

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Balogh Gábor

***In silico* vizsgálatok a hemosztázis és kapcsolódó
folyamatok területén: a XIII-as faktor A alegység
reakciómechanizmusának és az antitrombin
pentaszacharid-kötésének vizsgálata**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***In silico* vizsgálatok a hemosztázis és kapcsolódó
folyamatok területén: a XIII-as faktor A alegység
reakciómechanizmusának és az antitrombin
pentaszacharid-kötésének vizsgálata**

Dr. Balogh Gábor

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna, Dr. Komáromi István[†]



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2020**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 <i>A FXIII katalitikus mechanizmusának vizsgálata</i>	7
2.2 <i>Az antitrombin pentaszacharid-kötése</i>	9
3. Módszerek elméleti alapjai	13
3.1 <i>Kvantumkémiái módszerek</i>	13
3.2 <i>Sűrűségfukcionál-elmélet</i>	13
3.3 <i>Félempirikus módszerek</i>	14
3.4 <i>Hibrid QM/MM technikák</i>	15
3.5 <i>Molekulamechanikai erőterek</i>	16
3.6 <i>Molekuladinamikai szimulációk</i>	17
3.7 <i>„Javított” mintavételezést lehetővé tévő MD módszerek</i>	18
4. Célkitűzések	20
5. Módszerek	21
5.1 <i>A FXIII-A transzglutamináz reakció első lépésének in silico vizsgálata</i>	21
5.1.1 <i>FXIII – Alfa-2-antiplazmin peptid komplex szerkezete</i>	21
5.1.2 <i>A QM/MM szimulációknál alkalmazott modell rendszerek</i>	22
5.1.3 <i>ONIOM-típusú számítások</i>	23
5.1.4 <i>QM/MM MD szimulációk</i>	24
5.2 <i>Antitrombin pentaszacharid-kötésii mechanizmusának vizsgálata</i>	25
5.2.1 <i>Modell rendszerek</i>	25
5.2.2 <i>Molekuladinamikai szimulációk</i>	27
5.2.3 <i>A szimulációk eredményeinek kiértékelése</i>	28
6. Eredmények és diszkusszió	29
6.1 <i>A FXIII katalitikus mechanizmusának vizsgálata</i>	29
6.1.1 <i>A FXIII és az alfa2-antiplazmin peptid komplexének szerkezete</i>	29
6.1.2 <i>A Cys314 és a His373 aminosavak protonáltsága ONIOM-típusú számítások alapján</i>	30
6.1.3 <i>Az acilezési lépés mechanizmusa ONIOM-típusú számítások alapján</i>	32
6.1.4 <i>QM/MM MD szimulációk</i>	40
6.2 <i>Pentaszacharid-kötődés vizsgálata az antitrombinhoz MD szimulációk segítségével</i>	42
6.2.1 <i>A pentaszacharid kötési mechanizmusa az antitrombinhoz</i>	42

<i>6.2.2 Az antitrombin konformációváltásai</i>	46
<i>6.2.3 Allosztérikus folyamatok</i>	52
7. Konklúzió	55
8. A jelölt saját eredményei, új megállapításai	57
9. Összefoglaló	59
10. Summary	60
11. Irodalomjegyzék	61
12. Tárgyszavak	68
13. Köszönetnyilvánítás	69
14. Függelék	70
<i>14.1 Kiegészítő ábrák</i>	70
<i>14.2 Publikációs lista</i>	91
<i>14.3 Közlemények különlenyomatai</i>	93

1. Bevezetés

A hemostázis kettős élettani funkcióval rendelkezik: egyfelől biztosítja a vér folyékony állapotban maradását, másrészt nélkülözhetetlen szerepet játszik a további vérvesztés megakadályozásában az érþála sérülése esetén. A hemostázis három részfolyamatból áll, ezek az érþali sérülés helyén fellépő vazokonstrikció, a trombociták aktivációja és aggregációja, valamint a véralvadási folyamat, amely a (keresztkötött) fibrinalvadék képződését eredményezi. Több véralvadási faktor aktív formája (trombin, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa) is szerin proteáz enzimaktivitással rendelkezik. A véralvadási kaszkád lényege, hogy az ilyen enzimaktivitással rendelkező faktorok proteolízis révén aktiválják a soron következõ faktort, amely pedig az azt követõ faktor aktiválására képes, és így tovább (1).

A véralvadás XIII-as faktora a folyamat egyik utolsó lépésében aktiválódik. A fehérje aktív A alegysége (FXIII-A) transzglutamináz enzimaktivitással rendelkezik, és izopeptid keresztkötések kialakítására képes, legfontosabb funkciója a fibrinszálak kovalens keresztkötése, de további extra- és intracelluláris funkciókkal is rendelkezik (2). Stieler és munkatársai felvetették, hogy a FXIII A alegysége ígértes célpont lehet új véralvadásgátló gyógyszerek fejlesztésére (3).

A gyógyszerfejlesztés szempontjából igen fontos a katalitikus mechanizmus megértése, azonban a FXIII A alegysége esetén viszonylag kevés adat áll errõl rendelkezésre, szemben a transzglutamináz 2-vel. Az enzimkinetikai méréseken túl a mechanizmus tanulmányozása *in silico* módszerekkel is lehetséges. Az enzimreakciók mechanizmusának *in silico* vizsgálatára jelenleg a „hibrid” kvantumkémiai/molekulamechanikai (QM/MM) technikák számítanak a legelterjedtebb módszertannak. Az ilyen protokollok az enzimreakció szempontjából legfontosabb atomokra, atomcsoportokra, aminosav-oldalláncokra a reakciómechanizmusok pontos leírását lehetővé tévõ, azonban igen számításigényes kvantumkémiai módszereket alkalmaznak. A vizsgált rendszer többi részét azonban ennél sokkal hatékonyabb, elsõsorban molekulamechanikai módszerekkel veszik figyelembe (4).

Abban, hogy a véralvadási folyamat az érþalsérülés helyére korlátozódjon, nélkülözhetetlen szerepet játszanak a véralvadási kaszkád szabályozó fehérjéi. A legfontosabb ilyen fehérjék az antitrombin, az aktivált protein C és a szöveti faktor útvonal inhibitor (TFPI), de a heparin kofaktor II és a protein Z-függõ proteáz inhibitor is szerepet játszik a folyamatban (1, 5). Az antitrombin (AT) szerepét a hemostázis szabályozásában az is mutatja, hogy az öröklött vagy

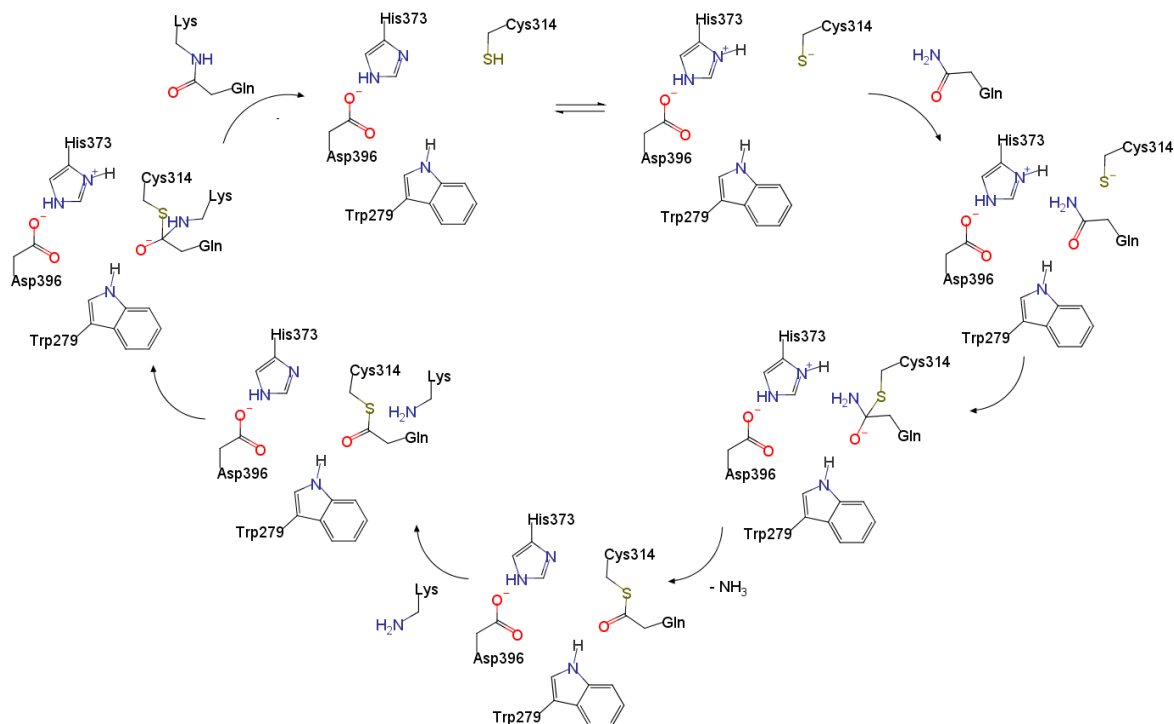
szerzett hiánya trombotikus kórképekre hajlamosít (1, 5). Az AT azonban emellett az egyik fontos véralvadásgátló gyógyszer csoport, a heparin és heparinszármazékok farmakológiai célpontja is (6).

A heparinoidok hatására lejátszódó konformációs aktiválás mechanizmusának feltárása értékes információkat nyújthat új AT-függő véralvadásgátló gyógyszerek fejlesztéséhez. Ezen túl a heparin kötődésmechanizmusának megismerése azért is fontos, mert az AT több, ismert patogén variánsa is a heparin kötésének zavarát okozza (1, 7, 8). A munkánk során egy nagy affinitású pentaszacharid-származék kötődését *in silico* vizsgáltuk, javított mintavételezésű molekuladinamikai szimulációk segítségével. Az ilyen szimulációk a kötődési mechanizmus, valamint a konformációváltozások olyan részleteinek vizsgálatára is lehetőséget nyújtanak, amire a fehérjéről „statikus” képet adó röntgenkristallográfiás vizsgálatok csak korlátozottan alkalmasak. Az AT azonban nemcsak a véralvadás szabályozásának szempontjából érdekes, hanem modell rendszerként is szolgálhat az allosztérikus aktiválás jelenségének tanulmányozására.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A FXIII katalitikus mechanizmusának vizsgálata

A XIII-as véralvadási faktor A alegysége a transzglutamináz enzimek családjába tartozik. A humán transzglutaminázok közül nyolc fehérje rendelkezik enzimaktivitással: a transzglutamináz 1-7 és a XIII-as véralvadási faktor A alegysége (9, 10). Szekvencia homológia alapján ide tartozik továbbá a humán eritrocita membrán band 4.2 protein is, amely azonban katalitikusan inaktív. A transzglutamináz enzimek kovalens, izopeptid keresztkötéseket alakítanak ki a szubsztrátjaikban található glutamin, illetve lizin aminosavak között (10). A katalitikusan aktív humán transzglutaminázok egy Cys, His valamint Asn oldalláncokból álló katalitikus triádot tartalmaznak, mely a cisztein proteázokkal mutat hasonlóságot. Iismaa és munkatársai egy kétlépéses mechanizmust javasoltak ezekre az enzimekre, amely egy „megfordított” cisztein proteáz reakcióval tekinthető analógnak (11).



1 ábra: A humán transzglutaminázok feltételezett katalitikus mechanizmusa, Iismaa és munkatársai után. Az eredetileg a transzglutamináz 2-re vonatkozó ábrán az oldalláncok számozását a FXIII-A-ra adaptáltuk.

A humán transzglutaminázok amin donor szubsztrát (fehérjék vagy peptidek keresztkötése esetén Lys oldallánc) hiányában a Gln amidcsoportjának a hidolízises reakcióját katalizálják

egy vízmolekula közreműködésével, ez viszont kinetikailag lényegesen lassabb reakció (10). A transzglutamináz 2 esetén leírtak ezen kívül GTP-áz és protein diszulfid izomeráz aktivitást is (9). A XIII-as faktor azonban valószínűleg nem képes guanin nukleotidok kötésére (12, 13).

A XIII-as véralvadási faktor a vérplazmában A_2B_2 heterotetramer zimogén formájában található, a két A alegységhez két katalitikus aktivitással nem rendelkező B alegység kapcsolódik. A XIII-as faktornak létezik intracelluláris formája is, amely két A alegységből áll. Az A alegység N-terminális végen elhelyezkedő aktivációs peptidből, valamint négy doménből áll: β -szendvics, katalitikus (core) domén, valamint két β -hordó domén. Röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján az inaktív A alegység dimer szerkezetű, a katalitikus centrumot egyrészt az első β -hordó domén Tyr541 oldallánca, másrészt a másik A alegység aktivációs peptidje, elsősorban az Arg12 aminosav teszi hozzáférhetetlenné.

A vérplazmában az A alegység aktivációjához az aktivációs peptidok trombin általi lehasítása, kalciumionok kötődése, valamint a B alegységek disszociációja szükséges (2, 14). A fiziológiásnál lényegesen magasabb kalcium-koncentrációk mellett azonban a FXIII nem-proteolitikusan, az aktivációs peptidok hasítása nélkül is aktiválódhat (2, 15). Az FXIII a koagulációs kaskád késői szakaszában aktiválódik. Fő funkciója a fibrin alfa és gamma láncok között kovalens keresztkötések kialakítása, ezen túl azonban számos extra-és intracelluláris (nem-hemosztatikus) funkciót lát el. Ezen további funkciókkal kapcsolatban a témában elérhető összefoglaló közleményekre hivatkozunk (2, 14).

2013-ban Stieler és munkatársai a FXIII A alegység egy nem-proteolitikusan aktivált, monomer formájának röntgendiffrakciós szerkezetét publikálták, amelyhez egy irreverzibilis inhibitor (ZED-1301) kötődött (3). Ez a szerkezet a β -hordó domének nagymértékű elmozdulását mutatja a natív formához képest. A struktúrában három betöltött kalcium-kötőhelyet találunk. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy ^{43}Ca NMR mérések (16), valamint molekuladinamikai szimulációk (17) alapján további „gyenge” kalcium-kötőhelyek létezésére következtethetünk a FXIII A alegységben, amelyek feltehetően a nem-proteolitikus aktiválásban játszhatnak szerepet. A struktúra alapján valószínűsíthető, hogy az aktív A alegység monomer szerkezetű, ezt később analitikai ultracentrifugálás (18), valamint atomerő-mikroszkópiás kísérletek (19) révén is megerősítették.

A humán transzglutamináz családon belül a katalitikus mechanizmus részleteivel kapcsolatos kísérleti adatok leginkább a transzglutamináz 2-re állnak rendelkezésre, melyeket Keillor és

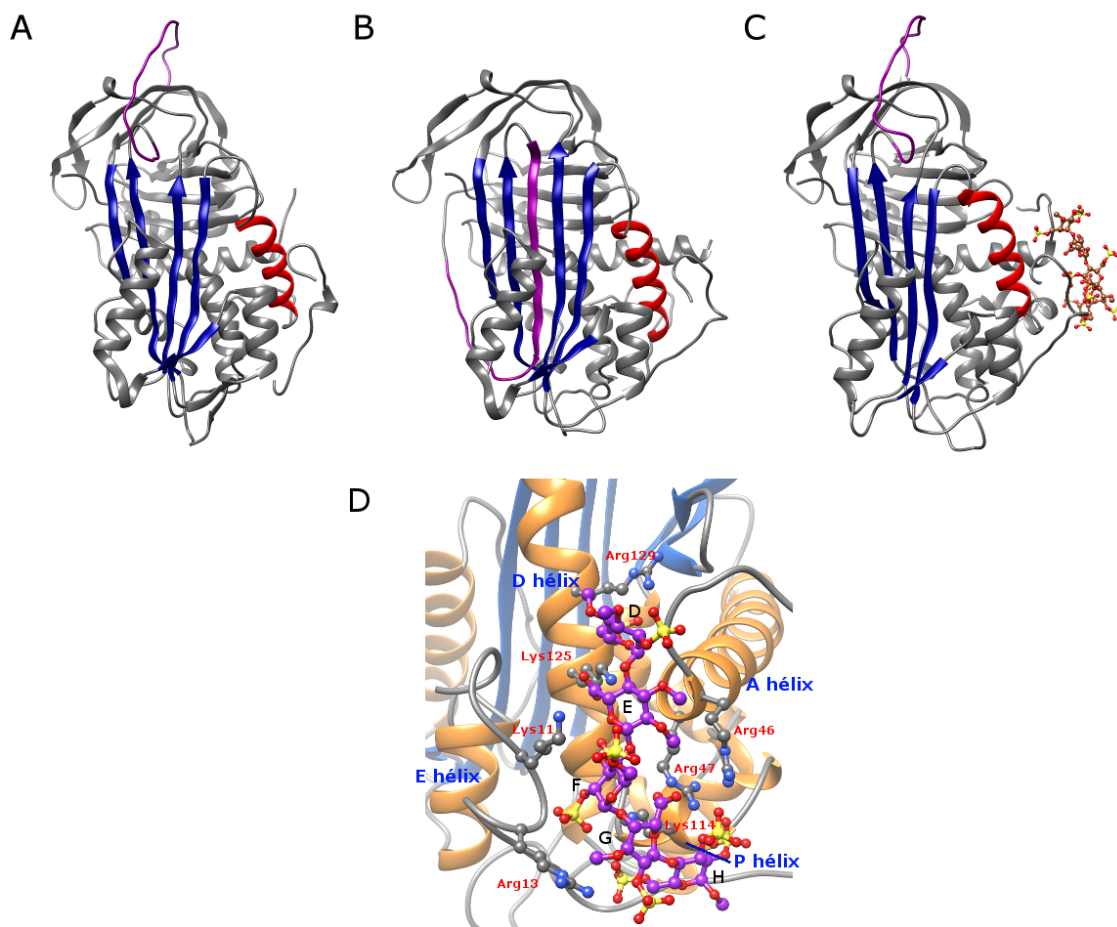
munkatársai foglaltak össze közleményükben (20). Ezzel szemben a FXIII esetén nagyon kevés ilyen adat áll rendelkezésre, az elérhető közlemények többsége különböző peptid szubsztrátok átalakításának kinetikájára fókuszál, amin donor szubsztrát jelenlétében vagy anélkül (21-24). Olyan kinetikai mérésekről azonban nincs tudomásunk, amelyek részletesebb betekintést engednének a reakciómechanizmusba.

Az enzimkinetikai mérések mellett hasznos adatokat szolgáltathatnak az enzimreakciók mechanizmusával kapcsolatban a hibrid kvantumkémia/molekulamechanikai módszereket alkalmazó számítások. Tudomásunk szerint a értekezés alapját képező egyik közlemény az első olyan munka, ahol egy humán transzglutamináz enzim katalitikus mechanizmusával kapcsolatban történtek *in silico* vizsgálatok ilyen módszerrel. Egy korábbi, QM/MM módszertant alkalmazó közleményben irreverzibilis inhibitorok kötődését vizsgálták transzglutamináz 2-höz, nem pedig valamilyen modell szubsztrát átalakításának mechanizmusát (25). Ebben a munkában a rendszereket QM/MM MD szimulációk segítségével tanulmányozták, a QM alrendszerre félempirikus módszereket (PM3, SCC-DFTB) alkalmaztak. Lényegesen több *in silico* tanulmányt publikáltak viszont a transzglutaminázokhoz hasonló katalitikus triádot tartalmazó cisztein proteázokkal kapcsolatban. Ezen fehérjecsald több tagjánál is vizsgálták a katalitikus triád aminosavainak protonáltságát, valamint a katalitikus mechanizmust, pl. papain (26-28), katepszin B és K (29, 30), vagy kaszpáz 7 (31) esetében. Ezekben a tanulmányokban energia-minimalizáción alapuló számításokat és QM/MM MD szimulációkat félempirikus kvantumkémiai módszerekkel (például PM3, SCC-DFTB) alkalmaztak. Tanszékünk egy korábbi munkájában a papain katalitikus mechanizmusát vizsgáltuk, ONIOM-típusú hibrid QM/MM számításokkal (32).

2.2 Az antitrombin pentaszacharid-kötése

Az AT egy 58 kDa molekulatömegű plazma glikoprotein, a szerin proteáz inhibitor (szerpin) szuperfamilia tagja (5, 33). Ennek a szuperfamilia tagjai állatokban, növényekben, baktériumokban és vírusokban is megtalálhatók (5, 34). A szuperfamilia a nevét onnan kapta, hogy számos tagjuk szerin proteáz inhibitor aktivitással rendelkezik, de cisztein proteáz inhibitorok és eltérő, például hormontranszporter funkcióval rendelkező fehérjék is ide tartoznak (34, 35). A humán genomban 36 szerpint kódoló gén található (36). Bár a szerpinek között a szekvencia homológia mértéke sok esetben alacsony, a család gyakorlatilag összes tagja nagy mértékben hasonló harmadlagos szerkezettel rendelkezik, amely 8 vagy 9 α -

hélixből és 3 β -redőből áll (34, 37). A proteáz inhibitor funkcióval rendelkező szerpinek natív formái tartalmaznak egy nagyrészt a vizes közeg felé mutató hurkot, amely a szerpin-proteáz reakció reakciócentrumát tartalmazza (*reactive center loop*, RCL) (35). A szerpinek inhibíciós mechanizmusában központi szerepet játszik az RCL-ban található P1-P1' peptidkötés részleges elhasítása. A proteáz reakció azonban az észter (vagy tioészter) intermediernél megáll, az intermedier jelentős konformációváltozások révén stabilizálódik, ezek közül a legfontosabb az RCL hasítási helytől N-terminálisan elhelyezkedő részének beékelődése az „A” β -redőbe (34, 35, 37). A proteáz harmadlagos szerkezete torzul, ez is akadályozza a proteolitikus reakció további lépéseinek végbemenetelét. Ezt a mechanizmust az teszi lehetővé, hogy a szerpinek natív konformációja valójában metastabil, a teljes RCL vagy annak egy részének a β -redőbe ékelődése jelentős szabadentalpia-csökkenéssel jár. Ez történik szerpin-proteáz komplex képződése, az RCL hasítása (proteáz inhibíció nélkül) vagy inaktív, ún. latens állapotba (lásd 2. ábra) való átmenet esetén (34, 37).



2. ábra: A. A nem-aktivált, „natív” antitrombin röntgendiffrakciós szerkezete (PDB: 1E04 (38)). A reakciócentrumot tartalmazó hurkot (RCL) lila, az „A” β -redőt kék, a heparin-

kötésben és a konformációs aktiválásban nélkülözhetetlen D-hélixet piros színnel jelöltük. B. A latens antitrombin szerkezete (PDB: 1E04 (38)), az „A” β -redőbe ékelődött RCL hurokkal. C. Az aktivált antitrombin szerkezete (PDB: 1E03 (38)), kötött pentaszachariddal. Az ábrák elkészítéséhez az UCSF Chimera szoftvert alkalmaztuk. (39). D. A pentaszacharid ligandum kötődési módja az antitrombinhoz,

Az AT a véralvadási kaszkád egyik legfontosabb szabályozó fehérjéje, ezt a funkcióját szerin proteáz aktivitással rendelkező véralvadási faktorok gátlása révén látja el (5, 33). A fő célpontjai a trombin, a Xa és az IXa véralvadási faktorok, ezen túl a XI-es faktor és egyéb szerin proteáz alvadási faktorok gátlására is képes (5). A vérplazmában keringő natív AT kevésbé hatékony inhibitora a véralvadási faktoroknak, azonban heparin és heparin analógok jelenlétében a gátlás reakciósebessége igen nagy mértékben növekszik (6). Az aktivitás növekedésére az irodalomban két eltérő mechanizmust javasoltak. Egyfelől a pentaszacharid (a heparin molekulák legkisebb, hatással bíró egysége) kötődése hatására összetett konformációváltozások mennek végbe az AT molekulában. Ez a „konformációs” aktiválási mechanizmus leginkább a IXa és a Xa véralvadási faktorok gátlásánál játszik szerepet, trombin esetén kismértékű a hatása. Másrészt hosszabb heparin láncok az AT és a véralvadási faktor közötti „hidak” kialakítása révén is jelentősen fokozhatják az gátlás hatékonyságát. Ez utóbbi mechanizmus leginkább a trombin esetén jelentős. Az AT-nak a vérplazmában két izoformája van, az α -AT (a teljes AT mennyiség kb. 90%-a) négy aszparagin oldalláncon glikozilált (Asn-96, 135, 155 és 192), míg a β -forma esetén (10%) az Asn-135 aminosavhoz nem kapcsolódik glikán (33, 40). A β -forma heparin affinitása jelentősen magasabb az alfa formánál, és minden bizonnyal hatékonyabb inhibitor annál (33).

Az AT nélkülözhetetlen szerepet játszik a véralvadási kaszkád szabályozásában, ezt az is mutatja hogy az öröklött és a szerzett deficiencia trombotikus kórképekre hajlamosít és hogy a homozigóta patogén mutációk elenyésző kivétellel letálisak. Az öröklött deficiencián belül megkülönböztetünk I-es és II-es típust az alapján, hogy mennyiségi vagy minőségi eltérést okoznak. A II-es típuson belül a variánsokat három altípusba sorolják, léteznek a heparinkötőhelyet (II.HBS) illetve a reaktív centrumot (II.RS) érintő valamint a pleiotróp hatású (II.PE) variánsok (7, 8).

Az AT szerkezet-funkció összefüggéseinek megértése céljából számos röntgenkristallográfias vizsgálatot végeztek. A nem-aktivált és az aktivált AT

röntgenkristallográfiás szerkezetén kívül (38, 41) elérhető olyan struktúra is, amely az AT egy „köztes” aktiváltságú állapotának felel meg. Ebben a szerkezetben az aktivációhoz vezető konformáció-változások többsége már lejátszódott, kivéve az ún. „hinge” régió (az RCL N-terminális szakasza) kimozdulását az „A” β -redőbe zárt pozíciójából, valamint a D hélix C-terminális részét érintő konformációváltozásokat (42). Az AT korábbi röntgenkristallográfiás szerkezetei egy natív és egy latens molekula dimerjét mutatták. Ezekben a struktúrákban a natív molekula RCL-je lényeges szerepet játszik a latens formához való kötődésben, és ez a hurok konformációját is jelentősen befolyásolja. Johnson és munkatársai egy olyan AT-variáns szerkezetét határozták meg röntgenkristallográfiás úton, amelyben a latens formába való átmenetet egy mesterséges diszulfid híd segítségével akadályozták meg (43). Ez a struktúra az AT RCL-jének egy újfajta konformációját mutatta.

Az AT pentaszacharid-kötődés hatására lejátszódó konformációváltozásaira az irodalomban egy háromlépcsős modellt javasoltak (6, 44, 45), a modell elsősorban röntgendiffrakciós szerkezeteken (38, 41, 42) és kinetikai méréseken alapul (44, 45). Az egyes lépésekben a pentaszacharid kötődése fokozatosan egyre erősebbé válik. Az első lépésben a pentaszacharid kötődése még relatíve gyenge, azonban a heparin kötőhelye közelében bekövetkező konformációváltozások révén a kötődés erősebbé válik (6). A második lépésben lejátszódó folyamatok elsősorban szintén a heparin kötőhelyet, valamint a fehérje hidrofób magját érintik (6, 45, 46). Az AT pentaszacharid-affinitása a harmadik lépésben válik maximálissá, a D-hélix meghosszabbodása, valamint az RCL A- β -redőbe beékelődött N-terminális részének („hinge” régió) kimozdulása révén (6).

3. Módszerek elméleti alapjai

3.1 Kvantumkémiai módszerek

Tulajdonképpen minden kvantumkémiai számítás alapját képezi a Born-Oppenheimer közelítés, amely azt feltételezi, hogy az atommagok és az elektronok mozgása szétválasztható. Alapja az atommagok és az elektronok tömege közötti több nagyságrendi különbség. Tehát lehetővé válik az elektronenergia meghatározása úgy, hogy az atommagokat rögzítettnek tekintjük (47).

A Hartree-Fock elmélet a hullámfüggvény és az energia közelítő meghatározását teszi lehetővé. A sokelektronos hullámfüggvényt Slater-determináns alakjában adjuk meg, amelyet N egyelektronos hullámfüggvényből építünk fel, ahol N az elektronok száma a molekulában (a Slater-determináns alak biztosítja az antiszimmetriát két elektron felcserélésére nézve). A Hartree-Fock egyenletek megoldása iteratív módon történik. Mivel a módszer „átlagos” taszítási potenciált alkalmaz, nem képes figyelembe venni az elektronok mozgásai közti korrelációkat (elektronkorreláció) (47).

Elterjedt módszer az elektronkorreláció közelítő figyelembe vételére a Møller-Plesset féle perturbációelmélet. A gerjesztett állapotok figyelembe vétele a Rayleigh–Schrödinger perturbációelméleten alapuló perturbációszámítás segítségével történik, melynek a kiindulópontja a Hartree-Fock módszerrel számított hullámfüggvény. Ha az alkalmazott sorbafejtésben legfeljebb a másod, harmad és negyedrendű tagokat vesszük figyelembe, kapjuk az MP2, MP3, MP4, stb. módszereket (47). Ezek közül az MP2 módszer a legelterjedtebb. Lehetővé teszi az elektronkorreláció nagy részének figyelembe vételét, azonban csak akkor alkalmazható, ha az alapállapotú elektronkonfiguráció a domináns (47).

Elektronkorreláció figyelembe vételére alkalmas módszerek közé sorolhatóak a sűrűségfunkcionál-elméleten alapuló technikák is, ezekről a következő alfejezetben esik szó részletesen.

3.2 Sűrűségfunkcionál-elmélet

A sűrűségfunkcionál-elmélet (*density functional theory*, DFT) elméleti alapjait Hohenberg és Kohn fektette le (Hohenberg-Kohn tételek). Ez alapján Kohn és Sham fejlesztett ki olyan módszert, amely a probléma gyakorlatban is használható hatékony közelítő megoldását tette

lehetővé (48). Egymással nem kölcsönható elektronokból álló rendszert feltételez, amelyekre ugyanaz az elektrosztatikus potenciál hat és ahol az elektronsűrűség azonos a „valódi” rendszerével (47). A funkcionál három tagból áll (49):

$$F(\rho(r)) = E_{ke}(\rho(r)) + E_H(\rho(r)) + E_{XC}(\rho(r))$$

Az első tag a kinetikus energia funkcionálja a feltételezett nem-kölcsönható elektronokból álló rendszerre, a második a Coulomb-energiát adja az elektron-elektron kölcsönhatásokra. A harmadik tag, a kicserélődési és a korrelációs funkcionál egzakt matematikai alakja azonban nem ismert, különböző közelítő módszereket fejlesztettek ki.

A hibrid funkcionálok közé tartozó módszer a B3LYP. A B3LYP a Becke által javasolt, három paraméteret tartalmazó módszert kombinálja az általánosított gradiens közelítésen (generalized gradient approximation, GGA) alapuló Lee-Yang-Parr korrelációs funkcionállal (47). Legfontosabb hiányossága a diszperziós kölcsönhatások figyelembe vétele, az újabban kifejlesztett módszereknél fontos szempont volt ennek a „korrigálása”. Az ω B97X-D funkcionál empirikus atom-atom diszperziós korrekciókat tartalmaz ezen kölcsönhatások pontosabb leírására (50). Ezzel szemben a funkcionálok M06 családja a diszperziós kölcsönhatásokat a funkcionálban szereplő paraméterek révén veszi figyelembe (51).

3.3 Félempirikus módszerek

A félempirikus módszerek számítási igénye az „*ab initio*” kvantumkémiai módszerek és a „klasszikus” molekulamechanikai erőterek (lásd később) között helyezkedik el. Azonban kvantumkémiai, így például lehetővé teszik kötések felbomlásának és kialakulásának leírását, szemben a „klasszikus” molekulamechanikai erőterekkel. A félempirikus módszerek egyik családja a Hartree-Fock módszeren alapul, hozzá képest különféle közelítéseket és elhanyagolásokat alkalmaz (például kételektron-integrálok figyelmen kívül hagyása vagy empirikus formulákkal való közelítése). Ezek közül jelenleg a legelterjedtebbek az NDDO (neglect of diatomic differential overlap) módszerek. Ide tartozik például az AM1, a PM3 és a PM6 (47).

A DFTB módszer a rendszer sűrűségfunkcionál-elmélet szerinti energiájának sorbafejtésén alapul egy referencia elektronsűrűség környezetében (52, 53). A sorbafejtésben szereplő nullad- és elsőrendű tagokat csak a vegyértékhéjakat figyelembe vevő minimális bázis

segítségével számítja a módszer. Az SCC-DFTB (DFTB2) módszer esetén ehhez töltések redisztribúcióját leíró másodrendű tagok járulnak (53). A DFTB3 módszer további tagokat tartalmaz, mely a sor harmadrendű tagjait közelíti. (54).

A paraméterfejlesztés az SCC-DFTB és a DFTB3 módszerekhez DFT számítások alapján történik, az elektronkorreláció figyelembe vétele is a paraméterezésnél használt DFT módszeren alapul (53, 55).

3.4 Hibrid QM/MM technikák

A kémiai reakciók pontos elméleti kémiai tárgyalása kvantumkémiai módszereket igényel. A számítási igény a rendszer méretének függvényében azonban nem lineárisan növekszik. Nagyobb méretű rendszerek, például biológiai makromolekulák vizsgálata tisztán QM módszerekkel az esetek nagy részében még ma sem kivitelezhető.

A kémiai reakció szempontjából legfontosabb atomokra, atomcsoportokra megfelelő kvantumkémiai módszereket (például sűrűségfüggvény-elmélet, esetleg félempirikus módszerek) alkalmazunk, a rendszer további részét pedig lényegesen gyorsabb számítást lehetővé tévő módszerrel (leggyakrabban „klasszikus” molekulamechanikai erőterek) vehetjük figyelembe.

