

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A venezuelai ló-láz encephalitis vírus
cisztein proteázának
szerkezet-alapú vizsgálata**

Hoffka Gyula

Témavezető: Dr. Mótyán János András



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2024.

A VENEZUELAI LÓ-LÁZ ENCEPHALITIS VÍRUS CISZTEIN PROTEÁZÁNAK SZERKEZET-ALAPÚ VIZSGÁLATA

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

Írta: Hoffka Gyula, okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Mótyán János András

Az értekezés bírálói:

Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dóra, PhD
Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dóra, PhD
Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Veres Balázs, PhD
Dr. Timári István, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2024. december 10. 13:00

1. Bevezetés

1.1. A venezuelai ló-láz encephalitis vírus

Korunk orvostudományának egyik legnagyobb kihívását a vírusokkal szembeni védekezés és a vírusfertőzések következtében kialakuló megbetegedések gyógyítása jelenti. A bakteriális eredetű megbetegedésekkel szemben a vírusok ellen nem lehetséges antibiotikumokkal védekezni. Az elmúlt években a világot megrázó járványért felelős súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 2 (SARS-CoV-2) víruson kívül számos más veszélyes vírus létezik még. Ezek közé tartozik a venezuelai ló-láz encephalitis vírus (*Venezuelan equine encephalitis virus*, VEEV) is. A VEEV a vírusok IV(+) csoportjának *Togaviridae* családjába tartozik, azon belül pedig alfavírus nemzetség újvilági (*New World*) ágába. A nemzetségbe tartozó vírusok általános jellemzője az ss(+)RNS genom, a gömb alak, és a receptor-mediált felismeréshez nélkülözhetetlen glikoproteinek a sejtmembránban. Az újvilági alfavírusok (VEEV, EEEV és WEEV) emberben agyvelőgyulladást okozhatnak, aminek tünetei enyhétől komolyig terjedhetnek, esetenként halált is okozhatnak. A VEEV fertőzés általában influenzaszerű tüneteket produkál, azonban halált okozhat, a halálozási arány kb. 1 %, az esetek további 14 %-ában pedig neurológiai tüneteket okoz. A fertőzés kezelésére jelenleg nincs az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer-Engedélyeztetési Hivatal (*Food and Drug Administration*, FDA) által elfogadott antivirális gyógyszer, a megelőzését lehetővé tevő vakcinák fejlesztése jelenleg is folyamatban van. Ezek közül kiemelhetünk egy vírus-szerű részecskéken alapuló vakcinát, amellyel már klinikai vizsgálatok végeztek, illetve egy DNS-alapú vakcinát, amelynek hatását makákók esetében igazolták. A vírus jövőbeli potenciális terjedéséhez hozzájárulhat a klímaváltozás is, melynek következtében a VEEV olyan helyeken is felbukkanhat, ahol korábban nem volt jelen. Terjedéséhez a globális utazási hálózatok is hozzájárulhatnak, amelyek segítségével a vírus a világ bármely pontján felbukkanhat. Ezeket figyelembe véve elmondhatjuk, hogy egy VEEV ellen kifejlesztendő antivirális gyógyszer vagy vakcina kiemelt fontossággal bírna.

1.2. Az nsP2pro fehérje

A VEEV genomjában két nyitott leolvasási keret (ORF) található. Az első egy, a nem-szerkezeti fehérjéket (*non-structural protein*, nsP) tartalmazó poliproteint kódol, a második pedig a szerkezeti fehérjéket. Transzlációt követően a poliprotein proteolitikus hasítással darabolódik önálló nsP1, nsP2, nsP3 és nsP4 nem-szerkezeti fehérjékre. Ezek közül a nem-

szerkezeti fehérje 2 (nsP2) kiemelt fontosságú a vírus életciklusának szempontjából. Az alfavírus nsP2 fehérjék esetében számos fontos régiót határoztak meg: az N-terminális régióról (Gly1-Ile456) megállapították, hogy ATPáz és GTPáz aktivitással, továbbá RNS helikáz aktivitással is rendelkezik, míg a C-terminális régiót (Met457-Cys794) alkotja többek között egy papain-szerű cisztein proteáz domén, amit egy S-adenozil-L-metionin (SAM)-függő RNS metiltranszferáz (SAM MTáz) domén követ. A VEEV nem-szerkezeti fehérje 2 proteáza, az nsP2pro (EC 3.4.22.B79) egy cisztein proteáz, melynek különösen fontos szerepe van a vírus életciklusában. A proteáz domén össze van kötve a SAM MTáz doménnel, amelynek a proteolízisben betöltött szerepét is sikerült igazolni: az Arg662, Lys705 és Lys706 aminosavak részt vesznek a szubsztrátkötő helyek kialakításában, ezáltal a szubsztrát felismerésében. Az nsP2pro katalitikus diádját egy cisztein és egy hisztidin aminosav alkotja, a Cys477 és a His546, a szubsztrátkötő hely pedig a proteáz és a SAM MTáz domének között helyezkedik el. Az nsP2pro legfontosabb szerepe az nsP1234 fehérje hasítása az nsP1/nsP2, nsP2/nsP3 és nsP3/nsP4 autoproteolitikus helyeken. A szubsztrátkötő alhelyek és az ezekbe kötődő szubsztrát egyes aminosavainak elnevezéséhez a Schechter és Berger által 1967-ben bevezetett nevezéktant vehetjük alapul. A szubsztrát esetében a hasítóhely felől az N-terminális irányba haladva P1, P2, stb., míg a C-terminális irányában P1', P2', stb. számozást alkalmazunk. Az enzim szubsztrátkötő helyét alhelyekre osztjuk, amelyek közül valamennyi egy-egy szubsztrát aminosavrész kötéséért felel, és az előzőeknek megfelelően S2, S1, S1', S2', stb. néven hivatkozunk ezekre.

Az alfavírusok autoproteolitikus hasítóhely szekvenciái nagyfokú hasonlóságot mutatnak, általában a P1 helyen egy kisebb oldallánccal rendelkező aminosav található, amit P2 pozícióban egy glicin követ. A P3 helyzetben lévő aminosav konzervált, míg a P4 jellemzően eltérő lehet, míg a P1'-P4' pozíciókban lévő aminosavak nagyobb mértékű változatosságot mutatnak.

A VEEV nsP2pro szubsztrátkötő alhelyei közül az S1 kialakításában az Asn475, Val476 és Ala509 aminosavaknak van fontos szerepe, a Val476 és Cys477 aminosavak főlánci amidjai oxianionos üreget képezhetnek. Az S2 alhely az ún. „glicin-specifikus motívumra” emlékeztet, amely más cisztein proteázokban is előfordul, egy magasan konzervált Trp547 és az előtte lévő katalitikus His546 alkotja, és a P2 helyen lévő glicin kötéséért felel. Az S3 alhely kialakításában fontos szerepe van a SAM MTáz doménnek, ezt az alhelyet az Ile698 és Met702 alkotja, amelyek mellett az Ala509 és His510 aminosavak szerepelnek.

A VEEV nsP2pro nagyon fontos gyógyszercélpont, ennek oka többek között a vírus életciklusában betöltött kritikus szerepe és az interferon védekezési mechanizmussal szembeni aktivitása. A proteáz képes felismerni a megfertőzött gazdasejtekben az immunválaszért felelős TRIM14 fehérjében előforduló, a virális poliproteinben lévő hasítóhelyhez hasonló szekvenciát, és elhasítani ezt a fehérjét. Az ilyen szekvenciákat a gazdaszervezet és a patogén fehérje szekvenciák rövid homológ szakaszainak nevezzük (*short stretches of homologous host-pathogen protein sequences*, SSHHPS). Mindezek alapján elmondható, hogy a VEEV nsP2pro a gyógyszertervezés egyik fontos célpontjában tekinthető.

1.3. Az alfavírus nsP2pro fehérjék kristályszerkezete

Az alfavírus közül csak a VEEV, a Chikungunya vírus (CHIKV) és a Sindbis vírus (SINV) proteázának szerkezetét határozták meg, a legtöbb szerkezeti információ a VEEV nsP2pro esetében érhető el. Az első VEEV nsP2pro szerkezetet 2006-ban sikerült leírni (PDB ID: 2HWK), a kutatás során az nsP2 457-794 régióját tartalmazó fehérjét expresszálták és kristályosították, majd röntgenkristallográfiás módszerrel a proteáz és a SAM MTáz doméneket magába foglaló régió (Asp468-Ser787) szerkezetét sikerült feloldani, 2,45 Å felbontással.

Egy 2016-ban közzétett tanulmányban a VEEV nsP2pro inhibitorral gátolt szerkezetét írták le (PDB ID: 5EZX). Ezt követően, egy 2017-ben megjelent tanulmányban a VEEV nsP2pro egy mutáns változatát is vizsgálták, amely esetében alacsonyabb enzimaktivitást határoztak meg. Az enzim az N475A mutációt tartalmazta, kristályszerkezetét a Gln471-Glu791 régió esetében sikerült meghatározni, 2,10 Å felbontással (PDB ID: 6BCM). A szerkezetben az N-terminális régió egy alternatív konformerét figyelték meg, amelyben az enzim N-terminális szakasza (Gln471-Cys477) az aktív hely irányába fordulva jelent meg, elfoglalva a szubsztrátkötő helyet. A tanulmány szerzői, mint „öninaktivált” formára utaltak rá (6BCM^{öninaktivált}), szemben a fő konformerrel, amely az aktív konformernek tekinthető (6BCM^{aktív}). Az aktív és inaktív konformerek 60 és 40%-os eloszlásban voltak jelen a szerkezetben az elektronsűrűségi térkép alapján. A legújabb, 2023-ban publikált vizsgálat keretében egy *in silico* módszerek felhasználásával fejlesztett inhibitorral együtt kristályosított VEEV nsP2pro szerkezetet is sikerült meghatározni (PDB ID: 8T8N).

