONIOM módszerrel végeztem.

### ***Az FXIII-A<sub>2</sub> és a TG2 kalcium dependens aktivációjának vizsgálata***

Figyelembe véve azon faktorok sokaságát, melyek szerepet játszanak az FXIII-A<sub>2</sub> és a TG2 fehérjék kalciumionok kötődése által indukált konformációs aktivációjában, célul tűztük ki ezen kezdeti események részleteinek vizsgálatát. Így az FXIII-A<sub>2</sub> esetében vizsgálni kívántuk a zimogén, a protetikusan aktivált és az AP feltételezett disszociációja után visszamaradt – még mindig zárt, azaz inaktív – homodimer dinamikai tulajdonságait. Vizsgálni kívántuk a kialakuló kalciumkötőhelyeket, különös tekintettel a fő kötőzsebre.

Hasonló részletességgel vizsgáltuk a TG2 esetében a GDP hatását a szöveti transzglutamináz dinamikájára, valamint a kalciumkötődésre, továbbá a dinamikai trajektóriákból nyert adatokat összehasonlítottuk a releváns kísérleti előzményekkel. A kovariancia mátrixok és főkomponens analízisek segítségével, azonosítani kívántuk azon szerkezeti elemeket melyeknek kiemelt szerep tulajdonítható az aktiváció során. Érintőlegesen vizsgáltuk az FXIII-A<sup>0</sup> és TG2 aktív formáit, azok kalcium kötő képességét. Kiegészítésként a munka során alkalmazott gömb-szerű kationokkal történő szimulációkhoz, két esetben vizsgálni kívántuk a kialakult kötőhelyek relevanciáját olyan ionmodell alkalmazásával, amelyben a kalciumion koordinációját töltéssel bíró színlelt (dummy) atomokon keresztül vesszük figyelembe („*multi-site*” modell).

## **MÓDSZEREK**

### ***A papain enzimmechanizmusának vizsgálata***

Az enzimreakciók vizsgálatánál az 1PPN krisztallográfiai úton meghatározott szerkezetéből indultam ki, és 250 ns hosszúságú NpT molekuladinamikai szimulációkat futtattunk, mind a neutrális (cisztein-hisztidin), mind az ionpár formában jelen levő aminosavakat tartalmazó fehérjére. Dodekaédeses szimulációs cellában, TIP3P explicit víz modellel szolvatálva a neutralizált dobozban 150 mM NaCl koncentráció mellett, Amber FF99SB erőterrel Berendsen barosztát és velocity-rescaling termosztát alkalmazásával kerültek futtatásra a szimulációk, melyekhez a GROMACS szoftvert használtunk. A rövid távú és van der Waals energiatagokra 10 Å cut-off távolságot használtam, továbbá Ewald-féle összegzés (Particle Mesh Ewald, PME) módszert alkalmaztam a hosszútávú elektrosztatikus energiák számítására.

Mivel a krisztallográfiás szerkezet nem tért el jelentősen a dinamikai trajektóriából származtatottól – leszámítva dinamika hőmérséklet függő fluktuációját –, így az előbbi szerkezetet az AMBER 12 sander szoftverrel optimáltuk, majd használtuk fel a QM/MM (ONIOM-EE) számításokhoz.

A mechanizmus részlépéseinek értelmezéséhez használt ábrákon pálcika vagy golyópálcika modellekben az atomok jelölése a következő: fehérrel a hidrogént, kézzel a nitrogént, pirossal az oxigént, feketével vagy semleges színnel a szenet illetve sárgával a kenet jelöltük.

A katalitikus centrum  $\sim 15$  Å távolságon belüli környezetére (Val16-Ala30, Ser60-Trp69, Val130-Ala136, Lys156-Ala162, Ile173-Gly178, Thr204-Phe207) csonkítottam a teljes rendszert, a létrejövő N- és C-terminálisokat acetil (ACE) és N-metil (NME) csoportokkal zártam le. Ezen rendszer Gln19-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys25, Gly62-Cys-Asn-Gly-Gly66, Asp158-His159, Asn175-Ser-Trp177 aminosavait optimáltam a potenciális energiafelületek pásztázásánál is. A terminális ACE és NME csoportok atomjai úgy lettek elhelyezve, hogy azok rendre az  $(n-1)$  és  $(n+1)$ -ik aminosav N, C $\alpha$  illetve C, O, C $\alpha$  atomjaival azonos pozícióban legyenek. A létrejött csonkított „fehérje” tartalmazott minden aminosavat, melynek hatása lehet a mechanizmusra. A szubsztrát N-metil-acetamiddal (NMA) együtt összesen 780 atomot tartalmazott ez a kiindulási modell. Miután a reakció minden elemi lépése felderítésre került, és rendelkezésre álltak a stacionárius pontok geometriái, a trunkált rendszer vissza lett illesztve az eredeti fehérjébe a VMD szoftver segítségével. A továbbiakban kizárólag a teljes rendszer hozzájárulásával nyert adatok kerülnek tárgyalásra.

A QM (magas szintű) rétegre a B97-D, M06-2X,  $\omega$ B97X-D és a B3LYP módszereket, valamint a 6-31G(d,p), 6-31+G(d,p), 6-311+G(d,p) és 6-311++G(d,p) Pople típusú báziskészleteket használtam. Az MM (alacsony szintű) rétegre az Amber erőteret használtam, mely implementálva van a Gaussian szoftverben.

### ***Az FXIII-A<sub>2</sub> és a TG2 aktivációjának vizsgálata***

#### *Modellrendszerek*

Annak érdekében, hogy az FXIII-A<sub>2</sub> kalciumkötődését megfelelő alapossággal tudjuk vizsgálni három szimulációs csoportot hoztunk létre. Az első csoportban (i) a zimogén enzim két formáját tanulmányoztuk. Az *i/a* modell alapjául a kötött kalciumokat tartalmazó XRD szerkezet szolgált (PDB ID: 1GGU), a rendszer teljes kalcium koncentrációja 14 mM-ra lett beállítva. Az *i/b* modellben a kalciumot nem tartalmazó szerkezetet vizsgáltuk (PDB ID: 1F13), és a rendszer kalcium koncentrációja ebben az esetben 50 mM volt. A második szimulációs csoportban (ii) az FXIII-A<sub>2</sub> a thrombin által aktivált fehérjét tanulmányoztuk,

oly módon, hogy felhasítjuk az Arg37 és Gly38 közötti kötést. Az *ii/a* és *ii/b* modellek az *i/a* és *i/b* modellek megfelelői voltak, míg a *ii/c* esetben *i/b*-vel azonos fehérjeszerkezetből indultunk ki, de csupán 14 mM Ca<sup>2+</sup> koncentráció volt jelen. A csoport utolsó modell rendszere a *ii/d* volt, mely kalciumionokat nem tartalmazott és referenciaként szolgált. A harmadik szimulációs csoportban (*iii*) az aktivációs peptidet nem tartalmazó homodimerek dinamikai vizsgálata volt a fő cél az 1F13 szerkezetből kiindulva. A csoport három modellt tartalmazott, melyek rendre a kalciumot nem tartalmazó (*iii/a*), (*iii/b*) 14 mM Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazó és végül (*iii/c*) 1000 mM Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazó rendszerek voltak.

A követhetőség érdekében külön szimulációs csoportban vizsgáltuk a szöveti transzglutaminázt (*iv*). Az *iv/a* és *iv/b* modellek esetében a krisztallográfiai szerkezetben található, kötött GDP eltávolításra került, míg *iv/b* esetében 8 mM kalcium került hozzáadásra. Az *iv/c* és *iv/d* rendszerek megfeleltek az *iv/a* és *iv/b* modelleknek, azonban itt a GDP-t megtartottuk, annak érdekében, hogy vizsgálható legyen annak feltételezett hatása. Ezen szimulációkban az 1KV3 szerkezetet használtuk fel, viszont ezen szerkezetben a Val224 aminosav feltehetően klónozási hiba eredménye, így a 4PYG szerkezetet is vizsgáltuk (*iv/e*). Ez már a natív Gly224 aminosavat tartalmazza, de ezen kívül még három pontmutációt is tartalmaz, melyeket nem diszkutáltak az eredeti közleményben.

Az utolsó (*v*) szimulációs csoport a nyílt (aktív) konformációt tartalmazta az FXIII-A<sup>o</sup> (*v/a*, PDB ID: 4KTY) és a TG2 (*v/b*, PDB ID: 2Q3Z) enzimeknek. Ezen szimulációk érdekes eseteket reprezentálnak, de nem tartoznak szorosan a disszertációban témájához.

A munka során az irodalomban elterjedt számozást alkalmaztuk a fehérjéket alkotó aminosavakra, miszerint az első (iniciátor) metionin nem került számozásra az FXIII-A<sub>2</sub> esetében, ezzel szemben a szöveti transzglutamináz vizsgálatánál a szekvencia Met1-el kezdődött.

### *Molekuladinamikai szimulációk*

A modell rendszerek oktaéderez szimulációs dobozban lettek szolvatálva TIP3P vízmodellel, a cellák méretének megválasztásánál 12 Å minimális távolságot biztosítottam a protein és a doboz fala között. A rendszerek ösztöltése minden esetben zérus volt és a teljes nátrium-klorid koncentrációt az izotóniás sókoncentrációnak megfelelően (150 mM) választottam meg. Rövid energiaminimálás után, 2 ns hosszúságú szimulált hőkezelés (simulated annealing, SA) került alkalmazásra, 310 K-en és 1 bar nyomáson a rendszer ekvilibrálása végett. Az ekvilibrálási folyamat során a nehézatomokon 1000 kJ mol<sup>-1</sup>nm<sup>-2</sup> kényszer erők kerültek alkalmazásra. A szimulációs modellektől függően 1 vagy 2

mikroszekundum hosszúságú NpT molekuladinamikai szimulációkat futtattam. Annak érdekében, hogy a newtoni mozgásegyenletek megoldására 4 fs-os lépésközt lehessen alkalmazni, virtuális kölcsönható pontok kerültek elhelyezésre, melyek magas rezgési hullámhossznál adják vegyértékrezgésük első harmonikusát. A szimulációk során minden kötés meg volt kötve a LINCS algoritmus segítségével. Azon modellekben, ahol GDP vagy GTP volt jelen 2 fs-os lépésközt alkalmaztam és a szimulációk minden esetben 1  $\mu$ s-ig tartottak. A Lennard-Jones és a rövid távú elektrosztatikus kölcsönhatások számítására 10,0 Å-ös cutoff érték került alkalmazásra. Simítási módszert alkalmaztam annak érdekében hogy 7,0 és 10,0 Å között az erők levágása folytonosan történjen. A hosszútávú kölcsönhatások a PME összegzés segítségével kerültek számításra. A hőmérséklet közel állandó értéken tartására a velocity-rescaling módszert alkalmaztam, míg a nyomást izotróp Parinello-Rahman barosztáttal szabályoztam. Amber-99SB-ILDN-NMR erőteret alkalmaztam a szimulációk során, míg a GDP és GTP szubsztrátokat Amber GAFF paraméterek segítségével vettük figyelembe. A használt Amber-99SB-ILDN-NMR erőteret korábban sikeresen alkalmaztuk NMR adatokból kiindulva a kalciumkötődés vizsgálatára. A munka során összesen több mint 21  $\mu$ s-os atomi felbontású (all-atom) molekuladinamikai szimuláció került kivitelezésre.