A „hagyományos” (vagy additív, lásd (4)) QM/MM sémák esetén a rendszer Hamilton operátorát a következőképpen definiáljuk:

$$\hat{H} = \hat{H}_{\text{QM}} + \hat{H}_{\text{MM}} + \hat{H}_{\text{QM/MM}}$$

A rendszer teljes energiáját pedig a következőképpen:

$$E = E_{\text{QM}} + E_{\text{MM}} + E_{\text{QM/MM}}$$

Ahol az E_{QM} és az E_{MM} a két alrendszer energiáját jelenti, az $E_{\text{QM/MM}}$ pedig a két rendszer közötti kölcsönhatások energiájának felel meg. A QM és az MM alrendszerek közti elektrosztatikus kölcsönhatásokat többféle séma szerint lehet figyelembe venni, ezek közül a legfontosabb a mechanikus (mechanical embedding) és az elektrosztatikus beágyazás (electrostatic embedding). Az előbbi esetben ezeket a kölcsönhatásokat ponttöltések közötti Coulomb-kölcsönhatásokként írjuk le, utóbbi esetben viszont az MM rendszer atomjainak

parciális töltései a QM rendszer Hamilton-operátorában is figyelembe vannak véve ponttöltéseként (4). A QM és az MM alrendszerek közötti kovalens kötések kezelésének talán legelterjedtebb módja a „link” (összekötő) atomok bevezetése. Ez leggyakrabban egy hidrogénatom, amely általában a „kettévágott” kovalens kötés mentén helyezkedik el és a kötés QM atomjának szabadon maradó vegyértékét telíti (4).

A hibrid technikák másik csoportját a szubsztraktív hibrid módszerek alkotják. Ezek legfontosabb képviselője az ONIOM módszer, amely a korábban kifejlesztett és IMOMM módszeren alapul (4, 56, 57). Az ONIOM modellt gyakran mint QM/MM sémát alkalmazzák, azonban lehetővé teszi kettőnél több alrendszer definiálását is, valamint különböző módszerek (molekulamechanikai erőterek, félempirikus módszerek, a magas szintű rendszernél alkalmazottnál kisebb számításigényű *ab initio* vagy DFT módszer) alkalmazását az alacsonyabb szinten számított alrendszerre vagy alrendszerekre. A jelen értekezés kizárólag a két alrendszert tartalmazó esetet tárgyalja. QM/MM sémát feltételezve ez az eset összesen három számítást igényel: (1) energiaszámítás a teljes rendszerre molekulamechanikai erőtér segítségével, (2) a „modell” rendszer számítása QM, illetve (3) az MM módszerrel. A teljes rendszer energiáját a következő kifejezés adja meg (4, 56):

$$E_{\text{ONIOM(QM:MM)}} = E_{\text{MM,teljes}} + E_{\text{QM,modell}} - E_{\text{MM,modell}}$$

Előnye, hogy nem igényel külön tagot a QM és az MM rendszerek közötti kölcsönhatások leírására, ennek leírása molekulamechanikai szinten történik. A QM és az MM alrendszerek közti elektrosztatikus kölcsönhatások figyelembe vételére leginkább a korábban már tárgyalt mechanikus (mechanical embedding) és az elektrosztatikus beágyazás (electrostatic embedding) szolgál. Az ONIOM módszerrel kapcsolatban további lényeges információk, például a gradiensek és frekvenciák számítása, vagy az összekötő atomok definiálása a két rendszer között megtalálhatók a módszert részletesen ismertető összefoglaló közleményekben (56, 58).

3.5 Molekulamechanikai erőterek

A molekulamechanika empirikus potenciálokat alkalmaz a molekulák viselkedésének leírására. A molekulamechanikában az atomokat merev testeknek tekintjük és eltekintünk az elektronok mozgásától. A vizsgált molekula energiája így csak az atomok (atommagok) pozíciójától függ. A molekulamechanikai módszerek esetén azonban az atomok közötti

kötéseket előre definiáljuk, ennek megfelelően ezek a módszerek általában nem képesek leírni a kovalens kötések kialakulását és felbomlását, ezáltal a kémiai reakciókat (kivéve az úgynevezett reaktív erők) (59). Az atomok között kötő és nemkötő kölcsönhatásokat definiálnak. Biológiai makromolekulák esetén alkalmazott erők matematikai alakja általában a következő (60):

$$V(r) = \sum_{\text{kötések}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{kötésszögek}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torziós szögek}} k_\varphi [\cos(n\varphi + \delta) + 1] + \sum_{\text{nemkötő kölcsönhatások}} \left[\frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \right]$$

A képletben a $V(r)$ az erőtérrel számított teljes potenciális energia, „ b ”, „ θ ” és „ φ ” egy kötés hosszát, egy kötésszög valamint egy diéderes szög nagyságát jelenti (ebben a sorrendben). „ b_0 ”, „ θ_0 ”, „ k_b ”, „ k_θ ” és „ k_φ ” az erőtér által definiált erőállandók illetve „egyensúlyi” értékek. q_i és q_j egy-egy atomhoz rendelt parciális töltések, A_{ij} és C_{ij} pedig a Lennard-Jones potenciál képletében szereplő atomtípustól függő állandók, az r_{ij} az atomok közti távolság a nemkötő kölcsönhatásoknál.

A kötő kölcsönhatásokon belül a kötésekhez és a kötésszögekhez tartozó tagok esetén az energia az egyensúlyi értéktől való eltérésének négyzetével arányos (a Hooke-törvényhez hasonlóan)(49, 59). A molekulamechanikai erők kötések körüli rotációt általában egy Fourier-sor három tagjának megfelelő képlettel írják le, ezek 4 atom által bezárt diéderes szögektől függenek (59). A nemkötő kölcsönhatások közül az elektrosztatikus kölcsönhatásokat a molekulamechanikai erők az atomokhoz rendelt pontszerű töltések közti Coulomb-kölcsönhatásokként írják le. Az atomok közötti van der Waals kölcsönhatásokra a Lennard-Jones potenciált alkalmazzák, amely egy r^{-6} -nal és r^{-12} -nel arányos tagot tartalmaz, amelyek az atomok közötti vonzó, illetve kisebb távolságok esetén taszító kölcsönhatásnak felelnek meg (59). A „klasszikus” molekulamechanikai erők a molekulák polarizálhatóságát nem képesek figyelembe venni, szemben a jelentősen nagyobb számítási igényük miatt ma még kevésbé elterjedt polarizálható erőkkel (59).

3.6 Molekuladinamikai szimulációk

A molekuladinamikai szimulációk során a tanulmányozott rendszer viselkedését az idő

függvényében vizsgáljuk. A „klasszikus” molekuladinamikai szimulációkban a rendszerben található atomok mozgását a newtoni mozgásegyenletek alapján számítjuk numerikus integrálás segítségével. Az integrálási lépésköz a 0,1-5 fs (femtosekundum) tartományba esik. Általában nagyobb lépésköz használható, ha nem hidrogén-hidrogén atomok vagy valamennyi atom közötti kovalens kötések rögzítésére például SHAKE vagy LINCS algoritmust alkalmazunk. Az erők számítása nagyobb mértékű rendszerek esetén (például biológiai makromolekula vizes közegben) túlnyomórészt „klasszikus” molekulamechanikai erők segítségével történik. Van lehetőség azonban kvantumkémiai, illetve hibrid QM/MM módszereket használó molekuladinamikai szimulációk futtatására is (4). Utóbbi esetben a rendszer kvantumkémiai módszerrel számított részénél gyakran valamilyen félempirikus módszert alkalmaznak, mivel nagy számú köztes állapotban szükséges az energiák számítása.

A szimuláció indításához szükség van az atomok kiindulási pozícióira és a kezdősebességeire. Az atomok kezdősebességét a molekuladinamikai szoftverek általában véletlenszerűen generálják a Maxwell-Boltzmann eloszlás alapján (49, 59). A molekuladinamikai szimuláció akár több milliárdos nagyságrendű lépésből áll, így a számítás időgéneje jelentős, különösen nagyméretű rendszerek esetén. Minden lépésben elsőként az egyes atomokra pillanatnyilag ható erőket kell kiszámítani az alkalmazott molekulamechanikai erőter (vagy kvantumkémiai módszer) segítségével. Az atomokra ható erők egy adott állapotban a potenciális energia gradiense alapján határozhatóak meg. Az erők alapján a newtoni mozgásegyenletek segítségével határozható meg az atomok sebessége, illetve az elmozdulása a következő időpillanatban (59). A molekuladinamikai szoftverek meghatározott számú lépésközönként mentik az atomok pozícióit, az egyes atomokhoz tartozó sebességeket, a molekulamechanikai erőterben szereplő egyes kölcsönhatásokhoz tartozó energiaértékeket, valamint a hőmérséklet és a nyomás pillanatnyi értékét is. Az egymás utáni lépésekhez tartozó, kimentett szerkezetek alkotják a rendszer trajektóriáját (49, 59). Kellően hosszú „klasszikus” molekuladinamikai szimuláció után a vizsgált rendszer általában valamilyen egyensúlyi állapotot ér el (59).

A molekuladinamikai szimulációkat leggyakrabban állandó hőmérsékleten és térfogaton (NVT), vagy állandó hőmérsékleten és nyomáson (NpT) végezzük (59). A hőmérséklet, valamint NpT szimulációk esetén a nyomás szabályozására többféle módszert is kifejlesztettek. A legelterjedtebb hőmérsékletszabályozók a Berendsen (61), a v-rescale (62) és a Nosé-Hoover módszerek (63).

3.7 „Javított” mintavételezést lehetővé tévő MD módszerek

Az MD szimulációk a gyakorlatban legfeljebb néhány vagy néhányszor tíz mikroszekundum hosszúságúak. Ez nagy mértékben nehezíti az úgynevezett „ritka események” vizsgálatát hagyományos molekuladinamikai módszerekkel, mivel az ilyen eseményekhez tartozó energiagátak jelentősek és így a változás bekövetkezésének valószínűsége alacsony. (A fehérjék biológiai szempontból jelentős konformációváltozásai gyakran „ritka események”.) Az ilyen események hatékonyabb *in silico* vizsgálatára számos ún. javított mintavételezésű molekuladinamikai módszert fejlesztettek ki (64). Ezek egy része előre meghatározott reakciókoordinátákat vagy „kollektív változókat” (collective variable, CV) igényelnek, és ezek függvényében vizsgálja a rendszer viselkedését, valamint teszik lehetővé szabadentalpia-különbségek számítását. Ilyen módszer többek között az umbrella sampling (65), az adaptively biased molecular dynamics (ABMD) (66) és metadinamika (metadynamics) (67, 68). Ezen módszerek hátránya, hogy a kollektív változók megválasztása általában a rendszer alapos ismeretét igényli és gyakran nem triviális.

A metadinamika lényege, hogy a rendszer potenciális energiáját meghatározott számú lépésenként Gauss-függvények hozzáadásával módosítjuk, amelyek maximumpontja a kollektív változók pillanatnyi értékétől függ (68). A potenciális energia az atomkoordináták függvényében tehát függ attól, hogy a rendszer milyen korábbi állapotokat mintavételezett korábban a kollektív változók függvényében. A hozzáadott, a rendszer korábbi állapotaitól függő potenciál alapján számíthatóak az egyes állapotok közötti szabadentalpia-különbségek (68). A metadinamika „továbbfejlesztett” változata a „well-tempered metadynamics”, amely a szimuláció, valamint a számított szabadentalpia értékek sokkal hatékonyabb konvergenciáját teszi lehetővé, a hozzáadott Gauss függvények méretének csökkentése révén, ha a metadinamika a konvergenciához közelít (69). Létezik a módszernek olyan változata is, amely a Gauss-függvények szélességét is automatikusan választja meg (70).

A Gaussian Accelerated Molecular Dynamics módszer javított mintavételezést tesz lehetővé előre definiált reakciókoordináták megadása nélkül (71). A korábban kifejlesztett Accelerated Molecular Dynamics (AMD) technikához hasonlóan. Viszont az AMD-vel szemben itt a „gyorsító” potenciál jó közelítéssel Gauss-eloszlású, ez pontos energiaszámítást (reweighting) tesz lehetővé a „cumulant expansion” módszer segítségével (71, 72). A módszert újabban eredményesen alkalmazták ligandkötődés mechanizmusánk tanulmányozására (73) többek között G fehérjéhez csatolt receptorokhoz (74-76) és a HIV proteázhoz (77).

4. Célkitűzések

Számos közleményt publikáltak a cisztein proteázokkal kapcsolatban, ahol a reakciómechanizmust valamilyen hibrid QM/MM módszerrel vizsgálták. Ezzel szemben tudomásunk szerint az irodalomban még nem szerepel QM/MM reakciómechanizmus-számításokkal alátámasztott modell egyetlen transzglutamináz acilezési reakciójára sem. Kísérleti adatok a transzglutamináz 2-re érhetőek el (20, 78), a FXIII-A esetén ilyen információ sem áll rendelkezésre. Emiatt célul tűztük ki az aktivált FXIII-A reakciómechanizmusában az első lépés, az acilezés vizsgálatát két eltérő QM/MM protokoll szerint is. Célunk volt továbbá vizsgálni a katalitikus centrum legfontosabb aminosavainak protonáltságát mind a Michaelis-komplexben, mind az enzim nyugvó, szubsztrátot nem kötő aktivált enzimben.

Az AT pentaszacharid-kötésének, illetve az allosztérikus aktivációjának mechanizmusa számos korábbi vizsgálat tárgyát képezte (6). Azonban a kötődés viszonylag korai lépéseire, amikor az AT-pentaszacharid kölcsönhatás még relatíve gyenge, nem áll rendelkezésre atomi szintű szerkezeti információ. Célul tűztük ki a pentaszacharid-kötődés vizsgálatát javított mintavételezésű molekuladinamikai szimulációk segítségével, a GAMD módszerrel, egy olyan röntgendiffrakciós úton meghatározott AT-konformációhoz, mely nem tartalmaz pentaszacharid vagy más szerkezetű aktivátort. Célunk volt továbbá az AT konformációváltozásainak tanulmányozása a kötődés GAMD szimulációk kimenetéből és ezek összevetése az irodalomban szereplő információkkal. Ezen kívül az AT aktiválásának allosztérikus útvonalait is tanulmányozni kívántuk ugyanezen szimulációk trajektóriáinak analízise révén.

5. Módszerek

5.1 A FXIII-A transzglutamináz reakció első lépésének *in silico* vizsgálata

5.1.1 FXIII – Alfa-2-antiplazmin peptid komplex szerkezete

A α 2-antiplazmin (N-terminálison hasított forma, lásd a (79) összefoglaló cikkben) N-terminális dodekapeptid lehetséges konformációit a későbbi peptid-fehérje dokkoláshoz egy rövid, 10 ns-os molekuladinamikai szimulációból nyertük. Az MD szimulációhoz egy olyan kiindulási konformációt használtunk fel, amelyben az összes ϕ torziós szöveget -139° -ra, valamint az összes ω szöveget 135° -ra állítottuk (β -redő konformációra jellemző értékek). A szimulációt a GROMACS szoftver (80) AMBER03 (81) molekulamechanikai erőter segítségével, állandó hőmérsékleten és nyomáson végeztük. Az FXIII-A 4KTY jelű röntgendiffrakciós szerkezetét használtuk a dokkolásnál (3). Ez a szerkezet a FXIII-A aktív, monomer konformációjának felel meg, amelyhez egy irreverzibilis inhibitor (ZED-1301) kötődik kovalensen. A szerkezetből az inhibitor peptidet *in silico* eltávolítottuk.

A dokkoláshoz HADDOCK szoftver 2.2-es verziójának webes felületét alkalmaztuk (82-84). A peptid három, a molekuladinamikai szimulációból nyert szerkezetét használtuk a dokkoláshoz ($t = 8, 9$ és 10 ns). A XIII-as faktor esetén “aktívként” definiáltuk a következő aminosavakat: 214-215, 223, 279-283, 289, 290, 313-315, 317, 339, 342, 350-352, 360, 365-374, 398-400, 441, 456, 459-460, valamint a dodekapeptid összes aminosava. A fehérje Cys 314 aminosava és a peptid Gln2 oldallánc karbonil szénatomja közötti távolságot ezen kívül egy további, „*unambiguous restraint*” segítségével rögzítettük. A HADDOCK szoftver a kapott szerkezeteket klaszterekbe sorolja, mindhárom peptidkonformáció esetén négy klaszter reprezentatív konformációját vizsgáltuk meg a legmegfelelőbb szerkezet kiválasztása céljából a további szimulációkhoz. A legfontosabb szempontok a Trp279 – peptid Gln2 hidrogénkötés megléte, a Cys314 megfelelő elhelyezkedése a peptid glutamin oldallánchoz képest, valamint a további oldalláncok helyzete voltak.

A szerkezetből a katalitikus domént “*simulated annealing*” (szimulált hőkezelés) szimulációval finomítottuk tovább, amelyhez a GROMACS szoftvert (80) és az AMBER 14SB molekulamechanikai erőteret (85) alkalmaztuk. Az alkalmazott protokoll 10, 10 ns hosszú lépésből állt. Minden egyes lépésben a rendszer először 5 K-ról 400 K-re lett melegítve 2 ns alatt, majd ezen a hőmérsékleten tartottuk 3 ns-ig, végül 5 ns alatt lett lehűtve

5 K hőmérsékletre. A „*simulated annealing*” szimuláció NpT körülmények között történt, egy „v-rescale” hőmérsékletszabályozó (62) és Berendsen nyomásszabályozó alkalmazásával (86), periodikus határfeltételek mellett. A 1 nm-nél távolabb lévő atomok közötti elektrosztatikus kölcsönhatások figyelembevétele a Particle Mesh Ewald (PME) módszerrel történt (87).

5.1.2 A QM/MM szimulációknál alkalmazott modell rendszerek

A reakciómechanizmus első lépését, amely közös a transzglutamináz és a glutamináz reakció esetén, két eltérő QM/MM protokoll segítségével is vizsgáltuk. Egyrészt ONIOM-típusú QM/MM számításokat végeztünk (56), ahol a QM rendszerrel magas szintű MP2 módszerrel, illetve diszperziós korrekciót tartalmazó DFT módszereket alkalmaztunk. Másrészt QM/MM alapú molekuladinamikai szimulációkat futattunk, ahol szabadenergia-számításokat végeztünk metadinamika segítségével, illetve a szolvatációt explicit oldószerrel tudtuk figyelembe venni.

Az ONIOM típusú számításainkhoz a modell rendszert úgy definiáltuk, hogy az a katalitikus domén aktív centrumhoz közeli aminosavait tartalmazza. A magas szintű (QM) alrendszerhez tartoztak a katalízisben nélkülözhetetlen Cys314 és His373 aminosavak, valamint a peptidet helyettesítő molekula. A modell rendszerben a peptid helyett egy, a Gln2 aminosav oldalláncát helyettesítő propionamid molekula szerepelt. Ennek oka az volt, hogy a peptid flexibilitása nagyban nehezítette az energiaminimalizációs futások konvergenciáját. A rendszer továbbá tartalmazta a 211–216, 219–227, 266–268, 274–279, 283–292, 311–313, 315–322, 334–342, 368–372, 374–376, 395–400, 430–434, 464–466 aminosavakat is (MM rendszer), itt az AMBER molekulamechanikai erőter Gaussian szoftverben elérhető verzióját használtuk. Minden „újjonnan” létrejött N-terminálishoz N-acetil, és minden C-terminálishoz metilamido csoportot kapcsoltunk. A modell rendszer elkészítéséhez a TAO szoftvercsomagot is felhasználtuk (88). Létrehoztunk még egy további modell rendszert is a katalitikus Cys és His aminosavak protonáltságának tanulmányozása céljából az enzim nyugvó, szubsztrátot nem kötő állapotában. Ez a rendszer a szubsztrátot helyettesítő molekulát nem tartalmazta. A modell rendszerben a fehérje mindhárom aminosava esetén, ahol az oldallánc a QM alrendszerhez tartozott, egy „összekötő” („link”) atomot definiáltunk a $C\alpha - C\beta$ kötés mentén.

A QM/MM MD szimuláció modell rendszere - a jobb összehasonlíthatóság érdekében - a fehérje ugyanazon aminosavait tartalmazta, mint az ONIOM módszer esetén, valamint a modell ligandum is azonos volt. A szolvatációt explicit TIP3P vízmolekulák (89), valamint 0,15 M sókoncentrációnak megfelelő számú Na^+ és Cl^- ion hozzáadásával vettük figyelembe.

Mivel a molekuladinamikai szimulációk nagy számú lépésből állnak, QM rendszerénél az energiák és az erők hatékony számítását lehetővé tevő félempirikus módszert, a sűrűségfunkcionál-elméleten alapuló DFTB3-at alkalmaztuk (53, 54). A felhasznált paraméterkészlet a szerves- és biomolekulákra kifejlesztett 3ob-3-1 volt (55, 90). A „link” atomokat az ONIOM-típusú számításainknál használt sémához hasonlóan definiáltuk, a „kettévágott” Ca – C β mentén, utóbbi atomtól megközelítően 1 Å távolságra helyezkedtek el.

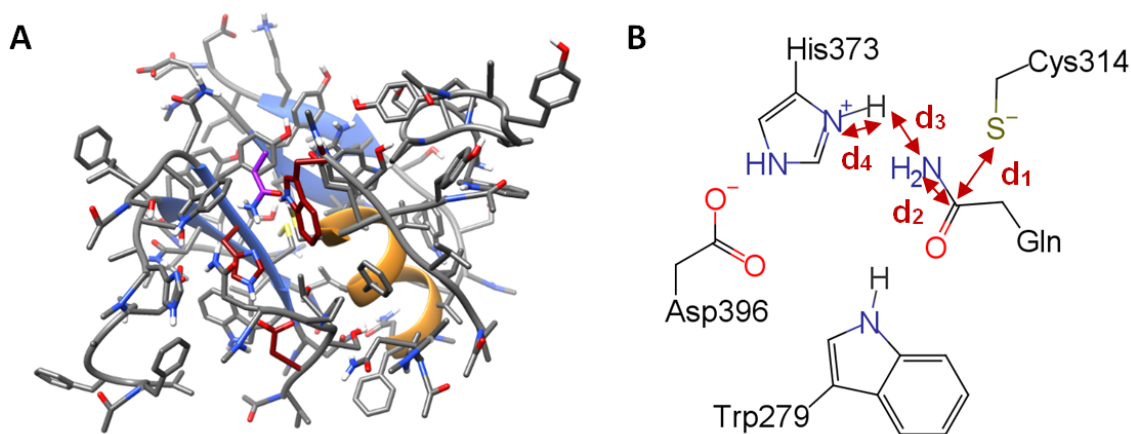
5.1.3 ONIOM-típusú számítások

Az ONIOM-típusú számításainkhoz a Gaussian szoftvercsomag 03 és 09 verzióit alkalmaztuk (91, 92). Az első a geometria optimalizálása volt az elkészített modell rendszerre, amelyben az 211-216, 219-227, 266-268, 274-279, 283-292, 311, 320-322, 334-342, 368-369, 371, 376, 395, 397, 399, 430-434, 464-466 aminosavak rögzítve voltak, a katalízisben közvetlenül részt vevő aminosavakra viszont semmilyen megszorítást nem alkalmaztunk.

A nukleofil támadási lépésnél először a potenciális energiafelület (potential energy surface, PES) feltérképezését („pásztázás”, „scan”) végeztük két különböző reakciókoordináta-pár függvényében (PES1 és PES2): Cys314 kénatom – szubsztrát amid szénatom távolság (d_1) és amid szénatom- amid nitrogénatom távolság (d_2), valamint kénatom – szubsztrát amid szénatom távolság (d_1) és a His373 ϵ -protonjának távolsága az amid nitrogéntől (d_3). Geometria-optimalizálásokat futtattunk a rácspontokban többnyire 0,2 Å, az átmeneti állapot feltételezett helye közelében nagyobb, 0,1 Å sűrűséggel, a két reakciókoordinátát az előre megadott értékekre rögzítve. Konvergenciaproblémák miatt a következő tartományokban nem minden pontban végeztünk energiaszámításokat: d_1 : 2,8-3,2 Å, d_2 : 2,0-2,6 Å. (Ezek azonban minden bizonnyal nagyon magas energiájú konformációk és gyakorlatilag nincsen biológiai relevanciájuk). A számításainkat az MP2/6-31G(d) valamint az M06-2X/6-31+G(d,p) módszerrel is elvégeztük, mindkét reakciókoordináta-pár esetén. (Az MP2 szintű optimalizálásokhoz a Gaussian 03 szoftvert alkalmaztuk, ennek a Gaussian 09-től eltérő minimumkereső algoritmusá számos esetben jóval hatékonyabb konvergenciát eredményezett. Az M06-2X funkcionál viszont kizárólag a Gaussian 09 vagy 16 verziókban elérhető.) Az előző esetben kapott tetraédes intermedier geometriájából kiindulva C-N kötés felbomlását további, egyváltozós „scan” segítségével vizsgáltuk. A QM rendszerre ugyanazt a két módszert használtuk, mint az előbbi esetben. A stacionárius pontokra és nyeregpontokra (Michaelis komplex, átmeneti állapotok, intermedierek) újabb optimalizálást futtattunk a reakciókoordináták rögzítésének feloldásával, több különböző bázis, valamint MP2 és DFT

módszerek (M06-2X, ω B97XD) segítségével. A DFT módszereknél ezen túl frekvenciaszámítást is végeztünk, részben zérusponthi vibrációra (ZPV) történő energiakorrekciók számítása céljából, részben annak az ellenőrzésére, hogy a megtalált átmeneti állapotok valóban elsőrendű nyeregponthok-e.

A Cys314 és His373 aminosavak protonáltságát a Michaelis-komplexben egy egydimenziós „scan” segítségével vizsgáltuk. A proton és a Cys314 kénatomja közötti távolságot használtuk reakciókoordinátaként. Hasonló számításokkal vizsgáltuk ezen aminosavak protonáltságát az enzim „nyugvó” állapotában is. Itt egy olyan modell rendszert használtunk, amely a szubsztrátot nem tartalmazta.



3 ábra: *A. Az ONIOM-típusú számításoknál alkalmazott modell rendszer. B. A reakciómechanizmus vizsgálatánál alkalmazott „karakterisztikus” távolságok (d_1 - d_4). d_1 : Cys314 kén-szubsztrát amid C távolság, d_2 : szubsztrát amid C-amid N távolság, d_3 : szubsztrát amid N-proton távolság, d_4 : His373 imidazol epszilon nitrogén-proton távolság.*

5.1.4 QM/MM MD szimulációk

A QM/MM MD szimulációkhoz a GROMACS szoftvercsomag 5.0 verzióját használtuk. A DFTB 3 féleempirikus módszer használatát lehetővé tevő kódot Kubař és munkatársai fejlesztették ki a GROMACS szoftverhez (93). A szoftver a metadinamikai szimulációkhoz a PLUMED programmal is bővítve lett (94). A modell rendszerre (lásd a „A QM/MM szimulációknál alkalmazott modell rendszerek” szakaszban) energiaminimalizációt futtattunk „steepest descent” módszerrel, amit egy, 1 ns hosszúságú „konvencionális” molekuladiamikai szimuláció követett NVT körülmények között, T=310 K hőmérsékleten. Az integrálási

lépésköz 0.5 fs volt. A 312-319, 370, 372-375, 396, 398 és 400 aminosavak szabadon mozoghattak, az összes többi aminosav pozícióját harmonikus potenciálok bevezetésével rögzítettük. Az “ekvibrációs” MD szimuláció alatt a Trp279 aminosav oldalláncára, valamint a szubsztrát molekulára is gyenge megszorítást alkalmaztunk.

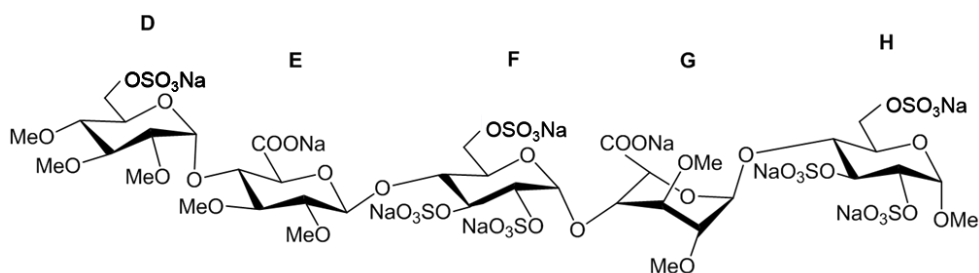
A Cys314 és a His373 oldalláncok protonáltságát 2 ns hosszúságú WT-MetaD szimulációval vizsgáltuk, a „*bias factor*” (a szimuláció konvergenciáját befolyásoló paraméter) értékét itt 30-nak választottuk. A kollektív változó a proton távolsága volt a Cys314 kénatomjától, hasonlóan az ONIOM-típusú számításainkhoz. A nukleofil támadási lépés szabadenergia-felületét egy 4,3 ns hosszúságú Well-Tempered Metadynamics (WT-MetaD) szimuláció segítségével térképeztük fel. A kollektív változók az ONIOM-típusú számításainknál alkalmazott d_1 (Cys314 kénatom-karbonil szénatom) és d_2 (amid szénatom-amid nitrogénatom) távolságok voltak. A Gauss-függvények szélességét a szoftver automatikusan határozta meg. (70). A szabadenergia-felület rendszer által bejárható részének korlátozása céljából „falakat” (lower walls, upper walls) alkalmaztunk (d_1 : 0,17 és 0,37 nm, d_2 : 0,13 és 0,33 nm)

A molekulaszervezetek háromdimenziós ábrázolásához az UCSF Chimera (39) szoftvert használtuk. A kétdimenziós energiafelületeket a DPlot szoftverrel ábráztuk (95).

5.2 Antitrombin pentaszacharid-kötődési mechanizmusának vizsgálata

5.2.1 Modell rendszerek

A pentaszacharid-kötődés korai lépéseinek vizsgálata céljából három modell rendszert hoztunk létre a molekuladinamikai szimulációinkhoz. Az első rendszer a „natív”, nem-aktivált AT 1T1F röntgendiffrakciós szerkezetén alapult (43). Ez a szerkezet monomer AT-nak (tehát nem egy „natív” és egy latens molekula dimerjének) felel meg. Ez a rendszer ligandumot nem tartalmazott.



4. ábra: A munkánk során alkalmazott pentaszacharid, az idraparinux szerkezete (96) valamint (97) alapján.

A második rendszer ugyanezen a struktúrán alapult, azonban egy pentaszacharid molekulát, idraparinuxot helyeztünk el a szerkezetben (az idraparinux szerkezetét lásd a 4. ábrán). Az idraparinux konformációja oldatban korábban már vizsgálatra került egyetemünkön mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR) mérések valamint molekuladinamikai szimulációk segítségével (97). A pentaszacharid kiindulási szerkezetét az 1NQ9 röntgendiffrakciós szerkezetben (42) (AT-pentaszacharid komplex) található, az idraparinuxtól kismértékben különböző „NTP” jelzésű ligandum alapján hoztuk létre. A molekula kiindulási pozícióját úgy határoztuk meg, hogy előbb a két röntgendiffrakciós szerkezetet egymásra illesztettük a legkisebb négyzetek módszere segítségével, majd a ligandumot 12 Å-mel elmozdítottuk a két molekula tömegközéppontját összekötő vektor irányában. Így az AT és a ligandum között valamennyi közeli kölcsönhatás megszűnt.

A harmadik rendszer az 1NQ9 jelzésű röntgendiffrakciós szerkezeten alapult, amely az AT egy „részlegesen aktivált” állapotát mutatja egy pentaszachariddal alkotott komplexben (42). A szimulációhoz a pentaszacharidot itt is idraparinuxra módosítottuk. A röntgendiffrakciós szerkezetekből hiányzó hurkokra a kiindulási konformációkat a MODELLER szoftverrel nyertük (98).

Az AT glikozilációját az Asn-96, az Asn155 és az Asn192 oldalláncokhoz kapcsolódó, két N-acetil-D-glükózamin egységből álló diszacharidokkal modelleztük. A „csonkított” szénhidrát egységek alkalmazását az tette szükségessé, hogy a nagy méretű és rendkívül flexibilis glikánok hatékony mintavételezése még javított mintavételezésű módszerekkel is igen nehéz lenne. A glikozilációs helyek az AT béta izoformájának feleltek meg (33, 40).

Korábbi, javított mintavételezésű szimulációink alapján a CHARMM szénhidrát erőteret találtuk legalkalmasabbnak a rendelkezésre álló NMR adatok reprodukálására (hidrogén

hidrogén távolságok Nuclear Overhauser Effect (NOE) alapján) (97). Ennek megfelelően a pentaszacharid modellezésére ezt az erőteret választottuk (99, 100), míg a fehérjére a CHARMM36m erőteret alkalmaztuk (101).

A szimuláció előkészítő lépéseihez és a topológia fájlok elkészítéséhez a CHARMM-GUI (102-104) webes felületet használtuk. A szimulációk kocka alakú dobozban történtek, periodikus határfeltételek mellett. A rendszert vízmolekulákkal szolvatáltuk, melyeket a CHARMM erőter módosított TIP3P vízmodelljével vettünk figyelembe. A hozzáadott Na⁺ és Cl⁻ ionok számát úgy határozta meg a szoftver, hogy a sókoncentráció megközelítően 0,15 M legyen.

5.2.2 Molekuladinamikai szimulációk

A munka alapját képező molekuladinamikai szimulációkat a 2. kiegészítő táblázatban foglaltuk össze. A szimulációkhoz az AMBER16 szoftvercsomag pmemd.cuda programját használtuk (105-107). Valamennyi molekuladinamikai szimulációt energiainimalizáció előzött meg, ahol az első 500 lépésben „*steepest descent*”, az azt követő 1500 lépésben konjugált gradiens módszert alkalmaztunk. Ezt egy újabb 2000 lépéses energia-minimalizáció követte, a megszorítások eltávolítása után.

A javított mintavételezésű szimulációk előtt minden esetben 150 ns hosszúságú egyensúlyi molekuladinamikai szimulációkat futtattunk. A megfelelő kiindulási konformációk kiválasztása céljából a „nem-aktivált AT és hozzáadott pentaszacharid” rendszer esetén négy független szimulációt hajtottunk végre (A-D), ezek közül kettőt használtunk a későbbiekben GAMD szimulációk kiindulópontjául (jelölésük A és B) a pentaszacharid pozíciója alapján (lásd 1. kiegészítő ábra).