1.4. Kristályszerkezet-meghatározás

Az enzimek szerkezetének kísérleti módszerekkel való vizsgálatára számos lehetőség áll rendelkezésünkre, ezek közül fontos kiemelni a röntgenkrisztallográfiát, amely több mint fél évszázados múltra tekint vissza a fehérjeszerkezeti vizsgálatok terén. A módszer alkalmazásához szükséges a fehérje expresszálása, tisztítása, majd kristályosítása. A kapott egykristályt ezután röntgensugarakkal sugározzák be, majd a diffrakciós képekből történik az elektronsűrűségi térkép kiszámítása. A konkrét atomok pozíciójának meghatározása az elektronsűrűségi térkép alapján történik, ebbe a térképbe helyezik be az atomokat és építik fel a fehérje háromdimenziós szerkezetét. A fehérje meghatározott szerkezetét többek között az RCSB Protein Data Bank (PDB) adatbázisba feltöltve őrizzük meg.

1.5. Molekulamechanika

A kísérleti módszerek előtt jelentős kihívást jelent az egyedi fehérjemolekulák vizsgálata, többek között a konformációs változások időbeli megfigyelése. A molekulamechanikai módszerek lehetőséget biztosítanak arra, hogy megvizsgáljuk egyedi molekulák, atomszerveződések dinamikai tulajdonságainak változásait. A módszer alapelvei a klasszikus, determinisztikus newtoni mechanikát követik, amelyben a molekulákat rugókkal összekötött modell atomokkal írjuk le. Az egyes atomokat töltés, tömeg és méret paraméterek jellemzik, időbeli mozgásuk a többi jelen lévő atommal való kölcsönhatás alapján meghatározott, továbbá az atomok közötti kötések típusa is előre megadott, ennek következtében elektronátmenet modellezése nem lehetséges a molekuladinamika módszereivel. A molekuladinamika módszereinek rendkívül nagy jelentősége van szerkezetvizsgálati tanulmányok esetében.

A vizsgált molekulákat valamilyen megfelelően paraméterezett erőterrel írjuk le, amely egy több tagból álló függvény, amely az atomi minőségek és pozíciók összességéhez, azaz konformációjához hozzárendel egy energia-értéket. Általában a kötéstávolságok, kötésszögek, diéderes szögek, Lennard-Jones potenciál és Coulomb kölcsönhatás szerepelnek, mint az erőteret leíró képlet tagjai. Az egyes különálló, adott elektronszerkezettel rendelkező molekulák, többek között a fehérjék, vízmolekulák, ionok topológiáját is meg kell, hogy adjuk, ezek nem változnak meg a szimulációk során

A módszer alkalmazásához szükséges egy megfelelő szerkezeti modell, ami lehetőség szerint egy kísérletileg meghatározott szerkezet, de szükség esetén igénybe kell venni a homológia modellezést, vagy újabban gépi tanuláson alapuló módszereket is (pl. AlphaFold).

Meg kell jegyezni azonban, hogy a kristályszerkezetek, az ezek alapján készített homológiamodellek, és ezek alapján tanított mesterséges intelligencia-alapú módszerek által becsült szerkezetek egyaránt kristályfázisban reprezentálják a fehérje szerkezetét, ami nem felel meg az élő sejtnek vagy *in vitro* kísérletek körülményeinek.

A fehérje szerkezetet ezután szükséges előkészítenünk a szimulációk lefuttatására, ellenőrizni, hogy monomert, vagy dimert szükséges vizsgálni, eltávolítani a nem szükséges molekularészleteket, pl. inhibitor, meg kell vizsgálni az alternatív konformerek jelenlétét és beállítani az egyes protonálható oldalláncok protonáltsági állapotait, és szükség esetén ún. *end-capping* csoportokkal lezárni a fehérjeláncot, pótolni a hiányzó atomokat.

A szimulációk lefuttatása ma már szinte kizárólag explicit oldószer jelenlétében történik, amelyhez szükséges valamilyen vízmodell kiválasztása, és az oldószermolekulák hozzáadása. A molekuladinamikai szimulációk általános esetben periodikus környezetben zajlanak (*Periodic Boundary Condition*), ami leggyakrabban téglatest vagy csonka oktaédes geometriájú szimulációs dobozt takar. Ionok hozzáadásával neutralizálhatjuk a rendszert, fiziológiás modellek esetén az ionerősséget is beállíthatjuk.

A szimulációk első lépése általában a szerkezet konformációs energiájának minimalizálása, amelynek során a geometriai deformációk miatt jelentkező feszültségeket szüntetjük meg. Ezután a molekuladinamikai szimuláció során a program előre beállított paraméterek alapján és véletlenszerűen megadott kezdősebességekkel indítja el a szimulációt, az egyes lépésekben az erőter alapján kiszámítja az atomokra ható erőket, és a szimuláció időközének megfelelően lépteti az atomok pozícióját. A rendszer egyes paramétereit nagymértékben kontrollálhatjuk, meg kell adnunk milyen körülmények között futtatjuk a szimulációt, milyen tulajdonságok jellemzik majd a sokaságot. A leggyakrabban alkalmazottak az ún. NVT, azaz kanonikus és NPT, vagy izotermális-izobárikus körülmények. A képletekben N az atomszámot, V a térfogatot, T a hőmérsékletet, P a nyomást jelenti, valamennyi esetben ezeket tartjuk állandó (N és V), vagy egy előre beállított várható érték (P és T) szintjén. A szimuláció során rendszert az algoritmus a megadott időközönként lépteti, lehetőségünk van megadni a mintavételezési időtartamot: azt az időszakot, amennyi lépés után a rendszer elmenti a kapott koordinátákat.

A kiindulási szerkezetként használt kristályszerkezet vagy modellezés alapján kapott szerkezet jelentős mértékben eltérhet a fiziológiás oldatban valójában megjelenő szerkezettől. Az ún. *simulated annealing* módszer alkalmazásával ebből a szerkezetből juthatunk el az oldatban valóban előforduló szerkezethez, úgy, hogy a rendszert fiziológiás hőmérsékletnél

magasabb hőmérsékletre felfűtjük, azon a hőmérsékleten ekvilibráljuk, majd alacsony hőmérsékletre hűtjük, több cikluson keresztül ismételve a lépéseket.

Egy fehérje és ligandja (pl. szubsztrát) által alkotott komplex vizsgálata során szükség lehet megkötések alkalmazására, ugyanis a valóságban a bekötődés után a szubsztrát minden valószínűség szerint rövid időn belül reakcióba lép az enzimmel, míg egy molekuladinamikai szimuláció során nincs lehetőség reakcióba lépésre, ezért szükséges lehet a szubsztrátot mesterségesen az aktív helyben tartani.

1.6. Szimulációk analízise

A lefutott molekuladinamikai szimulációk minőségi ellenőrzésének egyik lehetősége a négyzetes közép eltérés (*root mean square deviation*, r.m.s.d.) értékek kiszámítása. A módszerrel a kristályszerkezetekből nyert, határozott szerkezettel rendelkező fehérjék oldószerben történő viselkedésének megfelelő reprodukálását ellenőrizhetjük. Fontos megjegyeznünk, hogy a mozgékony, dinamikus fehérjék vagy fehérjeszakaszok (pl. rendezetlen fehérjék) esetében akkor beszélhetünk konvergenciáról, ha egy tartományon belül fluktuál ugyan, de átlagértéke már nem változik.

A fehérjék dinamikai tulajdonságainak vizsgálatára számos módszer áll rendelkezésünkre, többek között vizsgálhatunk különböző geometriai paramétereket, pl. aminosavak közötti távolságokat, amelyek kölcsönhatások megjelenését igazolhatják.

Kiemelt jelentőségű a hidrogénhidak vizsgálata, amik a másodlagos kölcsönhatások közül az egyik legerősebb kölcsönhatást biztosítják. A szimulációk jó lehetőséget biztosítanak a hidrogénhidak által alkotott kölcsönhatási rendszerek vizsgálatára. Egy kristályszerkezet csak a fehérje egy adott állapotát, még inkább a kristályban lévő molekulák átlagát, reprezentálja, még hozzá nem is oldószer fázisban, egy megfelelő minőségű szimuláció nagyon értékes részleteket mutathat meg a vizes közegben jelen lévő hidrogénhid kölcsönhatásokról.

A szimulációk során a fehérje egyes részei elmozdulhatnak, a kapott hosszú trajektóriák rendszerint számos, többé-kevésbé eltérő szerkezetet tartalmaznak. Szükség lehet a kapott szerkezetek egymással való összehasonlítására, csoportosítására, és a csoport(ok)ra leginkább jellemző szerkezet(ek) kiválasztása, amit klaszterezés segítségével oldhatunk meg.

1.7. A szimulációs szoftverek alkalmazása

Számos molekuladinamikai szoftver áll rendelkezésre, ezek közül több ingyenesen elérhető, közülük kiemelhetjük az Amber, GROMACS és NAMD szoftvereket. A bemutatott munka során az Amber16 szoftvert alkalmaztuk, amely több programot és scriptet tartalmaz. Két részből áll, az AmberTools-ból, és az Amber számítási programcsomagból. Az AmberTools, amely gyakorlatilag minden scriptet tartalmaz, amelyekkel egy fehérjét előkészíthetünk, lefuttathatjuk a szimulációkat, és az eredményeket is értékelhetjük. Beletartoznak az egyes erőterek paraméterei, a szerkezetek előkészítéséhez szükséges *tleap* script, és a más molekulák paraméterezését segítő *antechamber* program is. A szimulációk lefuttatására a *sander* programmal van lehetőség, eredményeinek analízisét a *cpptraj* scripttel tudjuk elvégezni. Az AmberTools-ban elérhető számítási programoknál nagyobb teljesítményű *pmemd* scriptet az Amber számítási programcsomag tartalmazza, amelyre a szimulációk gyorsabb, pl. grafikus processzoregység (GPU)-gyorsítást használó alkalmazásának lefuttatásához van szükség. Valamennyi bemutatott számítást az Amber16 szoftverrel futtattunk le, igénybe véve a *pmemd* algoritmus GPU-gyorsított változatát. A szerkezetek előkészítését, az eredmények analízisét pedig az AmberTools-ban elérhető scriptek segítségével végeztük el.