Két esetben (*ii/c* és *iv/d*), további 50 ns NpT MD szimulációt végeztem Amber ff14SB erőterrel és “*multi-site*”  $\text{Ca}^{2+}$  modell alkalmazásával annak érdekében, hogy igazoljuk az egyszerű ionmodellekkel kapott eredmények relevanciáját. Ezen két esetben a mikroszekundumos szimulációk utolsó pillanatképe került felhasználásra, valamint a kötött kalciumionokat megtartottuk, és a “*multi-site*” modell XZ atomját illesztettük mindegyik ionra. A rendszereket TIP3P vízmodellel töltöttük fel, neutralizáltuk, és 150 mM NaCl koncentráció került beállításra. A szimulációk során 10,0 Å cut-off került alkalmazásra, és energia minimalás után három fázisú, összesen 1,7 ns hosszúságú ekvilibrálás következett, melynek során a rendszer 310 K-re lett felfűtve, majd a sűrűsége került beállításra, ezt követően pedig az ekvilibrálás következett.

A molekuladinamikai szimulációkat GROMACS 5.1.4 és az Amber csomag pmemd szoftverével kerültek futtatásra. A dinamikai trajektóriákat a Gromacs csomag szoftvereivel valamint a cpptraj programmal analizáltuk. A dinamikus kereszt-korrelációk számításához (DCCM) 12500 pillanatképet használtam és a Bio3D v2.3 csomaggal kerültek számításra, ami az R statisztikai programban van implementálva. A mátrixműveletek szintén az R program segítségével lettek elvégezve. A szerkezetek az UCSF Chimera 1.11.2 és a Visual Molecular Dynamics (VMD) 1.9.1 programokkal kerültek megjelenítésre. A fehérjék azon szegmenseit, melyek nem megfelelően vagy részben nem megfelelően voltak meghatározva a krisztallográfiai szórásképből, a MODELLER 9.10 szoftver segítségével pótoltam és azon

szerkezet került felhasználásra mely a legjobb DOPE score-ral rendelkezett. Mindezt a UCSF Chimera grafikus interfészén keresztül végeztem el. Figyelembe véve, hogy az FXIII-A<sub>2</sub> 1GGU kristallográfiás szerkezetében a Thr508-Ser516 közötti hurok régió hiányzik, valamint ezen régió az 1F13 szerkezetben is két különböző állapotban található meg. Ahelyett, hogy *ab initio* modelleztem volna a kérdéses régiót, egyszerűen az 1F13-ban található hurkokat alkalmaztam az 1GGU-ban oly módon, hogy az 1F13 A főláncához tartozó hurkot az 1GGU B főláncába illesztettem. A munkában látható adatok a matplotlib és a numpy python könyvtárak segítségével kerültek megjelenítésre, melyekhez általam írt szkripteket alkalmaztam. A titrálható aminosavak protonáltságát a H<sup>++</sup> webszerver segítségével határoztuk meg 7,4-es pH-n. A szöveti transzglutamináz esetében minden negatív töltésű oldallánc deprotonálnak adódott.

### *A molekuladinamikai szimulációk kiértékelése*

A trajektóriák 80 ps-onként kerültek mentésre, és az atomi koordináták négyzetes közepe (RMSD), a forgási sugár ( $r_{\text{gyr}}$ ) és a fluktuációk (RMSF) számolására a protein nehézatomjait vettük figyelembe. Annak érdekében hogy az FXIII-A<sub>2</sub> esetében az aktivációs peptid (Ser2-Arg37) ne befolyásolja az eredmények összevethetőségét, ezen régiókat mellőztük az RMSD és  $r_{\text{gyr}}$  számításánál. Az aminosavakra átlagolt RMSF értékek mindkét alegységre külön-külön kerültek számításra, majd átlagolásra kerültek. A DCCM mátrixokhoz a C-alfa atomok trajektóriáját használtuk fel, így szimmetrikus  $N \times N$  -es mátrixokat nyertünk. Mivel az atomi mozgások korrelációjának kiértékelése nehézkes ilyen méretű fehérjék esetében, a különbségek kiemelésére törekedtünk oly módon, hogy a különbségét vettük az adott mátrix  $C_{ij}(2)$  és egy referencia  $C_{ij}(1)$  mátrix értékeinek. A Ca<sup>2+</sup> kötési tulajdonságok vizsgálatánál a savas oldalláncok karboxilát szenének és bármely kalciumionnak a távolságát vettem figyelembe. A nagy amplitudójú, alacsony frekvenciájú mozgások számításánál az első 10 sajátvektor került számításra, melyeket a ProDy szoftver segítségével végeztem el. A domén mozgások változásának leírására egy pszeudo torziós szöveget definiáltam és a dinamikai mozgásokból számolt szórásértékek is fel lettek tüntetve minden esetben, az FXIII-A<sub>2</sub> szimulációinál.

## EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

### *A papain enzimmechanizmusa*

#### *A papain nyugvó állapotának vizsgálata*

A 250 ns hosszúságú molekuladinamikai szimulációk, a szabad (N-metil-acetamidot nem tartalmazó) papain esetében mind a neutrális, mind az ionpár formában lévő ciszteinhisztidin diád jelenlétében azt mutatták, hogy a rendszerek jól ekvilibrálódtak az első 100-150 ns szimulációs idő alatt. Az is látható, hogy a neutrális forma szimulációjában a (Cys25)Hy és a (His159)Nδ közötti jelentős távolságbeli fluktuáció ellenére a legrövidebb távolságok (1,8-2,0 Å) megfelelnek az átlagos H-híd távolságnak, és mint ilyen a szimuláció jelentős részében jelen van. Ez azt sugalja, hogy a protonátmenet a (Cys25)Sy és a (His159)Nδ között előfordulhat víz jelenléte nélkül is, ezért mediátor vízmolekulát nem vettünk figyelembe a rendszer QM/MM (ONIOM-EE) vizsgálatánál. Másrészt, a protonátmenet után a (His159Nδ)-Hδ...Sy-(Cys25) távolság továbbra is megfelel a hidrogénkötésnek megfelelő.

A szimulációk elemzése során jelentős eltérések tapasztalhatók a katalitikus diád környezetében előforduló vízmolekulák számában. Míg a neutrális diád szimulációjánál a (Cys25)Sy atomnál nulla és három közötti számosságú vízmolekula fordul, addig az ionpár formában jelen lévő diád esetében ez a szám kettő és négy közöttire tehető. Ez alapján feltételezhető, hogy az oldószer hozzájárul az egyes formák stabilizálásához. Eltekintve a hőmérsékleti fluktuációtól mindkét esetben a Cys-His diád és annak közeli környezete jelentős hasonlóságot mutatott a kiindulási röntgenkristallográfiás szerkezettel.

A (His159)Nδ–Hy–Sy(Cys25) H-híd kapcsolat létezése a teljes szimulációk során ahhoz az elfogadható feltételezéshez vezetett, hogy a statikus ONIOM számítások megfelelően kivitelezhetőek az optimált H-kötéses szerkezetből. Ezen számításoknál minden esetben azt találtuk, hogy a zérusponthoz viszonyított vibrációs energia (ZPVE) nélkül nagyjából azonos energia értékek adódtak a semleges (N) és az ionos (Z) diád formákra is. Ezen rendszerek energiái között nem több mint 0,8 kcal mol<sup>-1</sup> volt a különbség. Az ωB97X-D módszerrel nyert eredmények az ion pár formát jósolják a legstabilabbnak, míg a többi módszerrel meglehetősen változó eredményeket kaptunk. Az M06-2X módszerrel kapott eredmények közelebb állnak az ωB97X-D értékeihez, ugyanakkor a B97-D és a B3LYP módszerek esetében nagyon kis különbség fedezhető fel, továbbá jellemzően azonos függőség mutatkozik az alkalmazott báziskészlet minőségétől. Korábbi munkákban azt találták, hogy az ionpár forma (Z) valóban stabilabb, mint a neutrális diád (N).

A zérus ponti energiakorrekció figyelembe vételével a neutrális forma adódik stabilabbnak minden általunk elvégzett számítás esetében. Mindazonáltal a két jellemző forma közötti korrigált energiakülönbség kicsiny marad, kevesebb mint  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$  minden esetben. Az ionpár  $\rightarrow$  neutrális diád átmenetre az alkalmazott módszerek alacsonyabb ZPVE korrigált aktiválási gátat jósolnak, mint a neutrális  $\rightarrow$  ionpár diád irányában történő átmenetre. Ez azt jelenti, hogy spontán átmenet lehetséges a neutrális diád irányába ezen formák között, azaz még  $0 \text{ K}$  hőmérsékleten is aktiválási gát nélküli reakcióról beszélhetünk.

Ezen zérus ponti korrekciót tartalmazó elméleti energiaértékek a korábbi elméletekkel ellentétesek, melyek az ionpár forma stabilitását hangsúlyozták, ugyanakkor van valószínűsége a neutrális forma létezésének, azaz energiáik feltehetően közel esnek egymáshoz.

Az oldószer molekuláknak az ionpár forma relatív energiájára gyakorolt hatását szofisztikált QM/MM számításokkal demonstrálták a katepszin példáján, mely papain homológjának tekinthető. Így bizonyított, hogy az ionpár diád csupán akkor adódik stabilabbnak, ha figyelembe vesszük az azt körülvevő vízmolekulákat.

Ezért úgy döntöttünk, hogy elektrosztatikus oldódási szabadenergia számításokat végzünk, mind az ionpár, mind a neutrális cisztein-hisztidin diádra, annak érdekében, hogy becsülni tudjuk a solvatáció hatását. A molekuladinamikai szimulációk utolsó  $100 \text{ ns}$ -a alapján számolt Poisson-Boltzman (PB) értékeket átlagolva az ionpár formára  $20 \text{ kT}$ -vel ( $\sim 11.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) nagyobb elektrosztatikus solvatációs energiatag adódik, melyeket a későbbiekben korrekciós tagként alkalmaztunk az ONIOM számításokból nyert ZPVE korrigált energiákra ( $E^{\text{ZPVEc}}$ ). Ezen korrekció elég nagy volt ahhoz, hogy megfordítsa a relatív stabilitását a két diád formának, azaz az ionpár formát adja stabilabbnak minden esetben. Jóllehet az általunk alkalmazott módszer alapvetően különbözik a Mladenovic és munkatársai által alkalmazottól, ahol egyértelműen hangsúlyozzák az oldószer fontosságát az ionpár forma stabilizálásában.

Az adatok azt mutatják, hogy az általunk kivitelezett ONIOM számításokban alkalmazott sűrűségfüggő módszerek nagyon hasonló geometriai paramétereket szolgáltatnak az S–H és a semleges imidazol oldallánc gamma protonja esetében, ugyanakkor a B97-D módszer jelentősen rövidebb  $\text{N}\delta\text{--H}\delta$  távolságot és kicsit hosszabb  $\text{S}\gamma\text{--H}\gamma$  távolságot becsül, azaz erősebb hidrogénkötést jósol az  $\text{N}\delta\text{--H}\gamma\text{--S}\gamma$  atomok között. A báziskészletek méretének és minőségének hatása itt elhanyagolható. Szintén érdekes, hogy ugyanezen módszerrel adódtak a leghosszabbnak az S–H távolságok, míg az átmeneti állapot esetében némiképp jobban szórnak az eredmények.

A  $d1$  és  $d2$  távolságok a semleges és az ionpár diád, valamint az átmeneti állapot esetében jó egyezést mutat a korábbi elméleti eredményekkel a papain–N-acetil-Phe-Gly-4-nitroanilid enzim–szubsztrát komplex esetében publikáltakkal. Kiemelendő, hogy a  $d1$  és  $d2$  távolságok az ionpár formára szintén jól egyeznek szofisztikált QM/MM-(MD) számítások átlagolt értékeivel, míg a neutrális formát illetően jelentősen eltérnek a Mladenovic és munkatársai által publikáltaktól. Ez utóbbi eltérésre magyarázatként szolgálhat, hogy a neutrális diád sokkal nagyobb konformációs flexibilitással rendelkezik, melyet a mi MD szimulációink is alátámasztanak.