A GAMD szimulációkat minden esetben egy 60 ns ekvilibrációs szakasz előzte meg (a GAMD szimulációk általános protokollja szerint, lásd (71)). A szimulációknál kettős gyorsítást (dual boost) alkalmaztunk, tehát a rendszer teljes potenciális energiáját és a diédes szögekhez tartozó energiatagokat is érintette a gyorsítás.

Az első 10 ns egyensúlyi dinamikának felelt meg, adatgyűjtés az első 4 ns-ban nem történt. A maradék 50 ns-ban a szoftver gyorsító potenciált alkalmazott a rendszer energiájának mindkét komponensére, az utolsó 40 ns alatt rendszeresen frissítve ennek paramétereit. Minden

kiindulási szerkezetből két párhuzamos futást indítottunk, a „nem-aktivált AT és hozzáadott pentaszacharid” rendszer esetén ez négy szimulációt jelentett (jelölésük A1, A2, B1 és B2). A GAMD szimulációk állandó 310 K hőmérsékleten és térfogaton történtek Langevin típusú hőmérsékletszabályozó alkalmazásával, az integrálási lépésköz 2 fs volt. A 12 Å-nél távolabb elhelyezkedő atomok közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat a PME módszer segítségével vettük figyelembe (87).

A „produkciós” szimulációk 600 ns hosszúságúak voltak, azonban három szimulációt, ahol a röntgendiffrakciós szerkezethez hasonló pentaszacharidkötést tudtunk megfigyelni, 1 μ s-ra hosszabbítottunk (az A1, a B1, valamint az 1NQ9 szerkezeten alapuló 1. szimuláció).

5.2.3 A szimulációk eredményeinek kiértékelése

A trajektóriák analíziséhez, az atom-atom távolságok, RMSD értékek és szénhidrát gyűrűkonformációk számításához a CPPTRAJ programot használtuk (108). A fehérje másodlagos szerkezetét a DSSP módszer segítségével vizsgáltuk (109). A pentaszacharid pozícióját a rendelkezésre álló röntgendiffrakciós szerkezetekhez képest egy kétlépéses módszerrel határoztuk meg: először az AT 6-26, 39-133, 137-355, 361-377, 402-431 aminosavait a röntgendiffrakciós szerkezetére illesztettük, majd a gyűrű és az interglükózidos atomok távolságainak négyzetes középértékét határoztuk meg a szerkezetek között. A konformációváltozások jellemzése céljából reprezentatív konformációkat választottunk ki az egyes trajektóriákból, klaszteranalízis segítségével (lásd 2. kiegészítő ábra). Az analízishez a CPPTRAJ szoftverben elérhető K-means algoritmust használtuk. Egy, a P-hélixet érintő konformáció esetén azonban más utat választottunk a konformációk nyerésére: a trajektóriát kettéosztottuk annál a pontnál, ahol a változás végbement, és a két „rész” átlagához leginkább hasonló konformációkat használtuk.

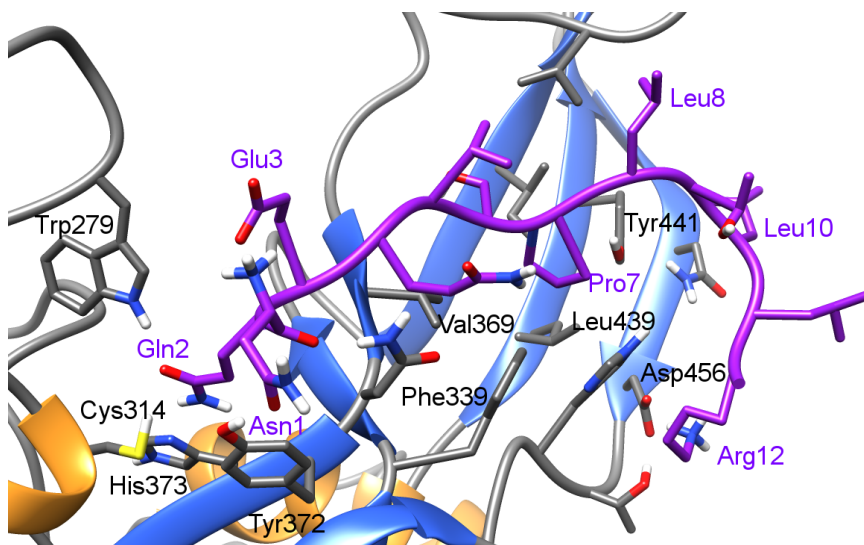
A fehérjék egyes aminosavai közötti korrelált mozgásokat a Lange és Grubmüller által kifejlesztett „általánosított korrelációs” módszerrel elemeztük, a g_correlation program segítségével (110, 111). A GAMD szimulációkból a szabadenergia-felület számításához a PyRewighting programot alkalmaztuk (72).

6. Eredmények és diszkusszió

6.1 A FXIII katalitikus mechanizmusának vizsgálata

6.1.1 A FXIII és az α 2-antiplazmin peptid komplexének szerkezete

A FXIII reakciómechanizmusával kapcsolatos munkánkhoz a FXIII-A katalitikus domén-dodekapeptid „*simulated annealing*” szimulációjából vett utolsó konformációt ($t = 100$ ns) használtuk (5. ábra). Az általunk kapott konformáció összhangban van a rendelkezésre álló enzimkinetikai mérések eredményeivel, valamint az NMR mérésekkel (23, 24, 112). A peptid Asn1 aminosavának pozitívan töltött N-terminálisa intramolekuláris sóhidat képez a Glu3 oldallánccal, ezáltal jelentősen befolyásolja a peptid konformációját. Az Asn1 aminosav szerepét a kötődésben kinetikai mérések is megerősítik (a katalitikus hatékonyság jelentősen alacsonyabb ezt az aminosavat nem tartalmazó peptideknél). Ugyanezen aminosav oldallánca hidrogénkötést alakít ki a fehérje Tyr372 aminosavával. A peptid Pro7 aminosava egy kis hidrofób zsebbe illeszkedik, amelyet az FXIII-A Val369, Phe339, Leu439 és Tyr441 aminosavai alkotnak. A Leu8 és a Leu10 oldallánccok elsősorban kölcsönhatásokat alakítanak ki a fehérje azon régiójával, amely a TG2 „hinge” régiójával homológ. Utóbbi két oldallánc kölcsönhatását az FXIII A alegységgel a kísérleti adatok is alátámasztják (24). A Lys12 aminosav, amely szintén szerepet játszik a kötődésben kinetikai mérések alapján, sóhid kölcsönhatást alakít ki a FXIII-A Asp456 aminosavával. A kapott szerkezet és a kísérleti adatok közti kisebb különbségek azzal indokolhatók, hogy a QM/MM szimulációk kiindulópontjának szánt egyetlen szerkezettel szemben az NMR állapotok sokaságát vizsgálja.



5 ábra: Az $\alpha 2$ -antiplazmin dodekapeptid kötődése az FXIII-A katalitikus doménjéhez, dokkolás és „simulated annealing” szimuláció után. A peptidet lila színnel tüntettük fel. A legfontosabb oldalláncok sorszámait a FXIII-A esetén fekete, a peptid esetén lila színnel szerepelnek.

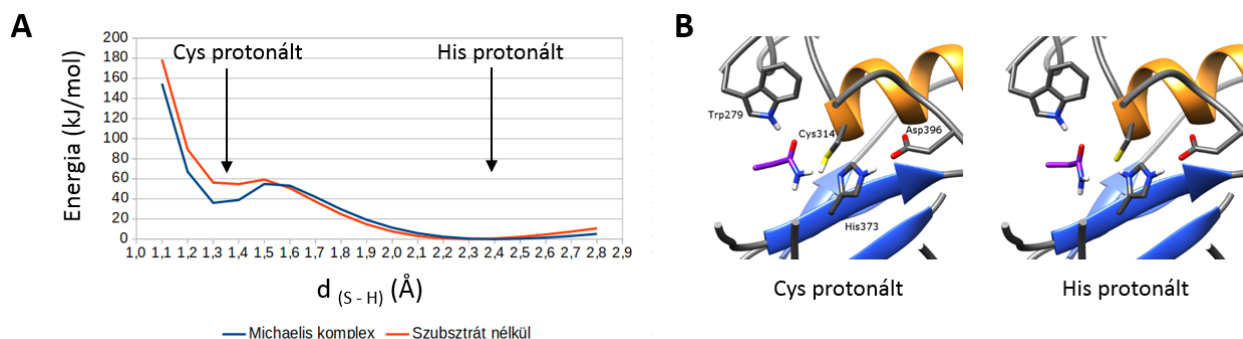
6.1.2 A Cys314 és a His373 aminosavak protonáltsága ONIOM-típusú számítások alapján

A proton transzfer nélkülözhetetlen szerepet játszik a transzglutaminázok, cisztein- és szerin-proteázok katalitikus mechanizmusában egyaránt. A folyamatban különösen kiemelkedő a szerepe a Cys és a His aminosavak protonáltságának (előbbi oldalláncnak protont kell átadnia a His oldalláncnak, hogy tiolát formába kerüljön), valamint a protonátmenetnek a katalitikus hisztidinről a ligand glutamin -NH₂ csoportjára. Számos tanulmány született a katalitikus Cys és His oldalláncok protonáltságáról a transzglutaminázokhoz hasonló katalitikus triádot tartalmazó cisztein proteázok esetén. Ezen tanulmányok alapján ez a két aminosav valószínűleg ionpár formában van jelen a legtöbb ilyen enzimben viszonylag széles pH-tartományban (32, 113-115). Kevesebb adat áll rendelkezésre a transzglutaminázok enzimcsaládjá esetén. A cisztein proteázokkal szemben Case és Stein reakciókinetikai vizsgálatok alapján neutrális Cys-His pár jelenlétére következtetett tengerimalac máj transzglutamináz, valamint transzglutamináz 2 „nyugvó” formájában (78). A FXIII A alegység esetén azonban tudomásunk szerint semmilyen kísérleti adat nem áll rendelkezésre

ezen aminosavak protonáltságáról.

A protonáltságot ONIOM-típusú QM/MM szimulációkkal vizsgáltuk, az enzim nyugvó állapotában és a Michaelis-komplexben egyaránt. Két egyváltozós pásztázást („scan”) végeztünk, a Módszerek fejezetben leírt módon, két külön rendszerre, melyek egyike nem tartalmazott szubsztrátot. Az energiákat a reakciókoordináta függvényében a 6. ábrán tüntettük fel. A legalacsonyabb energiájú állapot a két esetben 2,4, illetve 2,3 Å-nál helyezkedett el, amiből az ionpár forma nagyobb stabilitására következtethetünk mindkét állapotban. A Cys-protonált forma energiája lényegesen magasabbnak adódott (36,1 és 54,7 kJ/mol), A két végállapotra meghatároztuk a zérusponyi vibrációra (ZPV) korrigált energiákat is, két módszerrel (M06-2X, ω B97XD) és többféle bázis alkalmazásával (1. kiegészítő táblázat). Valamennyi esetben a His-protonált forma adódott jelentősen stabilabbnak, megerősítve a korábbi eredményeket. A nagy energiakülönbség miatt utóbbi forma előfordulási valószínűsége nagyon alacsony. Így valószínűtlennek tekinthető egy olyan mechanizmus, ahol a protonátmenet a ciszteinről a hisztidinre azonos elemi lépésben menne végbe a nukleofil támadással. Tehát a protonátmenetet és a nukleofil támadást két teljesen elkülönülő reakciólépésként tárgyalhatjuk.

Case és Stein javaslata szerint a FXIII A alegységével szekvencia-homológiát mutató transzglutamináz 2 szubsztrátot nem kötő, nyugvó állapotában a Cys314 és a His373 oldalláncok neutrális állapotban vannak, viszont a nukleofil támadási lépésben már kezdetben is cisztein tiolát formával, valamint protonált hisztidinnel kell számolni (78). Ezzel szemben a számításaink alapján az aktivált FXIII A alegységében az ionpár forma lehet a stabilabb, a cisztein proteázokhoz hasonló módon.



6. ábra: A. Az optimalizált geometriákhoz tartozó energiák a reakciókoordináta (S-H távolság) függvényében a Cys314 és a His373 oldalláncok protonáltságának vizsgálata során.

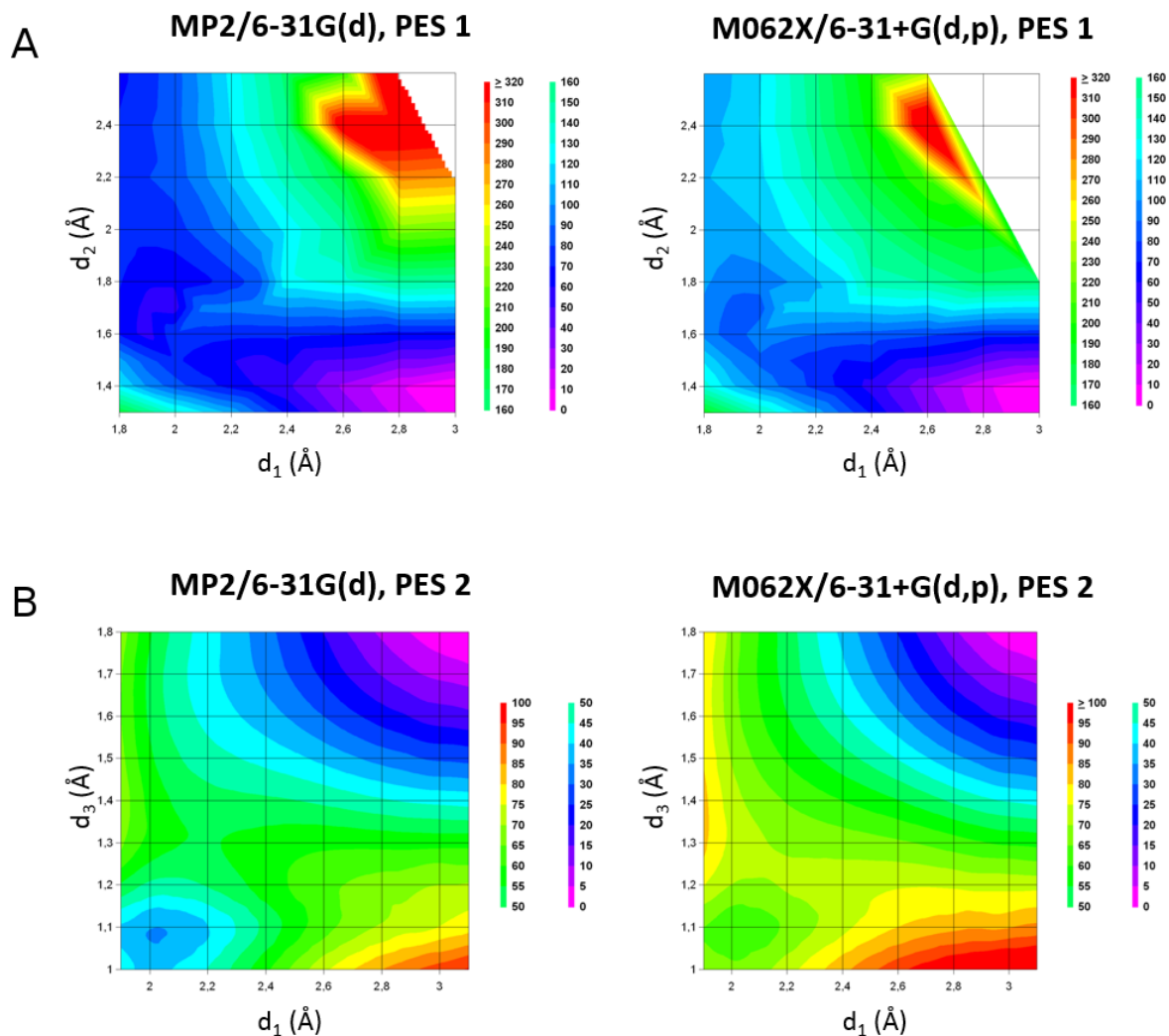
A számítást a Michaelis komplex mellett az enzim nyugvó, szubsztrátot nem tartalmazó állapotára is elvégeztük. B. A Cys, illetve a His oldalláncon protonált forma optimalizált geometriája.

6.1.3 Az acilezési lépés mechanizmusa ONIOM-típusú számítások alapján

A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján az acilezési reakciólépés mechanizmusa a cisztein proteázok családján belül valószínűleg nem egységes. Ezekre az enzimekre elsőként Lowe javasolt egy, a szerin proteázokéval analóg sémát (116). Kvantumkémi számítások alapján több különböző mechanizmus is lehetségesnek tűnik a családon belül: a Cys kénatom nukleofil támadása vagy egy elemi lépésben megy végbe a proton transzferrel a hisztidinről, vagy a protonátmenet akár meg is előzheti a nukleofil támadást. Különbségek vannak a javaslatok között abban a tekintetben is, hogy feltételezik-e egy tetraédes intermedier (tio-félacetál anion) létezését.

Iismaa és munkatársai a transzglutamináz 2 Trp241 (amely az FXIII A alegységben a Trp279-nek felel meg) aminosavval kapcsolatos mutagenezises kísérleteikben azt találták, hogy a katalitikus hatékonyság jelentősen csökken, ha ez az aminosav például fenilalaninra cserélődik (11). Feltételezték, hogy a triptofán oldallánc a tetraédes intermedier stabilizálásában játszhat szerepet (11).

Az acilezési lépés vizsgálata céljából két különböző reakciókoordináta-pár segítségével feltérképeztük a potenciálisenergia-felületet (d_1-d_2 , valamint d_1-d_3 , a távolságok definíciója 3. ábrán), két különböző módszerrel (MP2/6-31G(d) és M06-2X/6-31+G(d,p)).

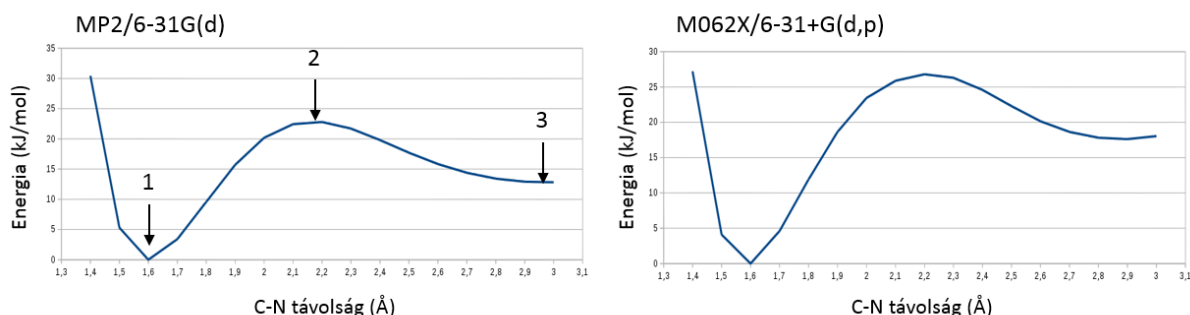


7. ábra: A nukleofil támadási lépésre kapott potenciálisenergia-felületek. A számításokat két különböző reakciókoordináta pár használatával (**A.** d_1 és d_2 , **B.** d_1 és d_3 távolságok, lásd 2. ábra B része) végeztük.

A d_1 (Cys314 kénatom-amid karbonil szánatom távolság) és d_2 (C-N távolság a szubsztrát amidcsoportjában) változók segítségével kapott energiafelületeken a legalacsonyabb energiájú konformáció mindkét esetben a Michaelis-komplex volt (7/A ábra) (körülbelül $d_1 = 2,0 \text{ \AA}$, $d_2 = 1,35 \text{ \AA}$ -nél). Az ábrák alapján nyeregpontra valószínűsíthető a $d_1 = 2,0 \text{ \AA}$, $d_2 = 1,5 \text{ \AA}$ hely közelében. Megfigyelhető továbbá egy helyi minimum $d_1 = 1,8 \text{ \AA}$, $d_2 = 1,7 \text{ \AA}$ körül, ez egy ikerionos szerkezetű, tetraédes intermediereknek felel meg, protonált $-\text{NH}_3^+$ csoporttal és negatív töltést hordozó oxigénatommal (I 1). A $d_1 = 1,8 \text{ \AA}$, $d_2 = 2,4\text{-}2,6 \text{ \AA}$ régióban a potenciálfelület más részeihez képest viszonylag kis energiakülönbségek figyelhetők meg. Különösen az M06-2X/6-31+G(d,p) módszerrel kapott energiafelület alapján egy második

átmeneti állapotot is feltételezhetünk ebben a régióban. (Ennek a lépésnek az energiagátját külön is vizsgáltuk, lásd később.) Az eredményeink alapján a cisztein kénatom nukleofil támadása, valamint a protonátmenet a His-H⁺ aminosavról a szubsztrát -NH₂ csoportjára egy lépésben megy végbe, míg az ammónia leválása a tetraédes intermedierből (I 1) egy külön reakciólépés. A két különböző módszerrel kapott potenciálisenergia-felületek alakja egymáshoz hasonló, a legfontosabb különbség, hogy az M06-2X/6-31+G(d,p) módszernél a Michaelis-komplexhez viszonyított relatív energiák következetesen magasabbak.

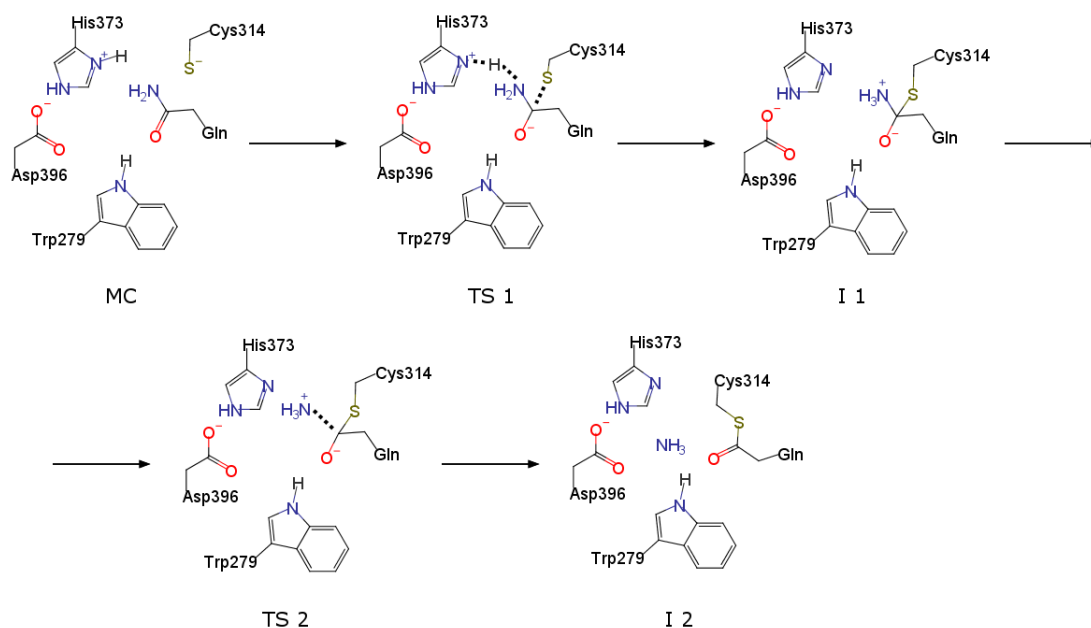
Ugyanezen reakciólépést, azaz a nukleofil támadást és a protonátmenetet az amid -NH₂ csoportra egy további „relaxed scan” segítségével is vizsgáltuk (7/B ábra). Két potenciális energia-felület egyértelműen egy elemi lépésben lejátszódó (koncertikus) reakcióra enged következtetni, jó egyezésben azzal, amit a másik reakciókoordináta-párral végzett számításaink alapján feltételeztünk. A végállapot mindkét módszerrel a korábban említett tetraédes, ikerionos intermedier volt. Fontos azonban megjegyezni, hogy a C-N kötés hasadása a tetraédes intermedierben spontán nem megy végbe energiaminimalizáció során.



8. ábra: Az energia a reakciókoordináta (C-N távolság) függvényében, a C-N kötés felhasadását vizsgáló egyváltozós „scan” alapján, két különböző módszerrel számítva. 1: az első, tetraédes intermedier (I 1), 2. a második lépés átmeneti állapota (TS 2), 3. a tioészter intermedier és kötött ammónia (I 2).

A C-N kötés felhasadását, amely az eddigiek alapján egy különálló reakciólépésnek tekinthető, tovább vizsgáltuk két újabb „scan” segítségével, az amid C-N távolságot reakciókoordinátának választva (d₂). A két „scan” a korábbiakhoz hasonlóan az alkalmazott módszerben különbözött egymástól (lásd 8. ábra.) A geometriaoptimalizálások után kapott

energiaértékek alapján egy átmeneti állapotot (TS 2) feltételezhetünk $d_2 = 2,2 - 2,3 \text{ \AA}$ távolságnál. Ennek energiája 23, illetve 27 kJ/mol-nak adódik a két esetben, ami gyors, nem sebességmeghatározó reakciólépésnek felel meg, viszont magyarázza, hogy miért nem megy végbe spontán a C-N kötés felhasadása. A tioészter intermedier állapotra (I 2) magasabb energiát kaptunk, mint a tetraédes intermedierre, ennek az lehet az oka, hogy az ammónia lehasadása nem ment teljesen végbe ebben az állapotban. A Gaussian szoftverben elérhető reakció-koordináták azonban az ammóniamolekula a közegbe való eltávozásának vizsgálatát nem vagy csak igen körülményesen teszik lehetővé.



9. ábra: Az ONIOM-típusú számításaink alapján kapott mechanizmus az aktivált FXIII-A enzimreakciónak első lépésére, a Michaelis komplextől (MC) a tioészter intermedierig (I 2). (TS: első átmeneti állapot, I 1: első, tetraédes intermedier, TS2: második átmeneti állapot,)

Összefoglalva tehát a számításaink alapján a nukleofil támadás, valamint a protonátmenet a protonált hisztidin oldalláncról az amid nitrogénatomra egy elemi lépésben megy végbe, és ez lesz a sebesség-meghatározó lépés. A N-H kötés felbomlása és az NH_3 távozása egy ettől különböző, ám igen gyors lépésben történik. A számításaink alapján javasolt mechanizmust a 9. ábrán tüntettük fel.

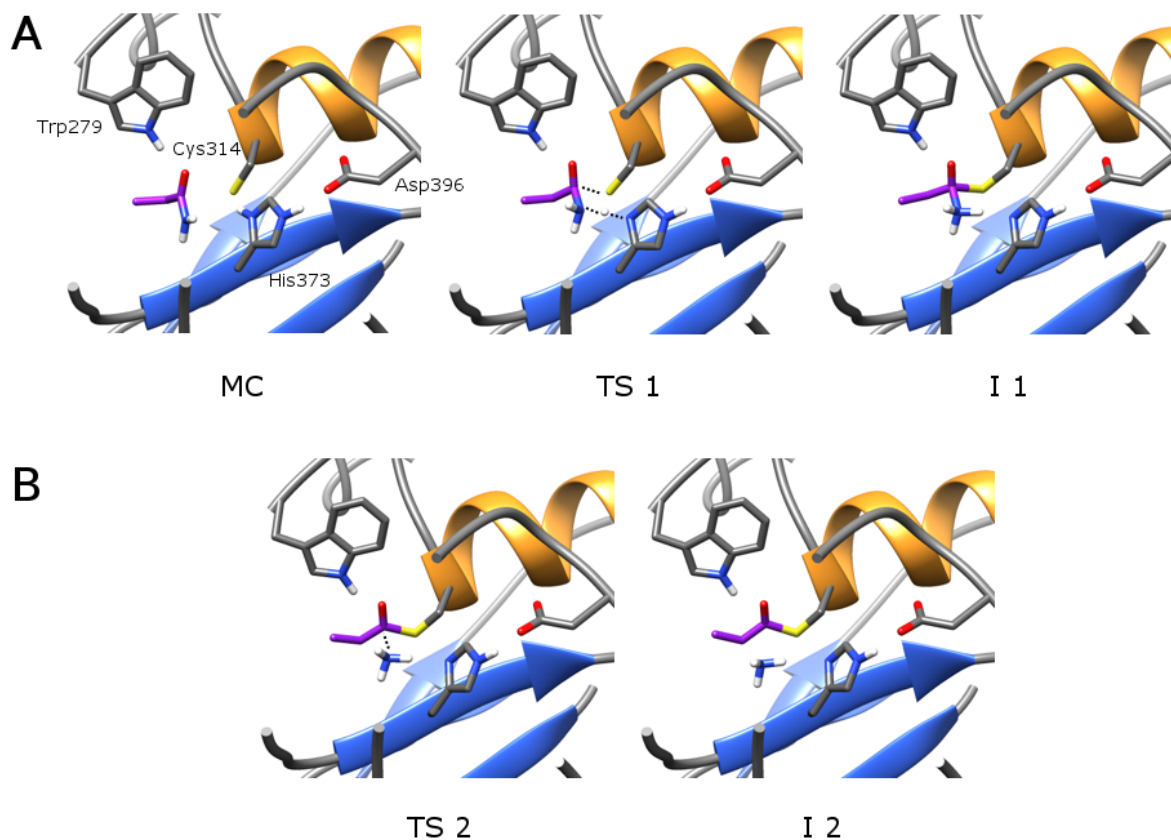
1. táblázat: Az optimalizált átmeneti állapot (TS 1), valamint a tetraéderes intermedier (I 1) energiája a Michaelis komplex (MC) energiájához viszonyítva. A számításokat több különböző módszerrel és bázissal is elvégeztük. A táblázatban szerepelnek a DFT módszerekkel számított zérusponthi vibrációra (ZPV) korrigált energiák is.

Módszer/Bázis	E(TS 1) – E(MC) (kJ/mol)	E(I 1) – E(MC, _s) (kJ/mol)	E(TS 1) – E(MC), ZPV korrigált (kJ/mol)	E(I 1) – E(MC) ZPV korrigált (kJ/mol)
MP2/6-31G(d)	83,9	62,4	-	-
MP2/6-31G(d,p)	79,2	65,2	-	-
MP2/6-31+G(d,p)	89,1	72,2	-	-
MP2/6-311+G(d,p)	85,4	69,1	-	-
ωB97XD/6-31G(d)	107,2	92,4	93,4	91,7
ωB97XD/6-31G(d,p)	105,8	96,4	91,5	93,9
ωB97XD/6-31+G(d,p)	114,5	100,9	101,5	100,2
ωB97XD/6-311+G(d,p)	118,2	103,8	105,1	103,5
M062X/6-31G(d)	93,6	82,4	80,8	80,8
M062X/6-31G(d,p)	93,3	86,5	80,5	83,5
M062X/6-31+G(d,p)	102,4	92,1	89,6	90,3
M062X/6-311+G(d,p)	105,7	94,6	92,8	92,7

2 táblázat: Az optimalizált második átmeneti állapot, valamint a tioészter intermedier (I 2) energiája az első, tetraéderes intermedier (I 1) energiájához viszonyítva. A számításokat több különböző módszerrel és bázissal is elvégeztük., valamint zérusponthi vibrációra (ZPV) korrigált energiát is számítottunk a DFT módszerekkel.

Módszer/Bázis	E(TS 2) – E(I 1) (kJ/mol)	E(I 2) – E(I 1) (kJ/mol)	E(TS 2) – E(I 1), ZPV korrigált (kJ/mol)	E(I 2) – E(I 1) ZPV korrigált (kJ/mol)
MP2/6-31G(d)	22,9	12,8	-	-
MP2/6-31G(d,p)	20,7	8,5	-	-
MP2/6-31+G(d,p)	27,9	17,3	-	-
MP2/6-311+G(d,p)	25,8	13,2	-	-
ωB97XD/6-31G(d)	22,5	16,7	16,2	8,4
ωB97XD/6-31G(d,p)	22,2	14,7	17,2	6,5
ωB97XD/6-31+G(d,p)	26,9	18,3	20,4	8,3
ωB97XD/6-311+G(d,p)	24,3	13,4	17,7	3,0
M062X/6-31G(d)	23,0	16,2	17,8	9,3
M062X/6-31G(d,p)	22,9	14,5	18,4	8,5
M062X/6-31+G(d,p)	267,0	17,7	21,6	10,6
M062X/6-311+G(d,p)	24,1	12,8	18,0	5,4

Az egyes stacionárius pontok energiáját a Michaelis komplexhez képest az 1. és a 2. táblázatokban tüntettük fel, a számított zérus ponti vibrációra korrigált energiákkal együtt. A stacionárius állapotok háromdimenziós szerkezetét a 10. ábra mutatja.



10. ábra: A stacionárius pontok M06-2X/6-311+G(d,p) szinten optimalizált geometriái. **A.** A Michaelis komplex, az első átmeneti állapot és a tetraédes intermedier. **B.** Az átmeneti állapot a második lépésben (C-N kötéshasadás és ammónia leválása), és a tioészter intermedier kötött ammóniamolekulával. (MC: Michaelis-komplex, TS: első átmeneti állapot, I 1: első, tetraédes intermedier, TS2: második átmeneti állapot, I 2: tioészter intermedier és részben felszabadult ammónia)

Az öt stacionárius pont „scan”-ekből nyert geometriáit különböző módszerek és bázisok segítségével újraoptimalizáltuk, a reakciókoordinátákra vonatkozó rögzítések feloldásával. Az energiaértékeket abszolút zérus ponti vibrációra korrigáltuk két DFT módszer felhasználásával. Az energiaértékeket az 1. táblázatban a Michaelis-komplexhez, míg a 2. táblázatban a tetraédes intermedierhez viszonyítva adtuk meg. Az első átmeneti állapotra kapott energiák a zérus ponti vibráció alkalmazása nélkül lényegesen alacsonyabbak voltak a MP2 számítások

esetén, mint DFT módszerek alkalmazásával, a különbség 23–33 kJ/mol volt wB97XD és 10–20 kJ/mol M06-2X funkcionállal.

