

Doktori (PhD) értekezés tézisei

***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

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

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

Írta: Dr. Balogh Gábor okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Mótyán János, PhD
Dr. Bodó Imre, PhD

A doktori szigorlat 2020. augusztus 13-án (csütörtökön), 11:00 órakor, online formában kerül lebonyolításra.

Az értekezés bírálói:

Dr. Ferenczy György, az MTA doktora
Dr. Purgel Mihály, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Ferenczy György, az MTA doktora
Dr. Purgel Mihály, PhD
Dr. Mótyán János, PhD
Dr. Bodó Imre, PhD

A nyilvánosságot online formában biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a zsbereczky@med.unideb.hu e-mail címen a vitát megelőző munkanap (2020. augusztus 12.) 12:00 óráig. Az értekezés védésének időpontja (online formában): 2020. augusztus 13. (csütörtök), 13:00 óra

1. Bevezetés

A hemostázis kettős élettani funkcióval rendelkezik: egyfelől biztosítja a vér folyékony állapotban maradását, másrészt nélkülözhetetlen szerepet játszik a további vérvesztés megakadályozásában az érpenyő sérülése esetén. A hemostázis három részfolyamatból áll, ezek az érpenyő sérülés helyén fellépő vazokonstriktió, a trombociták aktivációja és aggregációja, valamint a véralvadási folyamat, amely a (keresztkötött) fibrinálvadék 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 következő faktort, amely pedig az azt követő faktor aktiválására képes, és így tovább.

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. Stieler és munkatársai felvetették, hogy a FXIII A alegysége ígéretes célpont lehet új véralvadásgátló gyógyszerek fejlesztésére.

A gyógyszerfejlesztés szempontjából igen fontos a katalitikus mechanizmus megértése, azonban a FXIII A alegysége esetén viszonylag kevés adat áll erről 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 tévő, azonban igen számításigényes kvantumkémiai módszereket alkalmaznak. A vizsgált rendszer többi részét azonban ennél sokkal hatékonyabb, elsősorban molekulamechanikai módszerekkel veszik figyelembe.

Abban, hogy a véralvadási folyamat az érpenyősérülés 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-függő proteáz inhibitor is szerepet játszik a folyamatban. Az

antitrombin (AT) szerepét a hemosztázis szabályozásában az is mutatja, hogy az öröklött vagy szerzett hiánya trombotikus kórképekre hajlamosít. A homozigóta AT deficiencia néhány mutációtól eltekintve letális. Az AT azonban emellett az egyik fontos véralvadásgátló gyógyszercsoport, a heparin és heparinszármazékok farmakológiai célpontja is.

A heparinoidok hatására lejátszódó konformációs aktiválás mechanizmusának feltárása értékes információkat nyújthat új AT-függő véralvadásgátló gyógyszerek fejlesztéséhez. Ezen túl a heparin kötődési mechanizmusának megismerése azért is fontos, mert az AT több, ismert patogén variánsa is a heparinkötés zavarát okozza. 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 röntgenkrisztallográfiás 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 (TG 1-7) és a XIII-as véralvadási faktor A alegysége. 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. 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. 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.

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 peptidek trombin általi lehasítása, kalciumionok kötődése, valamint a B alegységek disszociációja szükséges. A fiziológiásnál lényegesen magasabb kalcium-koncentrációk mellett azonban a FXIII nem-proteolitikusan, az aktivációs peptidek hasítása nélkül is aktiválódhat. Az FXIII a koagulációs kaszkád 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.

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. Ez a szerkezet a β -hordó domének nagymértékű elmozdulását mutatja a natív formához képest. A struktúrában három betöltött kalcium-kötőhelyet találunk. Azonban ^{43}Ca NMR mérések, valamint molekuladinamikai szimulációk alapján további „gyenge” kalcium-kötőhelyek létezésére következtethetünk, amelyek feltehetően a nem-proteolitikus aktiválásban játszhatnak szerepet. A struktúra alapján valószínűsíthető, hogy az aktív A alegység monomer szerkezetű, ezt később analitikai ultracentrifugálás, valamint atomerő-mikroszkópiás kísérletek révén is megerősítették.

A humán transzglutamináz családon belül a katalitikus mechanizmus részleteivel kapcsolatos kísérleti adatok leginkább a transzglutamináz 2-re állnak rendelkezésre. Ezzel szemben a FXIII esetén nagyon kevés ilyen adat áll rendelkezésre. Az elérhető közlemények többsége különböző peptid szubsztrátok átalakításának kinetikájára fókuszál, amin donor jelenlétében vagy anélkül. Olyan kinetikai mérésekről azonban nincs tudomásunk, amelyek részletesebb betekintést engednének a reakciómechanizmusba.