#### *Az acil-enzim intermedier képződése*

Számításaink alátámasztják az ikerionos acil-enzim intermedier létezését, így az átmeneti állapotok energiáit a Michaelis komplexek (MC) energiáival hasonlítottuk össze. Ellentétben eredményeinkkel Wei és munkatársai egy lépéses, elemi reakciót javasoltak a mechanizmusra, stabil (tetraédes) intermedier állapot nélkül. Számításaikat B3LYP/6-31G(d) szinten számolt reakcióút modellezésre és B3LYP/6-13++G(d,p) augmentált báziskészlettel történő energiaszámításra és pszeudo-kötés szabadenergia becslésre alapozták a QM/MM számítások keretein belül.

A Michaelis komplex geometriáját illetően a kötэшossz paraméterek csupán csekély függőséget mutatnak az alkalmazott elméletektől. Másrészt a nemkötő távolságok sokkal inkább mutatnak módszerfüggő eltéréseket. A leghosszabb kötэшávolságok az  $S_{\gamma}$ -C(peptid-karbonil) és a (His159N $\delta$ )H-N(peptid-amid) esetében a B3LYP módszerrel adódtak, amire magyarázatként szolgálhat az, hogy a B3LYP funkcionál nem tartalmaz megfelelő tagot a hosszútávú kölcsönhatások leírására. A legszembetűnőbb különbségek a nemkötő távolságok esetében a B3LYP és az M06-2X módszer összehasonlításánál jelennek meg. Összehasonlítva eredményeinket a Wei és munkatársai által közöltekkel az N-acetil-Phe-Gly-4-nitroanilid szubsztrát esetében kapott amid kötэш hossza 1,37 Å mely kissé rövidebb mint az általunk kapott eredmények. További hasonlóságok fedezhetőek fel a korábban publikált eredmények és az általunk közöltek között a nemkötő távolságok tekintetében, azzal a kivétellel, hogy az  $S_{\gamma}$ -C(peptid-karbonil) között távolság 3,7 Å-nek adódott a már említett munkában.

A papain-NMA Michaelis komplex hidrogénkötésekkel stabilizált szerkezet, melyben az NMA karbonil oxigénje H-híd kölcsönhatásban van a Gln19 oldalláncával, valamint a Cys25 amid hidrogénjével. A megfelelő orientáció kialakításában a Gln19, a Trp177 és a Gly23 aminosavak fontos szerepet töltenek be, valamint meg kell jegyeznünk, hogy a His159 imidazol gyűrű és a Cys25 $S_{\gamma}$  megközelítőleg egy síkban van.

A kinyert távolságokból látható, hogy a tetraédes intermedier megfelel a formális ikerionos intermedier szerkezetnek. Ugyanakkor ezen szerkezet különbözik a klasszikus oxianionos intermediertől, ahol a szubsztrát amid nitrogénje nem szenved koncertikus protonálódást a nukleofil támadással egy időben, és létezése egyértelműen bizonyított a szerin proteázoknál. Kijelenthető tehát, hogy esetünkben a tiolát  $S_{\gamma}$  nukleofil támadása a szubsztrát karbonil szén atomján egy elemi lépésben történik a hisztidin imidazólium oldalláncának gamma nitrogénjéről történő protonátmenettel az NMA amid nitrogénjére. Mindazonáltal megfigyelve a  $d1$ ,  $d3$  és  $d4$  karakterisztikus távolságokat, azok elemi asszinkronitást adtak. Az utóbbi esetben a  $d1$  (S–C) távolság közel van a szerin proteázok esetében említett anionos tetraédes intermedierben (TI) feltételezhetőhöz, míg a  $d3$  és  $d4$  távolságok (protontranszfer) értékeit illetően azok inkább átmeneti állapot jellegű értékek. Ez azt jelenti, hogy az átmeneti állapot hasonlít egy olyan szerkezethez, mely összeköti a már kialakult szerin proteáz-szerű intermediert az ikerionos intermedierrel. Minden más módszernél az átmeneti állapotot főképp az S–C kötés kialakulása határozza meg és a H–N(imidazólium) távolság sokkal inkább hasonlít a Michaelis komplexben mérhetőhöz, továbbá ezen esetek mindegyikében az S–C kötés kialakulása látszólag megelőzi a protonátmenetet. A B97-D módszer esetében jelentősen hosszabb S–C kötéshosszak mérhetőek az átmeneti állapot esetében, szemben más módszerekkel, függetlenül a báziskészlettől. Hasonló, de jóval mértékletesebb tendencia figyelhető meg a tetraédes intermedier vonatkozásában.

Az átmeneti állapotokat és tetraédes intermediereket jellemzően ugyanazon hidrogénkötések stabilizálják, mint amelyeket már említettünk a Michaelis komplex esetében. Jelentős különbség figyelhető meg azonban a His159 imidazol gyűrűjének orientációjában, ami elfordul kezdeti állapotához képest és az N $\delta$ –H kötés az NMA amid nitrogénjének irányába mutat az átmeneti állapotban, így az imidazol gyűrű, már nincs egy síkban a Cys25- $S_{\gamma}$  atomjával.

A B3LYP/6-31G(d,p) módszer esetében kivételes viselkedést tapasztalhatunk, mely eltér minden egyéb esettől. Ebben az egy esetben egy további átmeneti állapotot azonosítottunk, ami a Michaelis komplex és az ikerionos intermedier közötti útvonalon található. A TS1a jelű átmeneti állapot igen hasonló azon átmeneti állapotokhoz, melyeket olyan módszerek esetében véltünk felfedezni, ahol valamilyen módon figyelembe vették a diszperziós korrekciót. Azonban ebben az esetben, a TS1a egy olyan intermedier képződéséhez vezet, amely megfelel az (oxi)anionos, szerin proteáz-szerű intermediernek, ezt követően pedig külön lépésben történik az ikerionos intermedier kialakulása.

Eredményeink alapján belátható, hogy a potenciális energiafelület a két átmeneti állapot (TS1a és TS1b) és közöttük az (oxi)anionos tetraédes intermedier (OI) közel azonos

energiával foglalja el, az ikerionos intermedier (ZI) pedig jelentősen stabilabbnak adódik. Figyelembe véve a ZPVE korrekciót az energiagát, amely elkülöníti az anionos és az ikerionos tetraédes intermediereket eltűnik. Azaz ezen gátnak pusztán elméleti jelentőséget szabad tulajdonítani.

Megfigyelhető, hogy az amid kötés felszakításához szükséges energia (TS2), mely az acil-enzim köztiterméket eredményezi, jelentősen alacsonyabbnak adódik a B3LYP módszerrel. Másrészt maga a szubsztrát szerkezete, a kémiai környezet és még az alkalmazott optimalizációs algoritmus is könnyedén befolyásolhatja eredményeinket, feltehetően ezért találták egy elemi lépésben végbemenő reakciónak acilezési reakciót a B3LYP sűrűségfüggő módszer alkalmazásánál.

A potenciális energiafelületek, melyeket B3LYP/6-31G(d,p) és M06-2X/6-31G(d,p) módszerekkel végeztünk szintén megjósolják az átmeneti állapotok eltérő szerkezeteit. Ezen PES-ek alapján világosan látható, miért volt meglehetősen nehéz megtalálni az átmeneti állapotokat és intermediereket a B3LYP/6-31G(d,p) módszer esetében (és általánosságban a B3LYP számolásoknál). A B3LYP PES pásztázásánál a TS1a látható  $d1$  2,7 Å,  $d3$  1,8 Å-nél, valamint a TS1b esetén  $d1$  2,26 Å és  $d3$  1,47 Å-nél és az első köti össze a Michaelis komplexet (MC) a klasszikus oxianionos intermedierrel (OI), míg a TS1b köti össze az anionos tetraédes intermediert (TI) az ikerionos tetraédes intermedierrel (ZI). A meglehetősen lapos B3LYP PES felületen, a stacionárius pontok létezése már csekély geometriai perturbációk vagy a báziskészletek változtatása által is nagy mértékben befolyásolható. Ezzel szemben az M06-2X PES sokkal szemléletesebb képet fest a nyeregponthelyzetéről.

A potenciális energia felületek pásztázása során nem tapasztaltunk spontán C–N kötéshasadást az NMA szubsztrátnál, így annak érdekében hogy megvizsgáljuk ezen kötés felhasadásának jellemzőit, hasonlóan az előbbiekhöz kétdimenziós pásztázást végeztünk a C–N(amid) és a Cys25Sy–C(amid), valamint az (amid)N–Hδ(His159) kötéstávolságok mentén. Érdekes módon, az utóbbi kombinációban a C–N kötés felhasadásával párhuzamosan lejátszódott az S–C(amid) kötés kialakulása, és az átmeneti állapot helyét ezen felület alapján becsültük meg. Fontos megjegyeznünk, hogy a B3LYP módszer esetében a C–N kötés jelentősen megnyúlt ( $>2,0$  Å), mely szintén magyarázhatja az egy elemi lépésben lejátszódó acilezési lépést adó korábbi eredményeket.

Harrison és munkatársai által kivitelezett hibrid QM/MM számítások alapján, majdnem tökéletesen szinkronban van egymással az Sy atom nukleofil támadása és a proton transzfer (B3LYP/3-21G\*:AMBER). Közel szinkronfolyamatot találtak Wei és munkatársai is ugyanezen esetben az általuk publikált átmeneti állapot geometriája alapján (B3LYP/6-31+

+G\*\*:*AMBER*). Az eltérés ezen irodalmi eredmények és az általunk publikáltak között feltehetően az alkalmazott elméletek, az eltérő modellek és az eltérő QM/MM particionálási sémák különbözőségében lelhető fel. Ahogyan azt említettük, ezen részletek könnyedén befolyásolhatják megfigyeléseinket. A második átmeneti állapot, mely összeköti a tetraédres intermedier és az acil-enzim intermediert, jelentősen lazult C–N kötést tartalmaz (~2,0 Å), ami modellünkben a hasítandó peptidkötés megfelelőjének tekinthető az NMA szubsztrát jelenlétében. Meg kell említenünk hogy a B97-D módszer esetében a legkisebb alkalmazott báziskészlettől (6-31G(d,p)) eltekintve, minden más esetben figyelemreméltó eltéréseket tapasztaltunk. Szintén fontos az is, hogy a B3LYP módszer esetében jelentősen alacsonyabb aktiválási gátat kaptunk az acilezési lépés utolsó részfolyamatára. Mindazonáltal az acil-enzim képződésére az eredményeink nagyon hasonlóak. Általánosságban véve a B97-D módszer, báziskészlettől függetlenül némiképp hosszabb S–C távolságot adott, más módszerekhez képest, ugyanakkor a B3LYP módszer esetében voltak tapasztalhatóak a leghosszabb távolságok, míg más módszerek, kiváltképp az M06-2X jelentősen rövidebb távolságokat adott. Ezen megfigyelés magyarázható azzal, hogy a B3LYP módszer nem tartalmaz hosszútávú elektron-elektron kicserélődést figyelembe vevő tagot. Eredményeinket összevetve Wei és munkatársai által közöltekkel, jelentősen rövidebb  $d_4$  távolságot (2,09 Å) kaptak, mely erősebb hidrogénkötést sugall az NMA amid hidrogénje és a hisztidin N $\delta$  atomja között.