Ugyanezen két DFT módszerrel kapott energiák a tetraédes intermedier esetén 29-35, illetve 20-25 kJ/mollal magasabbak az MP2 módszerrel számított értékeknél. A Michaelis-komplexhez viszonyított korrigált energiák a 80,8-91,5 kJ/mol tartományban voltak az átmeneti állapot és 80,8-93,9 kJ/mol között a tetraédes intermedier esetén. A két állapot korrigált energiája igen közel van egymáshoz szinte valamennyi módszer esetén. Ebből arra következtethetünk, hogy az intermedier féléletideje nagyon rövid lehet. A második átmeneti állapot energiájára (ammónia kilépése a tetraédes intermedierből) valamennyi módszer 21-27 kJ/mol közötti értéket ad korrekció nélkül, a korrigált energiák ennél 4-6 kJ/mollal alacsonyabbak. A „végső” állapotra kapott korrigált energiák a DFT módszerekkel 3,0-10,6 kJ/mollal adódnak magasabbnak a tetraédes intermediernél.

A kapott aktiválási energia értékeket az Eyring-Polányi egyenlet révén hasonlíthatjuk össze a kísérletileg meghatározott katalitikus hatékonysági értékekkel (k_{cat}). Azonban fontos megjegyezni, hogy FXIII-A esetén a rendelkezésre álló kísérleti eredmények keresztkötési reakcióra vagy a szubsztrát Gln aminosavának hidrolízisére vonatkoznak, a két reakciólépés kinetikáját még nem vizsgálták külön-külön. Amennyiben az acilezési lépés leglassabb részfolyamatát, a Cys nukleofil támadását sebességhatározó lépésnek feltételezzük, az aktiválási energia kb. 85 kJ/mol lenne a magas szintű MP2 számításaink alapján. Ezen a szinten a zérusponthoz való korrekció technikai okokból nem volt kivitelezhető, a korrekció nagyságát azonban a DFT módszerekkel kapott értékek alapján -15 – -10 kJ/mol-nak becsülhetjük. Ez alapján a „korrigált” energiáját 70-75 kJ/mol-nak adódik, amely $0,5-4 \text{ s}^{-1}$ kinetikai állandónak felel meg. Ezzel szemben az irodalomban különféle szubsztrátokra $16-490 \text{ s}^{-1}$ állandók szerepelnek (23, 24). Ebből arra következtethetünk, hogy a hatékony katalízishez feltehetően a peptid több aminosavának jelenlétére is szükség van.

3. táblázat: A d_1 - d_4 „karakterisztikus” távolságok a Michaelis komplex, az első átmeneti állapot valamint a tetraédes intermedier optimalizált geometriáiban.

Módszer/Bázis	Michaelis complex (MC)				1. átmeneti állapot (TS 1)				Tetraédes intermedier (I 1)			
	d_1 (Å)	d_2 (Å)	d_3 (Å)	d_4 (Å)	d_1 (Å)	d_2 (Å)	d_3 (Å)	d_4 (Å)	d_1 (Å)	d_2 (Å)	d_3 (Å)	d_4 (Å)
MP2/6-31G(d)	3,436	1,352	2,874	1,040	2,179	1,516	1,303	1,293	2,016	1,595	1,060	1,800
MP2/6-31G(d,p)	3,406	1,351	2,856	1,035	2,161	1,519	1,287	1,292	2,017	1,594	1,061	1,750
MP2/6-31+G(d,p)	3,630	1,347	2,962	1,033	2,100	1,518	1,286	1,294	1,985	1,583	1,057	1,781
MP2/6-311+G(d,p)	3,435	1,350	2,857	1,036	2,129	1,517	1,290	1,292	1,997	1,585	1,061	1,760
ω B97XD/6-31G(d)	3,525	1,349	2,824	1,032	2,330	1,508	1,229	1,363	2,040	1,592	1,060	1,773
ω B97XD/6-31G(d,p)	3,507	1,349	2,827	1,032	2,261	1,514	1,226	1,363	2,044	1,587	1,065	1,741
ω B97XD/6-31+G(d,p)	3,511	1,346	2,840	1,028	2,144	1,516	1,250	1,335	2,004	1,580	1,060	1,776
ω B97XD/6-311+G(d,p)	3,515	1,344	2,852	1,027	2,180	1,513	1,246	1,340	2,012	1,583	1,058	1,780
M062X/6-31G(d)	3,370	1,350	2,684	1,034	2,284	1,515	1,228	1,373	2,033	1,595	1,063	1,765
M062X/6-31G(d,p)	3,364	1,349	2,688	1,033	2,242	1,521	1,209	1,395	2,041	1,588	1,072	1,717
M062X/6-31+G(d,p)	3,368	1,347	2,715	1,029	2,162	1,519	1,238	1,360	2,002	1,583	1,065	1,756
M062X/6-311+G(d,p)	3,370	1,346	2,730	1,028	2,202	1,516	1,232	1,366	2,009	1,586	1,060	1,772

4. táblázat: A d_1 - d_4 „karakterisztikus” távolságok a második átmeneti állapot, valamint a tioészter intermedier optimalizált geometriáiban.

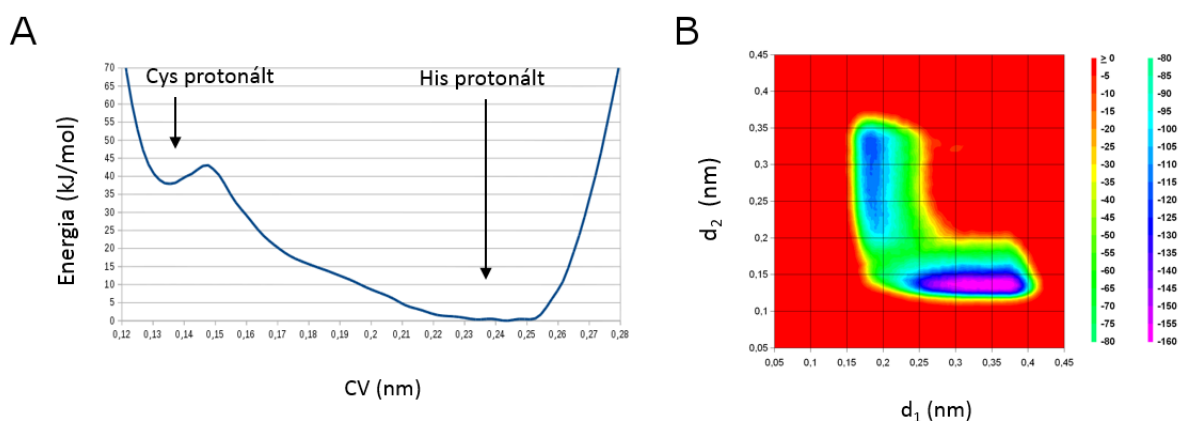
Módszer/Bázis	2. átmeneti állapot (TS 2)				Tioészter intermedier (I 2)			
	d_1 (Å)	d_2 (Å)	d_3 (Å)	d_4 (Å)	d_1 (Å)	d_2 (Å)	d_3 (Å)	d_4 (Å)
MP2/6-31G(d)	1,854	2,170	1,030	1,990	1,801	2,972	1,023	2,270
MP2/6-31G(d,p)	1,859	2,139	1,027	1,960	1,800	2,979	1,019	2,266
MP2/6-31+G(d,p)	1,845	2,180	1,026	1,992	1,796	2,991	1,019	2,266
MP2/6-311+G(d,p)	1,854	2,154	1,029	1,971	1,799	2,987	1,020	2,269
ω B97XD/6-31G(d)	1,852	2,233	1,028	1,990	1,810	2,824	1,024	2,177
ω B97XD/6-31G(d,p)	1,855	2,170	1,028	1,982	1,810	2,850	1,023	2,195
ω B97XD/6-31+G(d,p)	1,848	2,215	1,026	2,015	1,804	2,878	1,022	2,226
ω B97XD/6-311+G(d,p)	1,857	2,179	1,026	2,000	1,807	2,900	1,020	2,241
M062X/6-31G(d)	1,862	2,205	1,029	1,971	1,810	2,912	1,023	2,221
M062X/6-31G(d,p)	1,867	2,174	1,029	1,952	1,809	2,984	1,021	2,253
M062X/6-31+G(d,p)	1,856	2,179	1,028	1,987	1,802	3,005	1,020	2,287
M062X/6-311+G(d,p)	1,866	2,144	1,027	1,975	1,805	3,052	1,019	2,317

A 3. és a 4. táblázat tartalmazza a d_1 - d_4 karakterisztikus távolságokat (a távolságok definíciója a 3. ábrán szerepel) a korábban tárgyalt stacionárius pontokban. A Michaelis-komplex geometriája az adatok alapján szinte állandó a módszertől és az alkalmazott bázistól függetlenül. Az első átmeneti állapot és a tetraédes intermedier szerkezete meglehetősen közel áll egymáshoz, nagyon kicsi a különbség a d_1 és a d_2 távolságokban. A szerkezetben megfigyelhető a Trp279 és az amid karbonil szénatom közti hidrogénkötés, ez a tirptofán megfelel a transzglutamináz 2 Trp241 aminosavának, mely az átmeneti állapot stabilizálásában játszik szerepet. Az amid nitrogén-proton távolság azonban az átmeneti állapotban lényegesen nagyobb, mint a tetraédes intermedierben. Az intermedierben a C-S kötéstávolság még jelentősen hosszabb (2,00-2,02 Å), mint egy „átlagos” C-S kötés hossza (~1,82 Å). Diffúz függvényeket tartalmazó bázisokkal a kapott értékek valamivel kisebbek. A második átmeneti állapotban a karbonil szén-nitrogén távolság (d_2) a 2,14-2,23 Å tartományban mozog a módszertől és a bázistól függően. A szén-kén kötéstávolság minimálisan nagyobb, mint a tioészter intermedierben. A Michaelis komplex esetén a d_1 , a tioészter intermedier és kötött NH_3 esetén pedig a d_2 és d_4 távolság nagyobb variabilitást mutat. Ennek az a magyarázata, hogy ezekben az állapotokban a szubsztrát, illetve az ammónia az enzimhez nem kovalens módon kötődik.

6.1.4 QM/MM MD szimulációk

A protonátmenetet a His373 és a Cys314 aminosavak között a fentiekén túl egy QM/MM MD metadinamikai szimulációval is vizsgáltunk, a DFTB félempirikus módszer alkalmazásával a QM rendszerre. A solvatációt explicit TIP3P oldószerrel tudtuk figyelembe venni. Az 3. kiegészítő ábrán jól látható, hogy a szimulációnk során több protonátmenet is történt, mindkét irányban. A rendszer a His-protonált állapotokhoz képest jellemzően jóval rövidebb időintervallumokban található a Cys-protonált állapotban. (Ugyanakkor az egyes állapotokban töltött időtartamok nem tükrözik a valós reakciókinetikát, szimuláció „javított mintavételezésű” jellegéből adódóan.). A metadinamikai szimuláció eredményei alapján meghatároztuk a két állapot relatív szabadenergiáját (11/A ábra), az energiakülönbség 38 kJ/mol-nak adódott. Az adatok alapján az ikerionos (His protonált) forma bizonyult lényegesen stabilabbnak, összhangban az ONIOM-típusú számításokban kapott eredménnyel. A nem „rögzített” aminosav-oldalláncok konformációja viszonylag stabilnak adódott a szimuláció során.

A nukleofil támadási lépést vizsgáló, két kollektív változós metadinamikai szimuláció kimenetéből meghatároztuk a nukleofil támadási lépés szabadenergia-felületét (11/B ábra). A kapott felület egy egylépéses reakciómechanizmusra enged következtetni. Az egyetlen átmeneti állapot a $d_1 = 0,22$ nm és $d_2 = 0,18$ nm közelében található, energiája ~ 98 kJ/mollal magasabb a Michaelis komplexnél. Ez az energiaérték abba a tartományba esik, amit az ONIOM-típusú számításainknál tapasztaltunk. A tioészter intermedierre a Michaelis-komplexnél mintegy 40 kJ/mollal nagyobb energiát kaptunk, azonban meg kell jegyezni, hogy az ammónia felszabadulása a szimulációnk ezen állapotában nem ment végbe teljesen, a tioészter valós energiája ennél valószínűleg alacsonyabb. Azonban ellentétben az ONIOM-típusú számításainkkal, a tetraédes intermedier rendkívül labilnak bizonyult, és a potenciálisenergia-felületen sem volt megfigyelhető ilyen intermediernek megfelelő helyi minimum. A nukleofil támadás, a protontranszfer (a protonált hisztidinről) és az ammónia leválása gyakorlatilag egyetlen lépésben, koncertikus módon ment végbe.



11. ábra: A QM/MM MD számítások eredményei. **A.** A szabadenergia a kollektív változó (CV) függvényében (proton távolsága a Cys kénatomtól), a Cys-His protonátmenet QM/MM MD szimulációjából. **B.** A kétváltozós QM/MM MD metadinamika kimenetéből számított szabadenergia-felület. A két kollektív változó a cisztein kénatom-karbonil szénatom közti távolság (d_1) valamint az amid karbonil szénatom-amid nitrogénatom távolság (d_2) voltak.

A két kollektív változót, valamint az amid/ammónia nitrogén-proton távolságot az idő függvényében a 4. kiegészítő ábra mutatja. A szimuláció során nukleofil támadás először ~ 1 -54 ns-nál ment végbe, ezt azonnal követte a tioészter intermedier kialakulása. Ezt követően 3,05 ns-nál a reakció fordított irányba is lejátszódott, az intermedierből a rendszer visszaalakult a Michaelis-komplexnek megfelelő állapotba. 4,10 ns körül egy újabb nukleofil

támadás volt megfigyelhető. A szimulációkból vett „representatív” konformációkat mutat be a 5. kiegészítő ábra.

A nem megszorított oldalláncok pozíciója viszonylag stabil maradt egészen 4,3 ns-ig, azonban kb. 4,3 ns-nál megszűnt a szubsztrátmolekula karbonil oxigénje és a Trp279 oldallánc közötti hidrogénkötés. Emiatt a szimuláció kezdeti 4,3 ns hosszú szakaszát vettük figyelembe a szabadenergia számításánál.

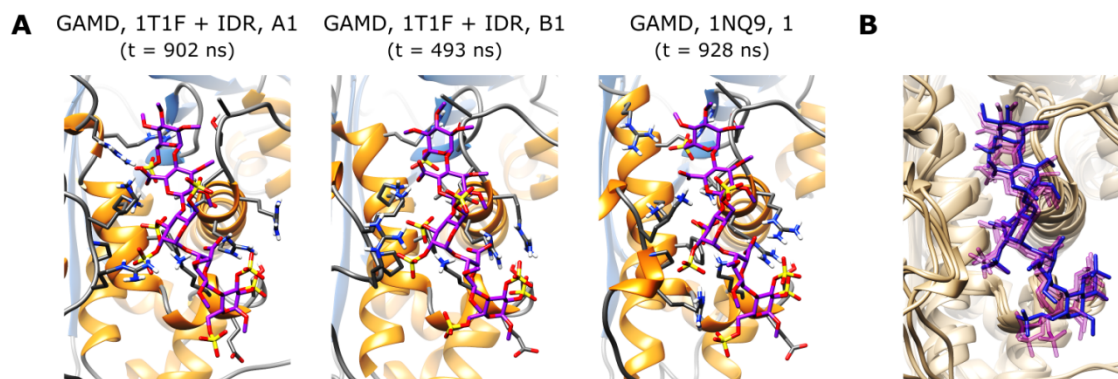
6.2 Pentaszacharid-kötődés vizsgálata az antitrombinhoz MD szimulációk segítségével

6.2.1 A pentaszacharid kötődési mechanizmusa az antitrombinhoz

Az AT pentaszacharid kötődési mechanizmusára az irodalomban egy háromlépcsős mechanizmust javasoltak. Az adatok elsősorban röntgendiffrakciós vizsgálatokon és különböző, módosított vagy csonkított oligoszacharid-származékokkal végzett kinetikai mérésekből származnak. Azonban nem áll rendelkezésre olyan röntgendiffrakciós szerkezet, amely a kötődés korai lépéseinek vagy egy relatíve gyenge AT-pentaszacharid komplexnek felelne meg. Az elérhető szerkezetek vagy teljesen aktivált, vagy köztes aktiváltságú állapotoknak tekinthetők.

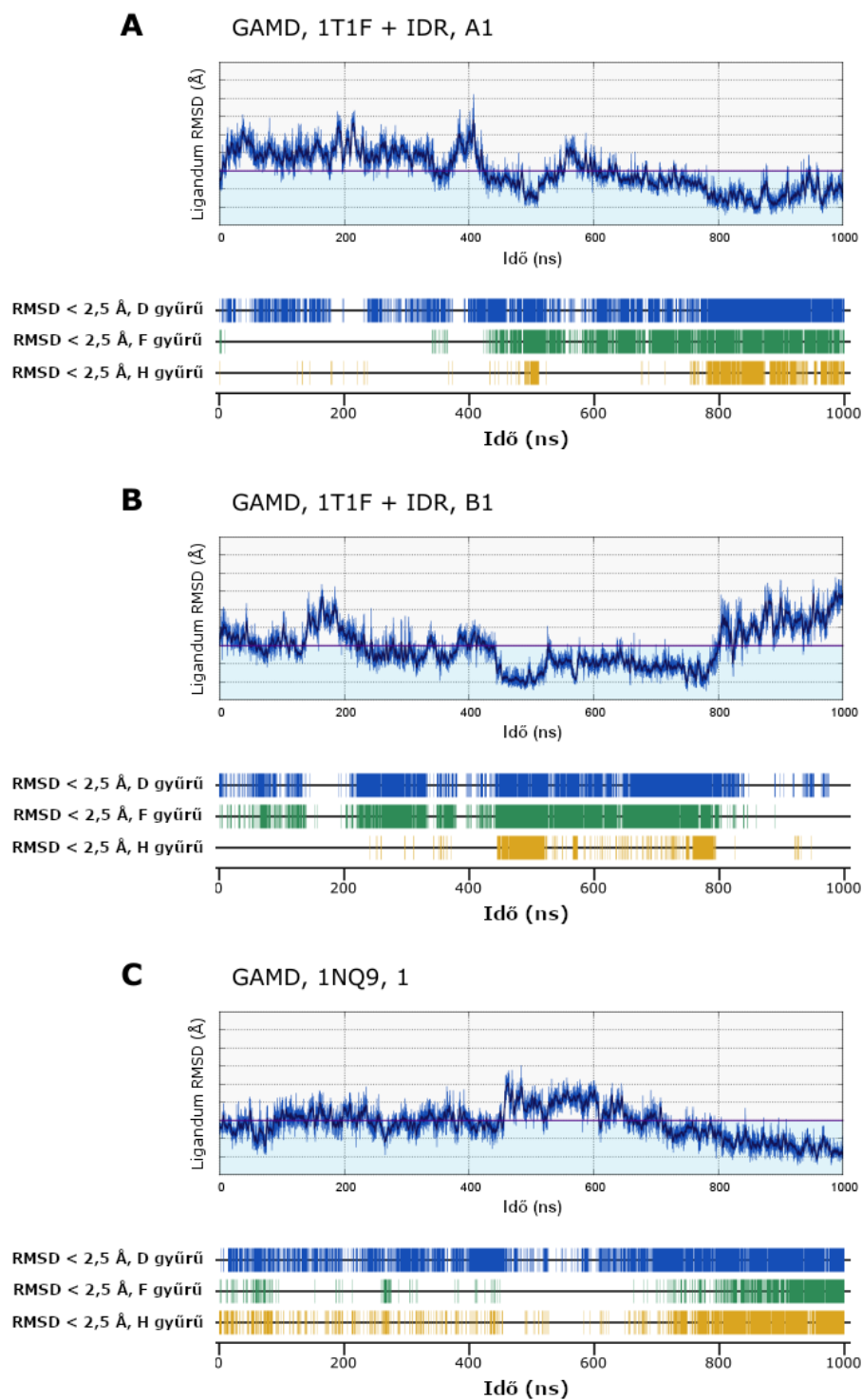
A kötődés mechanizmusának vizsgálata céljából GAMD szimulációkat futtattunk, az „Antitrombin pentaszacharid-kötődési mechanizmusának vizsgálata” szakaszban leírt protokoll szerint. A 6. kiegészítő ábra az egyes szimulációkból 50 ns sűrűséggel vett köztes állapotokat mutat be. A négy „antitrombin és hozzáadott pentaszacharid” rendszer esetén (A1, A2, B1 és B2) két trajektóriában figyeltünk meg olyan kötődést, ahol az RMSD a pentaszacharid gyűrű – és interglikozidos atomjaira 2,5 Å alatti értékeket vett fel a szimuláció hosszabb szakaszában (A1 és B1). Ezekben a szimulációkban 1 Å-nél alacsonyabb RMSD-t mutató állapotok is jelentős gyakorisággal fordultak elő. Az A1 szimuláció esetén az erős kötődés leginkább az utolsó 300 ns-os időintervallumban volt megfigyelhető, míg a B1 rendszerénél 450-800 ns között volt a pentaszacharid pozíciója leginkább hasonló a röntgendiffrakciós szerkezethez. Az 12./A ábrán a legalacsonyabb RMSD-vel rendelkező konformációkat ábrázoltuk, 1000, egyenletes sűrűséggel vett köztes állapot közül kiválasztva. Összehasonlításuképpen feltüntettük az egyik 1NQ9 szimuláció (AT-pentaszacharid komplex) utolsó 100 ns-os szakaszából származó köztes állapotot is, ahol az előbbi két esethez hasonló

kötődési mód volt megfigyelhető. Az 12./B ábrán a három szerkezetet az 1NQ9 struktúrára illesztettük a könnyebb összehasonlíthatóság érdekében. A pentaszacharidot a röntgendiffrakciós szerkezet esetén sötétkékkel tüntettük fel. A konformációk a várakozásnak megfelelően nagyon közel állnak ahhoz, amit az 1NQ9 szerkezetben találunk. A G és a H alegységeknél az eltérések valamivel nagyobbak, mint a D-F gyűrűk esetén.



12. ábra: *A. A három 1 μ s GAMD szimulációból RMSD alapján kiválasztott konformációk (az ábrán szereplő első két szimuláció a „nem aktivált AT és hozzáadot pentaszacharid”, a harmadik az „1NQ9” rendszerre vonatkozik). B. A három konformáció egymásra illesztve (lila), valamint összehasonlításképpen a pentaszacharid kötődési módja (kék) az 1NQ9 röntgendiffrakciós szerkezetben.*

A kötődés folyamatának jellemzése céljából három alegység, a D, az F és a H RMSD-jét külön-külön is meghatároztuk (13. ábra, valamint 7-10. kiegészítő ábrák.). Ezek sorrendben a pentaszacharid nemredukáló végének, „közepének” valamint a redukáló végének felelnek meg. Jelentős hasonlóságot figyelhetünk meg a kötődési mechanizmus tekintetében az A1 és a B1 szimulációk között: a H gyűrű csak akkor tud a röntgendiffrakciós szerkezetbelihez hasonló pozícióba kerülni, ha a D és az F gyűrű már elérte a megfelelő pozíciót. Az 1NQ9 rendszer 1 μ s-os szimuláció esetén viszont a részfolyamatok sorrendje ettől eltérő volt, a H gyűrű „erős” kötődéséhez nem volt szükség arra, hogy az F gyűrű előbb kötődjön be. Ennek magyarázata, hogy itt a kiindulási szerkezet már eleve tartalmazott egy pentaszacharidot, azaz a H gyűrű kötőhelye már eleve is előnyös konformációban volt a kötődéshez.

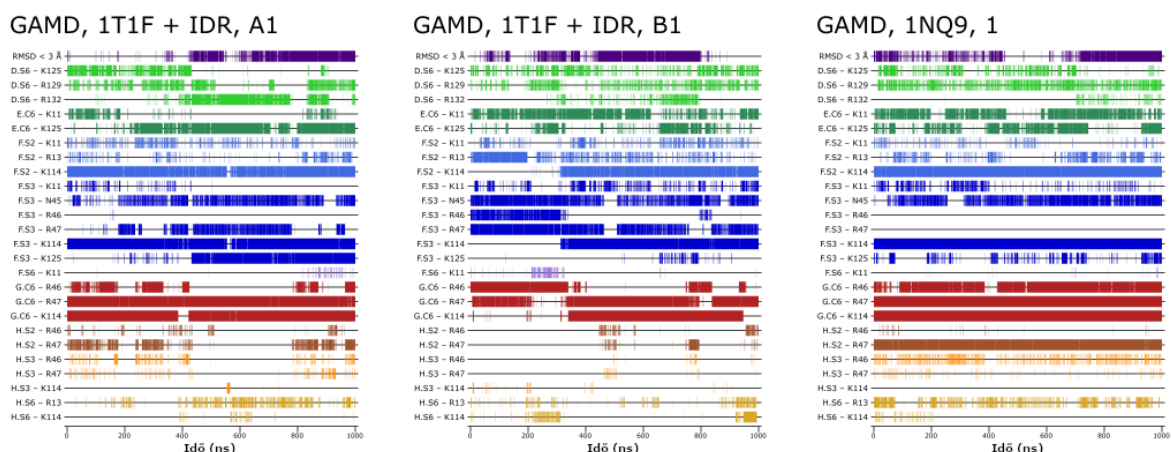


13. ábra: A D, az F és a H gyűrűk kötődésének sorrendje a három 1 μ s-os szimulációban. Az „A1” és a „B1” szimulációk esetén (az „antitrombin és hozzáadott pentaszacharid” rendszerre) a H gyűrű „erős” kötődésének feltétele, hogy a D és az F gyűrűk megfelelő pozícióban legyenek. A mechanizmus eltérő az „1NQ9” rendszer 1 μ s-os szimulációja esetén.

Az A1 és a B1 rendszereknél tapasztalt mechanizmus hasonlóságokat mutat azzal, amit Desai és munkatársai különböző módosított penta-, tetra- és triszacharidokkal végzett kinetikai méréseik során tapasztaltak (117). Ők a kísérleteik alapján egy olyan mechanizmust javasoltak, ahol a pentaszacharid DEF alegységei kötődnek be először, és ez indukálja a G és a H gyűrűk kötőhelyének konformációváltozásait az AT-ban.

Az AT kötőhelyének pozitív töltést hordozó aminosavai elengedhetetlenek a számos negatív töltésű csoportot tartalmazó pentaszacharid kötődéséhez. A kölcsönhatásban legfontosabb szerepet játszó három aminosav a Lys114, a Lys125 és az Arg129, de a Lys11, Arg13, Arg46 és Arg47 aminosavak hozzájárulása is jelentős a kölcsönhatási energiához (118). Az AT kötőhelyének pozitív töltésű oldalláncai, valamint a pentaszacharid negatív töltésű csoportjai (szulfát, karboxilát) közti kölcsönhatások jelenlétét az idő függvényében vizsgáltuk. Két atomcsoport között akkor feltételeztünk kölcsönhatást, ha köztük a távolság 5 Å alatt volt. Az eredmények a három, 1 µs-os szimulációra a 14. ábrán szerepelnek, ugyanezen adatokat a többi rendszer esetén kapott adatokkal együtt a 11. kiegészítő ábrán ábrázoltuk. Az eredmények alapján a sóhíd kölcsönhatások többsége akkor is ki tud alakulni, ha a pentaszacharid nem pontosan a röntgendiffrakciós vizsgálatok által megállapított pozícióban van.

Ennek magyarázata valószínűleg az Arg és a Lys oldallánccok jelentős flexibilitásában keresendő. Azonban a kölcsönhatások jelenléte a nagyobb RMSD-vel rendelkező konformációkban nem jelenti azt, hogy a pentaszacharid kötődési energiája ilyen pozíció esetén csak kevéssel marad el az energiaminimumtól. Az AT-pentaszacharid kölcsönhatásnak azonban jelentős hidrofób komponense is van, és ez nagymértékben függ attól, hogy az AT oldallánccok „megfelelő” pozícióban legyenek (119).



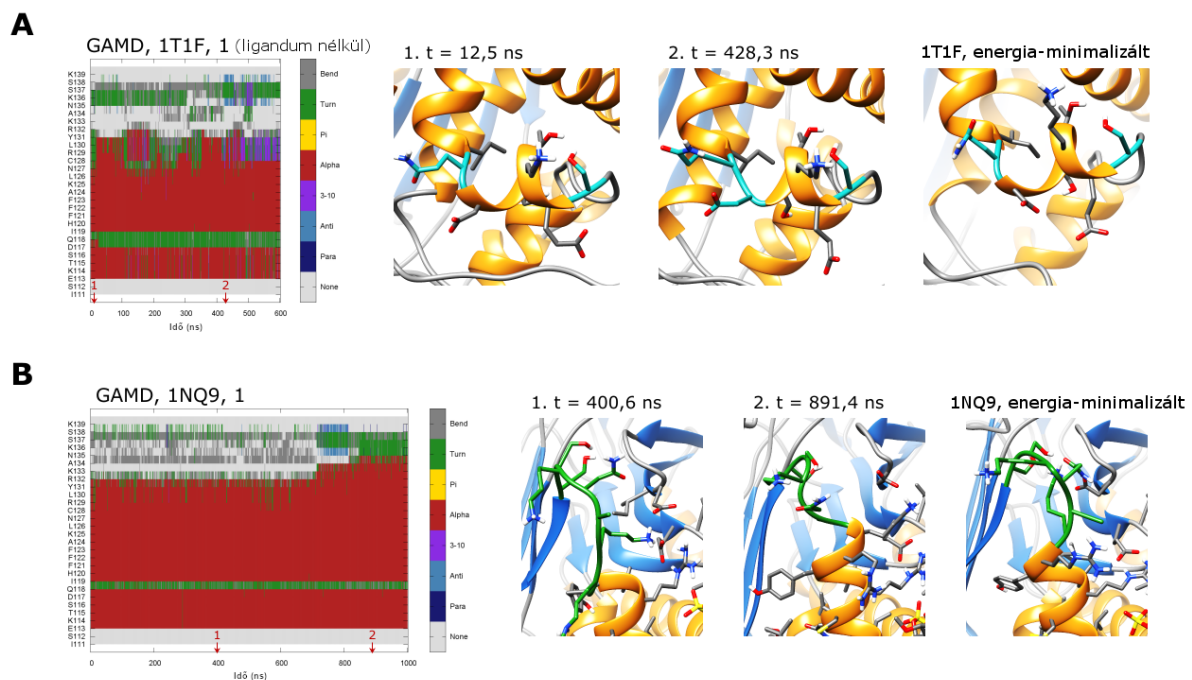
14. ábra: A pentaszacharid negatívan töltött csoportjai, valamint az antitrombin pozitív töltésű oldalláncai közötti kölcsönhatások a három 1 μ s-os szimulációból. Két atom között akkor feltételeztünk kölcsönhatást, ha a két atom távolsága 5 Å alatt volt.

6.2.2 Az antitrombin konformációváltozásai

Az AT konformációs aktiválásának atomi szintű részleteire vonatkozó adatok döntően röntgendiffrakciós szerkezetekből származnak. A lejátszódó konformációváltozásokat két részfolyamatra bonthatjuk aszerint, hogy ezek a változások a nem-aktivált állapothoz képest már az aktiváció „köztes” állapotában (1NQ9(42)) is megfigyelhetőek, vagy csak a teljesen aktivált állapotban (1E03(38), 1AZX(41)). Az első lépés leginkább az A és a D hélixekhez közeli régiók konformációját érinti, a pentaszacharid kötőhelyet is beleértve. A P hélix kialakulását is általában ide sorolják, az irodalomban azonban elérhető olyan röntgendiffrakciós szerkezet is, ahol ez a hélix nem-aktivált állapotban is megfigyelhető. A második lépésben megy végbe a „hinge” régió kimozdulása az „A” β -redőbe rögzült helyzetéből, valamint a D hélix meghosszabbodása a C-terminális irányba, a pentaszacharid kötődés ezen folyamatokban még erősebbé válik.

A P hélix kialakulásának vizsgálatára korábban kísérletet tettünk olyan GAMD szimulációkkal, amelyek az AT 1E04 röntgendiffrakciós szerkezetéből indultak ki (38), amely nem tartalmazza ezt a szerkezeti elemet. Ezekben az „előzetes” szimulációkban azonban javított mintavételezés mellett sem sikerült a P hélix kialakulására utaló jeleket észlelnünk (12. kiegészítő ábra). Emiatt a munkánkban a pentaszacharid kötődését egy olyan, nem-aktivált AT konformációhoz vizsgáltuk (1T1F), amely eleve tartalmazza a P hélixet (43). A hélix a DSSP adatok alapján az összes GAMD (és az összes egyensúlyi) dinamikai szimulációban igen stabilnak bizonyult (13. kiegészítő ábra). Az egyik pentaszacharid nélküli szimulációban

kismértékű konformációváltozás volt megfigyelhető a hélix C-terminális része közelében, azonban a hélix többi része ennél a szimulációnál is stabil volt (15/A ábra). Tehát ez a változás igazából nem mond ellent a feltevésünknek, viszont részleteket árulhat el a hélix kialakulásának mechanizmusáról. A hélix stabilitásával kapcsolatos korábbi, egyensúlyi molekuladinamikai szimulációval nyert eredményeinket (120) javított mintavételezésű szimulációk segítségével is megerősítettük. Ez alapján felmerül, hogy az ilyen konformációk jelentős arányban jelen lehetnek fiziológias körülmények között és szerepet játszhatnak az AT heparin-kötődési mechanizmusában.