A molekuladinamikai szimulációk általában nagy számítási kapacitást igényelnek, és a szimulációk során nagy mennyiségű adat generálódik. Lefuttatásukra leginkább szuperszámítógépes (HPC) környezetben van lehetőség, számos nagy teljesítményű CPU mag és GPU igénybe vételével, párhuzamosan futtatva több szimulációt. A szuperszámítógépes környezetben előre telepített szoftverek segítik munkánkat, amelyeket az adott HPC erőforrásainak megfelelően paramétereztek, így nekünk már ezek beállításával nem kell foglalkoznunk. Továbbá, akadémiai licenccel olyan szoftverek is elérhetőek lehetnek, amelyek külön megvásárlása jelentős összegeket emésztene fel. A modern MD programok erősen optimalizáltak a GPU-kon való futtatásra, sokszorosan meggyorsítva munkánkat ezzel a hagyományos CPU futásokkal szemben. Ebben kiemelhetjük a CUDA programozási interfész szerepét, amelyre a legtöbb GPU gyorsítást igénybe vevő molekuladinamikai szoftver támaszkodik.

2. Célkitűzések

A doktori disszertáció alapjául szolgáló kutatásaink célja a VEEV nem-szerkezeti fehérje 2 proteáz (nsP2pro) működését meghatározó szerkezeti sajátságok számításon alapuló kémiai módszerekkel történő vizsgálata volt, különös tekintettel az aktív helyen kialakuló inter- és intramolekuláris kölcsönhatásokra. A szerkezeti vizsgálatok részét képezték azon kísérletes vizsgálatoknak, melyek célja az enzim specificitásának *in vitro* aktivitásmérésekkel történő meghatározása, valamint az enzim szerkezetének röntgenkristallográfiával való feloldása volt.

I. A VEEV nsP2pro szubsztrát-specificitásának vizsgálata

A kísérletes specificitás vizsgálatok kiegészítéseként célul tűztük ki a VEEV nsP2pro szubsztráttal alkotott komplex szerkezetének elkészítését, a komplex molekuladinamikai szimulációkkal történő elemzését, valamint különböző szubsztrát variánsok szerkezeti és energetikai vizsgálatát, az aminosav preferenciákat meghatározó szerkezeti sajátságok azonosítása érdekében.

II. A VEEV nsP2pro kristályszerkezetének vizsgálata

A VEEV nsP2pro kristályszerkezetében megfigyelt aktív és öninaktivált konformációs állapotok részletesebb vizsgálata érdekében célunk volt az enzim stabilitását meghatározó szerkezeti sajátságok feltérképezése az elérhető kristályszerkezetek összehasonlítása és molekuladinamikai számítások segítségével, különös tekintettel az enzimet érintő mutációk hatásainak valamint az aktív hely kölcsönhatási hálózatainak feltérképezésére.

3. Anyagok és módszerek

Doktori munkáim során végzett valamennyi számítás a Kormányzati Informatikai Fejlesztési Ügynökség (KIFÜ, korábban NIIF) által rendelkezésünkre bocsátott HPC erőforrások igénybe vételével készült.

3.1. A VEEV nsP2pro szubsztrát-specifitásának vizsgálata

A kiindulási szerkezet a specificitás vizsgálata során a VEEV nsP2pro és a természetes szubsztrátja által alkotott komplex modell szerkezete volt. A fehérje szerkezete a 469-767 pozícióban lévő aminosavak tartalmazta, a szerkezetet Dr. Patricia M. Legler bocsátotta rendelkezésünkre (Center for Bio/molecular Science and Engineering, U.S. Naval Research Laboratory).

Az eredeti modell és a kísérletileg vizsgált fehérje szekvenciáit a Clustal Omega szoftver alkalmazásával illesztettük egymásra. A szerkezetben lévő peptid szubsztrátot az *in vitro* kísérletek során is alkalmazott szubsztrátra (EYHAGA↓GVVETP) módosítottuk. Az nsP2pro C-terminális szakaszán két aminosavat módosítottunk FoldX szoftverrel, hogy megfeleljen a kísérletileg vizsgált fehérjének. Az enzim és szubsztrát terminálisokon *end-capping* csoportokat alkalmaztunk. A protonálható aminosavak állapotát PROPKA 3.1 számítások alapján állítottuk be, a neutrális hisztidinek esetén Chimera szoftverrel vizsgáltuk a proton helyzetét. Az aktív hely Cys477 aminosavát deprotonált, a katalitikus His546 aminosavat protonált oldallánccal modelleztük. Az előkészítést az Amber16 *tleap* moduljával végeztük el, ezzel adtunk hozzá hidrogéneket is a szerkezethez. Mind a proteáz, mind a szubsztrát leírásához a ff14SB erőteret alkalmaztuk, a vízmolekulák leírása a TIP3P modell alapján történt.

A számítások lefuttatásához az Amber16 szoftvert alkalmaztuk, minimalizálást követően NPT körülmények között, 1 fs lépésközzel végeztünk molekuladinamikai szimulációkat. A rendszert elsőként 300 K-re fűtöttük egy 2 ns hosszú szimuláció során, majd 300 K hőmérsékleten ekvilibráltuk 2 ns időtartamon keresztül. A hőmérséklet szabályozásához a Langevin dinamika módszerét alkalmaztuk. Az egyik atomként hidrogént tartalmazó kötésekre a SHAKE algoritmust alkalmaztuk. A rendszert ezután tovább fűtöttük 400 K-re egy 0,5 ns hosszú szimuláció során, majd 400 K-en ekvilibráltuk további 0,5 ns ideig. Ezután 5 K hőmérsékletre hűtöttük egy 1 ns hosszú szimuláció során, a *simulated annealing* módszerének megfelelően. Ezután ismét 400 K-re melegítettük egy 0,5 ns hosszú szimuláció során, ezen a hőmérsékleten egy további 0,5 ns hosszú ekvibrációs szimulációt futtattunk. Ezt a szimulációs

ciklust még kétszer megismételtük, azonban a második esetben a rendszert csak 300 K hőmérsékletre fűtöttük fel. Ezen a hőmérsékleten további 0,5 ns ideig egy ekvilibrációs szimulációt futattunk.

A szimulációk során egy $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ értékű megkötést alkalmaztunk a katalitikus diád Cys477 kénatomja és a szubsztrát P1 alanin karbonil oxigénje között. Egy ugyanilyen értékű megkötést alkalmaztunk a katalitikus His546 donor nitrogén atomja és a szubsztrát P1' glicin főlánci nitrogén atomja között.

A konvergenciát az utolsó, ekvilibrációs szakaszban meghatározott r.m.s.d. értékek ellenőrzésével igazoltuk, az átlagszerkezetet, mint referenciát figyelembe véve. A különböző pozíciókban módosított szubsztrátot tartalmazó komplexek elkészítésére a DynaMut webszervert alkalmaztuk. Összesen 1 db P5, 4 db P4, 2 db P2, 2db P1, 20 db P1' és 2 db P2' mutáns szubsztrátot vizsgáltunk. A feltekeredési energia (szabadentalpia) definíció szerint a ≥ 0 kcal/mol változásokat ($\Delta\Delta G$) stabilizáló, míg a $\Delta\Delta G < 0$ esetében destabilizáló hatásúnak tekintettük. Az interakciók kétdimenziós vizuálizációjához a LigPlot+_v2.1 szoftvert, míg a szerkezetek térbeli megjelenítéséhez a PyMOL szoftvert használtuk.

3.2. A VEEV nsP2pro kristályszerkezetének meghatározása

A rekombináns fehérje előállítása, kristályosítása és a szerkezet feloldása George T. Lountos, Danielle Needle, Alexander Wlodawer és David S. Waugh munkája. A kísérletesen vizsgált fehérje a VEEV nsP2 Arg463-Thr785 régióját tartalmazta, a feloldott szerkezet csaknem a teljes hosszúságú fehérje szerkezetét magába foglalja (Asn472-Thr785). A fehérje a K741A és K767A felszíni entrópiát csökkentő mutációkat is tartalmazott az nsP2pro SAM MTáz doménjében, míg a cisztein proteáz domén nem tartalmazott módosítást. A kristályosított fehérjét röntgendiffrakciós vizsgálatnak vetették alá, a kapott kristályszerkezet a Protein Data Bank adatbázisban érhető el, azonosítója: 8DUF.

3.3. A VEEV nsP2pro kristályszerkezetének molekuladinamikai vizsgálata

A molekuladinamikai elemzések során három nsP2pro szerkezetet vizsgáltunk: a K741A és K767A felszíni mutációkat tartalmazó enzim általunk meghatározott szerkezetét (PDB ID: 8DUF), a vad típusú nsP2pro szerkezetét (PDB ID: 2HWK) valamint az N475A mutáns fehérje szerkezetét (PDB ID: 6BCM). A fehérjeláncokon és a kristályszerkezetekben lévő vízmolekulákon kívül minden egyéb jelenlévő atomot eltávolítottunk. A 8DUF esetében a szerkezetet az Asn472 aminosavtól az Ala768 aminosavig vizsgáltuk. Az aktív és öninaktivált

szerkezeteket külön vizsgáltuk. A titrálható aminosav oldalláncok protonáltsági állapotainak meghatározásához a PROPKA 3.1 szoftvert alkalmaztuk. A terminálisokhoz GaussView 6 segítségével acetil- vagy N-metilamid csoportokat adtunk. A hidrogéneket az AmberTools16 program *tleap* moduljának segítségével adtuk hozzá a szerkezetekhez. A katalitikus aminosavak ebben az esetben is töltött formában szerepeltek (deprotonált cisztein, ill. protonált hisztidin).

Explicit oldószer vízmolekulákkal egészítettük ki a rendszereket, a *Split charge* módszer alkalmazásával a fiziológiás ionkoncentrációt és az egyes szerkezetek töltését figyelembe véve állítottuk be a nátrium és a klorid ionokra számát. A protein paraméterezésére az ff14SB erőteret használtuk, míg a vízmolekulákat a TIP3P modell segítségével írtuk le.