Az aktiválási energiák tekintetében általános következtetés vonható le, miszerint az acil-enzim képződése, azaz az első elemi lépés determinálja a folyamat sebességét. A számolt ZPVE-korrigált energiák ~10-13 kcal mol<sup>-1</sup> tartományban vannak, az alkalmazott módszertől függően. Minden esetben azt találtuk, hogy az ikerionos intermedier kevésbé stabilabb a Michaelis komplexnél. Az acil-enzim intermedier képződéséhez vezető, második átmeneti állapot, sokkal könnyebben végbemehet, mint az első lépés. A képződött acil-enzim + metil-amin rendszer teljes energiája pedig magasabb a kiindulási komplex energiájánál. Ez önmagában azt jelenti, hogy a reakció el van tolva a reaktánsok irányába, ugyanakkor feltételezhető, hogy élettani körülmények között specifikus kötőhelyek hiányában a képződő amin termék gyorsan disszociál az enzim felületéről, mely az acil-enzim termék irányába tolja el a reakció lefolyását.

Figyelembe véve a korrelációs és kicserélődési tagokban alkalmazott paraméterek számát, melyeket a B97-D,  $\omega$ B97X-D és M06-2X módszerekben alkalmaztak, nehéz megmagyarázni az energiák és a geometriák tekintetében kapott eltérő eredmények forrását. Mindazonáltal általános megfigyelés, hogy a B3LYP módszer minden esetben jelentősen hosszabb nemkötő atomok közötti távolságot adott, mely a már korábban említett, hosszú távú

kölcsönhatásokat megfelelően figyelembe vevő korrelációs és kicserélődési tagok hiányának tudható be, ezen túl a kémiai kötések tekintetében hasonlóságok fedezhetőek fel.

### *Az acil-enzim intermedier hidrolízise*

Az acil-enzim intermedier képződése után a következő lépés, annak hidrolízise. Ezen reakció vizsgálata során az acilezési lépés metilamin termékének metil csoportját eltávolítottuk, és a megmaradt, csonka amino csoportban a nitrogén atomot oxigénre cseréltük, azaz egy víz molekulát alkalmaztunk. A távolságok, melyeket felhasználtunk a hidrolízis követésére az S–C ( $d1$ ), O(víz)–C ( $d2$ ), H(víz)–O(víz) ( $d3$ ), és a H(víz)–N(imidazol) ( $d4$ ) távolságok voltak. A B3LYP és B97-D módszerek esetében csupán csekély mértékben nőttek meg az S–C és C–O távolságok. Ezen paraméterek egyike sem mutatott jelentős függőséget az alkalmazott báziskészletek minőségétől.

Azon átmeneti állapotot (TS) illetően, mely az acil-enzim–víz komplexet (C) összeköti a papain–ecetsav komplexszel (P), tulajdonképpen nagyon hasonló eredményeket kaptunk a geometriákat illetően. A számolt átmeneti állapotokra a  $d2$  távolságok esetében már említettem azok némiképp hosszabb voltát. A  $d3$  kötés felhasadás és a  $d4$  kötés kialakulás esetében tulajdonképpen azonos eredményeket kaptunk, csupán az  $\omega$ B97X-D módszerrel számoltunk kissé rövidebb  $d3$  távolságot a  $d4$ -hez képest.

A számolt PES-ek B3LYP/6-31+G(d,p) és M06-2X/6-31+G(d,p) elméleti szintek esetén szinkron reakciót ad a  $d2$  és  $d4$  távolságok alapján, míg a TS geometriáknál a  $d1$  távolság csekély mértékben hosszabb, mint a reaktánsokban. Az S–C ( $d1$ ) kötés hasadás spontán bekövetkezik rövidebb  $d2$  és  $d4$  távolságoknál. Mivel belső reakciókoordináta (Intrinsic Reaction Coordinate, IRC) számításokra nem volt módunk, így manuálisan ellenőriztük azt, hogy a kapott átmeneti állapot valóban összeköti-e a kiindulási komplexet a termékekkel. A geometriaoptimalások a TS előtti pontból kiindulva a kiindulási acil-enzim–víz komplexhez, míg a TS utáni pontokból kiindulva papain–ecetsav komplexhez vezettek (P), ezzel az átmeneti állapot valóságát igazoltuk.

Ezen adatok alapján egy elemi lépésből álló reakció írható fel, melyben az O(víz)–C(karbonil) és a H(víz)–N $\delta$ (hisztidin) kötések kialakulása megelőzi az S–C kötés hasadását. A termék geometriák tekintetében szintén nagyon hasonló eredményeket kaptunk, melyek közül a B3LYP módszerrel végzett számítások ismét kissé eltérő eredményeket adtak a nemköti távolságokat illetően.

Korábbi eredmények arra utalnak, hogy a reakció két különálló lépésből áll, ugyanakkor ezen eredmények alapján a második részlépés aktivációs (szabad) energiája,

rendkívül alacsony, valamint az első részlépés átmeneti állapota és az általunk közölt eredmények között hasonlóság figyelhető meg. Az O(víz)–C(karbonil), O(víz)–H(víz) és a H(víz)–N $\delta$ (hisztidin) távolságok 1,68 Å, 1,16 Å és 1,32 Å-nek adódott Wei és munkatársainak munkájában, melyek jó egyezést mutatnak a  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$  távolságokkal. A második részlépés a S–C kötés hasadáshoz tartozik, ami a mi esetünkben nem spontán következett be.

Az átmeneti állapotok energiái az alkalmazott sűrűségfüggő funkcionál módszerekkel a  $\sim 10$ – $14$  kcal mol $^{-1}$  tartományba estek. Általánosságban véve a legnagyobb báziskészletekkel számoltuk a legmagasabb aktiválási gátakat, illetve az is belátható, hogy a termékoldali komplex energiája mindig magasabb, mint az acil-enzim–víz komplex energiája. Ahogyan azt említettük az acilezési lépés esetében, nem vizsgáltuk sem az explicit szolvens hatását, sem pedig az ecetsav eltávozását a számolt reakció energetikájára vonatkozóan.

Az acilezési és a dezacilezési reakciókat összehasonlítva a sebességmeghatározó lépésekhez tartozó aktiválási gátak összemérhetőek, de a dezacilezési lépés kissé magasabb aktiválási gáttal rendelkezik. Általánosan elfogadott, hogy az amid kötés hidrolízisének sebességmeghatározó lépése az acilezési lépés szemben az észterhidrolízissel, melynél a dezacilezési lépés a sebességmeghatározó. A kevés cisztein-proteázok teljes mechanizmusát vizsgáló elméleti munka alapján, valóban összemérhető gátakkal bír eme két részlépés.

Alkalmazva az Eyring-Polányi egyenletet a  $k_{cat}$  értékekre (melyek tipikusan az  $1$ – $50$  s $^{-1}$  tartományba esnek, szubsztráttól, hőmérséklettől és más paraméterektől függően),  $310$  K hőmérsékleten és a transzmissziós együtthatót egységnyiinek véve az aktivációs szabadentalpia  $15,8$ – $18,1$  kcal mol $^{-1}$  közöttinek adódik. Feltételezve, hogy sem az entrópia, sem pedig az entalpia  $p\Delta V$  tagjának nincs jelentős hozzájárulása, ezen értékeknek közel kell lennie az aktiválási gátakhoz. A reakciókinetikai paraméterekből származtatott aktivációs energiák, vagy szabadentalpiák az  $\sim 5$ – $18$  kcal mol $^{-1}$  tartományba esnek. Ezen értékek származtathatóak a  $k_{cat}$  sebességi állandókból, az Arrhenius egyenlet segítségével és az általános átmeneti állapot elméletből. Tehát a nyilvánvaló és szükségszerű egyszerűsítéseink ellenére, a modell rendszereink alapján számolt értékek megbízhatónak tekinthetők.

### ***A FXIII-A $_2$ és TG2 aktivációja***

#### *A molekuladinamikai szimulációk eredmények*

Tekintettel a XIII-as véralvadási faktor aktivációjának bonyolult voltára, olyan megközelítést alkalmaztunk a munka során, minek segítségével elkülöníthetően tárgyalhatóak azon jelenségek, melyek hozzájárulnak az aktív enzim létrejöttéhez, kiindulva a zimogén szerkezetekből (*i/a,b*) a thrombin által aktivált formán át (*ii/a-d*) azon elméleti jelentőséggel

bíró szerkezetig, melyben az aktivációs peptidek (AP) már disszociáltak a homodimer felszínéről (*iii/a-c*).

Általánosságban elmondható, hogy a kalciumionok jelenléte növeli az RMSD értékeket minden esetben, a referencia modell szimulációja során kapott értékekhez képest. Ugyanakkor érdekes, hogy az 50 mM  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció nem befolyásolja számottevően a fehérjék dinamikai sajátságait, noha ezen rendszerek (*i/b*, *ii/b*) sokkal lassabban konvergálnak a 2,5 Å -ös végső RMSD érték felé, mint bármely más. Nem zárható ki, hogy sokkal hosszabb időskálán komolyabb szerkezeti változások is végbe mennének, azonban erre nem találtunk közvetlen bizonyítékot. Elmondható, hogy az *i* és *ii* szimulációs csoportok modellrendszerei alapvetően hasonló dinamikai tulajdonságokkal rendelkeznek, melynek gyökere az aktivációs peptidek jelenlétében keresendő. A kalciumionok jelenlététől függően azonban jelentősen nőtt minden esetben az N-terminális tizenhét aminosav fluktuációja.

Ez a megfigyelés fontos abban a tekintetben, hogy az egyik monomer Arg11 és Arg12 aminosavai egy mély üregben találhatóak, melyek a másik alegység negatívan töltött aminosavainak oldalláncai által (Asp343, Asp345, Asp367, Glu401) meglehetősen erős sóhid kölcsönhatásokat jelentenek. Az aktivációs peptidek disszociációja a dinamikai időskálán feltehetően a ritka események körébe tartoznak, jóllehet kisebb változások megfigyelhetőek például a *ii/c* modell esetében, de az AP-k teljes disszociációja nem volt megfigyelhető. A 2  $\mu\text{s}$  hosszúságú szimulációk esetében, ahol az aktivációs peptideket eltávolítottuk (*iii/a-c*), mindhárom esetben emelkedtek az RMSD értékek, ami arra enged következtetni, hogy az aktivációs peptidek fő szerepe az intakt dimer szerkezet fenntartása az aktiváció bekövetkezéséig. A forgási (girációs) sugarak ( $r_{\text{gyr}}$ ) tekintetében szinte kivétel nélkül minden rendszer hasonló értékekkel rendelkezik, a szimulációk során átlagos értéke  $36,90 \pm 0,1$  Å volt. A láncként számított értékek megtalálhatóak a függelékben. A fluktuációk tekintetében számos régió azonosítható magas lokális fluktuációval, azonban ezek jó része hurok régió, vagy az aktivációs peptid N- vagy C-terminálisához térben közeli szegmens. Kiemelendő azonban négy régió, melyek rendre a Val274-Asp280, Met350-Trp370, Ile440-Ile460 és Pro505-Arg515 aminosavak között található. Az utolsó három régió térben egymáshoz közel található, melyből a Met350-Trp370 és az Ile440-Ile460 három antiparallel béta-redőben, illetve egy rendezetlen hurokban van. A hurok közvetlen kapcsolatban áll a másik monomer aktivációs peptidjének N-terminálisával (többek között biztosítva a már említett sóhidat képző, negatívan töltött aminosavakat), míg az Ile440-Ile460 térben szomszédos a Pro505-Arg515 hurokrégióval, amelynek N-terminálisán található hélix szerkezet szolgáltatja a fő kalciumkötőhely aminosavait, így egyfajta allosztérikus útvonal feltételezhető ez alapján. Függetlenül attól, hogy a korábban javasolt és a krisztallográfiai eredmények által sugallt

aktiváció során bekövetkező nagy konformációs változások közül melyiket tartjuk elfogadottnak, a Met350-Trp370 és az Ile440-Ile460 aminosavak által közrefogott régiók mindkét esetben alapvető fontossággal bírnak, mivel ezekkel szomszédos az 1-es  $\beta$ -hordó domén, melynek elmozdulása nem csak az FXIII-A<sub>2</sub> esetében kísérletileg alátámasztott, de a szöveti transzglutamináz esetében is dokumentált. Az aktivációs peptid nélkül végzett szimulációk során ezen fluktuációk még inkább megnőnek, mely bizonyítani látszik azon hipotézist, hogy kiemelt fontosságot kell tulajdonítsunk ezen régióknak.