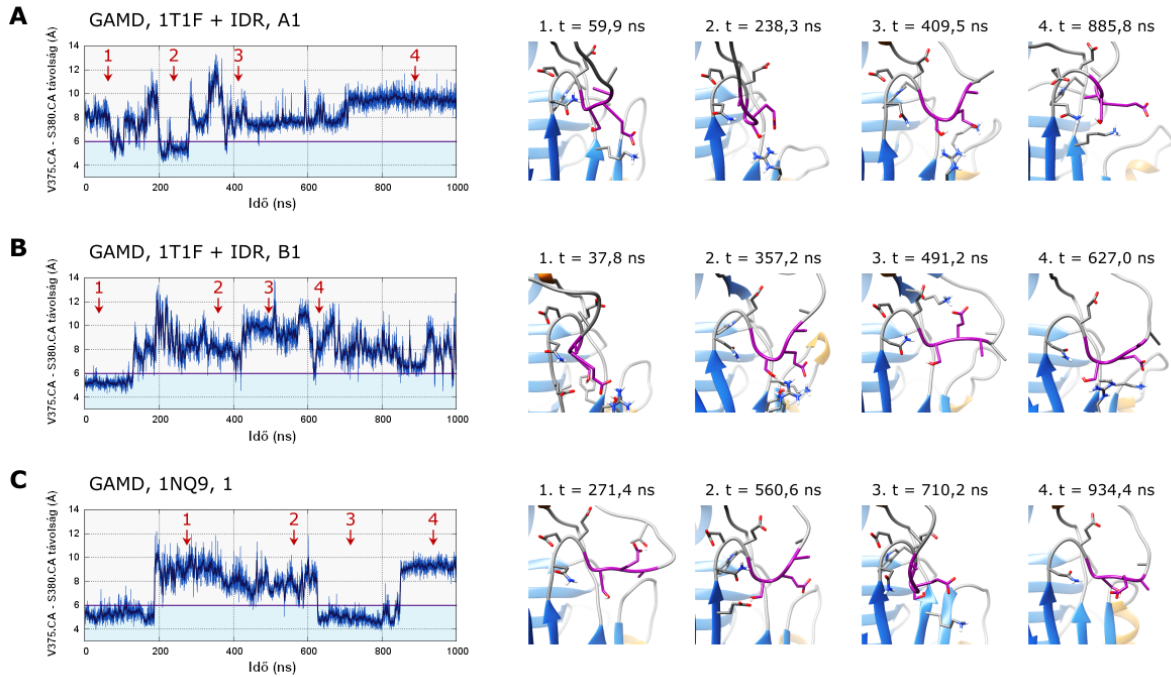


15. ábra: A P, illetve a D hélix konformációváltozásai. **A.** A P hélix konformációváltozása ez egyik olyan GAMD szimulációban, amely nem tartalmazott pentaszacharid ligandumot. Az ábrán a 110-139 régió DSSP módszerrel meghatározott másodlagos szerkezetét tüntettük fel, két „representatív” konformációval együtt. Összehasonításként feltüntettük ugyanezt a régiót az „1T1F” röntgendiffrakciós szerkezetben is. A „representatív” konformációk kiválasztásának módja a „Trajektóriaanalízis” fejezetben található. Az α -hélixket narancssárga, a β -redőket kék, a konformációváltozásban érintett, másodlagos szerkezet nélküli peptidszakaszokat zöld színnel jelöltük. **B.** A D hélix meghosszabbodása az egyik GAMD szimulációban, ahol az „INQ9” AT-pentaszacharid szerkezetet használtuk kiindulási struktúrának. A reprezentatív konformációkat klaszteranalízis segítségével nyertük (2/A kiegészítő ábra).

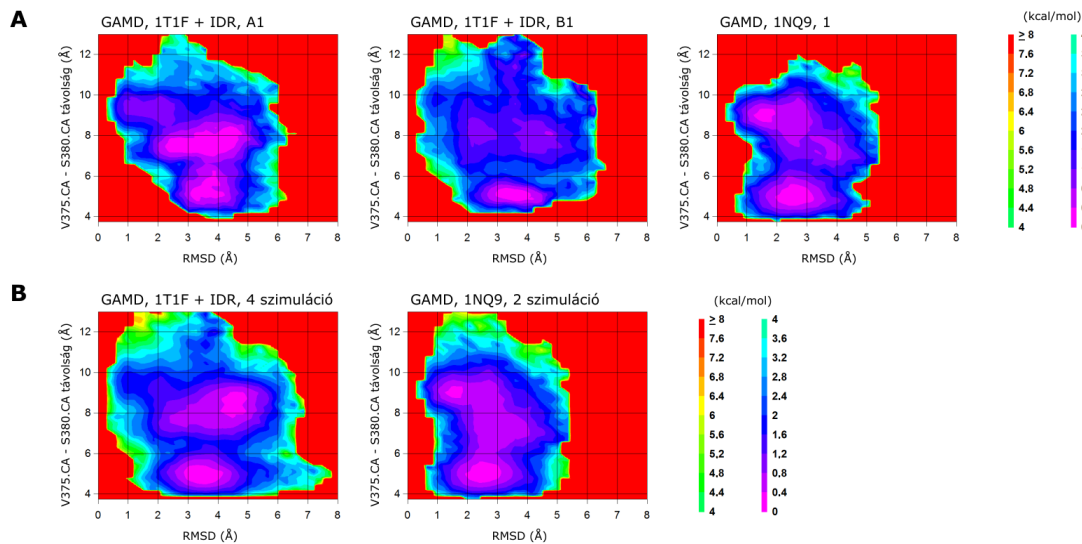
A hinge régió kimozdulása - a témában megjelent legfrissebb közlemények alapján - feltehetően az aktiváció második lépésében megy végbe (6, 45). Ezzel szemben Langdown és munkatársai azt javasolták, hogy a régió „zárt” és „nyílt” konformációja között konformációs egyensúly állhat fenn, és az A β -redő záródása rögzítheti ezt a molekulárszt a „nyitott” állapotban (46).

A trajektóriákban a „hinge” régió konformációját a Val375 és a Ser380 aminosavak α -szénatomjai közötti távolsággal jellemeztük. Ezt a távolságot az idő függvényében valamennyi pentaszacharidot tartalmazó szimulációra a 14. kiegészítő ábrán tüntettük fel. Ezen paraméter alapján a „nyitott” (kimozdulás utáni) és „zárt” konformációk jól elkülöníthetők, előbbi esetben a távolság megközelítően 6 Å felett, utóbbi esetben ez alatt van. A távolság számításán túl „representatív” konformációk kiválasztása céljából klaszteranalízist is végeztünk, ennek eredményét az 16. ábrán és az 5. kiegészítő ábrán tüntettük fel. A *hinge* régió kimozdulását a zárt konformációból 2 szimuláció kivételével valamennyi esetben sikerült megfigyelnünk. A hinge régió zárt pozícióba való "visszatérését" három szimuláció esetén sikerült észlelnünk, a 16. ábrán feltüntetett A1 és az 1NQ9 rendszert vizsgáló egyik szimulációt is beleértve (lásd a 14. kiegészítő ábrát).

A „*hinge*” régió kilökődését és a pentaszacharid kötődését a GAMD szimulációkból végzett szabadenergia-számítások (*reweighting*) segítségével is vizsgáltuk. A két reakciókoordináta az említett Val375-Ser380 távolság, valamint a pentaszacharid RMSD-je (számítási módját lásd korábban) voltak. A kiértékelést elvégeztük az összes GAMD szimulációra külön-külön, illetve a négy „1T1F és pentaszacharid” és a két „1NQ9” szimulációkból származó adatok egyesítésével is (17. ábra és 15. kiegészítő ábra). Az eredményeink alapján a „*hinge*” régió kimozdulása nem csak az aktiváció folyamatának egyik utolsó lépéseként mehet végbe. A D hélix meghosszabbodásának hiánya miatt valószínűtlen, hogy az A1 és a B1 rendszerek „teljesen” aktivált állapotba kerültek volna a szimuláció során. Az „1NQ9” rendszer 1 μ s-os szimulációjában viszont ez a konformációváltozás is megfigyelhető volt (14/B ábra), tehát ez esetben valószínűsíthető, hogy az AT elérte ezt az állapotot. A „teljesen” aktivált állapot eléréséhez szükséges konformációváltozás talán az A β -redő „záródása” lehet, ez a változás jól látható az 15/C ábrán.



16. ábra: Az „hinge” régió „representatív” konformációi a három 1 μ s-os szimulációból. A K236.CA – I390.CA távolságot használtuk a konformáció jellemzésére. Az alacsony értékek (kevesebb mint 6 Å) a zárt, beékelődött állapotnak felelnek meg. A „representatív” konformációkat klaszteranalízis segítségével választottuk ki (lásd Trajektóriaanalízis fejezet, valamint 2/B. kiegészítő ábra)



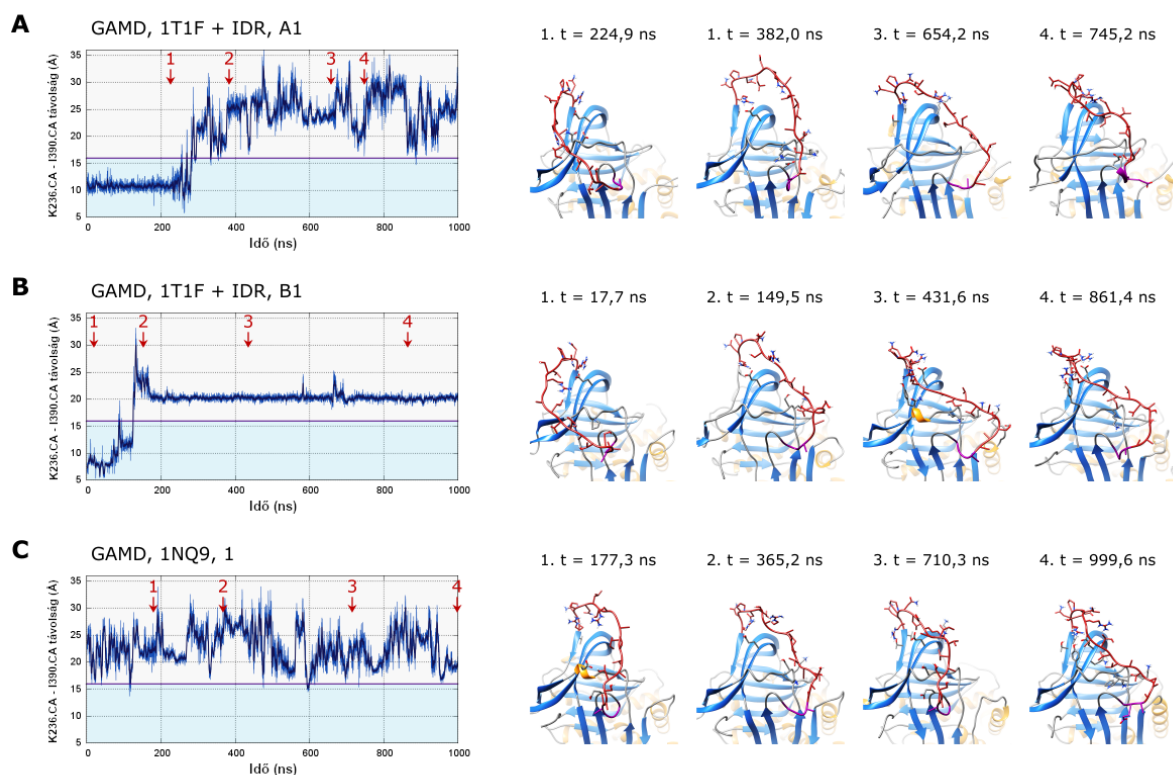
17. ábra: A. „GAMD reweighting” segítségével nyert kétdimenziós szabadenergia-felületek a három 1 μ s-os szimulációra B. Két további „GAMD reweighting” számítás eredménye, a négy „nem-aktivált AT és hozzáadott pentaszacharid”, illetve a két „1NQ9” szimulációra.

A D hélix jelentős meghosszabbodását kizárólag az egyik olyan szimulációban sikerült megfigyelni, amely az AT-pentaszacharid komplex szerkezetben (1NQ9, 1. szimuláció) alapult (15/B ábra). A konformációváltozás körülbelül 720 ns-nál kezdődött, a trajektória ~850 ns utáni részében nagyobb részben meghosszabbodott hélixet tartalmazó konformációk fordultak elő. A hélix ebben az állapotban körülbelül egy aminosavval rövidebb annál, amit az „aktivált” állapotok röntgendiffrakciós szerkezetében (például 1E03 (38)) megfigyelhetők. Mivel egyidejűleg a „hinge” régió kimozdulása is végbement, feltételezhetjük, hogy az AT a „köztes” aktiváltságú állapotból kiindulva „teljesen” aktivált állapotot ért el.

A reakciócentrumot tartalmazó hurok (RCL) nélkülözhetetlen szerepet játszik a szerpinek inhibíciós mechanizmusában. Azonban az RCL oldatbeli konformációjával kapcsolatban a röntgendiffrakciós vizsgálatok csak korlátozottan szolgáltatnak adatokat, ugyanis ezek a szerkezetek egyfelől egy kristályrácsban „rögzült” állapotot mutatnak, másrészt a kristályon belüli kölcsönhatások nagy mértékben befolyásolják a konformációt annak flexibilitása miatt. Több elérhető AT szerkezet valójában egy „natív” és egy latens molekula dimerjét mutatja, amelyben a natív molekula RCL-je szoros kölcsönhatásokat alakít ki a latens molekulával, ezáltal befolyásolva a konformációt. Johnson és munkatársai az AT egy olyan szerkezetét publikálták (PDB: 1T1F), ahol egy „mesterségesen” kialakított diszulfid híddal megakadályozták az átmenetet a latens formába. Ez a struktúra azonban az RCL egy eddigiektől jelentősen eltérő konformációját mutatták (43). A tanszékünk egy korábbi munkájában hosszú (2 μ s) molekuladinamikai szimulációkkal vizsgáltuk az RCL szerkezetét oldatfázisban, mindkét korábban említett konformációs típusból kiindulva. Az egyensúlyi dinamikai szimulációkban egyáltalán nem tapasztaltunk átmenetet a két forma között, viszont sikerült kimutatnunk az átmenet lehetőségét az egyik irányba egy metadinamikai szimulációval. (120)

A 18. ábrán bemutatott konformációkat, hasonlóan a „hinge” régióhoz, klaszteranalízis alapján választottuk ki. A távolság jellemzésére az Arg236 és az Ile390 aminosavak α -szénatomjai közötti távolságot választottuk, ez alapján a két konformációs típus jól elkülöníthető. (A paraméter időbeli változását a 16. kiegészítő ábrán tüntettük fel valamennyi rendszerre.) Az A1 és a B1 szimulációk kezdetén a vizsgált távolságadat értéke jóval 15 Å alatt maradt. Ez körülbelül megfelel az RCL 1T1F szerkezetben megfigyelhető pozíciójának. Az A1 szimuláció esetén kb. 270 ns-nál, míg a B1 esetén kb. 140 ns-nál jelentős

konformációváltozás volt tapasztalható. Ettől a ponttól kezdve mindkét esetben döntően olyan konformációk voltak megfigyelhetők, ahol az Arg236.CA – Ile390.CA távolság 15 Å felett volt. Az A1 trajektóriában a paraméter igen széles tartományban változott, viszont a tartomány majdnem azonos volt azzal (körülbelül 16-32 Å), ami az eltérő RCL konformációt mutató 1NQ9 szerkezetből (AT-pentaszacharid komplex) indított 1 µs-os GAMD szimulációnál volt tapasztalható. Ezzel szemben a B1 szimulációban ~ 180 ns után az RCL konformációja viszonylag stabil volt, 21 Å körüli Arg236.CA – Ile390.CA távolsággal. Az 1NQ9 rendszer 1 µs szimulációjában számos, eltérő RCL konformáció volt megfigyelhető, azonban kevés esett ezek közül a 15–18 Å tartományba. A Langdown és munkatársai által publikált szerkezet (1T1F) „alternatív” konformációjához hasonló formát pedig egyáltalán nem figyeltünk meg.



18. ábra: Az RCL „representatív” konformációi a három 1 µs-os szimulációból. A K236.CA – I390.CA távolságot használtuk a hurok pozíciójának jellemzésére. Az alacsony értékek (5 – 16 Å) az „1T1F” szerkezetbelihez hasonló konformációknak felelnek meg. A „representatív” konformációkat klaszteranalízis segítségével választottuk ki (lásd Trajektória-analízis fejezet, valamint 2/B. kiegészítő ábra).

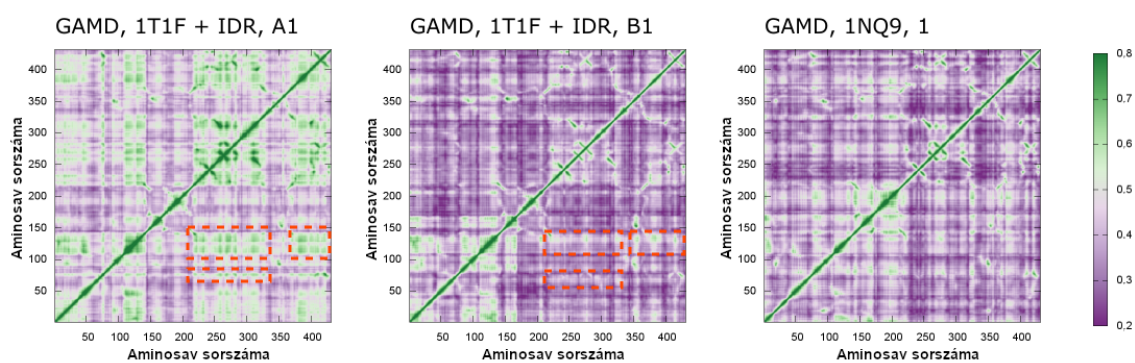
Azonban a javított mintavételezés ellenére is, vagy csak egyetlen átmenetet tapasztaltunk a két főbb konformációs típus között, vagy egyáltalán nem tapasztaltunk átmenetet. Ennek lehetséges oka, hogy a két állapot között az átmenetet valamilyen energiagát lassítja, még javított mintavételezés mellett is. Az RCL konformációváltásait szabadenergia-felületek segítségével is jellemezni próbáltuk, az energiafelületeket „GAMD reweighting” segítségével számítottuk, az RCL, illetve a „hinge” régió pozícióját leíró két reakciókoordináta segítségével. Ennek eredményét a 17. kiegészítő ábra tartalmazza. Az ábrák alapján arra következtethetünk, hogy az RCL két konformációs típusa közötti átmenetet valamilyen energiagát lassíthatja. Az is lehetséges azonban, hogy az 1NQ9-szerű konformációk esetén a konformációs tér nagy mérete miatt nem volt elegendő a mintavételezés.

6.2.3 Allosztérikus folyamatok

A pentaszacharid kötődése olyan allosztérikus folyamatokat indít el az AT-ban, melyek végeredményben az FXa és az FIXa hatékonyabb gátlásához vezetnek. Az ilyen útvonalak tanulmányozása tehát elengedhetetlen az allosztérikus aktiválás megértéséhez. Ezeket a folyamatokat korábban röntgendiffrakciós szerkezetek (6, 46), valamint molekuladinamikai szimulációk segítségével egyaránt vizsgálták (120-122). Az allosztérikus folyamatokat a szimulációink kimenetéből Lange és Grubmüller módszere segítségével vizsgáltuk (110). A kapott korrelációs mátrixokat a 19. ábrán és a 18. kiegészítő ábrán tüntettük fel.

Az A1 szimuláció esetén különös jelentősége lehet azon korrelált mozgásoknak, amelyeket a D hélix, valamint a fehérje 230-310 aminosavak közelében sikerült kimutatnunk. Az utóbbi régióban találunk több olyan aminosavat (Asn233, Arg235, Glu237, Tyr253 és Glu255), amelyeknek korábban nagy jelentőséget tulajdonítottak az FXa és az FIXa faktorokkal való kölcsönhatásban („exosite”) (123), míg a D hélix a pentaszacharid kötésében játszik kulcsszerepet. Egy további régió, melynek szerepe lehet az allosztérikus folyamatokban, (a 75-78 aminosavak környékén), a fehérje hidrofób magjához tartoznak. A véralvadási faktorok kötődésében résztvevő 233-253 régió a fehérje C-terminális részével (kb 400-432 aminosavak) is korrelációt mutat, ennek oka az lehet, hogy egymáshoz közel helyezkednek el a szerkezetben. Az 1NQ9 rendszer 1 μ s-os szimulációja esetén, amely már eleve tartalmaz egy

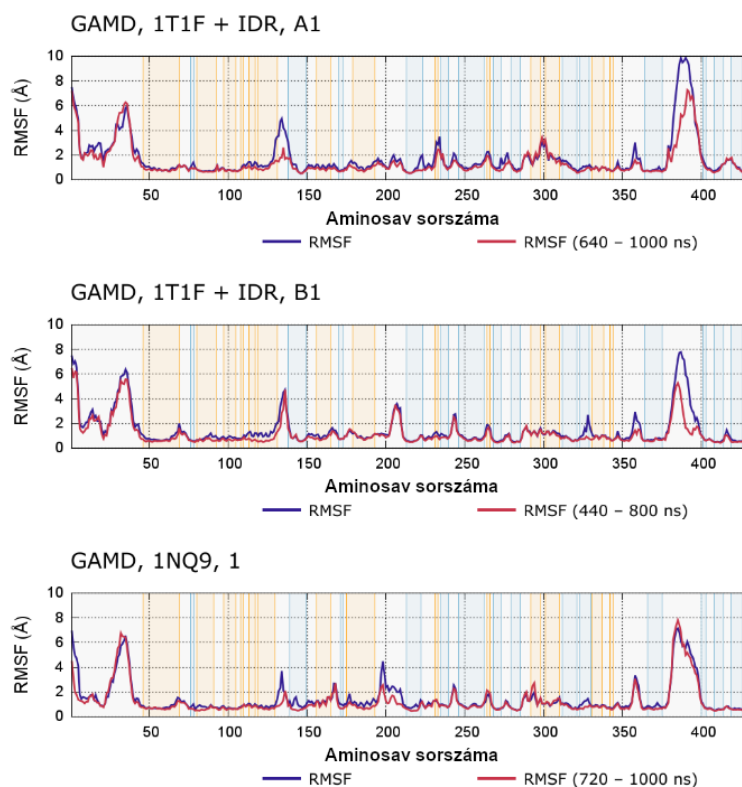
kötött pentaszacharidot, a korrelációs mátrix lényegesen különbözik az eddigiektől. Itt jelentős korrelált mozgásokat észleltünk egyrészt a korábban már említett „exosite”, az RCL és a molekula C-terminális része, másrészt a 110-230 régió aminosavainak többsége között. Az utóbbi régió magában foglalja a D , az E és az F hélixeket, valamint az A β -redő két szálát. Hasonló a helyzet a 75- 95 régió esetén is, mely többek között a B hélixet foglalja magába.



19. ábra: A három 1 μ s-os szimulációra számított „általánosított korrelációs” mátrixok Lange és Grubmüller módszere segítségével.

Ezen kívül vizsgáltuk, hogy a pentaszacharid kötődése hogyan befolyásolja az AT egyes aminosavainak flexibilitását. (20. ábra). A fluktuáció (RMSF) értékét az AT egyes α -szénatomjaira a 18. ábrán kék színnel ábrázoltuk a három 1 μ s-os szimuláció esetén. (Az eredmények az összes szimulációra az 19. kiegészítő ábrán láthatók). Az eredmények alapján a fehérje legflexibilisebb részei az RCL és a másodlagos szerkezettel nem rendelkező hurkok a fehérje N-terminális részénél. Az átlagosnál nagyobb flexibilitást tapasztaltunk a D hélix C-terminális végénél (a hélix meghosszabbodása), az F hélix C-terminális végénél (190-210. aminosavak), valamint a X-es véralvadási faktor másodlagos kötőhelyéhez közeli aminosavaknál (235-240) (123). A pentaszacharid-kötődés következményeinek vizsgálata céljából az RMSF számításokat megismételtük a három 1 μ s-os trajektória azon részeire, ahol a röntgendiffrakciós szerkezetekhez leginkább hasonló kötődési módok előfordultak (A1: 640–1000 ns, B1 440–800 ns, 1NQ9: 720–1000 ns). Csökkent fluktuációt észleltünk a heparinkötőhely közelében (110-140. aminosavak), az A1 és a B1 szimulációk esetén egyaránt. Ez feltehetően arra utal, hogy az antitrombin pentaszacharidot erősebben kötő konformációi stabilizálódhattak. Szintén változást észleltünk az RMSF-ben a 220-240

aminosavaknál. A változás különösen az A1 szimulációnál jelentős, de a B1 esetén is megfigyelhető. Több olyan aminosavat is találunk ebben a régióban (Asn233, Arg235, Glu237), amelyek feltehetően szerepet játszanak az AT és a Xa véralvadási faktorokkal való kölcsönhatásában (123). Az RCL fluktuációjának csökkenése látszólag ellentmond annak, hogy korábbi közleményekben a hurok flexibilitásának növekedését mutatták ki MD szimulációk segítségével ligandkötődés hatására (122). Azonban figyelembe kell venni, hogy az RCL rendkívül flexibilis, az analízis leszűkítése a szimuláció egyes szakaszaira valószínűleg számos konformáció „kizárását” eredményezi. Az RCL azonban a trajektóriák ezen részében is fehérje egyik legflexibilisebb részének adódik.



20. ábra: Az α -szénatomok fluktuációjának (RMSF) értéke az egyes aminosavak α -szénatomjaira a három 1 μ s-os szimulációból. A teljes trajektóriára számított értékeket kék szín jelöli. A számítást külön is elvégeztük a trajektóriák azon részeire, ahol az alacsony RMSD-val rendelkező állapotok leginkább előfordultak (piros). A háttér az adott régióra jellemző másodlagos szerkezet alapján színeztük (narancs: α -hélix, kék: β -redő.).

7. Konklúzió

A munkánk során az aktivált FXIII A alegység katalitikus mechanizmusának első, acilezési lépését tanulmányoztuk hibrid QM/MM módszerek segítségével. Szemben a hasonló katalitikus triádot tartalmazó cisztein protázokkal, tudomásunk szerint egyetlen humán transzglutamináz enzimre sem volt elérhető az irodalomban kvantumkéimiai számításokkal alátámasztott reakciómechanizmus. Célunk a katalitikus triád részét képező Cys314 és His373 aminosavak protonáltságának vizsgálata, valamint a nukleofil támadás egyes részfolyamatainak tanulmányozása volt.

A Michaelis-komplexben a cisztein tiolát-protonált hisztidin forma mindkét alkalmazott módszertan esetén lényegesen stabilabbnak adódott a neutrális His-Cys párt tartalmazó formánál. Hasonló eredményt kaptunk az enzim nyugvó, szubsztrátot nem tartalmazó formájára is. A nagy energiakülönbség miatt utóbbi forma előfordulási valószínűsége nagyon alacsony. Így valószínűtlennek tekinthető egy olyan mechanizmus, ahol a protonátmenet a ciszteinről a hisztidinre azonos elemi lépésben menne végbe a nukleofil támadással. Az ONIOM-típusú QM/MM számításaink alapján az acilezésre egy kétlépéses mechanizmust kaptunk, ahol az első lépésben történik a Cys314 kénatom nukleofil támadása, valamint a protonátmenet a szubsztrát amid $-NH_2$ csoportjára, ezt követi a C-N kötéshasadás és az ammónia leválása. A két lépés közül az első a sebességmeghatározó, a második ehhez képest valószínűleg igen gyorsan végbemegy. Ezzel szemben a QM/MM MD számításaink alapján mindhárom részfolyamat egyetlen elemi lépésben ment végbe. A két különböző protokoll segítségével kapott mechanizmusok közti eltérés oka egyfelől a QM/MM MD esetén alkalmazott félempirikus módszer lehet a magas szintű QM módszerekkel szemben. Az eltéréshez hozzájárulhat az explicit oldószer alkalmazása is a solvatáció figyelembe vételére a QM/MM MD módszer esetén. Az általunk kapott mechanizmus részben attól is különbözik, amit Iismaa és munkatársai a transzglutamináz 2-re javasoltak: a számításaink alapján az intermedier vagy ikerionos szerkezetű (ONIOM-típusú számítások), vagy nem is mutatható ki (QM/MM MD), szemben az irodalomban javasolt oxianionos intermedierrel és neutrális $-NH_2$ csoporttal.

Az AT pentaszacharid-kötődési mechanizmusát egyensúlyi, valamint javított mintavételezésű MD szimulációk segítségével vizsgáltuk. Ehhez egy olyan röntgendiffrakciós úton meghatározott AT-konformációt alkalmaztunk, amely nem tartalmaz pentaszacharidot vagy más szerkezetű aktivátort. Két egymástól független szimulációban sikerült olyan kötött

állapotokat megfigyelnünk ahol a pentaszacharid RMSD-je 1 Å alatti volt „részlegesen aktivált” AT 1NQ9 röntgendiffrakciós szerkezetéhez képest. E két trajektória, valamint további javított mintavételezésű szimulációink alapján következtetéseket tudunk levonni az AT kötődés hatására végbemenő konformációváltozásainak a részleteiről, például a „hinge” régió kimozdulása és a D hélix C-terminális irányú hosszabbodása. A P hélix a „javított mintavételezés” ellenére is igen stabilnak bizonyult a pentaszacharidot nem tartalmazó szimulációk esetén is, megerősítve a tanszékünk egy korábbi munkájában egyensúlyi MD szimulációkkal kapott eredményeket. Ez alapján felmerül, hogy az ilyen konformációk fiziológias körülmények között is előfordulhatnak, és szerepet játszhatnak a heparin-származékok kötődésében. Több trajektóriában is meg tudtuk figyelni a hinge régió kimozdulását az „A” β -redőbe zárt helyzetéből, valamint a visszahelyeződését is a redőbe. Azonban az irodalomban szereplő javaslatokkal szemben a kimozdulásnak nem volt feltétele az, hogy az AT elérje a „maximálisan” aktivált állapotot. Erre leginkább abból következtethetünk, hogy több esetben nem mentek végbe az ezzel a feltételezések szerint egy időben lejátszódó folyamatok, például a D hélix meghosszabbodása. A D hélix konformációváltozását egyetlen szimulációban sikerült megfigyelnünk, mely a „részlegesen” aktivált AT szerkezetéből (1NQ9) indult. Összhangban vannak az eredményeink viszont egy olyan modellel, ahol a hinge régió kétféle konformációja egymással egyensúlyban van és az egyensúlyt az AT aktiváltsági állapota befolyásolja. A GAMD módszer az RCL oldatbeli konformációinak hatékonyabb vizsgálatát is lehetővé tette.

A GAMD módszer egyik alkalmazási területe a receptor-ligand kölcsönhatások mechanizmusának tanulmányozása. A munkánk alátámasztja a módszer alkalmazhatóságát egy heparin analógra, mely több szempontból is jelentősen különbözik a korábbi tanulmányokban alkalmazott molekuláktól (nagy flexibilitás a szénhidrát struktúra miatt, többszörös negatív töltés). A GAMD módszer potenciálisan hasznos lehet különböző pentaszacharid-származékok kötődésének az összehasonlítására, és információkat nyújthat új AT-függő véralvadástgátlók fejlesztéséhez. Másrészt az AT esetén leírtak több olyan mutációt, amelyek a heparin-kötés zavarát okozzák (7, 8, 124). GAMD szimulációk révén tanulmányozható lehet, hogy milyen mechanizmus révén befolyásolják a kötődést az egyes mutációk.

8. A jelölt saját eredményei, új megállapításai

Az aktivált XIII-as vérvadási faktor katalitikus mechanizmusának első lépése

- A munkánkban elsőként javasoltunk QM/MM számításokkal alátámasztott modelleket egy humán transzglutamináz enzim, az (aktív) XIII-as faktor A alegység katalitikus mechanizmusának első, acilezési lépésére, két eltérő QM/MM protokoll alkalmazásával.
- A katalitikus centrum Cys314 és His373 aminosavaira az ionpár forma jóval stabilabbnak adódott a neutrális formánál, mindkét QM/MM módszertan alkalmazásával is. Ez eltér attól amit Case és Stein javasolt transzglutamináz 2-re, azonban megfelel több, cisztein proteáz enzimekre kapott eredménynek.
- Az ONIOM-alapú modellel végzett számításainkban, ahol a QM alrendszerre MP2 módszert vagy különböző DFT módszereket alkalmaztunk, az acilezés egy kétlépéses folyamatnak adódott. Hibrid QM/MM MD szimulációinkban azonban eltérő mechanizmust tapasztaltunk, itt mindhárom részfolyamat (nukleofil támadás, protontranszfer, ammónia leválása) koncertikus módon ment végbe.
- A mechanizmusok közötti különbség valószínűleg módszertani okokra vezethető vissza: az ONIOM sémában magas szintű kvantumkémiai módszereket (MP2, DFT) tudunk alkalmazni, míg a QM/MM MD metadinamikai szimulációink konformációs mintavételezést tesznek lehetővé félempirikus módszer alkalmazásával.

Az antitrombin pentaszacharid-kötési mechanizmusa

- A „javított” mintavételezést lehetővé tévő GAMD módszerrel vizsgáltuk egy pentaszacharid-származék, az idraparinux kötődését egy röntgendiffrakciós úton meghatározott, nem-aktivált AT konformációhoz.
- Két, egymástól független szimulációban is jelentős számú olyan konformációt figyeltünk meg, amelyek a pentaszacharid RMSD alapján nagyon hasonlóak a röntgendiffrakciós úton meghatározott kötődési módhoz.
- Két különböző rendszerre (nem-aktivált AT és hozzáadott pentaszacharid, „részlegesen” aktivált AT (1NQ9)-pentaszacharid komplex) futtatott GAMD szimulációk segítségével atomi szinten tudtuk vizsgálni a „hinge” régió kimozdulását,

a D hélix konformációváltozásait, valamint ezek kapcsolatát a pentaszacharid kötődésével.

- Javított mintavételezésű szimulációkkal is megerősítettük a P hélix stabilitását az AT „nem-aktivált” állapotában. Ez alapján felmerül, hogy az ilyen konformációknak fiziológias körülmények között is jelentősége lehet.
- „Általánosított” korrelációs mátrixok alapján sikerült olyan részeit azonosítani a molekulának, amelyek részt vehetnek az allosztérikus jel továbbításában a pentaszacharid-kötőhely felől az FXa és az FIXa *exosite*-ja felé.