A számítások lefuttatásához ugyancsak az Amber16 szoftvert alkalmaztuk, minimalizálást követően 1 fs lépésközt alkalmazva, a rendszereket első lépésként 300 K-re fűtöttük egy 1 ns hosszú szimuláció során, NVT sokaságot alkalmazva, amit egy 1 ns hosszú NVT ekvilibrációs szimuláció követett 300 K hőmérsékleten. Ennek során $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ mértékű helyzeti megkötést alkalmaztuk a fehérje atomjain. Ezután egy további ekvilibrációt futattunk, NPT körülmények között, 0,5 ns időtartamon át. Az ekvilibrációt követően a rendszereket 400 K hőmérsékletre fűtöttük, egy 0,5 ns hosszú szimuláció során. Ezen a hőmérsékleten további 1 ns időtartamig ekvilibráltuk a rendszereket. Ezután egy 2,5 ns hosszú szimuláció során lehűtöttük azokat 5 K hőmérsékletre. Ezután a rendszert ismét 400 K-re fűtöttük, ekvilibráltuk, és 5 K-re hűtöttük, a *simulated annealing* protokollnak megfelelően, az előbbieken megadott időtartamokat alkalmazva. Ennek során egy kisebb, $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ mértékű helyzeti megkötést használtunk a fehérje atomjainak megkötésére. Ezután további két, ugyanilyen ciklust futattunk le, melyek során rendre $3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ és $1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ mértékű pozicionális megkötést alkalmaztunk, de már csak a fehérje főláncban lévő atomjain. Végül megkötések alkalmazása nélkül a rendszereket 5 K-en 1,5 ns időtartamig ekvilibráltuk, majd 300 K hőmérsékletre fűtöttük egy 1,5 ns hosszú szimuláció során, és 300 K-en ekvilibráltuk további 5 ns időtartamig. Ezután a kiértékelésre tervezett, adatgyűjtési szakaszok (*production run*) következtek, amelyek során megkötések nélkül, 300 K-en futtattuk a szimulációkat 50 ns időtartamig. A szerkezeteket jellemző koordináták mintavételezése 5 ps időtartammal történt. Minden általunk vizsgált szerkezet esetében 3-3 különálló szimulációt futtattunk le.

Az adatgyűjtési szakaszok során kapott szerkezetekre kiszámítottuk az r.m.s.d. értékét, referenciaként a minden tizedik szerkezet összegzésével kapott koordináták átlagát adtuk meg. Vizsgáltuk az N-terminális szakaszok által képzett hidrogénhidak hálózatát is, az egyes

szerkezetekkel számított három trajektóriát egyben értékeltük ki. A továbbiak során a trajektória legalább 10%-ában jelenlévő hidrogénhidakat vettük figyelembe, mint jelentős, valóban megjelenő kölcsönhatások. A fehérjék dinamikai tulajdonságai meghatározásának céljából különböző távolságméréseket is végeztünk. Az egyes, független szimulációkat külön-külön kezeltük, az így kapott, szimulációs idő függvényében mért távolságértékeket is külön-külön elemeztük. Vizsgáltuk az aktív hely kölcsönhatásait is, ehhez az öninaktivált konformerek esetében számítási módszerek kapott szerkezeteket klaszterezésnek vetettük alá. A klaszterezés után a legnagyobb mértékben jelen lévő klaszter centroidját vettük, mint a szimulációt reprezentáló szerkezetet. A kölcsönhatásokat ebben a szerkezetben vizsgáltuk a LigPlot+ szoftver segítségével. Az összehasonlításhoz a korábban leírt, szubsztrátot kötő modellt vettük alapul.

A kristályszerkezetek molekuladinamikai vizsgálata során alkalmazott hosszabb *simulated annealing* protokoll célja az volt, hogy fel tudjuk térképezni a N-terminális kölcsönhatásait, míg a szubsztrát-specifitás vizsgálat esetén célunk egy olyan enzim-szubsztrát komplex ekvibrálása volt, amelyből kiindulva különböző variánsokat tudunk vizsgálni, DynaMut szoftver alkalmazásával.

4. Eredmények

4.1. A VEEV nsP2pro szubsztrát-specifitásának vizsgálata

Célunk a VEEV nsP2pro specifitásának kísérletes és számítógépes vizsgálata volt. Munkánk során az enzim S5, S4, S2, S1, S1' és S2' szubsztrátkötő alhelyeinek aminosav preferenciáit olyan rekombináns fehérje szubsztrátokkal vizsgáltuk *in vitro*, melyek az SFV vírus nsP1/nsP2 természetes hasítási helyének vad típusú (EYHAGA↓GVVETP), valamint P5, P4, P2, P1, P1' és P2' pozíciókban módosított variánsait reprezentálták. A vizsgálatokhoz összesen 31 különböző szubsztrátot hoztunk létre és használtunk fel (Dr. Bozóki Beáta munkája). Azzal a céllal, hogy magyarázatot találjunk a kísérletesen megállapított hasítási hatékonyságok és kinetikai paraméterek közötti különbségekre, elvégeztük a szerkezetek *in silico* elemzését. Ehhez felépítettem a kísérletes vizsgálatok során is alkalmazott enzim és a vad típusú SFV nsP1/nsP2 hasítóhelyet reprezentáló oligopeptid szubsztrát komplexének szerkezetét, amit ezt követően molekuladinamikai szimulációkkal vizsgáltam. Megvizsgáltuk a szimuláció utolsó lépésében, az adatgyűjtési szakasz lefuttatása során számított r.m.s.d. értéket, ami nem fluktuált jelentős mértékben. Az utolsó lépésben kapott szerkezetet fogadtuk el, mint a VEEV nsP2pro enzim és az oligopeptid szubsztrát komplexének szerkezetét.

Az ekvilibrált enzim-szubsztrát komplex szerkezetét alapul véve létrehoztuk a módosított szubsztrátokat tartalmazó szerkezeteket a DynaMut szoftverrel (Dr. Mótyán János András munkája), majd a komplex szerkezetek vizsgálatával feltérképeztük az enzim-szubsztrát kölcsönhatásokat, az aminosav-preferenciákat meghatározó szerkezeti sajátosságai meghatározása érdekében.

A P5 helyen lévő tirozint glutaminra módosítottuk, ebben az esetben DynaMut számítások alapján a mutáció hatására az enzim-szubsztrát kölcsönhatás gyengül ($\Delta\Delta G = -0,222$ kcal/mol), ami a kísérletes vizsgálatok eredményével összhangban volt. A P5-Gln-t tartalmazó szubsztrát esetében a kevésbé hatékony *in vitro* hasítás hátterében az állhat, hogy a vad típusú tirozin két hidrogénhidat is kialakít az S5 alhelyen (oldallánc- és főlánc-mediált kölcsönhatások a Ser371 és Ser701 aminosavakkal), mely kölcsönhatásokat nem mutattuk ki a P5-Gln-mutáns szubsztrát esetében.

A P4 helyen lévő vad típusú hisztidint több különböző aminosavra is módosítottuk. A DynaMut-tal számított $\Delta\Delta G$ értékek jó korrelációt mutattak a kísérletesen meghatározott értékekkel, valamennyi vizsgált variáns esetében a vad-típusnál is magasabb proteolitikus aktivitás volt mérhető *in vitro*. Az S4 alhelyen elsősorban a poláris enzim-szubsztrát kölcsönhatások a dominánsak és az S4-Lys706 oldallánc sóhidat képes kialakítani az S4-Gln

oldallánccal. Ezzel összhangban a kísérletes vizsgálatainkban a P4-Gln hasítása hatékonyabbnak bizonyult a vad típusú szubsztráthoz képest, amit magyarázhat, hogy a VEEV nsP1/nsP2 és nsP2/nsP3 természetes hasítóhelyek is glutamint tartalmaznak ebben a pozícióban. A legalacsonyabb aktivitást a P4-Gly mutáns esetében tapasztaltuk, ami arra utal, hogy az S4 alhelyen az oldallánc-mediált poláris kölcsönhatások valóban fontos szerepet töltenek be a szubsztrát-felismerésben.

A P2 pozícióban a vad típusú hasítóhely glicint tartalmaz, aminek alaninra vagy valinra módosítása esetében egy főlánci hidrogénhid megsejűnése jár destabilizáló hatásokkal. A DynaMut-tal számított feltekeredési energia-változás P2-Ala esetében -0,536, míg P2-Val esetében 0,495 kcal/mol volt. A kísérletes vizsgálatokban mindkét mutánsal jelentősen alacsonyabb aktivitás értéket határoztunk meg, a szerkezet vizsgálata alapján a glicinnél nagyobb méretű valin és alanin oldalláncok kötődése az S2 alhelyre kedvezőtlen.

A vad típusú szubsztrát esetében a P1 helyzetben előforduló alanin hidrofób kölcsönhatásokat alakít ki az S1 alhely aminosavaival. A glicinre való módosítás esetében mérsékelt változást jósoltunk a szerkezet vizsgálata alapján (0,188 kcal/mol), ami összhangban volt a kísérletes vizsgálatok eredményével, a vad típusú (P1-Ala) és mutáns (P1-Gly) szubsztrátok esetében meghatározott aktivitásértékek nagymértékben hasonlóak voltak. Az enzim-szubsztrát kölcsönhatások jelentősebb változását jósoltuk a P1-Val mutáció esetén (1,207 kcal/mol), a kísérletes vizsgálatok során pedig ezen mutáns szubsztrátot az enzim csupán elhanyagolható mértékben hasította. Eredményeink összhangban vannak korábbi kutatások megfigyeléseivel, az elágazó, apoláros oldalláncok alacsonyabb mértékű flexibilitása miatt ezek kötődése az S1 alhelyre kevésbé kedvező.

A vizsgált vad típusú hasítóhely P1' pozícióban glicin aminosavat tartalmaz, főlánci hidrogénhidat tud képezni az Arg662 aminosav oldalláncával. A kísérletesen vizsgálatok során a hasítóhely valamennyi lehetséges változatát megvizsgáltuk, az *in vitro* meghatározott aktivitások leginkább a teljes hasítóhely hidrofobicitással mutattak korrelációt, ugyanis az enzim a szubsztrát főláncával alakít ki hidrogénhidat ebben a pozícióban. Eredményeink alapján azonban az enzim P1' aminosav preferenciája mégsem teljes mértékben független az oldalláncától. A glicinen kívül a legnagyobb aktivitás értékeket poláros (Thr és Ser) vagy aromás (Tyr, Trp, Phe) oldalláncok esetében tapasztaltuk. Az alfavírusok valamennyi természetes nsP1/nsP2, nsP2/nsP3 és nsP3/nsP4 hasítóhelye rendre Gly, Ala és Tyr aminosavat tartalmaz a P1' pozícióban, ez igaz a VEEV-re is. Ezen variánsok közül a legnagyobb aktivitást a P1'-Tyr esetében határoztuk meg, amely esetében az aromás oldallánc miatt további hidrofób

kölcsönhatások is megjelenhetnek, továbbá a láncvégi hidroxil csoport egy további hidrogénhidat alakíthat ki a Leu665 főláncával. Ezek a hidrofób kölcsönhatások Phe vagy Trp oldallánc esetében is jelen lehetnek, ami megmagyarázza az aromás oldalláncot tartalmazó szubsztrátok esetében tapasztalt jelentősebb aktivitást. A számított feltekeredési energia-eltérések nem mutattak jelentős korrelációt a kísérletesen meghatározott relatív specifikus aktivitás értékekkel, aminek oka, hogy ebben a pozícióban a szubsztrátban egy „törés” figyelhető meg, egy nagyobb oldallánc beépítése jelentős szerkezeti változásokat okozhat, az ezzel járó jelentős energetikai változásokat a DynaMut kevésbé képes prediktálni.