Követve azon elképzelésünket, hogy lépésenként tárgyaljuk az egyes faktorok jelentőségét, a szöveti transzglutamináz példáján megvizsgáltam a kalciumionok és a GDP egyedi és együttes hatását is. A GDP nélkül kivitelezett szimulációk esetében nem találtunk jelentős különbséget az RMSD és  $r_{\text{gyr}}$  értékek időbeli változása között, azonban figyelembe véve a GDP jelenlétét az alábbi tendencia fedezhető fel:  $iv/a \sim iv/b > iv/d > iv/c$ . Az, hogy a GDP jelenlétében jelentősen csökkent az RMSD, összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a GDP (zárt) forma inaktív, azaz transzglutamináz aktivitással nem rendelkezik. A kalciumionok hatására azonban az RMSD megnő, tehát az *in vivo* aktivációt kiváltó Ca<sup>2+</sup> ionok jelenléte befolyásolja a fehérje dinamikáját. A girációs sugarak vizsgálata során jelentősebb eltérés látható ez utóbbi esetben. Hasonló következtetések vonhatók el a *iv/e* (4PYG) modell szimulációja alapján, azonban ki kell emelni, hogy bár ezen szerkezet tartalmazza a natív Val224 aminosavat, de emellett három pontmutáció is jelen volt, melyek a Gln186Glu, Thr533Asn, Val655Leu aminosavakat érintik.

A 650 ns után az RMSD-ben bekövetkezett változáshoz, ezen mutációk hozzájárulhatnak a kondenzált fázisban történő szimuláció során, azonban a girációs sugár alapján elmondható, hogy a fehérje nem szenvedett komolyabb változást, megtartotta feltekeredett szerkezetét. Az FXIII-A<sub>2</sub> esetében kiemelten nagy fluktuációkkal bíró régiók a TG2 esetében is megfigyelhetők (Ile313-Asn333, Val401-Val422, Asn460-Thr471), mely egyrészt az igen hasonló másodlagos- és harmadlagos szerkezetnek tulajdonítható, másrészt hangsúlyozza ezen szegmensek fontosságát az aktivációban betöltött szerepükre vonatkozóan. A fluktuációk változásának további tárgyalásánál az egyes szimulációk közötti különbségekre fókuszáltunk.

Ahogy a fluktuációk közötti különbségekből látható, a legtöbb nagy eltérés a  $\beta$ -szendvics domént érinti, ahol számos magas fluktuációval rendelkező régió található, melyeknek feltehetően nincs jelentősége az aktiváció során (Leu12-Lys30, Gly64-Gly72, Leu79-Asp87). Az Arg240-Tyr245 régió fluktuációja kalcium jelenlétében megnő, ami olyan szempontból érdekes megfigyelés, hogy az aktív hely Cys277 aminosava ezen rendezetlen hurok régió takarásában található, valamint egy kalciumkötőhely található az Asp232 és

Asp233 aminosavaknál, így ez a kötőhely indukálhat változásokat a kötőhely közelében amely hatással lehet a  $\beta$ -hordó doménekre is. A Thr343-Glu352 közötti hurokrégió szintén nagy fluktuációt mutat, de csupán a kalcium és GDP jelenlétét nélkülöző esetben. Abban az esetben ha kalcium is jelen volt a szimulációs rendszerben, ez a hurok rögzítve lett, így fluktuációja csökkent. Az Asn460-Thr471 régió tekintetében az alábbi magyarázat adható: ellentmondásos, hogy az FXIII-A<sub>2</sub>-ben a fő kötőhelyeket az Asp438, Gly457, Glu485, Glu490 aminosavak biztosítják és ezen aminosavak majdnem teljesen konzerváltak maradtak a TG2-ben is (Asp400, Ser419, Glu447, Glu452), azonban mégsem tudunk megfigyelni kalciumkötődést ezen a helyen. Az nyilvánvaló, hogy az Thr449-Ile460 aminosavak közötti  $\beta$ -szalag rendezetlen a TG2-ben (Ser411-Val422), tovább az is látható, hogy a kötőzseb által biztosított zseb sokkal tágabb, mint az FXIII-A<sub>2</sub> esetében. Ezen feltételezett hélix mögötti kötőhely helyett egy másik hely került azonosításra a hélix alatt, mely tulajdonképpen lefelé húzza az Asn460-Thr471 hurok régiót. A fluktuációk változásának jelentősége lehet a hordó domének helyzetének, az aktiváció során bekövetkező változásánál, hiszen az említett hurok régió nagy valószínűséggel vesz fel egyenes  $\alpha$ -hélix konformációt, ami indukálhatja az 1-es  $\beta$ -hordó kötőhely irányába történő elmozdulását, továbbá, mindkét hordó domén fejjel lefelé történő elmozdulását, azaz az átmenetet a nyílt konformáció irányába. Ezen hipotézis illeszkedik a svájci bicska-szerű konformációs aktiváció elméletébe.

#### *A kalciumkötődés vizsgálata*

Ahogy az azt korábbi tanulmányok során már igazolták, az FXIII-A<sub>2</sub> alegységként egy erős kötőhellyel rendelkezik. Számos szerkezet elérhető a protein adatbankban (<http://rcsb.org>) ahol két vagy három vegyértékű kationok vannak jelen a homodimerhez kötődve (1GGU, 1GGY, 1QRK, 1EVU). Ezen tanulmányok alapján a dimer egy Ca<sup>2+</sup> vagy Sr<sup>2+</sup> iont köt alegységként ugyanazon kötőhelyen (Asp438, Gly457, Glu485, Glu490), mindazonáltal az itterbium(III) esetében végzett kísérletek során nyolc kötött Yb<sup>3+</sup> került azonosításra három különböző, részben aszimmetrikusan elhelyezkedő kötőhelyen (4 Yb<sup>3+</sup> az A/B láncok Asp270, Asp271, Glu272 aminosavai által; 2 Yb<sup>3+</sup> a B lánc Asp438, Glu485, Glu490 aminosavainál; 1 Yb<sup>3+</sup> az A lánc Asp438, Glu485, Glu490 aminosavainál és 1 Yb<sup>3+</sup> - az A lánc Asp574, Glu585 aminosavai által). Meg kell említenünk, hogy a 4KTY röntgenszerkezetben, mely a nyitottnak vélt (aktív) konformációnak felel meg, három kötött Ca<sup>2+</sup> található. Ezen kalciumionok közül egy, az itterbiumkötődés esetében már korábban azonosított helyen az Asp270, Asp271 aminosavaknál található. Ezen aminosavak egy hélix C-terminálisánál találhatóak és maga a kötőhely ismert a TG3 esetében is. Miután a

krisztallográfiai tanulmányok során használt kationok vdW sugara közel megegyezik (~200 pm) így feltételezhető, hogy a dimer Asp270, Asp271 aminosavai, valóban képesek kötni kalciumiont vagy ionokat, jóllehet ezen kötőhely jelentőségét és funkcióját részleteiben eddig nem tárgyalták.

Molekuladinamikai szimulációink alapján számos lehetséges kötőhely került azonosításra, többségük térben közeli vagy szekvenciában egymást követő savas aminosavak által kialakított felszíni kötőhelyként került azonosításra. Annak érdekében, hogy kiszűrjük a gyenge és átmeneti kötőhelyeket, a következő kiválasztási kritériumot állítottuk fel. Az kalciumionokat akkor tekintettük kötöttnek, ha azok a megfelelő negatív töltésű oldallánc karboxilát szén atomjához képest 4,5 Å távolságon belül voltak találhatóak, a teljes szimulációs idő legalább 5 %-ában. A kalciumkötődések számszerűen teljes részletességükben megtalálhatóak az értekezés alapjául szolgáló közlemény kiegészítésben. Értekezésemben csupán azon kötőhelyek részletes vizsgálatára szorítkozok, melyek elsősorban konzervált kötőhelyeket jelenthetnek az FXIII-A, TG2 és TG3 enzimek vonatkozásában.

A kalciumkötődés vizsgálatánál mind az 1GGU (2 db kötött  $\text{Ca}^{2+}$ ), 1F13 (nincs kötött kalciumion jelen) szerkezetek vizsgálatát egyformán fontosnak gondoltuk. Ki kell emelnem, hogy bár az 1F13 szerkezet nem tartalmazott kötött kalciumot az *ii/c* szimuláció esetében az egyik alegység fő kötőhelye néhány 10 ns szimulációs idő elteltével betöltődött és az ion kötve maradt a szimuláció során, ugyanakkor a másik alegységnél nem detektáltam kötődési eseményt. Egy korábbi 2  $\mu\text{s}$  hosszúságú szimulációban, melynél a titrálható aminosavak protonáltságát nem vettük figyelembe 7,4 -es pH-n – ugyanakkor egyéb paramétereiben megegyezett az *ii/c* -vel – azt találtuk, hogy az A lánchoz tartozó fő kötőhely 500 ns szimulációs idő után, míg a B lánchoz tartozó fő site 900 ns után betöltődött. Fontos megemlíteni, hogy ebben a szimulációban az alegység szomszédos Asp270, Asp271 aminosavai két kalciumot is képesek voltak kötni a Glu272 hozzájárulásával, ami később a protonáltsági fok számítása során protonáltak adódott. A lánconként fő kötőhelyek eltérő mértékben történő betöltődésére kézen fekvő magyarázat lenne az, hogy a Pro505-Arg515 hurokrégió főlánconként eltérő konformációban van jelen. Ezen régiók hiányoztak az 1GGU szerkezetben, így jelentőségük vizsgálatának céljából azok úgy kerültek modellezésre, ahogyan az 1F13-ban találhatóak. Az *ii/a* szimuláció során azt találtuk, hogy ezen hurokrégiók konformációjának nincs jelentősége a kalciumkötődés szempontjából, legalábbis a krisztallográfiai szerkezetben. Azaz a kalciumok helyzete változatlan maradt az 1  $\mu\text{s}$ -os dinamika során. Még részletesebben megvizsgálva ezen hurokrégiók másodlagos szerkezetét, azt találtuk, hogy nincs összefüggés a kötődési események és a Pro505-Arg515 régió konformációja között.

Az 1GGU-ban modellezett hurok régiók, szinte tökéletesen megőrizték konformációjukat, azaz egyikük teljesen rendezetlen, másukuk gyakorta vesz fel egyenes hélix elrendeződést, ami sokkal szembetűnőbb a DSSP analízisben, továbbá a kötőhelyek geometriája között nincs számottevő különbség. Ezen információk alapján nehéz megjósolni, hogy *in vivo* lehet-e kiemelkedő jelentősége ezen hurokrégióknak az FXIII-A<sub>2</sub> aktivációjában, miután a Pro505-Arg515 régió a köti össze a katalitikus központi és az 1-es β-hordó domént.