9. Összefoglaló

A FXIII A alegysége (FXIII-A) a humán transzglutaminázok családjába tartozó multifunkciós fehérje. Elérhető ugyan az irodalomban egy javasolt reakciómechanizmus ezekre az enzimekre, azonban ezt nem támasztják alá QM/MM alapú számítások. A reakciómechanizmust részleteiben vizsgáló *in vitro* mérések kizárólag a transzglutamináz 2-re érhetőek el, a FXIII A alegységre azonban nem. A célunk egy javasolt reakciómechanizmus felállítása volt FXIII-A transzglutamináz reakció első lépésére (tioészter intermedier létrejötte), hibrid QM/MM számítások alapján. A mechanizmust két eltérő QM/MM alapú protokoll szerint is vizsgáltuk: egy ONIOM alapú módszer alkalmazásával, ahol a QM alrendszerénél magas szintű MP2 vagy DFT módszereket használtunk, valamint félempirikus QM/MM MD szimulációkat a DFTB3 félempirikus módszerrel. A Cys314-His373 aminosavak ionpár formája lényegesen stabilabbnak bizonyult a neutrális formánál, mindkét protokoll szerint. Az ONIOM-típusú számításaink alapján a tioészter intermedier egy kétlépéses folyamat révén alakul ki. Az első lépésben történik a nukleofil támadás és az amid $-NH_2$ csoport protonálódása, míg a második lépésben megy végbe az ammónia felszabadulása. Ezzel szemben a QM/MM MD szimulációinkban mindhárom részfolyamat egyetlen elemi lépésben ment végbe.

Jelentős mennyiségű információ áll rendelkezésre az irodalomban az antitrombin (AT) pentaszacharid-kötésével és allosztérikus aktiválásával kapcsolatban. Azonban a rendelkezésre álló röntgendiffrakciós szerkezetek nem adnak teljes képet a konformációváltozások dinamikus természetéről, a legkorábbi lépésekkel kapcsolatban pedig csak reakciókinetikai mérések érhetőek el. A munkánk során a kötődési mechanizmust, valamint az AT konformációváltozásait egy javított mintavételezésű MD módszer (GAMD) segítségével vizsgáltuk. Egy nem-aktivált AT konformáció röntgenkristallográfiás szerkezetéből kiindulva, két egymástól független MD trajektóriában is sikerült jelentős számú AT konformációt észlelnünk, ahol a pentaszacharid RMSD-je a komplex szerkezetéhez képest alacsony volt. Ezek, valamint további trajektóriák alapján, ahol az AT-pentaszacharid komplexét használtuk kiindulási szerkezetnek, sikerült képet alkotnunk az AT több konformációváltozásáról, például a „hinge” régió kimozdulásáról és a D hélix meghosszabbodásáról. Sikerült megerősítenünk a P hélix korábban egyensúlyi MD szimulációkban megfigyelt jelentős stabilitását az AT nem-aktivált állapotában. „Általánosított korrelációs” számítások révén sikerült meghatároznunk a molekula olyan régióit, melyek feltehetően szerepet játszanak az allosztérikus szignál továbbításában a pentaszacharid-kötőhely felől az FIXa és az FXa faktorok „másodlagos” kötőhelye felé.

10. Summary

The A subunit of factor XIII (FXIII-A) is in its active form a multifunctional enzyme belonging to the human transglutaminase family. Although a proposed reaction mechanism has been published for these enzymes, no QM-based calculations have been performed to confirm this. Additionally, the mechanism was studied in details in case of transglutaminase 2, but not in the case of FXIII-A. Our aim was to propose a mechanism for the first step of the reaction (*i.e.* formation of a thioester intermediate), supported by QM/MM based calculations. The reaction mechanisms were investigated using two different QM/MM based protocols: an ONIOM-based model where high level MP2 or DFT methods were applied to the QM subsystem, and QM/MM MD simulations, where the QM region was treated using the semiempirical method DFTB3. In our calculations using both protocols, the ion pair form of Cys314 and His373 was predicted to be significantly more stable than neutral form. The formation of the thioester intermediate was calculated to be a two-step process using the ONIOM protocol, the nucleophilic attack and the ammonia release took place in the first, the ammonia release in the second step. However, in our QM/MM MD based metadynamics simulations, all three events occurred in the same reaction step.

Significant amount of information is available on the allosteric activation mechanism of the serpin antithrombin (AT), which is one of the main regulators of the coagulation cascade. However, the „static” structures obtained by X-ray crystallography cannot provide the full picture on the complex allosteric process. Furthermore, only kinetic measurements are available for the early events of binding. In the present work, the pentasaccharide-binding and conformational behavior of AT was studied by the means of an „advanced sampling” MD technique, GAMD. Using a non-activated AT conformation as starting structure, we could observe AT conformations with low RMSD compared to the X-ray structure of the complex in two independent MD trajectories. From these trajectories, as well as additional ones based on the AT-pentasaccharide complex structure, we could gain insight into the conformation changes discussed in the literature, including the expulsion of the hinge region and the expansion of helix D. We have also confirmed the high stability of the P helix in non-activated AT conformations, that was previously proposed based on „equilibrium” MD simulations. Using „generalized” correlation calculations from the trajectories, we could gain insight into the allosteric pathways connecting the pentasaccharide binding site with the FIXa and FXa binding exosites.

11. Irodalomjegyzék

1. Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, Schulman S, White GC. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice: Wolters Kluwer Health; 2012.
2. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011;91(3):931-72.
3. Stieler M, Weber J, Hils M, Kolb P, Heine A, Büchold C, et al. Structure of active coagulation factor XIII triggered by calcium binding: basis for the design of next-generation anticoagulants. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013;52(45):11930-4.
4. Senn HM, Thiel W. QM/MM methods for biomolecular systems. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(7):1198-229.
5. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:102-15.
6. Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PG. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie.* 2010;92(11):1587-96.
7. Muszbek L, Bereczky Z, Kovács B, Komáromi I. Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48 Suppl 1:S67-78.
8. Corral J, de la Morena-Barrio ME, Vicente V. The genetics of antithrombin. *Thromb Res.* 2018;169:23-9.
9. Facchiano A, Facchiano F. Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino Acids.* 2009;36(4):599-614.
10. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev.* 2009;89(3):991-1023.
11. Iismaa SE, Holman S, Wouters MA, Lorand L, Graham RM, Husain A. Evolutionary specialization of a tryptophan indole group for transition-state stabilization by eukaryotic transglutaminases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12636-41.
12. Klöck C, Khosla C. Regulation of the activities of the mammalian transglutaminase family of enzymes. *Protein Sci.* 2012;21(12):1781-91.
13. Lee CS, Park HH. Structural aspects of transglutaminase 2: functional, structural, and regulatory diversity. *Apoptosis.* 2017;22(9):1057-68.
14. Schroeder V, Kohler HP. Factor XIII: Structure and Function. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(4):422-8.
15. Komáromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost.* 2011;9(1):9-20.
16. Ambrus A, Bányai I, Weiss MS, Hilgenfeld R, Keresztessy Z, Muszbek L, et al. Calcium binding of transglutaminases: a ⁴³Ca NMR study combined with surface polarity analysis. *J Biomol Struct Dyn.* 2001;19(1):59-74.
17. Fekete A, Komáromi I, Mucs D. On the early events of the calcium-induced activation of coagulation factor XIII-A. *J Biomol Struct Dyn.* 2019:1-16.
18. Anokhin BA, Stribinskis V, Dean WL, Maurer MC. Activation of factor XIII is accompanied by a change in oligomerization state. *FEBS J.* 2017;284(22):3849-61.
19. Protopopova AD, Ramirez A, Klinov DV, Litvinov RI, Weisel JW. Factor XIII topology: organization of B subunits and changes with activation studied with single-molecule atomic force microscopy. *J Thromb Haemost.* 2019;17(5):737-48.
20. Keillor JW, Clouthier CM, Apperley KY, Akbar A, Mulani A. Acyl transfer mechanisms of tissue transglutaminase. *Bioorg Chem.* 2014;57:186-97.

21. Muszbek L, Polgár J, Fésüs L. Kinetic determination of blood coagulation Factor XIII in plasma. *Clin Chem.* 1985;31(1):35-40.
22. Kárpáti L, Penke B, Katona E, Balogh I, Vámosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem.* 2000;46(12):1946-55.
23. Cleary DB, Maurer MC. Characterizing the specificity of activated Factor XIII for glutamine-containing substrate peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1764(7):1207-17.
24. Péntzes K, Kövér KE, Fazakas F, Haramura G, Muszbek L. Molecular mechanism of the interaction between activated factor XIII and its glutamine donor peptide substrate. *J Thromb Haemost.* 2009;7(4):627-33.
25. Jasim MH, Rathbone DL. Reaction profiling of a set of acrylamide-based human tissue transglutaminase inhibitors. *J Mol Graph Model.* 2018;79:157-65.
26. Han WG, Tajkhorshid E, Suhai S. QM/MM study of the active site of free papain and of the NMA-papain complex. *J Biomol Struct Dyn.* 1999;16(5):1019-32.
27. Harrison MJ, Burton NA, Hillier IH. Catalytic Mechanism of the Enzyme Papain: Predictions with a Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Potential. *Journal of the American Chemical Society.* 1997;119(50):12285-91.
28. Shokhen M, Khazanov N, Albeck A. Challenging a paradigm: theoretical calculations of the protonation state of the Cys25-His159 catalytic diad in free papain. *Proteins.* 2009;77(4):916-26.
29. Ma S, Devi-Kesavan LS, Gao J. Molecular dynamics simulations of the catalytic pathway of a cysteine protease: a combined QM/MM study of human cathepsin K. *J Am Chem Soc.* 2007;129(44):13633-45.
30. Mladenovic M, Fink RF, Thiel W, Schirmeister T, Engels B. On the origin of the stabilization of the zwitterionic resting state of cysteine proteases: a theoretical study. *J Am Chem Soc.* 2008;130(27):8696-705.
31. Miscione GP, Calvaresi M, Bottoni A. Computational evidence for the catalytic mechanism of caspase-7. A DFT investigation. *J Phys Chem B.* 2010;114(13):4637-45.
32. 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.* 2016;18(48):32847-61.
33. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(3):386-9.
34. Huntington JA. Shape-shifting serpins--advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(8):427-35.
35. Huntington JA. Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:26-34.
36. Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 2006;7(5):216.
37. Whisstock JC, Bottomley SP. Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding. *Curr Opin Struct Biol.* 2006;16(6):761-8.
38. McCoy AJ, Pei XY, Skinner R, Abrahams JP, Carrell RW. Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *J Mol Biol.* 2003;326(3):823-33.
39. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-12.
40. Brennan SO, George PM, Jordan RE. Physiological variant of antithrombin-III lacks carbohydrate sidechain at Asn 135. *FEBS Lett.* 1987;219(2):431-6.

41. Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14683-8.
42. Johnson DJ, Huntington JA. Crystal structure of antithrombin in a heparin-bound intermediate state. *Biochemistry*. 2003;42(29):8712-9.
43. Johnson DJ, Langdown J, Li W, Luis SA, Baglin TP, Huntington JA. Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35478-86.
44. Schedin-Weiss S, Richard B, Olson ST. Kinetic evidence that allosteric activation of antithrombin by heparin is mediated by two sequential conformational changes. *Arch Biochem Biophys*. 2010;504(2):169-76.
45. Roth R, Swanson R, Izaguirre G, Bock SC, Gettins PG, Olson ST. Saturation Mutagenesis of the Antithrombin Reactive Center Loop P14 Residue Supports a Three-step Mechanism of Heparin Allosteric Activation Involving Intermediate and Fully Activated States. *J Biol Chem*. 2015;290(47):28020-36.
46. Langdown J, Belzar KJ, Savory WJ, Baglin TP, Huntington JA. The critical role of hinge-region expulsion in the induced-fit heparin binding mechanism of antithrombin. *J Mol Biol*. 2009;386(5):1278-89.
47. Levine IN. *Quantum Chemistry*: Pearson Education; 2009.
48. Kohn W, Sham LJ. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*. 1965;140(4A):A1133-A8.
49. Leach AR. *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 2nd Edition: Pearson Education; 2001.
50. Chai JD, Head-Gordon M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys Chem Chem Phys*. 2008;10(44):6615-20.
51. Zhao Y, Truhlar DG. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2008;120(1):215-41.
52. Slater JC, Koster GF. Simplified LCAO Method for the Periodic Potential Problem. *Physical Review*. 1954;94(6):1498-524.
53. Elstner M, Seifert G. Density functional tight binding. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2014;372(2011):20120483.
54. Gaus M, Cui Q, Elstner M. DFTB3: Extension of the self-consistent-charge density-functional tight-binding method (SCC-DFTB). *J Chem Theory Comput*. 2012;7(4):931-48.
55. Gaus M, Goez A, Elstner M. Parametrization and Benchmark of DFTB3 for Organic Molecules. *J Chem Theory Comput*. 2013;9(1):338-54.
56. Chung LW, Sameera WM, Ramozzi R, Page AJ, Hatanaka M, Petrova GP, et al. The ONIOM Method and Its Applications. *Chem Rev*. 2015;115(12):5678-796.
57. Vreven T, Byun KS, Komáromi I, Dapprich S, Montgomery JA, Morokuma K, et al. Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM. *J Chem Theory Comput*. 2006;2(3):815-26.
58. Dapprich S, Komáromi I, Byun KS, Morokuma K, Frisch MJ. A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives1Dedicated to Professor Keiji Morokuma in celebration of his 65th birthday.1. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 1999;461-462:1-21.
59. Schlick T. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. New York, NY: Springer New York; 2010.
60. Ponder JW, Case DA. Force fields for protein simulations. *Adv Protein Chem*. 2003;66:27-85.

61. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*. 1984;81(8):3684-90.
62. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys*. 2007;126(1):014101.
63. Nosé S, Klein ML. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Molecular Physics*. 1983;50(5):1055-76.
64. Bernardi RC, Melo MCR, Schulten K. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(5):872-7.
65. Kästner J. Umbrella sampling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2011;1(6):932-42.
66. Babin V, Karpusenka V, Moradi M, Roland C, Sagui C. Adaptively biased molecular dynamics: An umbrella sampling method with a time-dependent potential. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2009;109(15):3666-78.
67. Barducci A, Bonomi M, Parrinello M. *Metadynamics*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. 2011;1(5):826-43.
68. Laio A, Parrinello M. Escaping free-energy minima. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(20):12562-6.
69. Barducci A, Bussi G, Parrinello M. Well-tempered metadynamics: a smoothly converging and tunable free-energy method. *Phys Rev Lett*. 2008;100(2):020603.
70. Branduardi D, Bussi G, Parrinello M. Metadynamics with Adaptive Gaussians. *J Chem Theory Comput*. 2012;8(7):2247-54.
71. Miao Y, Feher VA, McCammon JA. Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation. *J Chem Theory Comput*. 2015;11(8):3584-95.
72. Miao Y, Sinko W, Pierce L, Bucher D, Walker RC, McCammon JA. Improved Reweighting of Accelerated Molecular Dynamics Simulations for Free Energy Calculation. *J Chem Theory Comput*. 2014;10(7):2677-89.
73. Bhattarai A, Miao Y. Gaussian accelerated molecular dynamics for elucidation of drug pathways. *Expert Opin Drug Discov*. 2018;13(11):1055-65.
74. Liao JM, Wang YT. In silico studies of conformational dynamics of Mu opioid receptor performed using gaussian accelerated molecular dynamics. *J Biomol Struct Dyn*. 2019;37(1):166-77.
75. Miao Y, Bhattarai A, Nguyen ATN, Christopoulos A, May LT. Structural Basis for Binding of Allosteric Drug Leads in the Adenosine A₁ Receptor. *Sci Rep*. 2018;8(1):16836.
76. Miao Y, McCammon JA. Graded activation and free energy landscapes of a muscarinic G-protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(43):12162-7.
77. Miao Y, Huang YM, Walker RC, McCammon JA, Chang CA. Ligand Binding Pathways and Conformational Transitions of the HIV Protease. *Biochemistry*. 2018;57(9):1533-41.
78. Case A, Stein RL. Kinetic analysis of the action of tissue transglutaminase on peptide and protein substrates. *Biochemistry*. 2003;42(31):9466-81.
79. Abdul S, Leebeek FW, Rijken DC, Uitte de Willige S. Natural heterogeneity of α 2-antiplasmin: functional and clinical consequences. *Blood*. 2016;127(5):538-45.
80. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19-25.
81. Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem*. 2003;24(16):1999-2012.

82. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc.* 2003;125(7):1731-7.
83. van Zundert GCP, Rodrigues JPGL, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol.* 2016;428(4):720-5.
84. van Zundert GC, Bonvin AM. Modeling protein-protein complexes using the HADDOCK webserver "modeling protein complexes with HADDOCK". *Methods Mol Biol.* 2014;1137:163-79.
85. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput.* 2015;11(8):3696-713.
86. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics.* 1981;52(12):7182-90.
87. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics.* 1993;98(12):10089-92.
88. Tao P, Schlegel HB. A toolkit to assist ONIOM calculations. *J Comput Chem.* 2010;31(12):2363-9.
89. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics.* 1983;79(2):926-35.
90. Gaus M, Lu X, Elstner M, Cui Q. Parameterization of DFTB3/3OB for Sulfur and Phosphorus for Chemical and Biological Applications. *J Chem Theory Comput.* 2014;10(4):1518-37.
91. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian 03. Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.; 2004.
92. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian 09, Revision E.01. Gaussian, Inc., Wallingford CT; 2009.
93. Kubař T, Welke K, Groenhof G. New QM/MM implementation of the DFTB3 method in the gromacs package. *J Comput Chem.* 2015;36(26):1978-89.
94. Tribello GA, Bonomi M, Branduardi D, Camilloni C, Bussi G. PLUMED 2: New feathers for an old bird. *Computer Physics Communications.* 2014;185(2):604-13.
95. DPlot, <https://www.dplot.com/index.htm>
96. Petitou M, van Boeckel CA. A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004;43(24):3118-33.
97. Balogh G, Gyöngyösi T, Timári I, Herczeg M, Borbás A, Fehér K, et al. Comparison of Carbohydrate Force Fields Using Gaussian Accelerated Molecular Dynamics Simulations and Development of Force Field Parameters for Heparin-Analogue Pentasaccharides. *J Chem Inf Model.* 2019;59(11):4855-67.
98. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993;234(3):779-815.
99. Guvench O, Mallajosyula SS, Raman EP, Hatcher E, Vanommeslaeghe K, Foster TJ, et al. CHARMM additive all-atom force field for carbohydrate derivatives and its utility in polysaccharide and carbohydrate-protein modeling. *J Chem Theory Comput.* 2011;7(10):3162-80.
100. Mallajosyula SS, Guvench O, Hatcher E, Mackerell AD. CHARMM Additive All-Atom Force Field for Phosphate and Sulfate Linked to Carbohydrates. *J Chem Theory Comput.* 2012;8(2):759-76.

101. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods*. 2017;14(1):71-3.
102. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem*. 2008;29(11):1859-65.
103. Lee J, Cheng X, Swails JM, Yeom MS, Eastman PK, Lemkul JA, et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput*. 2016;12(1):405-13.
104. Park SJ, Lee J, Patel DS, Ma H, Lee HS, Jo S, et al. Glycan Reader is improved to recognize most sugar types and chemical modifications in the Protein Data Bank. *Bioinformatics*. 2017;33(19):3051-7.
105. Case D, Betz R, Cerutti DS, Cheatham T, Darden T, Duke R, et al. Amber 2016, University of California, San Francisco 2016.
106. Salomon-Ferrer R, Götz AW, Poole D, Le Grand S, Walker RC. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *J Chem Theory Comput*. 2013;9(9):3878-88.
107. Le Grand S, Götz AW, Walker RC. SPFP: Speed without compromise—A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. *Computer Physics Communications*. 2013;184(2):374-80.
108. Roe DR, Cheatham TE. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput*. 2013;9(7):3084-95.
109. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 1983;22(12):2577-637.
110. Lange OF, Grubmüller H. Generalized correlation for biomolecular dynamics. *Proteins*. 2006;62(4):1053-61.
111. Ichiye T, Karplus M. Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. *Proteins*. 1991;11(3):205-17.
112. Marinescu A, Cleary DB, Littlefield TR, Maurer MC. Structural features associated with the binding of glutamine-containing peptides to Factor XIII. *Arch Biochem Biophys*. 2002;406(1):9-20.
113. Polgár L. Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis. *FEBS Lett*. 1974;47(1):15-8.
114. Sluyterman LA, de Graaf MJ. The fluorescence of papain. *Biochim Biophys Acta*. 1970;200(3):595-7.
115. Johnson FA, Lewis SD, Shafer JA. Determination of a low pK for histidine-159 in the S-methylthio derivative of papain by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*. 1981;20(1):44-8.
116. Lowe G. The structure and mechanism of action of papain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1970;257(813):237-48.
117. Desai UR, Petitou M, Björk I, Olson ST. Mechanism of heparin activation of antithrombin. Role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin. *J Biol Chem*. 1998;273(13):7478-87.
118. Olson ST, Björk I, Bock SC. Identification of critical molecular interactions mediating heparin activation of antithrombin: implications for the design of improved heparin anticoagulants. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(5):198-205.

119. Jairajpuri MA, Lu A, Desai U, Olson ST, Bjork I, Bock SC. Antithrombin III phenylalanines 122 and 121 contribute to its high affinity for heparin and its conformational activation. *J Biol Chem*. 2003;278(18):15941-50.
120. 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*. 2015;33(9):2023-36.
121. Pol-Fachin L, Franco Becker C, Almeida Guimarães J, Verli H. Effects of glycosylation on heparin binding and antithrombin activation by heparin. *Proteins*. 2011;79(9):2735-45.
122. Arantes PR, Pérez-Sánchez H, Verli H. Antithrombin conformational modulation by D-myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate (TMI), a novel scaffold for the development of antithrombotic agents. *J Biomol Struct Dyn*. 2018;36(15):4045-56.
123. Izaguirre G, Aguila S, Qi L, Swanson R, Roth R, Rezaie AR, et al. Conformational activation of antithrombin by heparin involves an altered exosite interaction with protease. *J Biol Chem*. 2014;289(49):34049-64.
124. Dinarvand P, Yang L, Villoutreix BO, Rezaie AR. Expression and functional characterization of two natural heparin-binding site variants of antithrombin. *J Thromb Haemost*. 2018;16(2):330-41.

12. Tárgyszavak

Tárgyszavak

XIII-as véralvadási faktor

reakciómechanizmus

kvantumkémia

hibrid QM/MM módszerek

antitrombin

kötődési mechanizmus

heparinszármazékok

allosztéria

konformációváltozás

Subject words

Coagulation factor XIII

reaction mechanism

quantum chemistry

hybrid QM/MM methods

antithrombin

binding mechanism

heparinoids

allostery

conformational change

13. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Bereczky Zsuzsannának, témavezetőmnek, a DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék vezetőjének, hogy munkámat a Klinikai Laboratóriumi Kutató tanszéken lehetővé tette, anyagi támogatást biztosított, segítséget nyújtott tudományos publikációim elkészültéhez.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Komáromi Istvánnak, aki TDK, majd később PhD munkám során rengeteg támogatást és szakmai segítséget nyújtott, és a témavezetése alatt elsajátíthattam az *in silico* módszerek alapjait.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Muszbek László professzor úrnak hasznos szakmai javaslataiért és a közleményeimmel kapcsolatban nyújtott segítségéért.

Hálával tartozom továbbá a Debreceni Egyetem ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék valamennyi munkatársának.

Hálás vagyok Dr. Fuxreiter Mónikának (DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) és Dr. Mándi Attilának (DE TTK Szerves Kémia Tanszék) a közleményem megjelenésében nyújtott nélkülözhetetlen szakmai segítségükért.

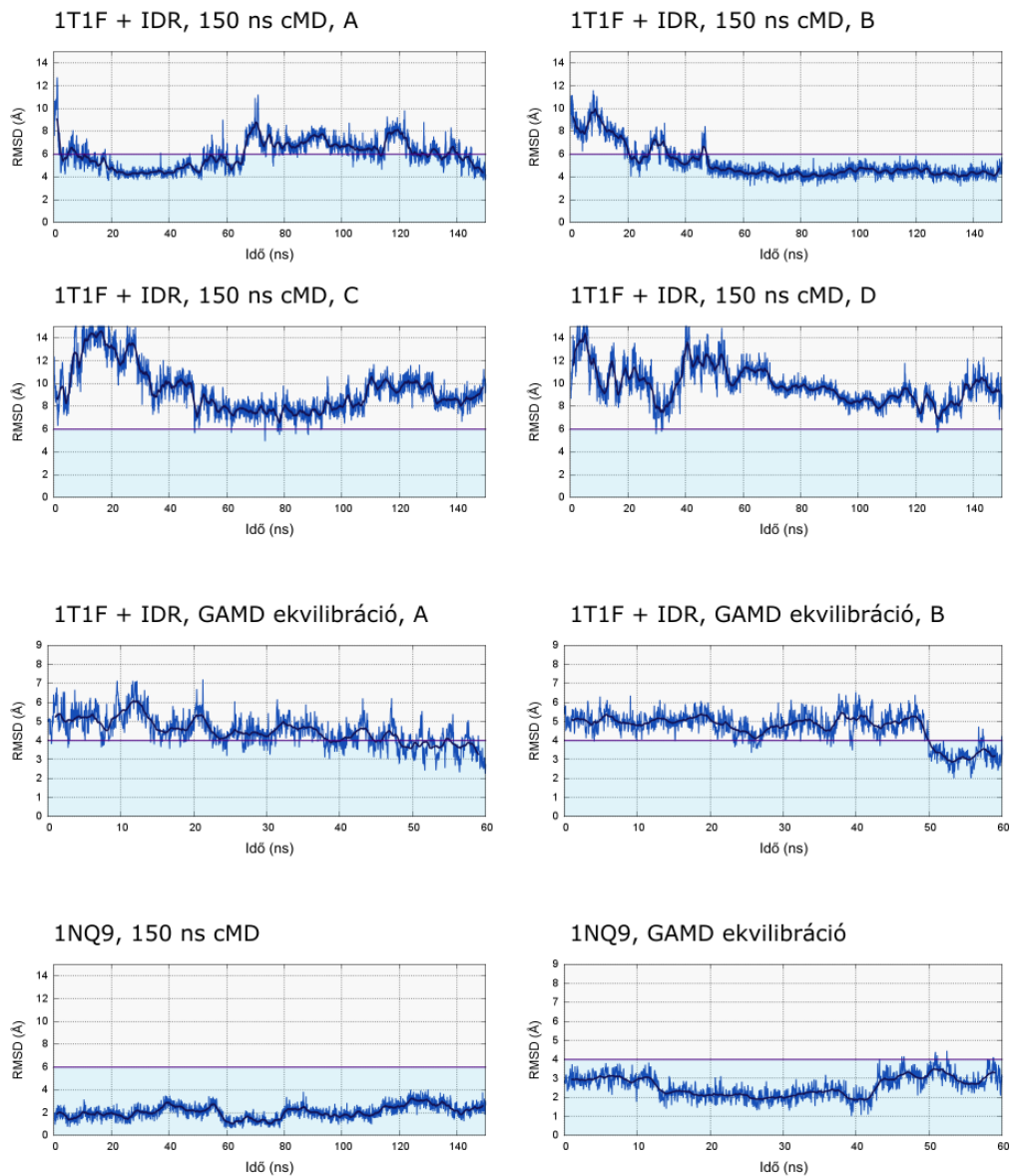
Köszönettel tartozom a Richter Gedeon Nyrt. „Talentum” alapítványának, hogy PhD tanulmányaimat ösztöndíj formájában támogatták.

Szeretném köszönetemet kifejezni a Kormányzati Informatikai Fejlesztési Ügynökségnek a tanszék számára biztosított szuperszámítógépes erőforrásért.

A munkám megvalósulását az OTKA K-106294, K-120633 és OTKA-K116228, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 pályázatok tették lehetővé.

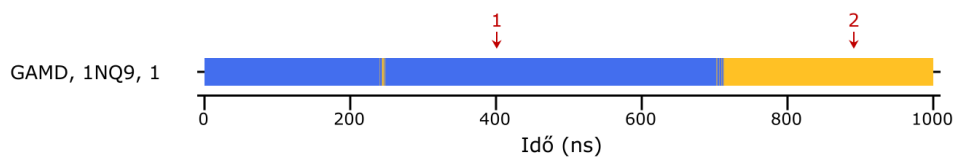
14. Függelék

14.1 Kiegészítő ábrák

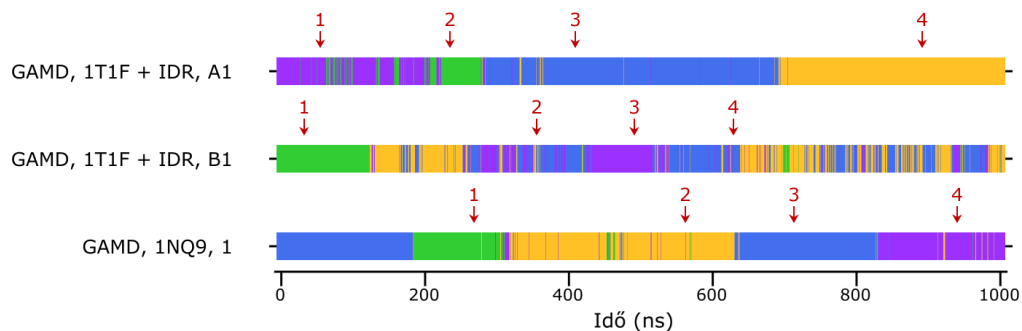


1. kiegészítő ábra: A pentaszacharid gyűrű- és inerglikozidos atomjainak RMSD-je az 1NQ9 röntgendiffrakciós szerkezethez viszonyítva, a 150 ns-os „ekvilibrációs” szimulációkban, valamint a GAMD 60 ns-os “előkészítő” szakaszában (IDR: idraparinux, a szimulációkban használt ligandum)

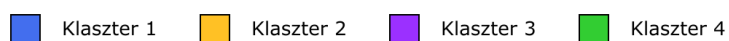
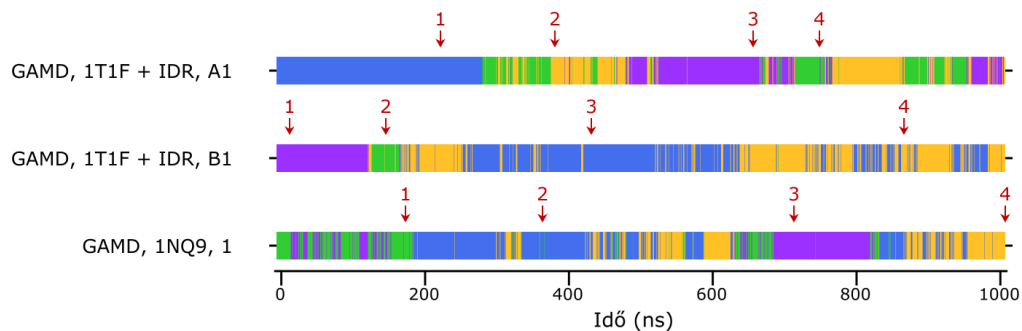
A D hélix hosszabbodása



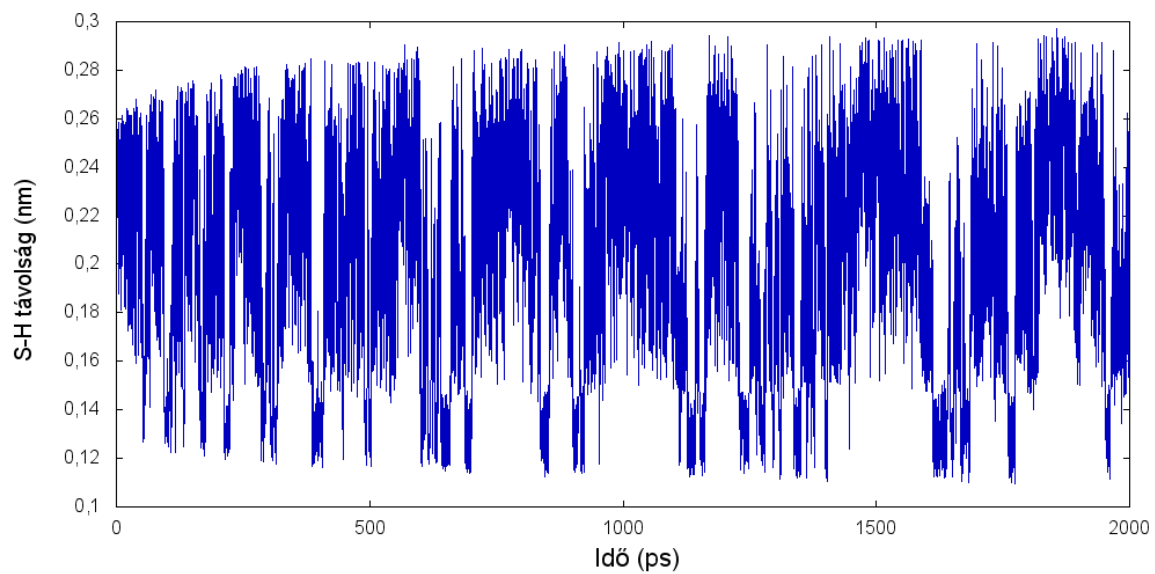
B Hinge régió kimozdulása



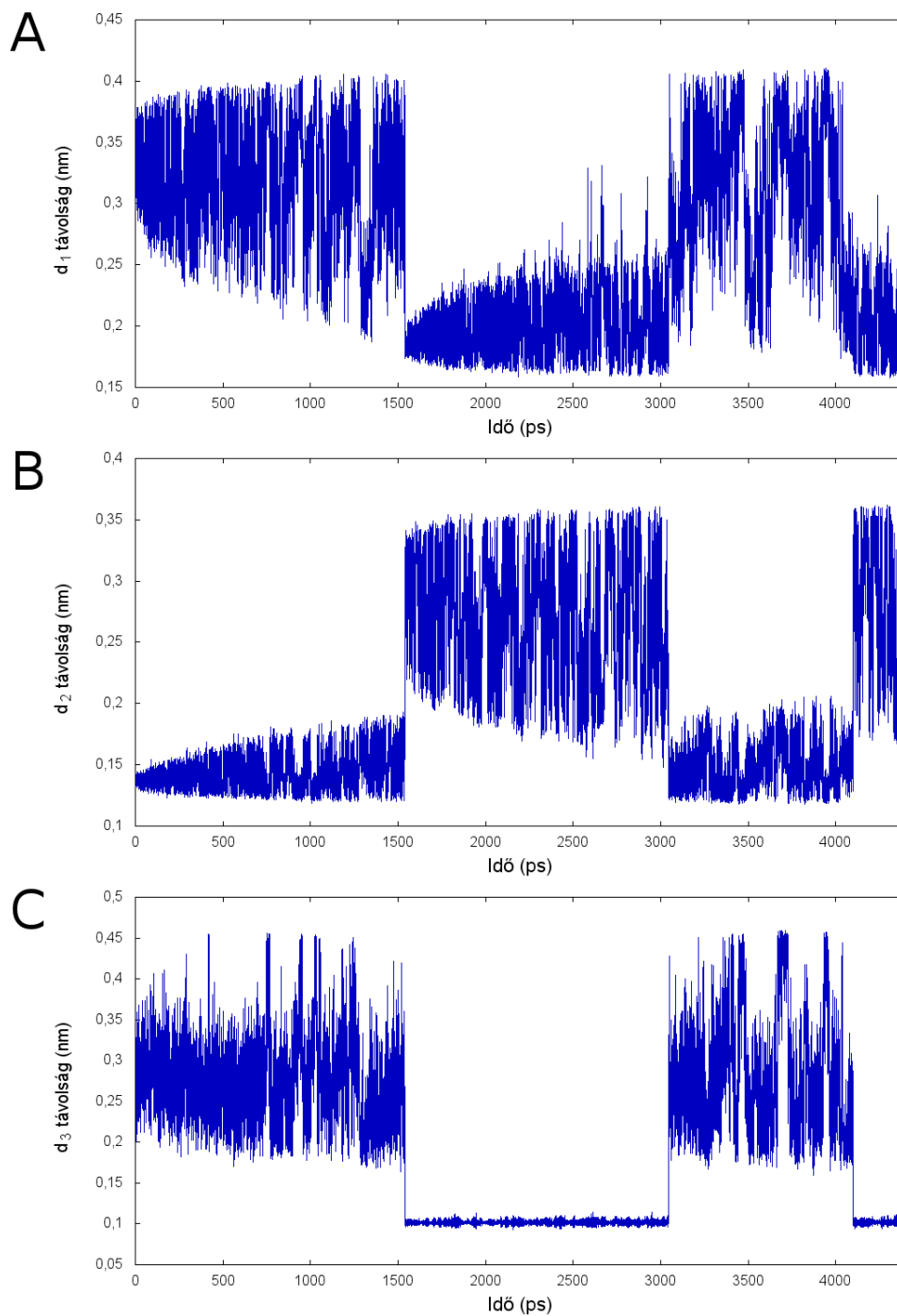
C RCL konformációváltzásai



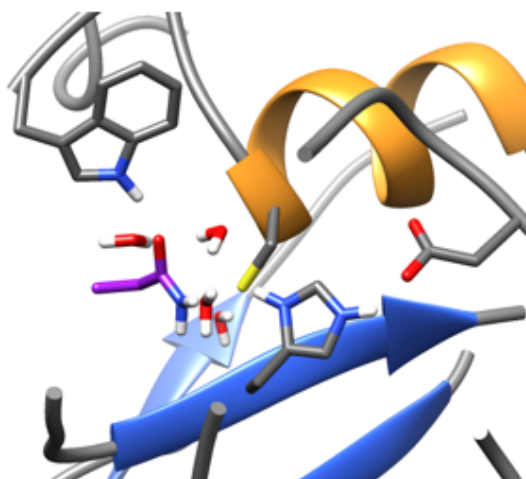
2. kiegészítő ábra: A klaszter-analízis eredménye, a reprezentatív konformációk nyerése céljából. Három konformációváltzás esetén végeztünk ilyen analízist: **A.** a D hélix meghosszabbodása (130-140 aminosavak), **B.** a „hinge” régió kimozdulása (375-385 aminosavak) és **C.** az RCL konformációváltzásai (382-401 aminosavak). A klaszter sorszámát az idő függvényében ábrázoltuk az adott konformációváltzás esetén releváns trajektóriáknál.