A legtöbb alfavirus esetében az nsP1/nsP2, nsP2/nsP3 és nsP3/nsP4 autoproteolitikus hasítóhelyek P2' helyzetben hidrofób/apoláros aminosavakat tartalmaznak (Pro, Leu, Ile vagy Val), míg egyes alfavirusok esetében, beleértve a VEEV-t is, az nsP1/nsP2 hasítóhelyen poláros Ser található ebben a pozícióban. A kísérletes vizsgálatok során kollégáim az SFV nsP1/nsP2 vad-típusú hasítóhelyének P2' valin aminosavát szerinre vagy prolinra mutálták. Korábbi kutatások igazolták, hogy az S4-S1' alhelyek hozzájárulása a szubsztrát felismeréséhez jelentős. A vad-típusú valin szerinre történő módosítása nem okozott jelentős különbségeket a kinetikai paraméterekben, a k_{cat}/K_M értéke mindkét esetben $0,06 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéknek adódott. A P2' oldallánc az oldószer irányába fordul, leginkább a szubsztrát főlánc alakít ki interakciót az enzimmel. A számított feltekeredési energia megváltozásának mértéke $-0,068 \text{ kcal/mol}$ volt, ami igen kis mértékű változást jelent a mutáció hatására. A P2'-Pro esetében számított feltekeredési energia-változás ehhez képest jelentősebb volt ($0,427 \text{ kcal/mol}$). A vad típusú, valamint a P2'-Pro és P2'-Ser variáns szubsztrátok esetében a kísérletesen meghatározott specifikus aktivitás értékek nagymértékben hasonlóan bizonyultak. Az S2 alhely esetében számított és mért értékek azzal magyarázhatók, hogy az S4-S1' alhelyekhez képest az S2' alhely kevésbé jól definiált, az oldószer felé nagyobb mértékben nyitott. Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy a P2'-P6' pozíciókban lévő aminosavak az oldószer irányába orientáltak és a P1'-P6' pozíciókban leginkább főlánc-mediált kölcsönhatások dominánsak.

4.2. A VEEV nsP2pro kristályszerkezetének meghatározása és elemzése

Röntgendiffrakcióval meghatároztuk a VEEV nsP2pro kristályszerkezetét. A szerkezet meghatározásához előállított rekombináns fehérje a VEEV nsP2 Arg463-Thr785 régióját tartalmazta. Az enzim SAM MTáz doménje a megfelelő diffrakció és nagy felbontás – a felületi entrópia csökkentése révén történő – elérése végett két felületi mutációt is tartalmazott (K741A és K767A). A cisztein proteáz domén nem tartalmazott módosításokat. Az Arg463-Thr785

rekombináns fehérje szerkezetét csaknem teljes hosszában sikerült feloldani (Asn472-Thr785), azonban a Tyr764-Tyr774 hurok egy része (Arg769-Tyr774) nem volt látható az elektronsűrűségi térképen, feltehetően a régió relatíve nagyobb mértékű flexibilitása miatt. A meghatározott szerkezet felbontása relatíve nagy, 1,46 Å volt. Az elektronsűrűségi térkép alapján meghatározott kristályszerkezetben az enzim N-terminális régiójának két eltérő konformációja volt megfigyelhető (8DUF^{aktív} és 8DUF^{öninaktivált}).

A 8DUF^{aktív} konformer esetében a Lys473 aminosavtól kezdődően volt látható szerkezet, míg a 8DUF^{öninaktivált} konformer esetében az Asn472-től kiindulva. Az N-terminálison egészen Cys477-ig minden aminosav rendelkezett alternatív konformerrel. Az N-terminális szakasz a 8DUF^{aktív} konformer esetében az oldószer irányába fordulva jelent meg, míg a 8DUF^{öninaktivált} konformer esetén az aktív hely irányába fordulva volt látható, a domének közötti részbe kötődve, közvetlenül a β-hajtú alatt. Mivel az öninaktivált konformerben az N-terminális szakasz az S5-S1' szubsztrátkötő helyeket foglalja el, katalitikusan inaktívnak tekinthető. Ez megfelelt a korábban az N475A aktív hely mutáns enzim esetében megfigyelt konformációs állapotnak (6BCM^{öninaktivált}). Az öninaktivált állapotot nem figyelték meg a nem-módosított aktív helyet tartalmazó enzim esetében (PDB ID: 2HWK).

Az ismert VEEV nsP2pro és a CHIKV nsP2pro szerkezetek összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy az aktív konformáció esetén az N-terminális szakasz az oldószer irányába fordulva látható, azonban az N-terminális konformációja eltérést mutatott abban az esetben, ha az enzimben jelen volt az N475A mutáció is (6BCM^{aktív}).

A 8DUF kristályszerkezetben a C-terminális régióban az Arg769-Tyr774 aminosavak nem jelentek meg, illetve különbségek voltak figyelhetőek meg ezen régió esetében a SAM MTáz domén mutációit nem tartalmazó szerkezetekhez képest (5EZS, 2HWK, 6BCM), ami arra utal, hogy a Tyr764-Tyr774 hurok flexibilisebbé vált a mutációk következtében.

A CHIKV nsP2pro esetében a katalitikus His548 aminosavat tartalmazó β-hajtú a proteáz és SAM MTáz domének közötti távolságot csökkentve meg tudja akadályozni a szubsztrát bekötődését, és ehhez hasonlóan alacsony távolságot figyelhetünk meg az N475A VEEV nsP2pro mutáns esetében is. A 8DUF esetében azonban nem találtunk kisebb távolságot, ami arra utal, hogy a N475A mutációnak feltehetően nincs szerepe az öninaktivált forma kialakulásában.

4.3. A VEEV nsP2pro kristályszerkezetek molekuladinamikai vizsgálata

4.3.1. A molekuladinamikai szimulációk ellenőrzése

A protokoll „*simulated annealing*” szakasza során a szerkezetek geometriáját vizualizációval ellenőriztük. Az ekvilibrációs szakasz utáni adatgyűjtési szakasz számítások lefutását az r.m.s.d. értékek kiszámításával ellenőriztük, a referencia minden fehérje esetében a teljes trajektóriából minden tizedik mintavételezett szerkezet atomi pozícióinak átlagából számított szerkezet volt.

Az eredmények alapján nem történt jelentős konformációs változás egyik vizsgált szerkezet egyik konformere esetében sem, ami előfeltétele volt az egyes konformerek további vizsgálatának. Az N475A mutáns öninaktivált szerkezetében ($6BCM^{\text{öninaktivált}}$) magasabb fluktuációt tapasztaltunk, mint az aktív konformációjú változatában ($6BCM^{\text{aktív}}$), ami a mutáns változat öninaktivált szerkezetének nagyobb flexibilitására utal. Megvizsgáltuk az adatgyűjtési szakaszok utolsó lépésében kapott szerkezeteket is, a $6BCM^{\text{aktív}}$ szimulációk egyikében megfigyelhető volt, hogy az N-terminális egy az aktív és öninaktivált konformerek közötti konformert vett fel.

4.3.2. A VEEV nsP2pro N-terminálisának interakciói

Feltérképeztük valamennyi vizsgált szerkezet esetében az nsP2pro N-terminális régiója által kialakított interakcióikat. A trajektóriában megjelenő hidrogénhidak nem mutattak jelentős különbségeket az N475A mutáns ($6BCM$) és a vad-típusú Asn475 aminosavval rendelkező K741A/K767A mutáns ($8DUF$) aktív és öninaktivált konformerei között. Az ellentétes töltéssel rendelkező katalitikus aminosavak (Cys477 és His546) hidrogénhid kölcsönhatást alakítottak ki valamennyi trajektóriában. Fontos kiemelni a 475. aminosavat jellemző különbségeket. A $8DUF$ szerkezetben, a vad-típusú Asn475 jelenlétében az aktív konformer négy hidrogénhid kölcsönhatást alakított ki ($8DUF^{\text{MD-aktív}}$), melyek közül két oldallánc és egy főlánc által kialakított hidrogénhid az 507. pozícióban lévő Asp aminosavval jelent meg, míg egy oldallánc által kialakított hidrogénhid a 662. helyzetben lévő Arg aminosavval. Az oldallánc által kialakított hidrogénhidak minden esetben csak a trajektória kevesebb, mint felében jelentek meg. A főlánc által kialakított hidrogénhid a trajektóriák 78%-ában volt jelen, ami erősebb kölcsönhatásra utal.

A $8DUF$ esetében az öninaktivált forma ($8DUF^{\text{MD-öninaktivált}}$) egészen más interakciós hálózatot mutat: Asn475 oldallánca hidrogénhidakat alakít ki az N-terminálison található 472-es és 473-as pozícióban lévő aminosavakkal. Ezek jelenléte rendre 11% és 24%, mindez az N-

terminális erősen fixált, belsőleg rendezett szerkezetére utal. Lys473 és Ala474 további hidrogénhid kölcsönhatásokat alakít ki a fehérje más aminosavaival is, Asn475 pedig két hidrogénhidat alakít a His510 aminosavval, amelyek jelentősebb mértékben vannak jelen a szimulációk során (25% és 34%).