Az enzimkinetikai mérések mellett hasznos adatokat szolgáltathatnak az enzimreakciók mechanizmusával kapcsolatban a QM/MM módszereket alkalmazó számítások. Tudomásunk szerint az értekezés alapját képező egyik közlemény az első olyan munka, ahol egy humán transzglutamináz enzim katalitikus mechanizmusával kapcsolatban történtek *in silico* vizsgálatok. Egy korábbi, QM/MM módszertant alkalmazó közleményben irreverzibilis inhibitorok kötődését vizsgálták transzglutamináz 2-höz, nem pedig valamilyen modell szubsztrát átalakítását. Lényegesen több *in silico* tanulmányt publikáltak a hasonló katalitikus triádot tartalmazó cisztein proteázokkal kapcsolatban. Ezen fehérjecsald több tagjánál is vizsgálták a katalitikus triád aminosavainak protonáltságát, valamint a katalitikus mechanizmust, pl. papain, katepszin B és K, vagy kaszpáz 7 esetében. Ezekben a tanulmányokban energia-minimalizáción alapuló számításokat és QM/MM MD szimulációkat egyaránt alkalmaztak. Tanszékünk egy korábbi munkájában a papain katalitikus mechanizmusát vizsgáltuk, ONIOM-típusú hibrid QM/MM számításokkal.

2.2 Az antitrombin pentaszacharid-kötése

Az AT egy 58 kDa molekulatömegű plazma glikoprotein, a szerin proteáz inhibitor (szerpin) szupercsalád tagja. Ennek a szupercsaládnak a tagjai állatokban, növényekben, baktériumokban és vírusokban is megtalálhatók. A szupercsalád 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. A humán genomban 36 szerpint kódoló gén található. 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. 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). 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. 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, latens állapotba való átmenet esetén.

Az AT a véralvadási kaszkád egyik legfontosabb szabályozó fehérjéje, ezt a funkcióját szerin proteáz aktivitással rendelkező véralvadási faktorok gátlása révén látja el. 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. A vérplazmában keringő natív AT kevéssé hatékony inhibitora a véralvadási faktoroknak, azonban heparin és heparin analógok jelenlétében a gátlás reakciósebessége igen nagy mértékben növekszik. Az aktivitás növekedésére az irodalomban két eltérő mechanizmust javasoltak. Egyfelől a heparin molekulában található pentaszacharid szekvencia AT-hoz 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, míg trombin esetén kismértékű a hatása. Másrészt hosszabb heparin láncok az AT és a véralvadási faktor közötti „hidak” kialakítása révén is jelentősen fokozhatják az inhibíció hatékonyságát. Ez utóbbi mechanizmus leginkább a trombin esetén jelentős. Az AT-nak a vérplazmában két izoformája van, az alfa-AT (a teljes AT mennyiség kb. 90%-a) négy aszparagin oldalláncon glikozilált (Asn-96, 135, 155 és 192), míg a béta forma esetén (10%) az Asn-135 aminosavhoz nem kapcsolódik glikán. A béta forma heparin affinitása jelentősen magasabb az alfa formánál, és minden bizonnyal

hatékonyabb inhibitor annál.

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.

Az AT szerkezet-funkció összefüggéseinek megértése céljából számos röntgenkristallográfiás vizsgálatot végeztek. A nem-aktivált és az aktivált AT röntgenkristallográfiás szerkezetén kívül 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. Az AT számos röntgenkristallográfiás szerkezetei egy natív és egy latens molekula dimerjének felel meg. Ezekben a struktúrákban a natív molekula RCL-je kötődik a latens molekulához, 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. Ez a struktúra az AT RCL-jének egy újfajta konformációját mutatta.

Az AT pentaszacharid-kötődés hatására lejátszódó konformációváltozásaira egy háromlépcsős modellt javasoltak röntgendiffrakciós szerkezetek és kinetikai mérések alapján. Az első lépésben a pentaszacharid kötődése még relatíve gyenge, azonban a heparin kötőhelye közelében bekövetkező konformációváltozások révén a kötődés erősebbé válik. A második lépésben lejátszódó folyamatok elsősorban szintén a heparin kötőhelyet, valamint a fehérje hidrofób magját érintik. Az AT pentaszacharid-affinitása a harmadik lépésben válik maximálissá, a D-hélix meghosszabbodása, valamint a „hinge” régió kimozdulása révén.

3. Módszerek elméleti alapjai

3.1 Kvantumkémiai módszerek

Tulajdonképpen minden kvantumkémiai számítás alapját képezi a Born-Oppenheimer közelítés. Feltételezi, hogy az atommagok és az elektronok mozgása szétválasztható. Alapja az atommagok és az elektronok tömege közötti több nagyságrendi különbség. Lehetővé válik az elektronenergia meghatározása úgy, hogy az atommagokat rögzítettnek tekintjük. 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 antiszimetriát 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).