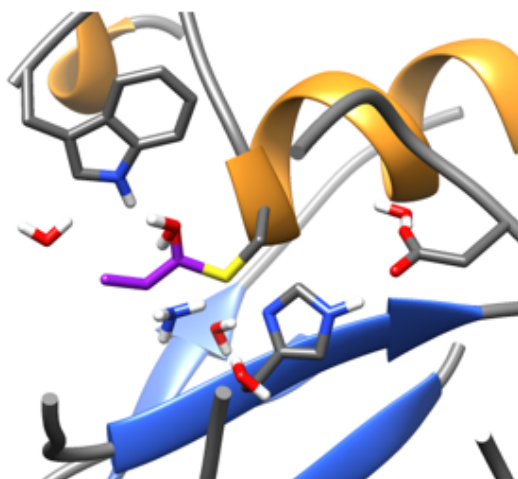
3. kiegészítő ábra: A kollektív változó (Cys314 kénatom-proton távolság) az idő függvényében ábrázolva, a Cys-His proton transzfer QM/MM MD szimulációja során.



4. kiegészítő ábra: (A) A Cys314 S-amid C (d_1 , CV1), (B) az amid C-N (d_2 , CV2) és (C) az N-H távolságok (d_3) az idő függvényében ábrázolva, a nukleofil támadási és az ammonia-felszabasulási lépések QM/MM MD metadinamikai szimulációjából.

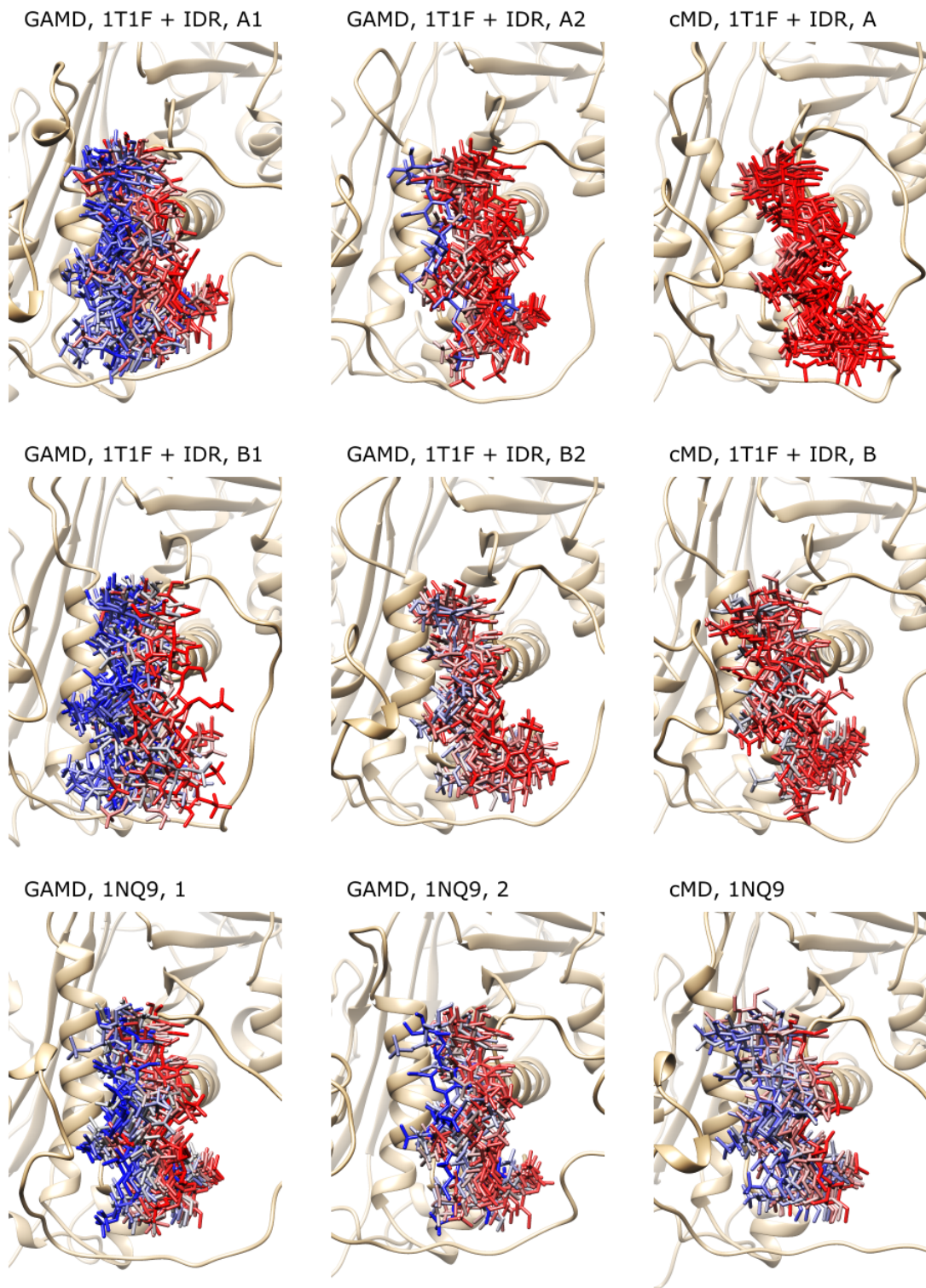


Michaelis komplex (MC)
t = 0,50 ns

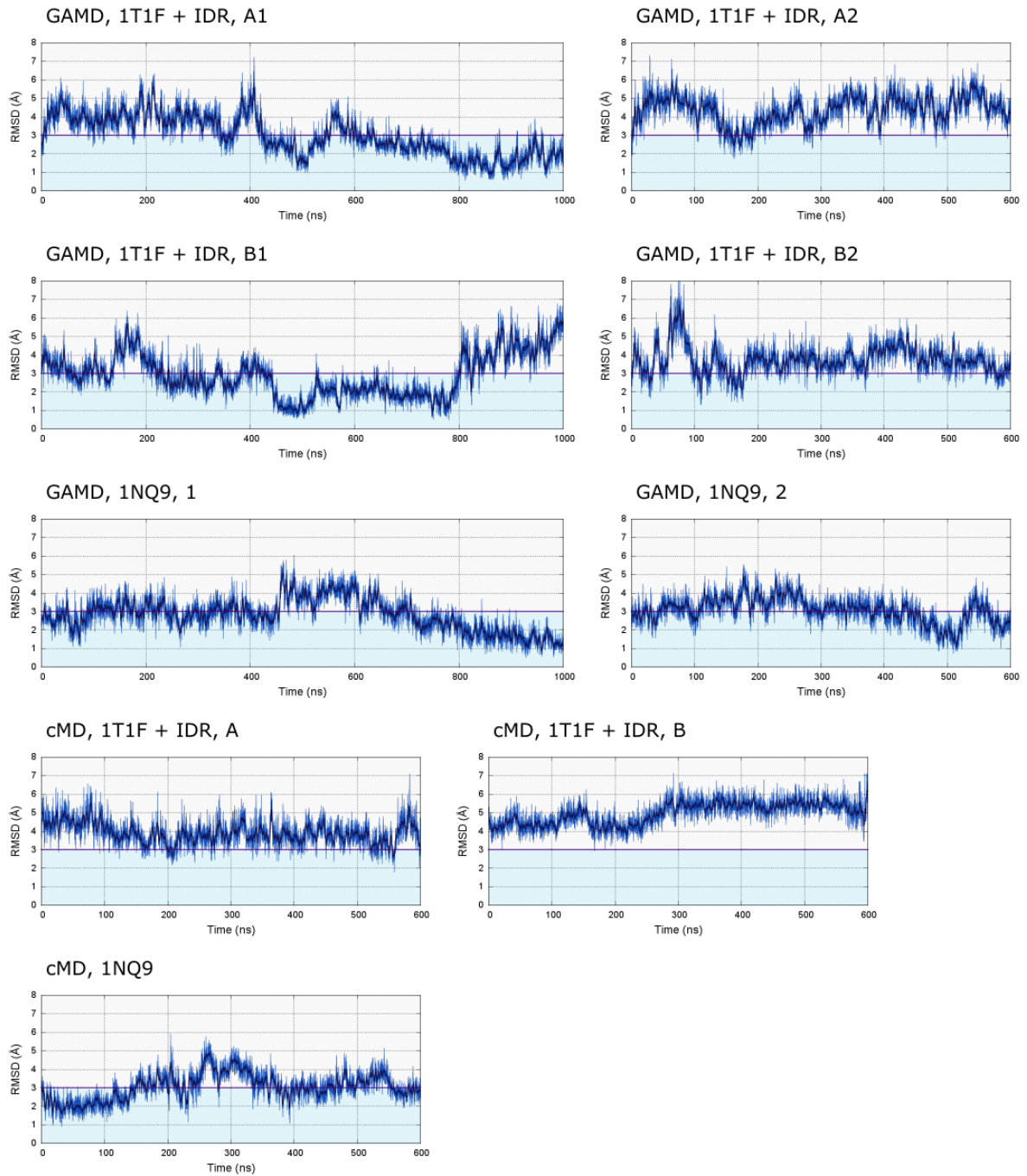


Tioészter intermedier + NH₃ (I 2)
t = 4,10 ns

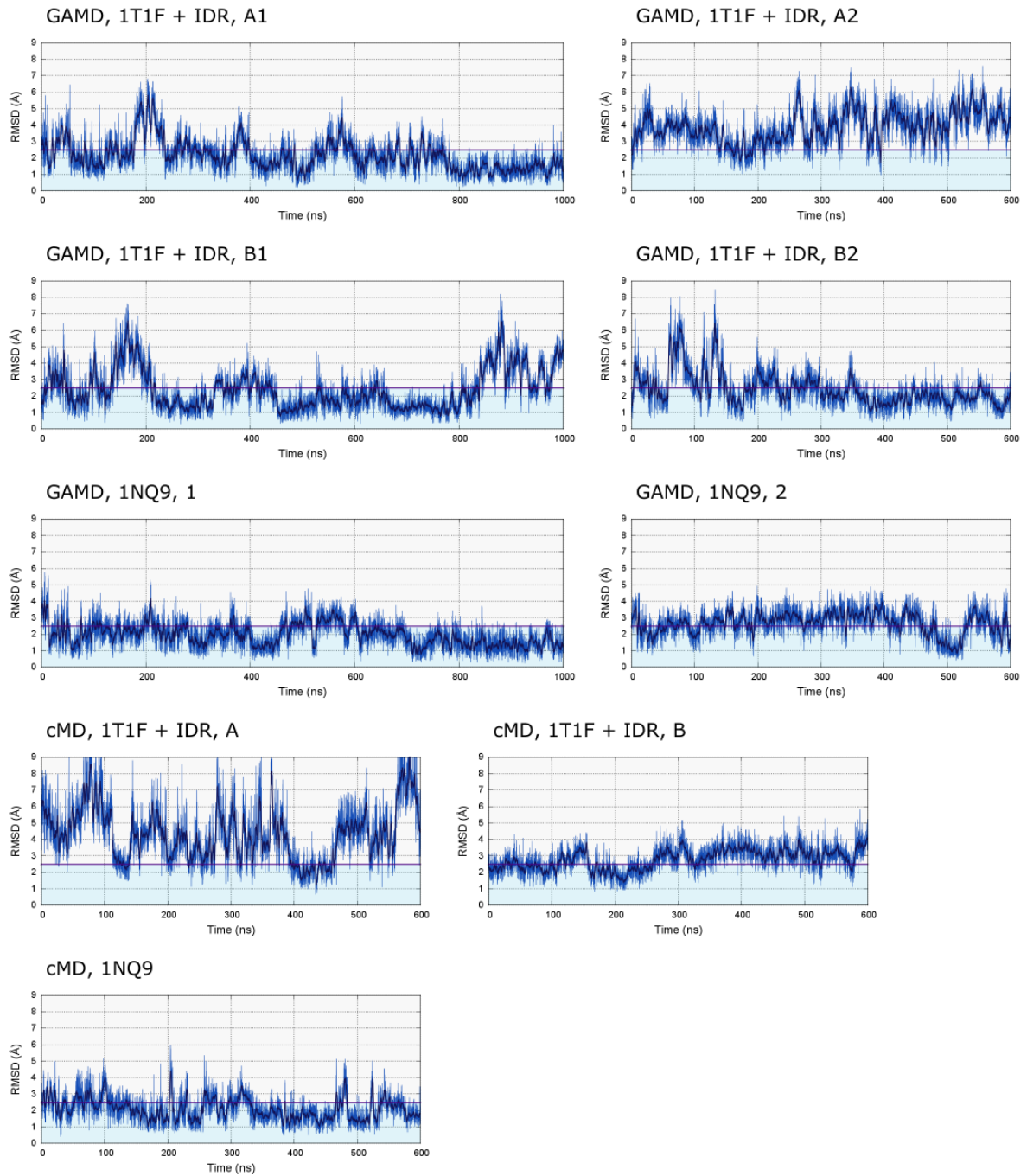
5. kiegészítő ábra: A Michaelis-komplex (MC) és a tioészter intermedier (I 2) „karakterisztikus” konformációi a nukleofil támadási és az ammóniafelszabadulási lépések QM/MM MD metadinamikai szimulációjából. Azokat a vízmolekulákat tüntettük fel, ahol az oxigénatom távolsága a Cys314 kénatomjától legfeljebb 7 Å volt.



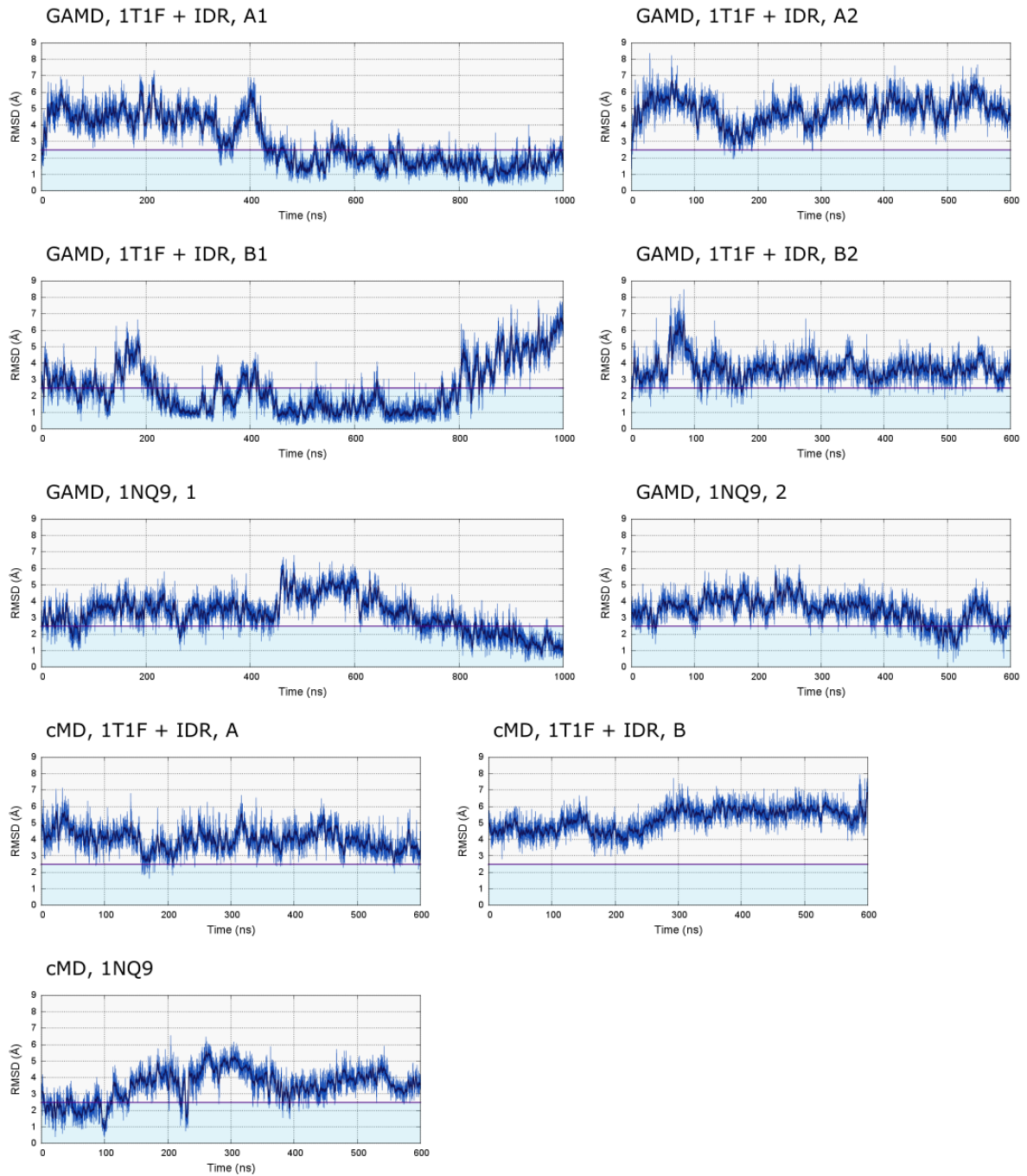
6. kiegészítő ábra: A pentaszacharid különböző kötődési módjai a GAMD, valamint a „konvencionális” MD (cMD) szimulációkból. A köztes állapotokat 50 ns sűrűséggel ábráztuk. A kék szín alacsony, a piros magas RMSD-nek felel meg.



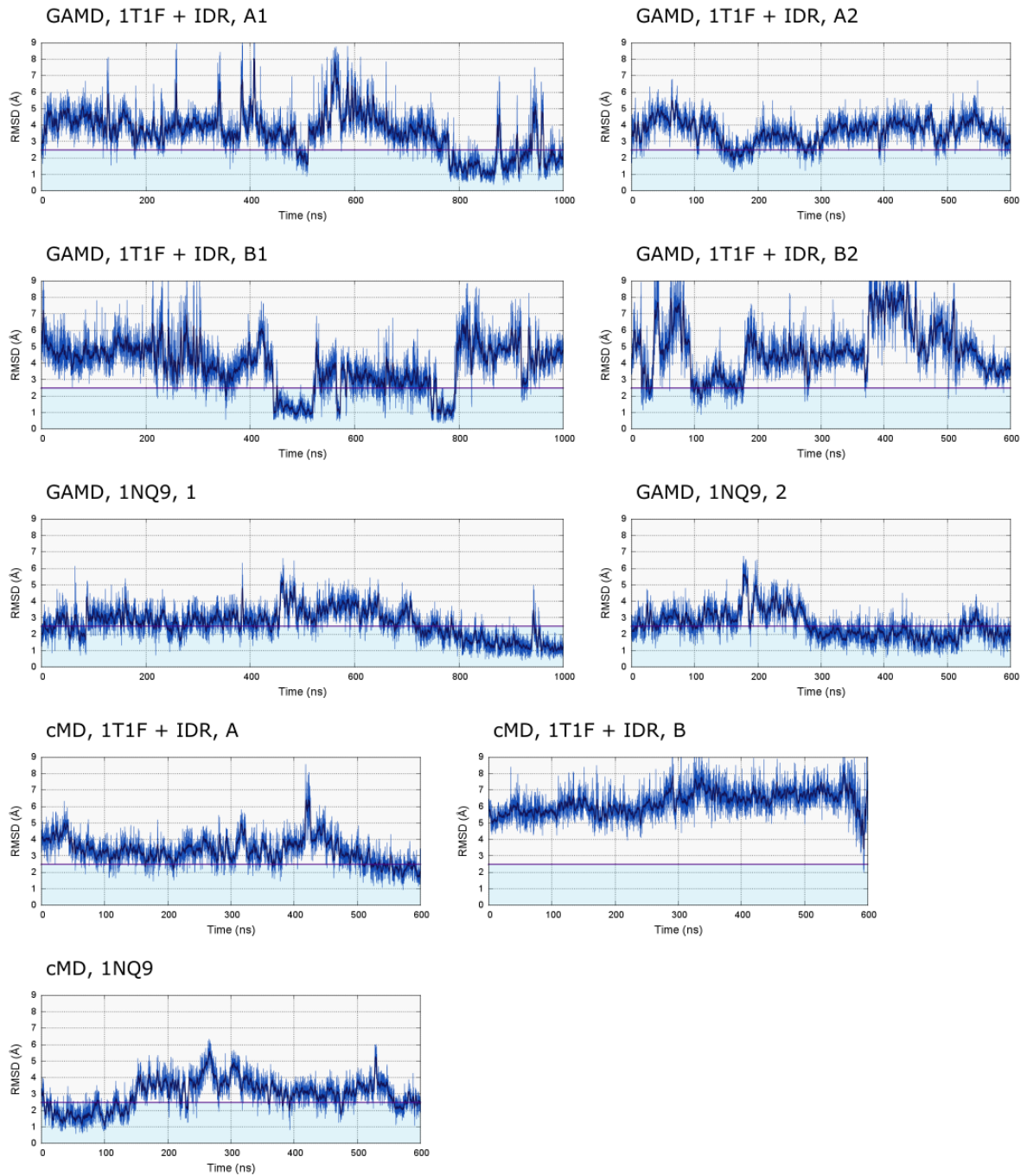
7. kiegészítő ábra: A pentaszacharid gyűrű- és inerglikozidos atomjainak RMSD-je az 1NQ9 röntgendiffrakciós szerkezethez viszonyítva a „konvencionális” MD és GAMD szimulációkban, az idő függvényében ábrázolva.



8. kiegészítő ábra: A pentaszacharid D gyűrűjének RMSD-je az 1NQ9 röntgendifrakciós szerkezethez viszonyítva a „konvencionális” MD (cMD) és GAMD szimulációkban az idő függvényében ábrázolva.

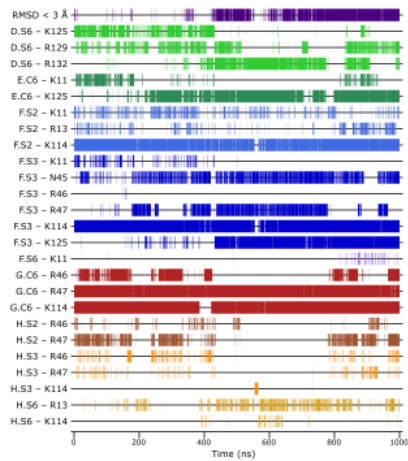


9. kiegészítő ábra: A pentaszacharid F gyűrűjének RMSD-je az 1NQ9 röntgendiffrakciós szerkezethez viszonyítva a „konvencionális” MD és GAMD szimulációkban az idő függvényében ábrázolva.

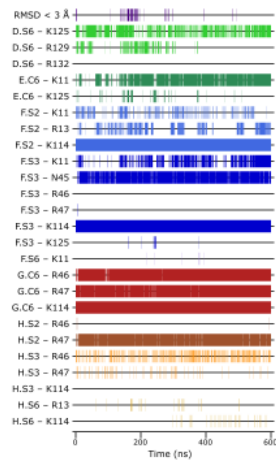


10. kiegészítő ábra: A pentaszacharid H gyűrűjének RMSD-je az 1NQ9 röntgendifrakciós szerkezethez viszonyítva a „konvencionális” MD és GAMD szimulációkban az idő függvényében ábrázolva.

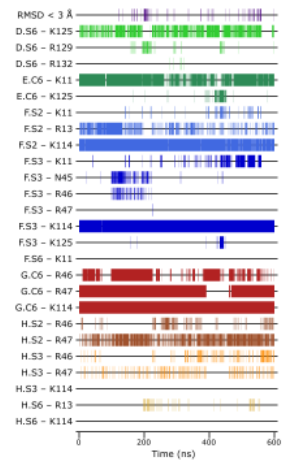
GAMD, 1T1F + IDR, A1



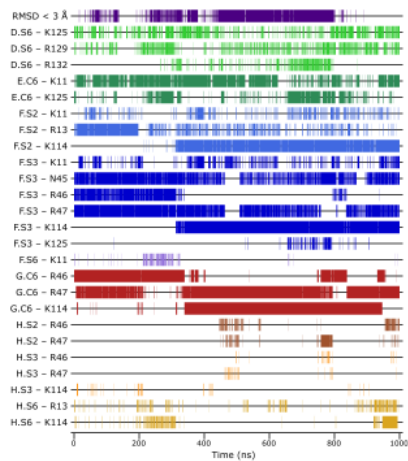
GAMD, 1T1F + IDR, A2



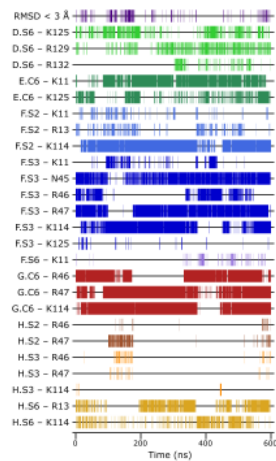
cMD, 1T1F + IDR, A



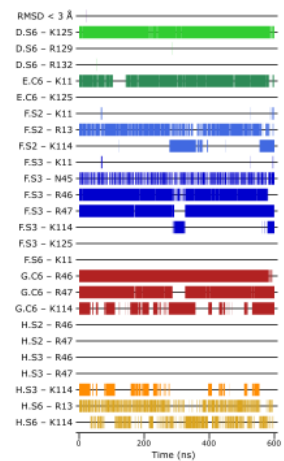
GAMD, 1T1F + IDR, B1



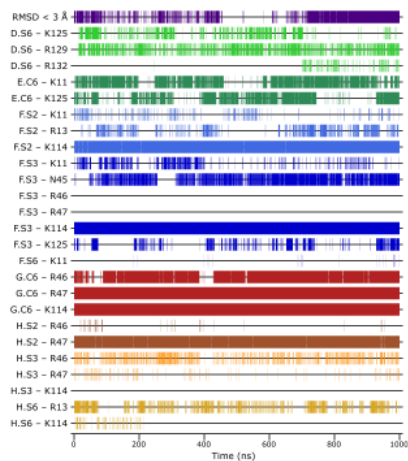
GAMD, 1T1F + IDR, B2



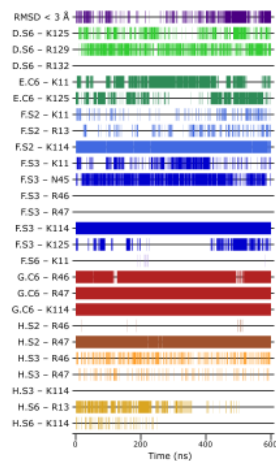
cMD, 1T1F + IDR, B



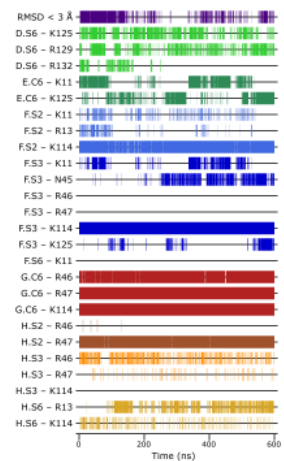
GAMD, 1NQ9, 1



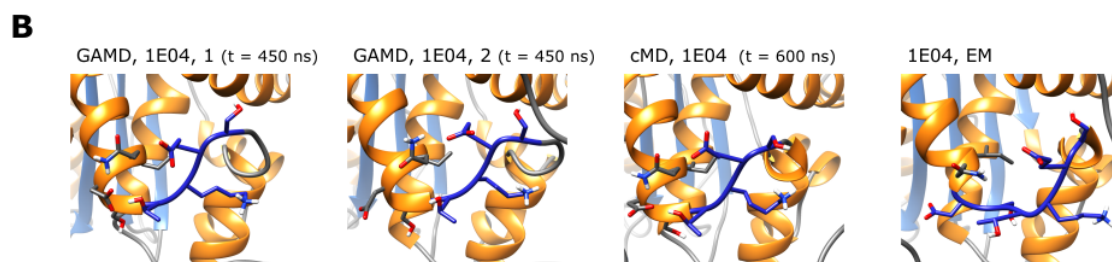
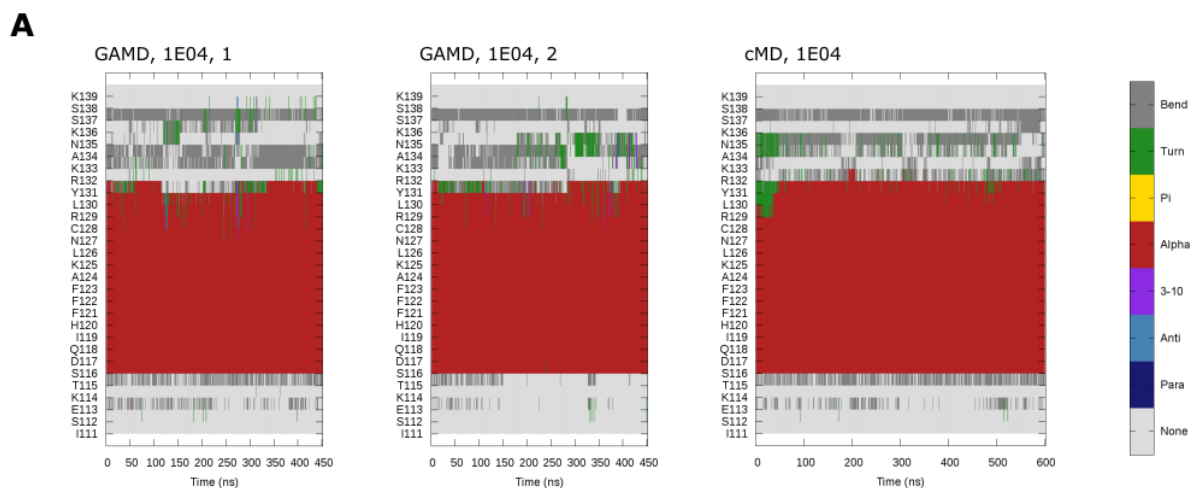
GAMD, 1NQ9, 2