Fontosnak találtuk megvizsgálni azt, hogy az *ii/c* esetében miért nem detektáltunk kötődést a B lánc főhelye esetében, ezért az *ii/c* szimuláció utolsó pillanatképéből indulva, a kötött kalcium megtartásával újraszolváltuk a rendszert, 100 mM Ca<sup>2+</sup> jelenlétében, majd az előkészítési lépéseket követően 17×25 ns szimulációt indítottunk, eltérő kezdeti sebességeket alkalmazva. Azt találtuk, hogy egyetlen esetben 11 ns után a B lánc fő kötőhelye is betöltődött. Így feltehetően a látens preferencia a fő kötőhelyeket illetően csupán a dinamika sztochasztikus természetének és az ionok véletlenszerű elhelyezésének tulajdonítható.

A második kötőhely, mely szinte minden esetben betöltöttnek volt tekinthető szimulációinkban az alegységek Asp270 és Asp271 aminosavainál található. Korábbi tanulmányok alapján ismert volt, hogy ezen a kötőhelyen találhatóak kötött Yb<sup>3+</sup> ionok, valamint az aktív (4KTY) monomer szerkezetben egy kalciumion is fellelhető az Asp270 és Asp271 aminosavaknál, továbbá a TG3 szerkezetben (PDB ID: 1NUD, szintén monomer) is találunk itt kalciumot. Eredményeink azt sugallják, hogy ezen a helyen mindig található a kötéshez hozzájáruló aminosavak protonáltsági fokától (Glu272) és a kalcium koncentrációtól függően legalább egy kalcium.

Erőfeszítéseink ellenére ezen kötőhely szerepe az aktivációban továbbra is homályos maradt, ugyanakkor egyrészt meglehetősen közel található az alegységek között található sóhid hálózathoz, másrészt ezen site-ok közvetlen kapcsolatban vannak a Ser278-Gly294 hurok régióval, amely kijelöli a katalitikus üreg határát és amely részben kapcsolatban van a 1-es β-hordó doménnel. Az utóbbi megállapítás érvényes a TG3 és a TG2 esetében is.

A 4KTY és az 1NUD szerkezetek alapján rendelkezésre álló szerkezeti információkból látható, hogy egy olyan kötőhely is található (Asp343, Asp345, Asp351, Asp367), amely az FXIII-A<sub>2</sub> (zárt) szerkezetben az aktivációs peptid által oldószer molekuláktól és ionoktól el van zárva. Az ionkötésért felelős oldalláncok közül az Asp343 és az Asp367 sóhid kölcsönhatásban áll a másik alegység aktivációs peptidén található Arg11 és Arg12 aminosavakkal, míg az Asp345 és az Asp351 meglehetősen távol van a másik két aszpartáttól, így konformációs változások szükségesek ahhoz, hogy ezek valóban köthessenek kalciumot.

Az aktivációs peptid jelenlétében végzett szimulációk így alkalmatlanok arra, hogy ezen feltételezett kötőhely szerepét vizsgáljuk. Az *iii/b* szimulációban, ugyan az AP-ek már

nem voltak jelen, de mégsem tudtuk ezen kötőhelyet teljes egészében megfigyelni, csupán az A lánc esetében detektáltunk kalciumkötődést az Asp343 és Asp345 aminosavaknál. Ahogy azt már említettük, a rendkívül magas 1000 mM  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció jelenlétében (iii/c), nagymértékű alegységmozgás figyelhető meg, ebben az esetben mindkét láncban detektálhatunk 250 ns után kalciumokat az említett négy aszpartát hozzájárulásával, valamint szinte minden gyengébb kötőhely betöltődött. Feltételezhető tehát, hogy ezen kötőhely csupán akkor válik fontossá, ha már az aktivációs peptidek disszociáltak a dimer felszínéről. Az alegységek elfordulása feltételezhetően összefüggésben áll azzal, hogy a nagy ionerősség letöri az alegységek közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat, míg a  $\beta$ -hordó domének elmozdulása nem volt megfigyelhető, továbbá az sem világos, hogy mi indukálja a figyelemre méltóan nagy elmozdulásukat. Hangsúlyoznunk kell az Asp472, Glu631, Glu720, Asp722 aminosavak által definiált kötőhely jelentőségét, mely tulajdonképpen a  $\beta$ -hordók és a katalitikus központi domén között teremt kapcsolatot.

Fontos kérdés lehet, hogy az egyszerűsített molekulamechanikai paraméterek vajon mennyire képesek pontosan prediktálni a kalciumionok kötődését. Ezért úgy döntöttünk, hogy az ii/c szimuláció utolsó szerkezetéből kiindulva, a kötött kalciumokat megtartva, “*multi-site*” ionmodell segítségével megvizsgáljuk a kialakult kötőhelyeket és 50 ns hosszúságú NpT dinamikát futtattunk. Eredményeink alapján egyértelműen látszik, hogy az 1  $\mu\text{s}$  hosszúságú dinamika során kialakult kötőhelyek, megtartották jelentőségüket a “*multi-site*” ionmodell alkalmazásával is, ezen szimuláció utolsó képe, a koordinálódó vizekkel együtt, megtalálható a disszertáció alapját képező publikáció kiegészítésében. Megemlítenénk, hogy a 4KTY szerkezet segítségével végzett FXIII-A<sup>0</sup> szimulációban öt kötőhelyet találtunk, melyek szinte folyamatosan kötöttek kalciumot a dinamika során, ez alapján jelentőség tulajdonítható nekik, az aktiváció valamely fázisában, ugyanakkor a zimogén és hasítással aktivált szimulációs modellek esetében ezen kötőhelyek közül kettő (Asp138, Glu139 or Glu355, Glu356, Asp357) gyengének adódott, illetve a rendelkezésre álló információk alapján nem tudunk különösebb szerepet tulajdonítani nekik.

A szöveti transzglutamináz esetében végzett irányított mutagenézis kísérletek alapján, sikeresen meghatározásra került öt kötőhely a hatból. A kísérletek részben szerkezeti homológia, részben pedig a felületi elektrosztatikus töltéseloszlás által definiált negatív töltésű centrumok alapján lett megtervezve. A körültekintő munka ellenére, ezen kísérletek alapjául statikus krisztallográfiai szerkezet szolgált, mely csupán egy olyan szerkezet szórásképéből adódott, mely feltehetően egy alacsony energiával bír, így nagy számban betöltött részét képezi a valódi sokaságnak. Annak ellenére, hogy a molekuladinamikai szimulációk által leírható időtartományt behatárolja a szimulálni kívánt rendszer mérete,

valamint az elérhető számítási erőforrás, a módszer minden kétséget kizáróan alkalmas módszer az olyan atomi jelenségek vizsgálatára, melyeket kísérletes úton, valós időben és megfelelő felbontásban igazolni másképp nehezen lehet. Mivel hasonlóan részletes mutagenézis kísérletek nem érhetőek el az FXIII A alegysége esetében, így ideális választásnak tűnt kihasználni a szöveti transzglutamináz esetében elérhető kísérletes adatokat és közvetlenül összevetni azokat a dinamikai szimulációink eredményeivel. Ahelyett, hogy a kalciumkötődés eseményeit ábráztuk volna, itt a megfelelő oldallánc karboxilát szene és a legközelebbi kalcium távolsága került ábrázolásra.

A kötött GDP-t tartalmazó szöveti transzglutamináz (*iv/d*) esetében kapott eredmények a 15. Ábrán láthatóak, a kötőhelyek proteinen való elhelyezkedése pedig a 16. Ábrán lettek feltüntetve. A statikus modellezés alapján végzett *in vitro* kísérletek eredményeit összevetve a molekuladinamikai szimulációk eredményeivel szembevető különbség, hogy legalább két olyan kötőhely található, melyeknek az aktivációban betöltött relevanciája kérdéses. Ezen kötőhelyek jelentősége mérséklődik a GTP kötött forma (*iv/e*) vizsgálatánál, ugyanakkor teljesen elvetni nem lehet jelentőségüket, mivel a nyílt (aktív) TG2 esetében végzett szimulációban (*v/b*) is részben megfigyelhetőek.

A kísérleti eredményekkel összhangban az S1 kötőhely a dinamikai szimulációk esetében is igazolva lett, kivételt képez ez alól a *iv/b* (GDP nélküli) 2  $\mu$ s -os szimuláció, melynek során nem sikerül kötődést detektálni. Ezen kötőhely az Asp232, Asp233 aminosavak hozzájárulásával alakul ki és megfelelnek az Asp270, Asp271 aminosavaknak az FXIII-A szekvenciájában, továbbá szintén ismert kötőhely a TG3 esetében.

Az S2A és S2B kötőhelyet illetően látható, hogy a Glu396 aminosav oldallánca a katalitikus centrum domén belseje felé orientálódik, így teljesen temetett. Ezen aminosav mellett az S2A kötőhely egy másik negatívan töltött aminosava az Asp400. Az *iv/a-d* szimulációk esetében az Asp400 C $\gamma$  és a Lys464 N $\zeta$  atomok közötti távolság  $5,55 \pm 1,25$  Å átlagosan, mely nem változik számottevően a dinamikai szimulációk folyamán. Összehasonlítva ezt az értéket a *ii/a-d* (FXIII-A<sub>2</sub>') esetekben a megfelelő aminosavak közötti távolság  $6,25 \pm 1,30$  Å, így a jelentősen rövidebb távolság felfogható úgy, mintha az Asp400-at a Lys464 blokkolva tartaná, így az már nem lesz alkalmas arra, hogy részt vegyen a kalcium kötésében.

Az S2A és S2B kötőhely helyett egy új zseb került azonosításra, mely magas betöltöttséggel rendelkezik. Ezen felületi zseb a Glu381, Glu451 és Glu454 aminosavak által alakul ki és betöltöttsége közel folyamatos. Egy másik – szintén korábban ismeretlen – kötőhely alakulhat ki a Glu381, Asp408 és Asp409 aminosavak hozzájárulásával. Meg kell említeni, hogy az aktív forma szimulációjában az Asp581 is részt vesz ezen kötőhely

kialakításában, valamint a  $\beta$ -hordó 1 és  $\beta$ -hordó 2 domének elmozdulása szintén szükséges, hiszen a zárt formában az Asp581  $\sim 30$  Å távolságra helyezkedik el a másik három aminosavtól. A 460-as loop régió Glu467, Glu469, Glu470 aminosavai gyenge affinitást mutatnak, de a “*multi-site*” ionmodell alkalmazása mellett is közel található a kötött kalcium a Glu467 és Glu470-hez.

Az S3A és S3B kötőzsebeket egy-egy negatív töltésű oldallánccal bíró aminosavakból által determinált és valóban mindkét aminosav részt vesz ugyanazon kalciumion kötésében, valamint néhány esetben a Glu363 is részt vesz az ion kötésében. A negyedik kötőzseb (S4) az Asp151 és Glu158 közötti régió öt negatív töltésű oldallánccal rendelkező aminosavat tartalmaz és ez a kötőhely közel található az S5-höz. Szimulációink alapján az Asp151 és Glu155 hozzájárulásával valóban kialakulhat megfelelő kötőhely.

A már korábban feltételezett öt kötőhelyen túl egy olyan új kötőhely került azonosításra, mely az Asp640, Glu643 és Glu464 aminosavak segítségével alakul ki és minden szimuláció esetében megfigyelhető. Hasonlóan, ahogy azt az FXIII-A<sub>2</sub> esetben tettük, a *iv/d* szimulációt is folytattuk 50 ns szimuláció erejéig a “*multi-site*” kalcium modell alkalmazásával és a kapott eredmények azt mutatták, hogy a kialakult kötőhelyek túlnyomó többsége változatlan maradt.