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. 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.

3.2 Sűrűségfukcionál-elmélet

A sűrűségfukcionál-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. Egymással nem kölcsönható elektronokból álló rendszert feltételez, amelyekre ugyanaz az elektrosztatikus potenciál hat és ahol az elektronsűrűség azonos a „valódi” rendszerével. A funkcionál három tagból áll, 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.

Elterjedt, a hibrid funkcionálok közé tartozó módszer a B3LYP. A B3LYP a Becke által javasolt, három paramétert tartalmazó kombinálja az általánosított gradiens közelítésen (generalized gradient approximation, GGA) alapuló Lee-Yang-Parr korrelációs funkcionállal. 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. Ezzel szemben a funkcionálok M06 családja a diszperziós kölcsönhatásokat a funkcionálban szereplő paraméterek révén veszi figyelembe.

3.3 Félempirikus módszerek

A félempirikus módszerek számítási igénye az „*ab initio*” kvantumkémiai módszerek és a „klasszikus” molekulamechanikai erők (lásd később) között helyezkedik el. Azonban lehetővé teszik kémiai reakciók leírását, szemben a „klasszikus” molekulamechanikai erőkkel. A félempirikus módszerek egyik családja a Hartree-Fock módszeren alapul, hozzá képest különféle közelítéseket és elhanyagolásokat alkalmaz (például a kételektron-integrálok esetén). Ezek közül jelenleg a legelterjedtebbek az NDDO (neglect of diatomic differential overlap) módszerek. Ide tartozik például az AM1, a PM3 és a PM6.

A DFTB módszer a rendszer sűrűségfunkcionál-elmélet szerinti energiájának sorbafejtésén alapul egy referencia elektronsűrűség környezetében. 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. A DFTB3 módszer további tagokat tartalmaz, mely a sor harmadrendű tagjait közelíti. A paraméterfejlesztés az SCC-DFTB és a DFTB3 módszerekhez DFT számítások alapján történik.

3.4 Hibrid QM/MM technikák

A kémiai reakciók pontos elméleti kémiai tárgyalása kvantumkémiai módszereket igényel. Nagyobb méretű rendszerek vizsgálata tisztán QM módszerekkel az esetek nagy részében még ma sem kivitelezhető. A hibrid módszerekben a kémiai reakció szempontjából legfontosabb atomokra, atomcsoportokra megfelelő kvantumkémiai módszereket (például sűrűségfunkcionál-elmélet, esetleg félempirikus módszerek) alkalmazunk, a rendszer további

részét pedig lényegesen gyorsabb számítást lehetővé tevő módszerrel (leggyakrabban „klasszikus” molekulamechanikai erők) vehetjük figyelembe.

A QM/MM módszerek egyik típusa a „hagyományos” (vagy additív) QM/MM sémák. 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. A QM és az MM alrendszerek közötti kovalens kötések kezelésének talán legelterjedtebb módja a „link” (összekötő) atomok bevezetése.

A hibrid technikák másik csoportját a szubsztraktív hibrid módszerek alkotják. Ezek legfontosabb képviselője az ONIOM módszer, amely a korábban kifejlesztett és IMOMM módszeren alapul. Az ONIOM modellt gyakran mint QM/MM sémát alkalmazzák, azonban lehetővé teszi kettőnél több alrendszer definiálását is, valamint különböző módszerek (MM, félempirikus módszerek, kisebb számításgényű ab initio vagy DFT módszer) alkalmazását az alacsonyabb szinten számított alrendszerre vagy alrendszerekre. 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. 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.

3.5 Molekulamechanikai erők

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 kötések előre definiáljuk, ennek megfelelően ezek a módszerek általában nem képesek leírni a kovalens kötések kialakulását és felbomlását, ezáltal a kémiai reakciókat.

A kötő kölcsönhatásokon belül a kötésekhez és a kötésszögekhez tartozó tagok esetén az

energia az egyensúlyi értéktől való eltéréseinek négyzetével arányos. A molekulamechanikai erők kötések körüli rotációt általában egy Fourier-sor három tagjának megfelelő képlettel írják le, ezek 4 atom által bezárt diéderes szögektől függenek. 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. A „klasszikus” molekulamechanikai erők a molekulák polarizálhatóságát nem képesek figyelembe venni, szemben a jelentősen nagyobb számítási igényük miatt ma még kevésbé elterjedt polarizálható erőkkel.

3.6 Molekuladinamikai szimulációk

A molekuladinamikai (MD) 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 tartományba esik. Általában nagyobb lépésköz használható, ha a kovalens kötések rögzítésére például SHAKE vagy LINCS algoritmust alkalmazzuk. Az MD szimulációkhoz nagyobb mértékű rendszerek esetén túlnyomórészt „klasszikus” molekulamechanikai erőtereket alkalmaznak. Van lehetőség azonban kvantumkémiai, illetve hibrid QM/MM alapú szimulációkra is.