A 6BCM^{MD-aktív} szerkezetet esetében egyértelműen nem kell számítani az oldallánc által kialakított hidrogénhid kölcsönhatásokra, lévén az N475A mutáns alanin oldalláncának a metil csoportja nem képes kialakítani ilyeneket. Az N475A mutáns aminosav és Asp507 közötti oldallánc hidrogénhid jóval kisebb mértékben, 13%-ban jelenik meg, ami egy jóval gyengébb interakcióra utal. Sem a Lys473, sem pedig az Ala474 nem alakít ki hidrogénhidakat, ami a szerkezet kisebb stabilitására utal. A 6BCM^{MD-öninaktivált} szerkezetben viszont nem látszik, hogy az oldallánc hidrogénhidak megszűnése N475A főlánci hidrogénhidjait jelentősen befolyásolta volna. A 475-ös helyzetben lévő aszparagin oldallánca több hidrogénhid kialakítására is képes, amelyek szerepe jelentős lehet mind az aktív, mind az öninaktivált konformerek stabilizálásában is. Az N475A mutációt követően ezek megszűnése jelentős különbségeket okoz az N-terminális régió hidrogénhid kölcsönhatási hálózatában, és ez az aktív konformerben még inkább jelentősebb.

4.3.3. A β -hajtú és Asn545 aminosav

Az Asn545 aminosav a cisztein proteáz doménben lévő egyik hurokban, az ún. β -hajtúben helyezkedik el, mely hajtú alacsony relatív B faktor értéket mutatott mindkét öninaktivált konformer esetében. Az interdomén távolság változásának követéséhez az Asn545 és Leu665 aminosavak tömegközéppontjának távolságát mértük meg a szimulációkban. Ezek a domének kölcsönhatási felszínén helyezkednek el, így feltételeztük, hogy a köztük lévő távolság esetleges megváltozása a cisztein proteáz és SAM MTáz domének egymáshoz viszonyított távolságának megváltozására utalhat. A domének távolságának hasonló mértékű fluktuációit figyeltük meg mind az aktív, mind az öninaktivált konformerekben egyaránt. A trajektóriákban számított távolság valamennyi esetben 5-10 Å között volt, ami arra utalt, hogy az N475A mutáció nem változtatja jelentősen ennek a huroknak a mobilitását.

4.3.4. Az Asn545 és Val476 közötti kölcsönhatás

A β -hajtú hurok mozgását korábban megfigyelték az N475A mutációt tartalmazó szerkezetben, megállapítva, hogy az N545-O és V476-NH atomok közötti hidrogénhid kölcsönhatás felelhet a β -hajtú relatív alacsonyabb flexibilitásért az öninaktivált konformerben.

A 8DUF szimulációk során Asn545 főlánci oxigénje és Val476 főláncja között hidrogénhid volt megfigyelhető, amit az N-terminális intramolekuláris kapcsolatainak vizsgálata is megerősített, ott az öninaktivált konformerben a terminális interakciókat alakít ki β -hajtúvel (Asn545-tel), azonban az aktív konformerben nem figyelhető meg ilyen kölcsönhatás.

A molekuladinamikai szimulációk alapján az Asn545 és Val476 közötti hidrogénhid kölcsönhatás még nagyobb mértékben volt jelen az N475A mutáns öninaktivált szerkezetben, aránya 31%, szemben a vad-típusú Asn475 esetében számított 13%-kal, ami erősebb kölcsönhatást jelent.

Kiszámítottuk a trajektóriákban az Asn545 és Val476 tömegközéppontjainak távolságát is. A 8DUF szerkezetben az aktív konformer esetében a távolság stabilan 10-15 Å közé esett, míg az öninaktivált konformerre kapott távolságérték jelentősen alacsonyabb, kb. 5-8 Å értékek között fluktuált. A 2HWK^{MD-aktív} szerkezetre számított értékek jó egyezést mutattak a 8DUF^{MD-aktív} esetében számítottakkal. Az N475A mutáns 6BCM^{MD-öninaktivált} és a 8DUF^{MD-öninaktivált} szerkezetének vizsgálatakor kapott értékek hasonlóak voltak, ami az öninaktivált konformerek közötti strukturális hasonlóságra utal. A 6BCM^{MD-aktív} esetén számított értékek azonban több trajektóriában is nagy fluktuációt mutattak az N475A mutációt nem tartalmazó enzimekhez képest, a távolság elérte az öninaktivált konformerre jellemző értékeket is, ami az N475A mutációnak az aktív szerkezetet esetlegesen destabilizáló hatására utalt. A távolságérték csökkenésének következménye lehet továbbá az is, hogy a mutánsban az aktív konformer könnyebben alakulhat át az öninaktivált konformerré.

4.3.5. Az aktív hely kölcsönhatásai

A 8DUF^{öninaktivált} konformer az N475A mutáns öninaktivált konformerének feleltethető meg (6BCM^{öninaktivált}), amelyben az N-terminális az aktív hely irányába fordul és a ⁴⁷²AKANVC⁴⁷⁷ aminosavak kötődnek az aktív helyre. Mindkét esetben a Cys477 aminosav foglalja el a S1' alhelyet, míg az N-terminális további aminosavai (472-476) az S5-S1' alhelyekre kötődnek. Az öninaktivált konformer esetében az enzim N-terminális régiója az aktív helyre kötődik be, a természetes szubsztráthoz hasonló módon, azért ezt a szakaszt tulajdonképpen pszeudo-szubsztrátnak tekinthetjük ezekben a konformerekben. Feltérképeztük a pszeudo-szubsztrát által az aktív helyen kialakított legfontosabb kölcsönhatásokat (intramolekuláris kölcsönhatások), amit összehasonlítottunk egy oligopeptid szubsztrát által kialakított interakciókkal (intermolekuláris kölcsönhatások).

Az oligopeptid szubsztrát és az enzim közt az S2-S7 helyeken kialakuló kölcsönhatások vizsgálatához a VEEV nsP2pro és a VEEV vad-típusú nsP1/nsP2 hasítóhelyet reprezentáció oligopeptid szubsztrát modell szerkezetét használtuk fel, melyet Dr. Patricia M. Legler bocsájtott rendelkezésünkre, vizsgálatát az indokolta, hogy ez reprezentálja a VEEV nsP2pro valós hasítóhelyének szekvenciáját, ami virális replikáció során is hasításra kerül. Annak érdekében, hogy a pszeudo- és az oligopeptid szubsztrátok kötődését össze tudjuk hasonlítani, a peptid szubsztrát P2-P7 aminosavainak ($^2\text{QEAGAG}^7$) kölcsönhatásait térképeztük fel. A szerkezetet vizsgálva azt láttuk, hogy összességében relatíve alacsony az enzim és a szubsztrát között kialakuló hidrogénhidak száma, ami egyezik a korábban leírt megállapításokkal, miszerint a szubsztrát aktív helyhez kötődéséért leginkább a P4-P1' aminosavak által kialakított van der Waals interakciók felelnek.

Az inter- és intramolekuláris kölcsönhatások összehasonlítása alapján megállapíthattuk, hogy az öninaktivált konformerek esetében a kölcsönhatások között nincsenek jelentős különbségek a vad-típusú Asn475 és az N475A mutáns esetében, ami a konformerek nagymértékű hasonlóságára utal. A pszeudo- és az oligopeptid szubsztrátok kötődése alapvető hasonlóságokat mutat, mindkét „szubsztrát” aminosavai az S5-S1' alhelyeket foglalják el, és jelentős hasonlóság látható kölcsönhatásaik között is. A hasonlóságok mellett azonban számottevő különbségek is láthatóak az inter- és intramolekuláris kölcsönhatások hálózatában, amelynek jelentősége lehet inhibitor molekulák tervezésekor.

4.3.6. Az aktív hely hozzáférhetősége

Korábbi molekuladinamikai tanulmányok megállapították, hogy a VEEV nsP3/nsP4 hasítóhely P6-P6' aminosavait reprezentáló szubsztrát (RFDAGA↓YIFSSD) konformációs változásokon mehet keresztül, és a P1'-P6' helyen lévő aminosavak nem csak a proteáz domén, hanem az SAM MTáz domén felé is fordulhatnak. Az enzim konformációs flexibilitásának jelentős szerepe lehet a szubsztrát bekötődésében, a flexibilitás összefüggésben lehet az aktív hely hozzáférhetőségével, amely kulcsfontosságú a szubsztrát, vagy az N-terminális bekötődéséhez. Egy másik tanulmány arra utalt, hogy az Asn475 és Arg662 aminosavak közötti interakciónak jelentős szerepe lehet az nsP2pro stabilizálásában.

Vizsgáltuk ezen két aminosav tömegközéppontjának távolságát szimulációink során és megállapítottuk, hogy nem jelentős mértékben, de szisztematikusan a vad típusú Asn475 aminosavat tartalmazó szerkezetek esetében (8DUF és 2HWK) a két konformer között eltérés volt tapasztalható, az öninaktivált szerkezetre valamivel magasabb távolságérték volt jellemző.

Az N475A mutáció esetében azonban az aktív konformerre ($6\text{BCM}^{\text{MD-aktív}}$) jellemző érték volt nagyobb, elérte a $8\text{DUF}^{\text{MD-öninaktivált}}$ esetében tapasztalt értékeket és kiugró fluktuációkat mutatott. Ez az információ kristályszerkezetből nem volt egyértelműen megállapítható (6BCM), a mutáció nem módosította az Arg662 konformációját, de szimulációink megmutatták, hogy az N475A mutáció csökkentette a két domén közötti interakció erősségét. Eredményeink az Asn475 és Arg662 aminosavak közötti interakciók domének stabilitásában betöltött szerepére utalnak.

4.3.7. A katalitikus diád stabilitása

Általános esetben a katalitikus aminosavak távolsága egy adott, az enzimre jellemző érték, ami az aktív hely stabilitását jellemzi, ezért megvizsgáltuk a Cys477 és His546 aminosavak közti távolságot is. A 8DUF és a 2HWK esetében ez a távolságérték stabilan 5 \AA -höz közeli értéket mutatott, csupán kisebb mértékű fluktuációkkal. A N475A mutáns esetében azonban a távolságérték fluktuációja jóval nagyobb volt az aktív konformer esetében ($6\text{BCM}^{\text{MD-aktív}}$), egyes szimulációkban elérte akár a 10 \AA értéket is, ami egy jóval kevésbé stabil aktív hely konformációra utalt. Ennek rendkívül jelentős szerepe lehet az enzim aktivitása szempontjából: a destabilizálódott aktív hely nem feltétlenül képes ellátni feladatát, azaz a peptidkötés hidrolízisét.