Eredményeink alapján, az alábbi általános következtetések vonhatóak le a TG2 kalcium kötő tulajdonságaival kapcsolatban, Király és munkatársai eredményeihez hasonlítva. Az S1, S3A/S3B valamint az S4 kötőhelyeket illetően a dinamikai szimulációk alapján is megfelelőnek adódtak a kalciumok kötésére. Mindazonáltal az S2A/S2B kötőhelyet egyáltalán nem adódott olyan kötőhelynek, ahol megfigyelhettünk volna kalciumkötődést. Összevetve ezen megfigyelést az FXIII-A<sub>2</sub> fő kötőhelyével kapcsolatban kapott információkkal, ahol a dimer esetében legalább az egyik lánc esetében megfigyelhető kalciumkötődés az 1 vagy 2  $\mu$ s-os szimulációs idő alatt látható, hogy a TG2 esetében is elérhető a kötőhely, mely némiképp tágabb is mint az FXIII-A<sub>2</sub> esetében. Mindazonáltal nem zárható ki, hogy a kötőhely jelentősége változik az aktiváció későbbi fázisában, de az elérhető krisztallográfiás szerkezetekből kiindulva egyetlen kötődési eseményt sem sikerült megfigyelünk. Végül, az S5 kötőhellyel kapcsolatban azt találtuk, hogy az aktiváció ezen korai fázisában, nem tulajdonítható jelentőség ezen kötőhelynek, valamint az aktív (nyílt) TG2 (*v/b*) esetében sem adódott potenciális kötőhelynek, így jelentősége megkérdőjelezhető.

Általános konklúziót tudunk levonni az FXIII-A<sub>2</sub> esetében végzett szimulációk C $\alpha$  trajektóriái alapján végzett kereszt-korrelációk számításának eredményeivel kapcsolatban. A zimogén (i) és a hasított (ii) szimulációs csoportok osztoznak azon a közös sajátságon, hogy erős (pozitív) korreláció van az alegységek  $\beta$ -szendvics doménjei, valamint az 1-es  $\beta$ -hordók között is. Ezen korrelációk szemléletesebb értelmet nyernek, ha a pozitív korrelációt az egyes atomok azonos irányba történő, míg a negatív (anti-) korrelációt az atomok ellentétes irányba történő elmozdulásaként fogjuk fel. Az *i/a* és *i/b* valamint a *ii/a* és *ii/b* szimulációk során kapott korrelációk különbségét véve azt kapjuk, hogy ahogy azt már korábban említettük, a Met350-Trp370 és az Ile440-Ile460 régióknak kiemelt jelentősége lehet. Függetlenül attól, hogy milyen úton történik az aktiváció, ezen régióknak mindkét mechanizmusnál szerepük kell hogy legyen. Ezen szegmensek korrelációja megnő az 1-es  $\beta$ -hordóval valamint a másik alegység ugyanezen régióival, míg a zimogén szerkezetek esetében ezen korrelációk kevésbé dominánsak. Másik érdekes pont, a Gly210-Trp225 régiók közötti korreláció. Ezen régió az 1-es  $\beta$ -hordó C-terminálásával, az 1-es és 2-es  $\beta$ -hordót összekötő hurokkal és a 2-es  $\beta$ -hordó N-terminálásával szomszédos és a zimogén szerkezetekben szintén csökken jelentősége. A kalciumionok jelenléte a *ii/c* és *ii/d* szimulációk esetében kapott DCCM mátrixok összehasonlításából látható a legszemléletesebben, miszerint a kalciumok jelenléte egyértelműen növeli a  $\beta$ -szendvics domének közötti korrelációt. Végül, minden említett korreláció megtalálható a harmadik szimulációs csoport esetében, azaz az aktivációs peptid jelenléte nélkül kivitelezett dinamikákban. Ugyanakkor a rendkívül nagy ionerősség, extrém módon megnövelte az alegységek  $\beta$ -szendvics doménjei közötti korrelációt és erős antikorrelációt láthatunk a  $\beta$ -szendvics és a  $\beta$ -hordó domének között. Ezek a felismerések összhangban vannak az alegységek megfigyelt rotációival valamint a főkomponensanalízis eredményével.

Annak ellenére, hogy az FXIII-A és a TG2 (és általánosságban a transzglutaminázok között) meglehetősen jól konzerválódtak a másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemek, olyan különbségek figyelhetők meg a korrelációkban, melyek kizárólagos jellemzői egyiknek, s másiknak. Ilyen jellemző különbség, hogy a TG2 esetében az 1-es  $\beta$ -hordó korrelál a  $\beta$ -szendviccsel és a 2-es  $\beta$ -hordó korrelál a katalitikus doménnel és ez kizárólag a szöveti transzglutamináz esetében jellemző. Fontos kiemelni, hogy az Ile313-Asn333 és a Val401-Val422 között található három antiparallel  $\beta$ -redő (mely rendre megfelel a Met350-Trp370 és Ile440-Ile460 szegmensnek az FXIII-A<sub>2</sub> szerkezetében) korrelálnak az 1-es  $\beta$ -hordóval és a központi doménnel is, míg az FXIII-A<sub>2</sub> esetében nem figyelhető meg ilyen korreláció.

A nyílt (aktívnek vélt) szerkezetek szimulációiból ( $v/a,b$ ) nyert korrelációs mátrixok tisztán látható különbségeket sugallnak. Nevezetesen, az  $v/b$  (TG2, 2Q3Z) esetében a 2-es hordó domén korrelál a  $\beta$ -szendvics doménnel, melyek térben meglehetősen távol helyezkednek el egymástól és erős antikorrreláció fedezhető fel a katalitikus központi és az 1-es  $\beta$ -hordó domén között. Az  $v/a$  (FXIII-A, 4KTY) esetében pontosan az ellenkezője érvényes az előbbi megállapításnak. Jelenlegi tudásunk birtokában azt lehet feltételezni, hogy ezen enzimek vagy két, részleteiben teljesen eltérő aktivációs útvonalat követnek vagy az aktívnek vélt szerkezet valamelyike kinetikusan csapdázva lett egy olyan átmeneti termékként, mely az aktivációs útvonal valamely mozzanatában megrekedt szerkezetet reprezentálja.

### *Főkomponens analízis és a központi domének közötti sóhíd hálózat szerepe*

A nagy amplitúdójú (esszenciális) mozgások valós szimulációs időben történő megfigyelése, általában még hosszabb dinamikai szimulációk során is rejtve marad, így úgy gondoltuk hasznos lehet megvizsgálni ezen mozgásokat leíró sajátvektorokat. A dinamikai trajektóriákban megjelenő doménmozgásokat lehetséges leírni egy kvázi-torziós szöggel, melyet a megfelelő domének tömegközéppontjainak segítségével tudunk definiálni. Az általunk kivitelezett szimulációkban a 17. ábrán látható értékek nagyjából  $-40^\circ$  -ot mutatnak, míg a  $iii/c$  esetben ez az érték  $-70^\circ$ , amely azt jelenti hogy az alegységek  $30^\circ$ -ot mozdulnak el egymáshoz képest. Érdekes módon, ez az elmozdulás pontosan megegyezik azzal, melyet a főkomponens analízis során kaptunk és amelyet az első sajátvektor reprezentál a  $iii/a-c$  szimulációk esetében. Fontos kihangsúlyozni, hogy ezen főkomponensvektor az aktivációs peptid jelenlétében nehezebben vagy egyáltalán nem figyelhető meg. Összhangban azzal, hogy a  $iii/a$  esetben ( $\text{Ca}^{2+}$  nélkül) is megfigyelhető ezen sajátvektor, jól egyezik a kísérleti megfigyelés, miszerint nagy ionerősség jelenlétében kalcium nélkül is lassú, progresszív növekedés tapasztalható a zimogén FXIII-A<sub>2</sub> magas ionkoncentrációval indukált aktivációja során. Mivel ezen mozgások az aktivációs peptid jelenlétében rejtve maradnak, feltételezhető, hogy az N-terminális peptid fő szerepe az, hogy az aktivációt késleltessék. Az alegységek elfordulásával kapcsolatban elmondható, hogy az első sajátvektorok által leírt mozgás középpontjába rajzolható tengely pontosan áthalad egy olyan sóhíd hálózaton, mely az alegységek ugyanazon aminosavainak hozzájárulásával található meg a dimer szerkezetekben. Ezen aminosavak az Asp404, Asp427 és az Arg260, Arg408. Ez a központi sóhíd hálózat részleteiben még nem volt vizsgálva, ugyanakkor még a  $iii/c$  esetében is csak csekély mértékű változásokat figyelhetünk meg.

Érdekességképpen megemlítenénk, hogy a sóhíd hálózat Arg260 tagjának mutációja, komoly deficienciával jár és számításos módszerekkel tanulmányozták a mutációk során kapott kölcsönhatási energiák változását. A számításos módszerekkel készített Arg260Cys mutáns esetében általunk kivitelezett 1  $\mu$ s-os szimulációk alatt nem volt megfigyelhető változás a homodimer szerkezetében, annak ellenére, hogy a Cys260 nyilvánvalóan képtelen natív kapcsolatokat kialakítani.

Lehetséges magyarázat lehet ezen mutáció által okozott súlyos működésbeli zavarokra, hogy a fehérje feltekeredésében következnek be változások, melyek után az intakt dimer szerkezet már nem tud megfelelően összeszerelődni. Ezt a hipotézist támogatja az a gondolat, hogy az Arg408 aminosav a TG2 szerkezetében a Cys370 aminosavnak felel meg, melynek jelentősége a Cys371 aminosavval alkotott diszulfid-kapcsolóként ismert. Feltételezhető tehát, hogy amennyiben ez a mutáció az oka annak, hogy a szöveti transzglutamináz monomerként működik, úgy vélhetően ugyanez az oka annak, hogy az Arg260Cys mutáció a felelős azért, hogy a mutáns FXIII-A képtelen a dimer szerkezet kialakítására.

## KONKLÚZIÓ

### *A papain enzimmechanizmusa*

A papain proteolitikus reakcióját vizsgáltuk ONIOM típusú QM/MM módszerekkel, melyben az egyszerű N-metilacetamid szubsztrátot alkalmaztuk. Az ONIOM QM/MM számításainkban, QM komponensként a hibrid GGA (B3LYP) módszer mellett, olyan újabb DFT módszereket is alkalmaztunk, melyekben a hosszútávú korrekciós tag vagy azt megfelelően leíró paraméterek már jelen voltak a kölcsönhatás leírására.

Számításaink megmutatták, hogy a papain nyugvó állapotában a semleges és az ionpár formában jelen lévő cisztein-hisztidin diád energiája igen közel esik egymáshoz és csupán csekély aktiválási gát választja el őket. A zérus ponti energia korrekciót figyelembe véve, az egyensúly enyhén eltolódik a semleges forma irányába, míg a Poisson-Boltzman (PB) számítások alapján becsült, implicit oldószer modell korrekciót figyelembe véve az ionpárként jelen levő diád tűnik a leginkább betöltött populációnak, mely jó egyezést mutat a kísérleti adatokkal.