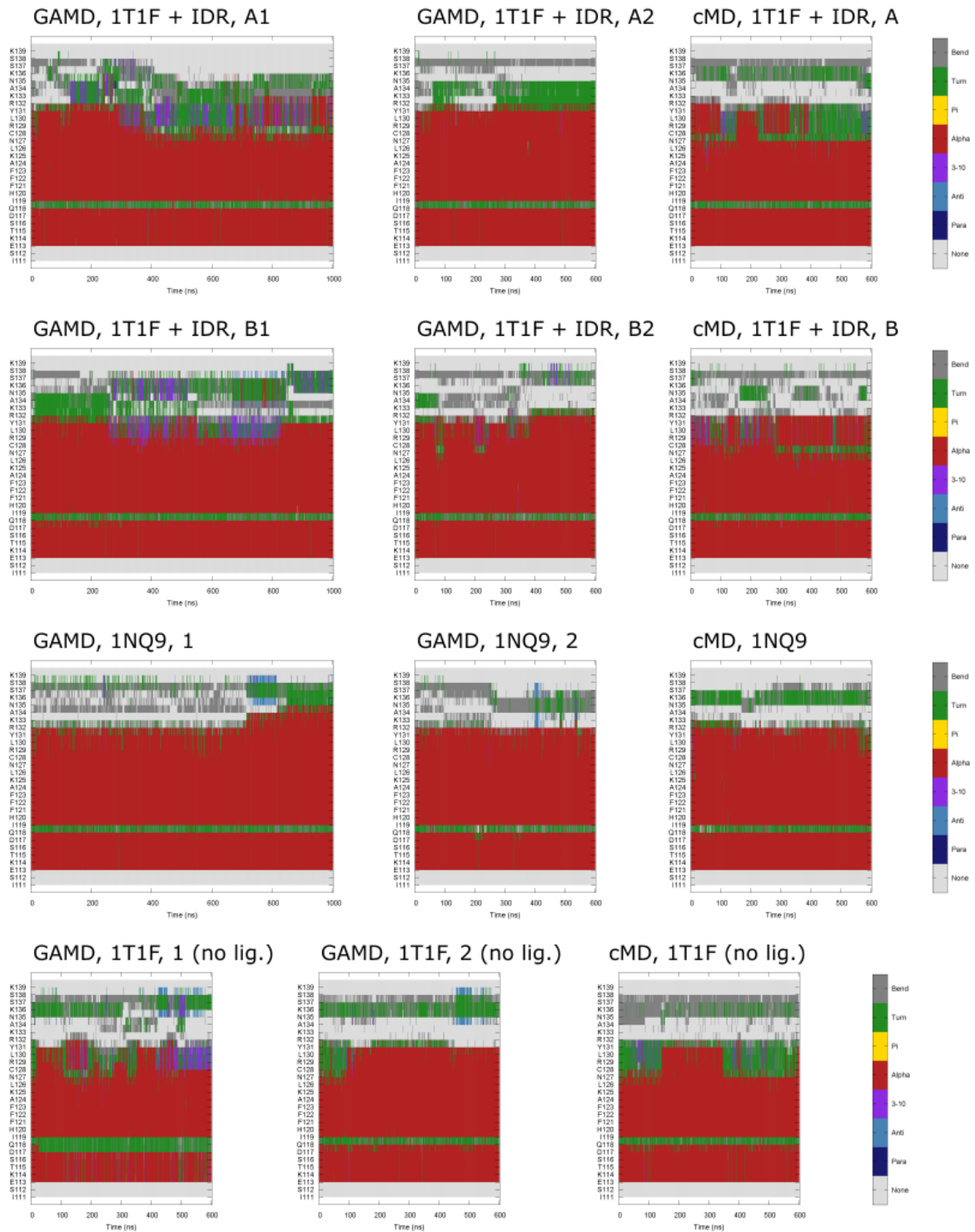
cMD, 1NQ9



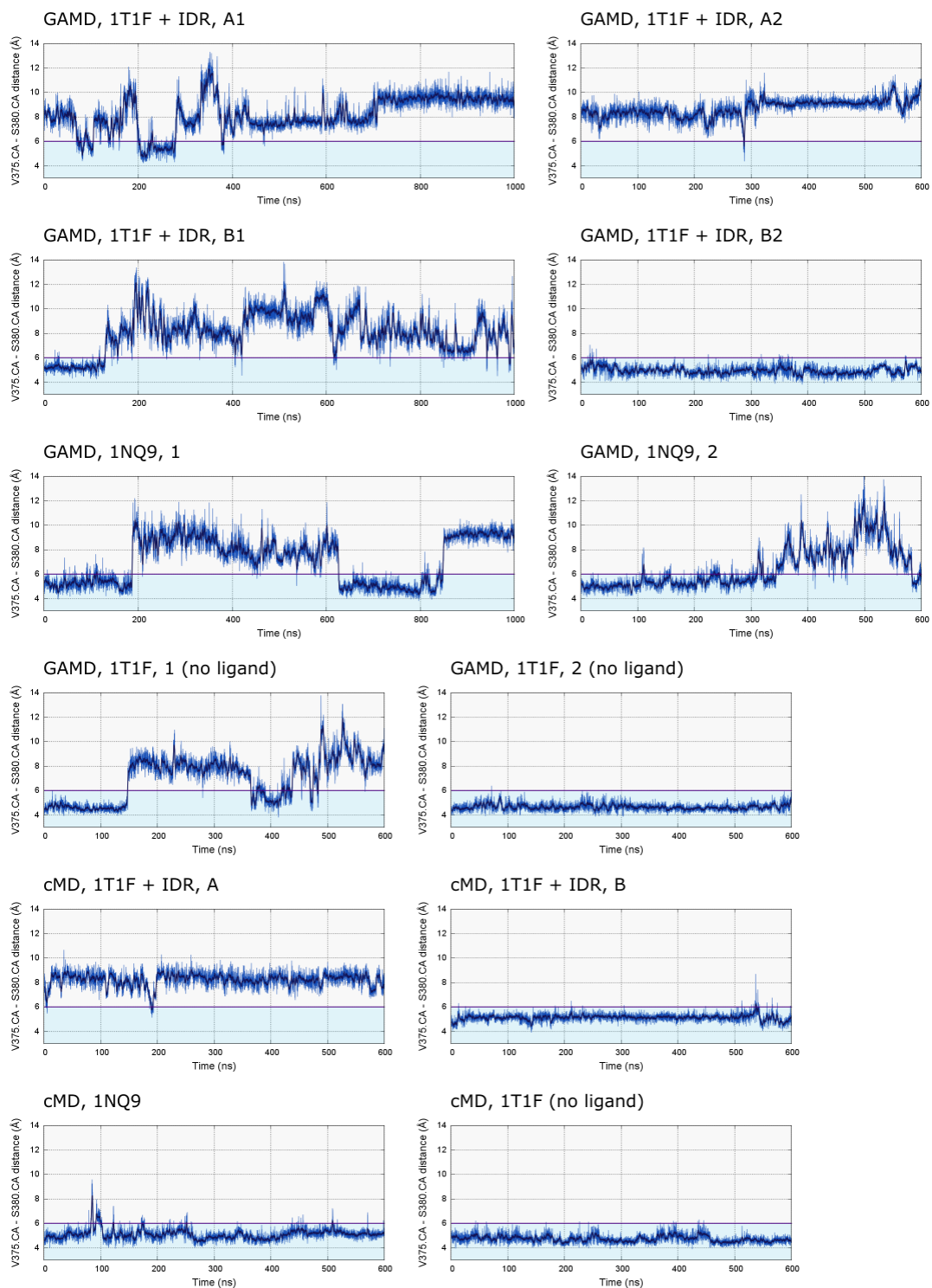
11. kiegészítő ábra. A pentaszacharid negatív töltésű csoportjai, valamint az antitrombin pozitívan töltött oldalláncai közötti kölcsönhatások. Két atom között kölcsönhatást feltételeztünk, ha a távolság 5 Å alatt volt.



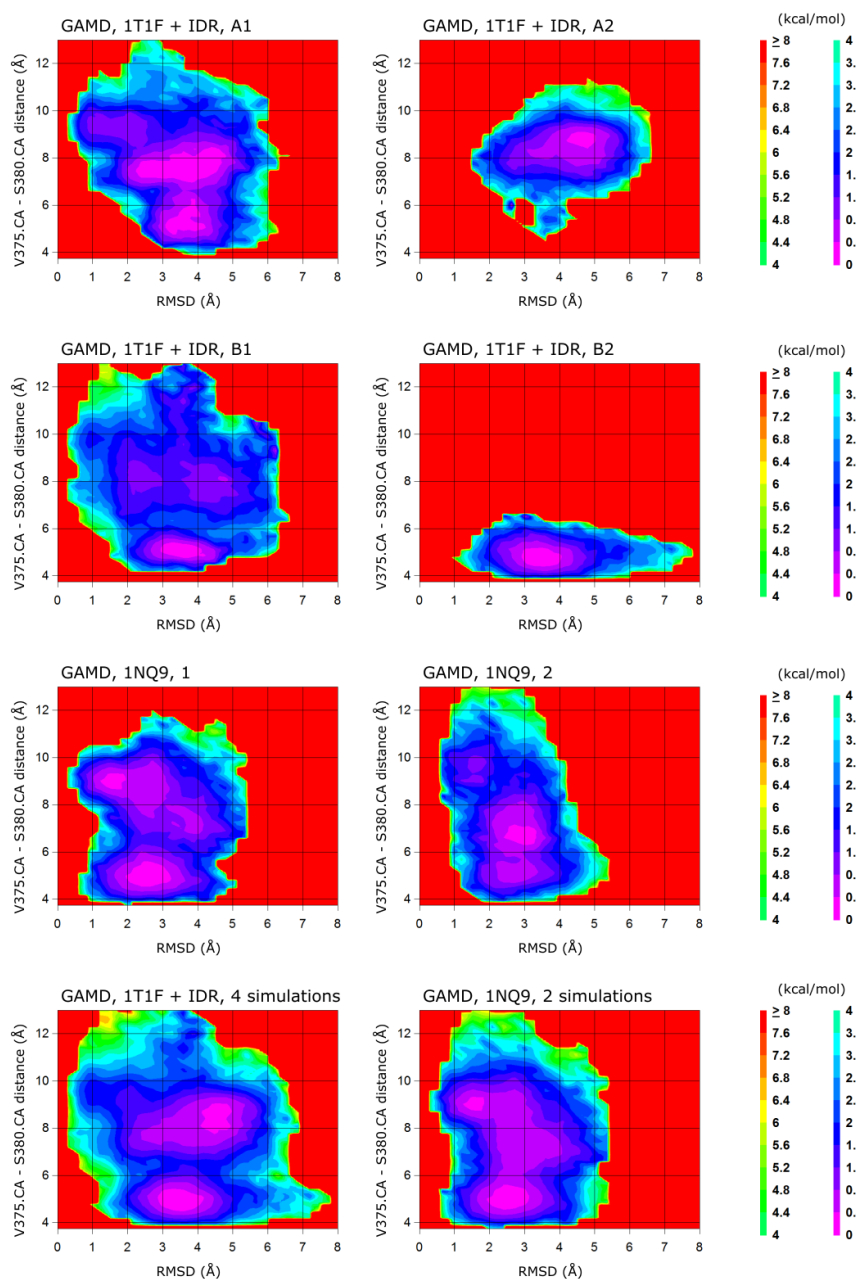
12. kiegészítő ábra: **A.** A másodlagos szerkezet vizsgálata DSSP módszerrel a111-139 régióban, két „előzetes” 450 ns hosszú GAMD, valamint egy 600 ns-os egyensúlyi MD szimulációból. A régió magában foglalja a D hélixet, valamint a P-hélix aminosavait. (Para: Parallel β -redő, Anti: Anti-parallel β -redő, 3-10: 3-10 hélix, Alpha: α -hélix, Pi: Pi hélix.) **B.** A molekuladinamikai szimulációkból vett konformációk a három szimuláció esetén. Összehasonlításképpen az 1E04 röntgendiffrakciós szerkezetben is feltüntettük a molekula azonos részét.



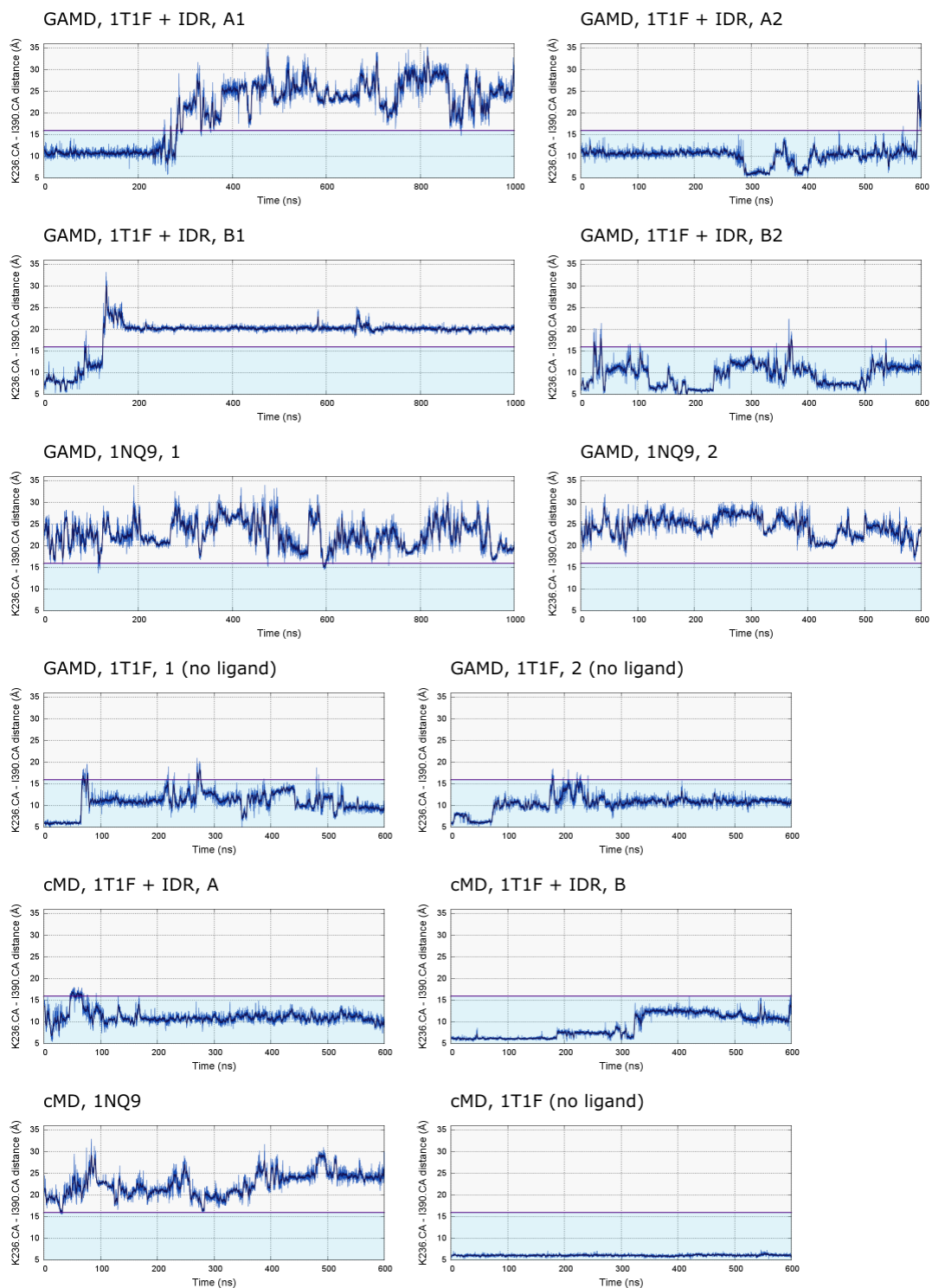
13. kiegészítő ábra: A másodlagos szerkezet vizsgálata DSSP módszerrel a 111-139 régióban, a 12 GAMD, illetve „konvencionális” MD szimulációból. A régió magában foglalja a D hélixet, valamint a P-hélix aminosavait. (Para: Parallel β -redő, Anti: Anti-parallel β -redő, 3-10: 3-10 hélix, Alpha: α -hélix, Pi: Pi hélix.)



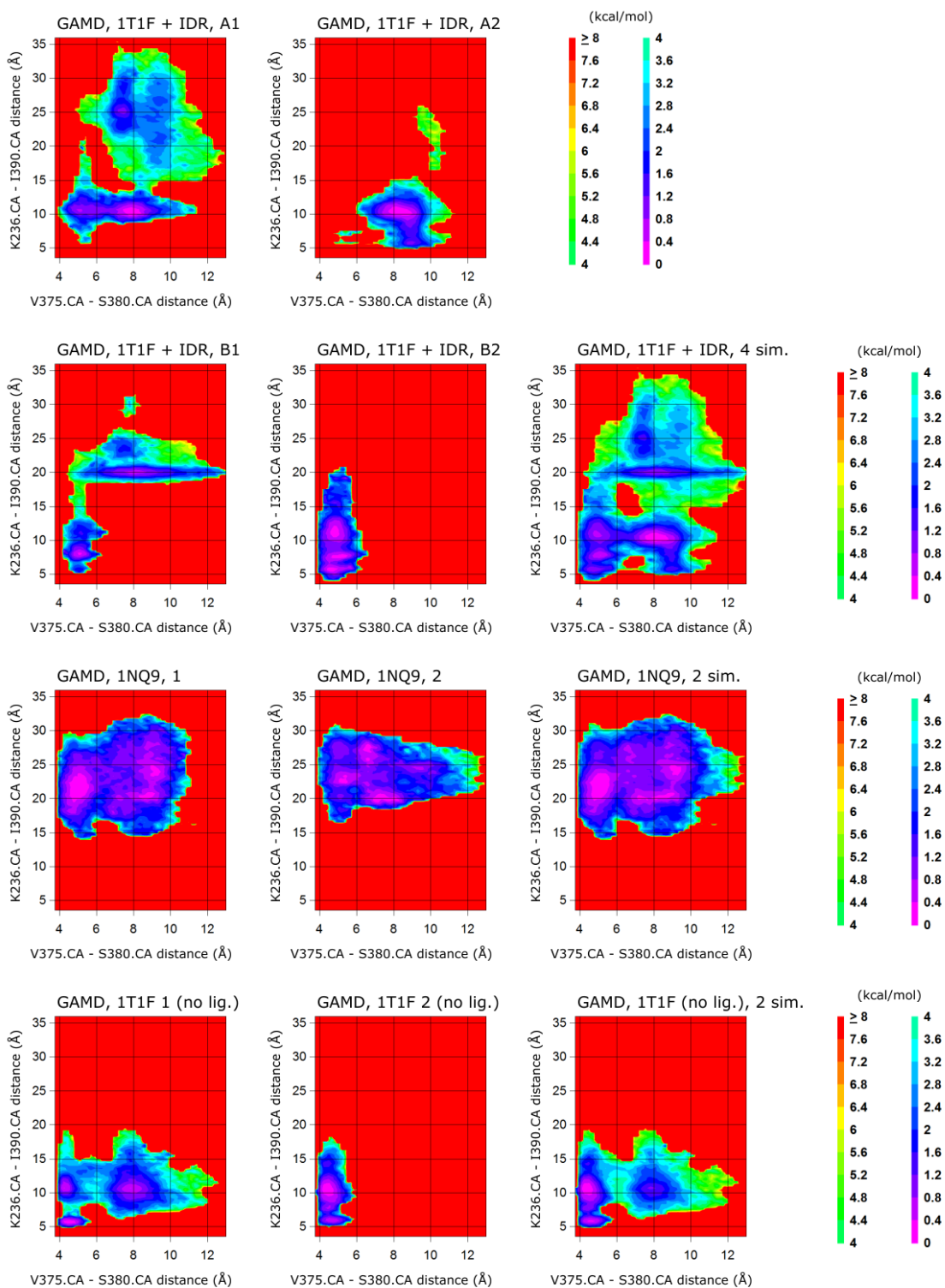
14. kiegészítő ábra. A „hinge” régió konformációja, a V375.CA – S380.CA távolság alapján, a GAMD és a “konvencionális” MD szimulációkban. Az alacsony értékek (kevesebb, mint körülbelül 6 Å) a “zárt” állapotnak felelnek meg.



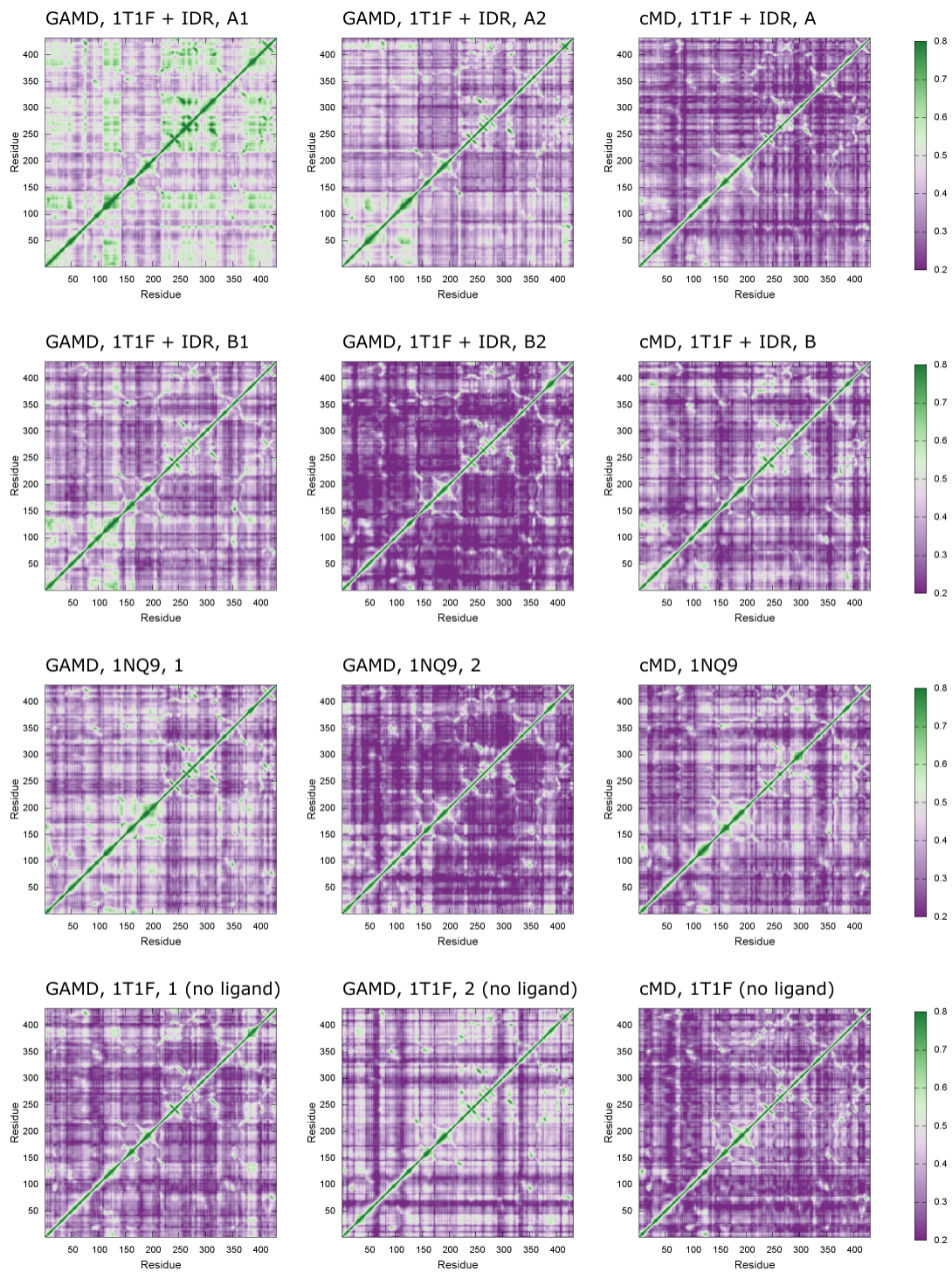
15. kiegészítő ábra. A GAMD szimulációkból számított szabadenergia, két reakciókoordináta függvényében: a pentaszacharid RMSD-je (4. kiegészítő ábra) és V375.CA – S380.CA távolság (14. kiegészítő ábra).



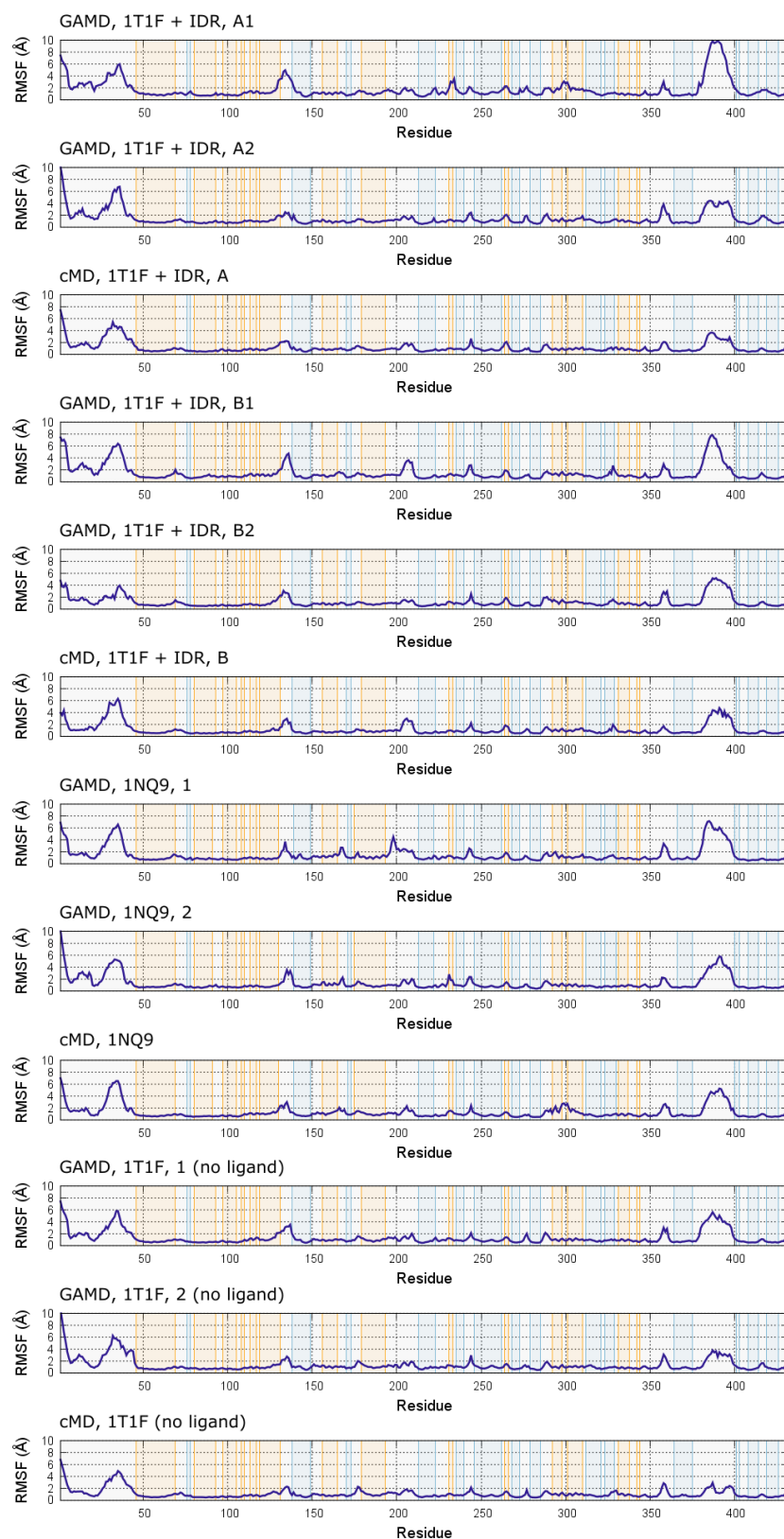
16. kiegészítő ábra. Az RCL (reakciócentrumot tartalmazó hurok) konformációja, a K236.CA – I390.CA.CA távolság alapján, a GAMD és a „konvencionális” MD szimulációkban. Az alacsony értékek (5–16 Å) az 1T1F szerkezetbelihez hasonló konformációknak felelnek meg.



17. kiegészítő ábra: A GAMD szimulációkból számított szabadenergia, két reakciókoordináta függvényében: V375.CA – S380.CA távolság (14. kiegészítő ábra) és K236.CA – I390.CA távolság (16. kiegészítő ábra).



18. kiegészítő ábra: A Lange és Grubmüller módszere segítségével számított „általánosított korrelációs” mátrixok a 12 GAMD, illetve „konvencionális” MD szimulációra.



19. kiegészítő ábra: Az α -szénatomok fluktuációja (RMSF) a GAMD és „konvencionális” MD szimulációkban. A háttér a másodlagos szerkezet alapján színeztük az adott aminosavpozícióban (narancssárga: hélix, kék: β -redő.)

Módszer/Bázis	Michaelis komplex, E(Cys protonált) – E(His protonált) (kJ/mol)	Michaelis komplex, E(Cys protonált) – E(His protonált) <i>zérusponi vibr. korr.</i> (kJ/mol)	„Nyugvó” állapot, E(Cys protonált) – E(His protonált) (kJ/mol)	„Nyugvó” állapot, E(Cys protonált) – E(His protonált) <i>zérusponi vibr. korr.</i> (kJ/mol)
MP2/6-31G(d)	34,1	-	53,0	-
MP2/6-31G(d,p)	30,0	-	48,4	-
MP2/6-31+G(d,p)	47,7	-	48,8	-
MP2/6-311+G(d,p)	22,6	-	41,9	-
ω B97XD/6-31G(d)	47,5	35,9	63,1	50,0
ω B97XD/6-31G(d,p)	48,5	37,0	64,1	50,6
ω B97XD/6-31+G(d,p)	54,6	43,4	64,9	53,2
ω B97XD/6-311+G(d,p)	54,1	43,1	63,0	51,0
M062X/6-31G(d)	45,1	34,5	60,1	45,9
M062X/6-31G(d,p)	46,2	35,1	61,2	47,3
M062X/6-31+G(d,p)	52,0	42,2	62,0	50,0
M062X/6-311+G(d,p)	51,4	41,1	59,8	48,1

1. kiegészítő táblázat: A Cys-protonált állapotok (neutrális Cys-His pár) energiája a His-protonált (ikerionos) formához viszonyítva, a Michaelis komplexben, valamint az enzim „nyugvó” állapotában. Az energiákat többféle módszerrel és bázissal is meghatároztuk, valamint a DFT módszereknél a zérusponi vibrációra korrigált energiákat is feltüntettük. Valamennyi esetben az ionpár forma bizonyult stabilabbnak.

Rendszer	Egymást követő MD vagy GAMD lépések			
„Natív” AT, ligandum nélkül (1T1F)	150 ns „konvencionális” MD szimuláció	60 ns GAMD „ekvilibráció”	600 ns GAMD	
		60 ns GAMD „ekvilibráció”	600 ns GAMD	
		600 ns „konvencionális” MD		
„Natív” AT, hozzáadott pentaszachariddal (idraparinux)	150 ns „konvencionális” MD szimuláció (A)	60 ns GAMD „ekvilibráció”	1000 ns GAMD (A1)	
		60 ns GAMD „ekvilibráció”	600 ns GAMD (A2)	
		600 ns „konvencionális” MD		
	150 ns „konvencionális” MD szimuláció (B)	60 ns GAMD „ekvilibráció”	1000 ns GAMD (B1)	
		60 ns GAMD „ekvilibráció”	600 ns GAMD (B2)	
		600 ns „konvencionális” MD		
	150 ns „konvencionális” MD szimuláció (C)			
	150 ns „konvencionális” MD szimuláció (D)			
	„Részlegesen” aktivált AT- pentaszacharid komplex (1NQ9)	150 ns „konvencionális” MD szimuláció	60 ns GAMD „ekvilibráció”	1000 ns GAMD
			60 ns GAMD „ekvilibráció”	600 ns GAMD
600 ns „konvencionális” MD				

2. kiegészítő táblázat: Az antitrombin, valamint az antitrombin-pentaszacharid komplex molekuladinamikai szimulációi.

14.2 Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/10/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Balogh Gábor
Neptun kód: FCP6BD
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Balogh, G.**, Muszbek, L., Komáromi, I.: First Step of the Transglutaminase Reaction Catalyzed by Activated Factor XIII Subunit A, Hybrid Quantum Chemistry/Molecular Mechanics Calculations.
J. Phys. Chem. B. 123 (18), 3887-3897, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00542>
IF: 2.923 (2018)
2. **Balogh, G.**, Komáromi, I., Bereczky, Z.: The mechanism of high affinity pentasaccharide binding to antithrombin, insights from Gaussian accelerated molecular dynamics simulations.
J. Biomol. Struct. Dyn. [Epub ahead of print], 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2019.1688194>
IF: 3.31 (2018)





További közlemények

3. **Balogh, G.**, Gyöngyösi, T., Timári, I., Herczeg, M., Borbás, A., Fehér, K., Kövér, K. E.:
Comparison of Carbohydrate Force Fields Using Gaussian Accelerated Molecular Dynamics Simulations and Development of Force Field Parameters for Heparin-Analogue Pentasaccharides.
J. Chem Inf. Model. 59 (11), 4855-4867, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00666>
IF: 3.966 (2018)
4. Gindele, R., Selmecezi, A., Oláh, Z., Ilonczai, P., Pfliegler, G., Marján, E., Nemes, L., Nagy, Á., Losonczy, H., Mitic, G., Kovac, M., **Balogh, G.**, Komáromi, I., Schlamadinger, Á., Molnárné Rázsó, K., Boda, Z., Muszbek, L., Bereczky, Z.: Clinical and laboratory characteristics of antithrombin deficiencies: a large cohort study from a single diagnostic center.
Thromb. Res. 160, 119-128, 2017.
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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,278

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,233**

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, 2020.01.10.



14.3 Közlemények különnyomatai