Az N475 aminosav által kialakított kölcsönhatások N475A mutáció következtében történő megszűnése olyan konformációs változásokat okozhat, amely hatással lehet a szubsztrát bekötődésére is. Az Asn545 és Val476 közötti interakciók korábbiak során részletezett megváltozása is erre utal. A SAM MTáz és proteáz domének között megnövekedett távolság elviekben egyaránt segíthetné a szubsztrát és az N-terminális aktív helyre való bekötődését. Az N475A mutánsban azonban a katalitikus diád távolsága kimagasló fluktuációkat mutatott, így az N-terminális bekötődésének valószínűsége nagyobb lehet (lévén azzal nincs reakcióba lépésre lehetőség). Az N475A mutánsban nagyobb lehet az öninaktivált konformer kialakulásának valószínűsége, és az aktív hely kedvezőtlen megváltozása negatív hatással lehet az nsP2pro aktivitására. Ezzel szemben az aktív helyen a vad-típusú Asn475 aminosavat - de a felszínen K741A és K767A mutációkat - tartalmazó enzim esetében a molekuladinamikai vizsgálatok alapján az öninaktivált konformer az, amely kevésbé stabil.

4.3.8. A K741A és K767A felszíni mutációk hatása

A 8DUF kristályszerkezet meghatározásához - a felszíni entrópia csökkentésének céljából - kerültek bevezetésre a K741A és K767A felszíni mutációk. A VEEV nsP2pro ezen aminosavai megfeleltethetők a SINV nsP2 SAM MTáz domén R755 és R781 aminosavainak. Az R781 aminosav a SINV SAM MTáz doménjének felszínén helyezkedik el, az nsP2 fehérje valamint az nsP3 „macro” és cink-kötő doménjét összekötő szakasz közötti felszínen. Az R755 aminosav az nsP2 és nsP3 közti interakciókban is részt vehet. Az R718A SINV mutációról korábban kimutatták, hogy nem okoz változást a vírus életképességében. Azt, hogy a VEEV replikációs ciklusára van-e hatással ez a két felszíni mutáció, nem ismerjük, erre vonatkozóan nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok, korábban ilyen mutációkat tartalmazó enzimformát nem vizsgáltak. Továbbá, a doktori disszertációban bemutatott munkák célja a rekombináns nsP2pro fehérje szerkezetének *in vitro* és *in silico* vizsgálata volt, kutatásaink nem terjedtek ki az életciklus vizsgálatára sejtes rendszerben. A VEEV és SINV fehérjék közti hasonlóságok alapján azonban mégis következtethetünk arra, hogy a K741A és K767A mutációk milyen hatással lehetnek a VEEV nsP2pro működésére. A szerkezetek azonos pozícióiban elhelyezkedő aminosavak hasonló szerepet tölthetnek be a fehérje működésében, így - a SINV nsP2pro-hoz hasonlóan - a VEEV pozitívan töltött Lys741 és Lys767 oldalláncai is szerepet játszhatnak az nsP2 és nsP3 közti kölcsönhatások kialakításában. Vizsgálataink alapján erről nem kaptunk információkat, az általunk vizsgált fehérje csupán az nsP2pro enzimikus domént reprezentálta, nem a teljes hosszúságú nsP2 poliproteint vagy az nsP23 prekursor fehérjét. A vad-típusú és a K741A/K767A mutánsokkal végzett *in vitro* aktivitásvizsgálatok adhatnak választ rá, hogy ezek a mutációk hogyan befolyásolják az enzimikus sajátságokat.

Szerkezeti vizsgálataink eredményei alapján nem jelenthető ki egyértelműen, hogy a K741A és K767A mutációknak van-e közvetlen szerepe a VEEV nsP2pro öninaktivált forma kialakulásában. Ezek a mutációk egyik korábban vizsgált VEEV nsP2pro szerkezetében sem szerepeltek, és jelen tanulmány esetében is a kristályszerkezet meghatározása érdekében kerültek beépítésre. Az elektronsűrűségi térkép alapján nem sikerült meghatározni annak a felszíni huroknak egy részét (Arg769-Tyr774), amely a két módosított aminosav közelében helyezkedik el, így feltehető, hogy a mutációk megnövelik ennek flexibilitását. Megvizsgáltuk a kristálykontaktusok szerepét ennek a huroknak a stabilizálásában, és azt találtuk, hogy a Lys767 oldallánca egy sóhíd kialakításán keresztül járulhat hozzá a hurok stabilizálásához a kristályszerkezetben. Bár a Lys741 és a Lys767 aminosavak az aktív helytől távol helyezkednek el és nem vesznek részt a ligand kötésében, feltételezzük, hogy módosításuk - bizonyos

allostérikus kölcsönhatások megváltoztatása - mégis hozzájárulhat az öninaktivált forma megjelenéséhez vagy annak stabilizálásához. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés is, hogy az öninaktivált konformer megjelenését korábban nem tapasztalták a vad típusú enzim esetében, mely sem az aktív helyen, sem pedig az enzim felszínén nem tartalmazott mutációkat (2HWK).

5. Összefoglalás

A doktori értekezésemben bemutatott kutatások célja a venezuelai ló-láz encephalitis vírus (VEEV) nem-szerkezeti fehérje 2 proteázának (nsP2pro) számításon alapuló kémiai módszerekkel történő vizsgálata volt, amelyhez a molekuladinamika módszereit alkalmaztam. Vizsgálataink során az enzim specificitását, valamint az öninaktiváló konformáció kialakulását és az enzim stabilitását meghatározó szerkezeti sajátosságok vizsgálatát tűztük ki célul.

A szubsztrát-specificitás vizsgálatához az nsP2pro oligopeptid szubsztráttal alkotott komplex modelljét hoztam létre, mely szubsztrát a kísérletes vizsgálatok során is használt SFV nsP1/nsP2 természetes hasítóhely szekvenciát reprezentálta. Az így felépített enzim-szubsztrát komplexet molekuladinamikai szimulációkkal vizsgáltam, majd az ekvilibrált komplexben lévő szubsztrátot különböző (P5-től P2'-ig) pozíciókban mutáltuk *in silico*, és meghatároztuk, hogy a szubsztrát módosítása hogyan befolyásolja az enzim-szubsztrát kölcsönhatásokat. Eredményeinket a kísérletes specificitási vizsgálatok eredményeinek értelmezéséhez és az aminosav-preferenciákat meghatározó szerkezeti sajátosságok azonosításához használtuk fel.

Röntgenkristallográfiával határoztuk meg a VEEV nsP2pro szerkezetét. Az aktív helyen nem (de a felszínen két pozícióban is) módosított enzim szerkezetében az N-terminális aktív hely irányába fordult konformerét észleltük, amely jelentős hasonlóságot mutatott a korábban az N475A aktív hely mutáns enzim esetében leírt, ún. öninaktivált formával. Az öninaktivált konformációs állapot kialakulásának szerkezeti hátterét molekuladinamikai szimulációkkal vizsgáltam a munkánk során meghatározott, valamint korábban publikált szerkezeti koordináták alapján. Vizsgáltam az N-terminális hidrogénhid-interakciós hálózatát és a dinamikai szempontok alapján fontos aminosavak távolságának változását is. Továbbá, összehasonlítottam az aktív helyen kialakuló kölcsönhatásokat az enzim N-terminális régiója (öninaktivált konformer) vagy oligopeptid szubsztrát kötődése esetében, meghatározva a kölcsönhatási hálózatok legfontosabb hasonlóságait és különbségeit. A szimulációs eredmények felfedték a vad-típusú Asn475 aminosav esetében is megjelenő, az öninaktivált forma kialakulásért felelős kölcsönhatásokat.

Eredményeink hozzájárulnak a VEEV nsP2Pro specificitását valamint stabilitását meghatározó szerkezeti követelmények jobb megértéséhez és potenciálisan felhasználhatóak lehetnek más homológ virális proteázok vizsgálatában, valamint a proteáz gátolni képes molekulák tervezésekor.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Mótyán János Andrásnak** a kutatómunkámhoz és doktori dolgozatom elkészüléséhez nyújtott rengeteg segítségért, továbbá a számos pályázati anyagom, előadásom elkészüléséhez nyújtott önzetlen segítségért, ami hatalmas mértékben járult hozzá szakmai fejlődésemhez.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Tózsér József** intézetvezető professzor úrnak, mind a szakmai segítségért, mind a lehetőségért, hogy a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratórium kutatócsoporthoz csatlakozva kutatómunkát folytathassak, és számos kutatási projektben, konferencián részt vehessek.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Bozóki Beátának** a doktori munkám elkészüléséhez nélkülözhetetlen szubsztrát-specifitást vizsgáló kísérletes munkák elvégzéséért.

Köszönettel tartozom **Dr. David S. Waugh** professzor úrnak, továbbá **Dr. George T. Lontos**-nak, **Dr. Danielle Needle**-nek és **Dr. Alexander Wlodawer**-nek, a VEEV nsP2pro kristályszerkezetének meghatározásáért, amely nélkül e doktori dolgozat nem születhetett volna meg.

Köszönetet mondanék a Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratórium munkatársainak, **Dr. Mohamed Mahdinak**, **Dr. Szabó Andrásnak**, **Dr. Golda Máriának** és **Irene Wanjiru Kiarie**-nek a közös munkáért és a lehetőségért, hogy további érdekesítő projekteken is részt vehettem. Köszönettel gondolok a munkacsoport további tagjaira, megköszöném a segítséget **Miltner Noéminek**, **Ambrus Vikornak**, továbbá **Nagyné Veres Ágotának** és **Janics-Pető Szilviának**. Kiemelt hálával tartozom **Kunkli Balázs Tibornak** a szakmai segítségért, a baráti beszélgetésekért és közös pályázatunk sikeréért.

Köszönettel tartozom **Dr. Shina Caroline Lynn Kamerlin** professzor asszonynak, mind az EBSA ösztöndíjas lehetőségért, mind a számításhoz kémia területén nyújtott rengeteg segítségért, tanácsért.