Az enzimmechanizmussal kapcsolatban elmondható, hogy a diszperziós korrekciót tartalmazó DFT módszerek, valamint a B3LYP módszerek a nagyobb (6-31+G(d,p) - 6-311++G(d,p)) báziskészletek alkalmazása mellett két elemi lépés jósolnak az acilezési lépésre, míg egy lépésben történik az acil-enzim hidrolízise. Számításaink alapján az acilezési lépésben az

ikerionos tetraédes intermedier létezik. A származtatott aktivációs energiák jól egyeznek az irodalomban található kísérleti úton meghatározott kinetikai konstansokból származtatottakkal. Habár az alkalmazott sűrűségfüggő módszerek asszinkron sebességmeghatározó első lépést jósoltak az acilezési folyamatra, ki kell emelnünk, hogy a diszperziós korrekciót tartalmazó DFT módszerek az ONIOM QM/MM számításainkban jelentősen eltérő átmeneti állapotot adtak a B3LYP (6-31+G(d,p) – 6-311++G(d,p)) módszerhez képest. Ugyanakkor a protonátmenet lemarad (de legalábbis nem előzi meg) az S–C kötés kialakulását. A B3LYP/6-31G(d,p) módszer esetében három elemi lépést találtunk, mely a klasszikus oxianionos, majd az ikerionos intermedieren keresztül vezet az acil-enzim intermedier kialakulásához. Ezen két intermedier közötti aktiválási gát igen alacsony volt. Mivel a B3LYP módszer által az amid kötés felhasadására jósolt gát nagyon alacsony volt, feltételezhetően a kémia környezettől és az alkalmazott módszer részleteitől függően az acilezési lépésre 2-3 elemi lépésben lejátszódó mechanizmus felírása lehetséges.

Eredményeink alapján a cisztein proteináz reakciók tanulmányozásában erősen ajánlott a diszperzió-korrigált DFT módszerek használata a QM/MM számítások, tiszta QM rétegében, mivel ezek nagyban befolyásolhatják a tanulmányozott reakciók kimenetelét, ellentétben a szerin-proteázok mechanizmusával.

### ***A FXIII-A<sub>2</sub> és a TG2 aktivációjának korai eseményei***

Mikroszekundumos hosszúságú „all-atom” molekuladinamikai szimulációk kerültek kivitelezésre annak érdekében, hogy fényt derítsünk azon finom részletekre, melyek a tanulmányozott transzglutaminázokban nagy konformációs változásokat indukálnak és első sorban a kalciumkötődéshez köthetőek.

A FXIII-A<sub>2</sub> esetében kimutattuk, hogy a kalciumionok jelenléte egyértelműen befolyásolja az aktivációs peptidek mozgékonyágát. Javaslatot tettünk ezidáig keveset vagy egyáltalán nem vizsgált kalcium kötő helyekre, azok vélhető szerepére. Aktivációs peptidek hiányában az egyensúlyi szimulációk eredményeként a nagy kalcium koncentráció az A alegységek egymástól való elfordulását okozta, mely látható a C-alfa atomok dinamikus keresztkorrelációjából és a főkomponens analízis alapján prediktált első sajátvektor által jósolt mozgásokból is. Az elfordulás középpontjában egy alegységek között sóhid hálózat található, melyet részleteiben eddig nem tárgyaltak, így ezidáig jelentősége nem került hangsúlyozásra.

A szerkezetileg az FXIII-A-hoz nagyon hasonló, ám eltérő biológiai szereppel bíró szöveti transzglutamináz enzim esetében megvizsgáltuk a Király és munkatársai által végzett

kalciumkötőhelyek relevanciáját, számításos eredményeink az esetek többségében jó egyezést mutattak a kísérleti előzményekkel, illetve egy eddig nem ismert, azonban nagy affinitással rendelkező kötőhely került azonosításra.

## A JELÖLT SAJÁT EREDMÉNYEI, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

•Az értekezésben szereplő és alapjául szolgáló publikációkban közölt számításos eredmények teljes mértékben a saját munkámat tükrözik.

•A papain enzimmechanizmusának vizsgálata során igazoltuk, hogy annak nyugvó állapotában a semleges és az ionpár formában jelen lévő cisztein-hisztidin diád között a protonátmenetnek nem szükséges mediátor vízmolekula.

•A protonátmenet a zérusponthi vibrációs energia korrekció alkalmazásával spontán átmenetnek adódott.

•A szolvatációs szabadentalpia korrekcióval az ionpár formát minden esetben stabilabbnak számoltuk.

•A papain acilezési lépése két lépéses folyamat, melyben az ikerionos intermedier létezik. Az intermedier képződéséhez vezető asszinkron átmeneti állapotban koncertikusan történik a protonátmenet és a nukleofil támadás.

•Az acil-enzim hidrolízise egy koncertikus átmeneti állapoton keresztül történik egy vízmolekula jelenlétében, mely termékként ecetsavat ad és visszaalakul az enzim nyugvó állapotának ionpár formájára.

•A humán transzglutaminázok dinamikáját befolyásolja a kalcium jelenléte.

•A FXIII-A<sub>2</sub> esetében a fő kötőhelyek betöltődése között nincs preferencia, de allosztérikus útvonal írható fel az aktivációs peptid Arg11 és Arg12 aminosavait rögzítő üreg irányába.

•A FXIII A alegységeinek Asp270 és Asp271 aminosavai közösen alakítanak ki egy kötőhelyet, mely minden esetben megfigyelhető és eddig a zárt forma esetében nem volt igazolva. Ezen túl számos gyengébb kötőhelyet azonosítottunk.

•Magas (1 M) kalcium koncentráció jelenlétében, az A alegységek 30°-kal elfordulnak, melyet igazolnak a dinamikus kereszt-korrelációk és a főkomponensanalízis is.

•A szöveti transzglutamináz (TG2) esetében a korábban azonosítottak vélt kötőhelyek közül az S1, S3, S4 kötőhelyek valóban minden esetben jelen vannak.

•Az S2A/S2B (FXIII-A analóg) kötőhelyek és az S5 kötőhelynek esetében nem tulajdonítható szerep a tanulmányozott mikorszekundumos időskálán.

•Három új kötőhely került azonosításra a TG2 esetében, melyek közül egy a mind ez idáig ismeretlen S6 kötőhely.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A cisztein proteázok enzimmechanizmusát több ízben vizsgálták, mind kísérleti, mind pedig elméleti módszerekkel a papain példáján keresztül, azonban mind ez idáig nem került publikálásra olyan közlemény, melyben egyrészt a teljes enzimreakciót összefoglalóan tárgyalták volna, másrészt pedig a mechanizmust optimált, frekvenciaanalízissel igazolt stacionárius pontokkal jellemezték volna. Jelen munkában ONIOM-EE típusú hibrid számításokkal kívántuk vizsgálni a mechanizmus részleteit. A QM/MM számítások kvantumkémiai rétegre a sűrűségfunkcionál módszereket alkalmaztuk és teljesítőképességüket is összehasonlítottuk. Számításaink alapján a semleges és az ionpár (tiolát-imidazólium) formában jelen lévő katalitikus diád közötti átmenet spontán gáz fázisú szimuláció szerint, melyet a solvatáció az ionpár forma irányába tol el. Az acilezési lépést illetően koncertikus reakciót találtunk, melyben a cisztein tiolát kenének nukleofil támadása és az imidazólium formában jelen lévő hisztidin delta nitrogénjéről, a szubsztrát amid nitrogénjére történő protonátmenet erősen csatolt, de nem teljesen szinkronban történik. A peptidkötés hasadása csekély energiagáttal rendelkezik, külön részlépésnek tekintendő és csupán elméleti jelentőséggel bír. A kialakult acil-enzim intermedier hidrolízisének aktiválási gátja összemérhető az acilezési részlépés esetében szükséges energiamennyiséggel, ezen – szintén koncertikus – reakció eredményeként, megfelelő karbonsav termék és a regenerálódott aktív centrum marad vissza.

A papain-szerű katalitikus, központi doménnel rendelkező humán transzglutaminázok, kalciumionok által indukált konformációs aktivációját két fehérje példáján keresztül tárgyaltuk. Ugyan meglehetősen jól konzerválódott másod- és harmadlagos szerkezet fedezhető fel a véralvadási kaszkád XIII-as faktorának A alegysége (FXIII-A) és a szöveti transzglutamináz (TG2) között, azonban a szekvenciahomológiáról ugyanez már nem mondható el, mely talán már előre vetíti azon diverz biológiai funkciókat, melyek ezen enzimekhez társíthatóak.

Munkánk során első ízben tárgyaltuk mikroszekundumos molekuladinamika segítségével, ezen fehérjék aktivációjának azon korai fázisát, melyben a kalciumionok kötődése történik. Szimulációink azt mutatták, hogy az FXIII-A<sub>2</sub> esetében korábban feltételezett gyengébb kötőhelyek valóban léteznek, melyek közül kiemelendő az alegységek ugyanazon aminosavai (Asp270, Asp271) által formált kötőhely. A TG2 szöveti transzglutamináz vizsgálatánál kiemelt figyelmet fordítottunk a korábban mutagenézis kísérletekkel felderített kalciumkötőhelyek vizsgálatára. A már azonosítottak vélt zsebek vizsgálata mellett, egy új – a dinamikai szimulációk alapján - erősnek vélt kötőhelyet is azonosítottunk, mely feltehetően a mind ez idáig ismeretlen hatodik kötőhely.



Nyilvántartási szám: DEENK/51/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

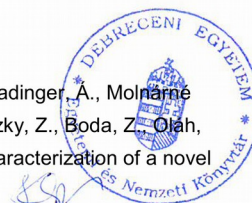
Jelölt: Fekete Attila  
Neptun kód: L0TV9S  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10062749

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fekete, A.**, Komáromi, I., Mucs, D.: On the early events of the calcium induced activation of coagulation factor XIII-A2 and tissue transglutaminase: an in silico study.  
*J. Biomol. Struct. Dyn. [Epub ahead of print]*, 1-16, 2019.  
IF: 3.107 (2017)
2. **Fekete, A.**, Komáromi, I.: Modeling the archetype cysteine protease reaction using dispersion corrected density functional methods in ONIOM-type hybrid QM/MM calculations: the proteolytic reaction of papain.  
*Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (48), 32847-32861, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C6CP06869C>  
IF: 4.123

### További közlemények

3. Fizil, Á., Sonderegger, C., Czajlik, A., **Fekete, A.**, Komáromi, I., Hajdu, D., Marx, F., Batta, G.: Calcium binding of the antifungal protein PAF: Structure, dynamics and function aspects by NMR and MD simulations.  
*PLoS One.* 13 (10), 1-19, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0204825>  
IF: 2.766 (2017)
4. Selmeczi, A., Gindele, R., Ilonczai, P., **Fekete, A.**, Komáromi, I., Schlammadinger, A., Molnár, Rázsó, K., Kovács, K. B., Bárdos, H., Ádány, R., Muszbek, L., Bereczky, Z., Boda, Z., Olah, Z.: Antithrombin Debrecen (p.Leu205Pro) - Clinical and molecular characterization of a novel mutation associated with severe thrombotic tendency.  
*Thromb. Res.* 158, 1-7, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.07.023>  
IF: 2.779





5. Tóth, L., **Fekete, A.**, Balogh, G., Bereczky, Z., Komáromi, I.: Dynamic properties of the native free antithrombin from molecular dynamics simulations: computational evidence for solvent-exposed Arg393 side chain.  
*J. Biomol. Struct. Dyn.* 33 (9), 2023-2036, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2014.986525>  
IF: 2.3
6. Kovács, K. B., Pataki, I., Bárdos, H., **Fekete, A.**, Pfliegler, G., Haramura, G., Gindele, R., Komáromi, I., Balla, G., Ádány, R., Muszbek, L., Bereczky, Z.: Molecular characterization of p.Asp77Gly and the novel p.Ala163Val and p.Ala163Glu mutations causing protein C deficiency.  
*Thromb. Res.* 135 (4), 718-726, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2015.01.011>  
IF: 2.32
7. Bokor, É., **Fekete, A.**, Varga, G., Szócs, B., Czifrák, K., Komáromi, I., Somsák, L.: C-( $\beta$ -d-Glucopyranosyl)formamidrazones, formic acid hydrazides and their transformations into 3-( $\beta$ -d-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazoles: a synthetic and computational study.  
*Tetrahedron.* 69 (48), 10391-10404, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.09.099>  
IF: 2.817

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,212**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,23**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.03.05.