Szeretnék köszönetet nyújtani tanulmányaim során korábbi mentoraimnak, **Dr. Mándi Attilának**, aki megismertetett a számításhoz kémia alapjaival. Köszönetet mondanék **Dr. Fuxreiter Mónika** professzor asszonynak a szakmai segítségért. Hálával szeretnék megemlékezni **Dr. Komáromi Istvánról**[†], aki megismertetett a fehérjemodellezés számos módszerével.

Szeretném megköszönni **Dr. Fésüs László** professzor úrnak, **Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dórának** és **Dr. Fehér Krisztinának** a komplex vizsgán nyújtott szakmai tanácsokat, ami jelentős mértékben járult hozzá a doktori dolgozat színvonalának emeléséhez.

Köszönet szeretnék mondani **Dr. Fekete Attilának** a számításhoz kapcsolódó kémia területén nyújtott tanácsokért, és a szuperszámítógépek használatában nyújtott segítségéért, türelméért. Szeretném megköszönni a számos szakmai tanácsot **Dr. Miskei Mártonnak**. Köszönettel tartozom **Dr. Hajdu Péter Bélának** a fizika tudományával kapcsolatos számos tanácsáért. Köszönettel tartozom **Dr. Kurtán Tibor** professzor úrnak, aki egyetemi tanulmányaim alatt segítette munkám. Köszönet illeti **Tornyai Ilonát**, a bioinformatikai módszerekkel kapcsolatos tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Tüü-Szabó Boldizsárnak**, **Duró Norbertnek** és **Kertiné Dr. Ferenczi Renátának** a korábbi kutatómunkám során nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom **Tölly Lajosnak** a számítástechnikai segítségért.

Köszönettel tartozom **Oláh Zsuzsannának**, **Szabó Orsolyának**, **Nagy Anettnek** és **Vida Ildikónak** az adminisztratív feladatokkal kapcsolatos segítségért.

Köszönetet mondok családom tagjainak is. Különösen nagy hálával tartozom **édesanyámnak** a tanulmányaim során nyújtott támogatásért, türelméért. Szeretném megköszönni a rengeteg önzetlen segítséget és támogatást **nagynénémnek**. Őszinte hálával gondolok **nővéremre** és **bátyámra**.

Őszinte hálával gondolok **édesapámra**, aki mindig támogatott tanulmányaimban, és bátorított a felmerülő nehézségekkel szemben. Emlékét mindig őrizni fogom.

A doktori dolgozatban tárgyalt munkák a felsorolt pályázatok támogatásával készültek:

Adatintenzív és Nyitott Tudomány Program ösztöndíj (Hoffka Gyula részére), Tématerületi Kiválósági Program (TKP2021-EGA-20), MTA Post-covid jelenségek kutatására irányuló pályázati program (POST-COVID₂₀₂₁₋₁₆), „Idea to Life” Tudományos Ötletfejlesztési Program (EFOP-3.6.1-16-2016-00022) és EBSA Bursary (Hoffka Gyula részére). A Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-23-5-DE-486 kódszámú (Mótyán János András részére) és ÚNKP-23-3-II-DE-456 kódszámú (Hoffka Gyula részére) Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült, továbbá Mótyán János András munkáját az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatja (BO/00110/23/5).

Köszönetet mondok a KIFÜ által biztosított számítási időért.

7. Függelék

Konferencia előadások

1. **Hoffka Gyula**, Komáromi István: A mikrobiális transzglutamináz reakció vizsgálata hibrid QM/MM (ONIOM) módszerekkel.
KeMoMo-QSAR 2017 szimpózium, Szeged, 2017.06.01-02.
2. **Gyula Hoffka**, Mónika Fuxreiter: Multiscale simulations on enzymatic catalysis.
11th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2018.01.04-05.
3. **Hoffka Gyula**, Mándi Attila, Herczeg Mihály, Borbás Anikó, Fuxreiter Mónika, Komáromi István: Hidrogén-szulfid addíció in silico vizsgálata.
KeMoMo-QSAR 2018 szimpózium, Szeged, 2018.05.24-25.
4. **Gyula Hoffka**, Mónika Fuxreiter: Conformational heterogeneity propels enzyme evolution.
12th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2019.01.10-11.
5. **Hoffka Gyula**, Fuxreiter Mónika: A konformációs heterogenitás szerepe az enzimek evolúciójában.
KeMoMo-QSAR 2019 szimpózium, Szeged, 2019.06.06-07.
6. Mónika Fuxreiter, **Gyula Hoffka**, Letif Mones: The role of conformational heterogeneity in the evolution of enzymes.
Az MBFT XXVII. Kongresszusa, Debrecen, 2019.08.26-29.
7. **Gyula Hoffka**, Mónika Fuxreiter: Role of conformational heterogeneity in enzymatic catalysis.
13th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2020.01.09-10.
8. **Gyula Hoffka**, Mónika Fuxreiter: Multiscale simulations on the role of conformational heterogeneity.
1st Molecular, Cell and Immune Biology Summer Symposium, Debrecen, 2021.05.14.
9. **Gyula Hoffka**, Mónika Fuxreiter: Theoretical studies on the underlying mechanism of enzyme evolution.
15th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2022.01.09-10.
10. **Gyula Hoffka**, János András Mótyán, József Tózsér: Computational studies on the self-inactivated conformation of the wild-type Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) protease.
2nd Molecular, Cell and Immune Biology Summer Symposium, Debrecen, 2022.06.03.

11. **Hoffka Gyula**, George T. Lountos, Tózsér József, Mótyán János András: Venezuelai ló-láz encephalitis vírus proteáz öninaktivált konformerének vizsgálata molekuladinamikai szimulációkkal.
Bioinformatika 2022 konferencia, Budapest, 2022.11.11.
12. **Gyula Hoffka**, Mohamed Mahdi, József Tózsér, János András Mótyán: Structural analysis of the binding of nirmatrelvir to the SARS-CoV-2 main protease.
Bioinformatics and Data Science in Genomic Studies, Debrecen, 2022.11.24-25.
13. **Gyula Hoffka**, Mohamed Mahdi, József Tózsér, János András Mótyán: Combined computational study of the binding of nirmatrelvir to SARS-CoV-2 main protease: Insight into resistance mechanism.
EBSA-2023 Congress, Stockholm, 2023.07.21.-08.04.
14. **Gyula Hoffka**, Mohamed Mahdi, József Tózsér, János András Mótyán: Multiscale computational study on the binding of nirmatrelvir to SARS-CoV-2 main protease: possible pathways to resistance.
MBFT XXIX. Kongresszus, Budapest, 2023.08.28-21.
15. **Gyula Hoffka**, Shina Caroline Lynn Kamerlin: The role of conformational dynamics in the evolution of designed Kemp eliminase.
FEBS 2023 Advanced Course: Computational Approaches to Understanding and Engineering Enzyme Catalysis, Zágráb, 2023.09.25-29.
16. **Gyula Hoffka**, Mohamed Mahdi, József Tózsér, János András Mótyán: Multiscale computational study on the protonation states of the SARS-CoV-2 main protease catalytic dyad.
17th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2024.01.15-16.
17. Irene Kairie, Tamás R. Linkner, Zsófia I. Szojka, **Gyula Hoffka**, Balázs T. Kunkli, József Tózsér, Mohamed Mahdi. Efficacy of integrase strand transfer inhibitors & the capsid inhibitor lenacapavir against HIV-2 and the cellular effects of HIV-2's viral protein X.
17th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2024.01.15-16.

Poszter prezentációk

1. **Gyula Hoffka**, George T. Lountos, József Tózsér, János András Mótyán:
Crystallographic and molecular dynamics simulations shed light on the self-inactivated conformation of the Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) protease
MBFT XXIX. Kongresszus, Budapest, 2023.08.28-21.



Nyilvántartási szám: DEENK/302/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hoffka Gyula
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10080018

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hoffka, G.**, Lontos, G. T., Needle, D., Wlodawer, A., Waugh, D. S., Tózsér, J., Mótyán, J. A.:
Self-inhibited state of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) nsP2 cysteine protease:
a crystallographic and molecular dynamics analysis.
J. Mol. Biol. 435 (6), 1-20, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168012>
IF: 5.6 (2022)
2. Bozóki, B., Mótyán, J. A., **Hoffka, G.**, Waugh, D. S., Tózsér, J.: Specificity Studies of the
Venezuelan Equine Encephalitis Virus Non-Structural Protein 2 Protease Using Recombinant
Fluorescent Substrates.
Int. J. Mol. Sci. 21 (20), 1-26, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21207686>
IF: 5.924

További közlemények

3. Golda, M., **Hoffka, G.**, Cherry, S., Tropea, J. E., Lontos, G. T., Waugh, D. S., Wlodawer, A.,
Tózsér, J., Mótyán, J. A.: P1' specificity of the S219V/R203G mutant tobacco etch virus
protease.
Proteins. [Epub ahead of print], 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/prot.26693>
IF: 2.9 (2022)
4. Mótyán, J. A., Mahdi, M., **Hoffka, G.**, Tózsér, J.: Potential Resistance of SARS-CoV-2 Main
Protease (Mpro) against Protease Inhibitors: lessons Learned from HIV-1 Protease.
Int. J. Mol. Sci. 23 (7), 1-20, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23073507>
IF: 5.6





5. Ambrus, V. A., **Hoffka, G.**, Fuxreiter, M.: Asymmetric dynamic coupling promotes alternative evolutionary pathways in an enzyme dimer.
Sci. Rep. 10 (1), 1-9, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-75772-5>
IF: 4.379
6. Tüü-Szabó, B., **Hoffka, G.**, Duró, N., Fuxreiter, M.: Altered dynamics may drift pathological fibrillization in membraneless organelles.
Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom. 1867 (10), 988-998, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.04.005>
IF: 2.371
7. Ferenczi, R., Illyés, T. Z., Király, S. B., **Hoffka, G.**, Szilágyi, L., Mándi, A., Antus, S., Kurtán, T.: Evaluation of Different Synthetic Routes to (2R,3R)-3-Hydroxymethyl-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-Benzodioxane-6-Carbaldehyde.
Curr. Org. Chem. 23 (26), 2960-2968, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1385272823666191212113407>
IF: 1.933

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,707

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,524**

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, 2024.05.24.