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. A szimuláció egymást követő lépésekből áll, minden lépésben elsőként az egyes atomokra pillanatnyilag ható erőket kell kiszámítani, 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. A molekuladinamikai szoftverek meghatározott számú lépésközönként mentik az atomok pozícióit, az egyes atomokhoz tartozó sebességeket, valamint további adatokat (egyes kölcsönhatások energiái, hőmérséklet, nyomás, stb.). A molekuladinamikai szimulációkat leggyakrabban állandó hőmérsékleten és térfogaton (NVT), vagy állandó hőmérsékleten és nyomáson (NpT) végezzük. A hőmérséklet, valamint NpT szimulációk esetén a nyomás szabályozására többféle módszert is kifejlesztettek (Berendsen, a v-rescale és a Nosé-Hoover).

3.7 „Javított” mintavételezést lehetővé tevő 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. Ezek egy része előre meghatározott reakciókoordinátákat vagy „kollektív változókat” (collective variable, CV) igényelnek, és ezek függvényében vizsgálják a rendszer viselkedését, valamint teszik lehetővé szabadentalpia-különbségek számítását. Ilyen módszer többek között az umbrella sampling, az adaptively biased molecular dynamics (ABMD) és metadinamika (metadynamics). Ezen módszerek hátránya, hogy a kollektív változók megválasztása általában a rendszer alapos ismeretét igényli és gyakran nem egyértelmű. A metadinamika lényege, hogy a rendszer potenciális energiáját meghatározott számú lépésként Gauss-függvények hozzáadásával módosítjuk, amelyek maximumpontja a kollektív változók pillanatnyi értékétől függ. 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. A metadinamika „továbbfejlesztett” változata a „well-tempered metadynamics”, amely a szimuláció sokkal hatékonyabb konvergenciáját teszi lehetővé. Létezik a módszernek olyan változata is, amely a Gauss-függvények szélességét is automatikusan választja meg.

A Gaussian Accelerated Molecular Dynamics módszer javított mintavételezést tesz lehetővé előre definiált reakciókoordináták megadása nélkül 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. A módszert újabban eredményesen alkalmazták ligandkötődés mechanizmusának tanulmányozására többek között G fehérjéhez csatolt receptorokhoz és a HIV proteázhoz.

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, 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. 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) 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 szöget -139° -ra, valamint az összes ω szöget 135° -ra állítottuk. A szimulációt a GROMACS szoftver AMBER03 molekulamechanikai erőter segítségével, állandó hőmérsékleten és nyomáson végeztük. Az FXIII-A 4KTY jelű röntgendiffrakciós szerkezetét használtuk a dokkolásnál. Ez a szerkezet a FXIII-A aktív, monomer konformációjának felel meg, amelyhez egy irreverzibilis inhibitor (ZED-1301) kötődik kovalensen, amelyet a szimulációkhoz eltávolítottunk.

A dokkoláshoz HADDOCK szoftver 2.2-es verziójának webes felületét alkalmaztuk. 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*” szimulációval finomítottuk tovább, amelyhez a GROMACS szoftvert és az AMBER 14SB molekulamechanikai erőteret alkalmaztuk. Az alkalmazott protokoll 10, 10 ns hosszú lépésből állt. Minden egyes lépésben a rendszer először 5 K-ről 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 és Berendsen nyomásszabályozó alkalmazásával, periodikus határfeltételek mellett. A 1 nm-nél

távolabb lévő atomok közötti elektrosztatikus kölcsönhatások figyelembevétele a Particle Mesh Ewald (PME) módszerrel történt.

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, ahol a QM rendszernél magas szintű MP2 módszerrel, illetve diszperziós korrekciót tartalmazó DFT módszereket alkalmaztuk. Másrészt QM/MM alapú molekuladinamikai szimulációkat futtattunk, 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 “újonnan” létrejött N-terminálisához N-acetil, és minden C-terminálisához metilamido csoportot kapcsoltunk. A modell rendszer elkészítéséhez a TAO szoftvercsomagot is felhasználtuk. 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 α – C β 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, valamint 0,15 M sókoncentrációnak megfelelő számú Na⁺ és Cl⁻ ion hozzáadásával vettük figyelembe. Mivel a molekuladinamikai szimulációk nagy számú lépésből állnak, QM rendszernél az energiák és

az erők hatékony számítását lehetővé tevő félempirikus módszert, a sűrűségfunkcionál-elméleten alapuló DFTB3-at alkalmaztuk. A felhasznált paraméterkészlet a szerves- és biomolekulákra kifejlesztett 3ob-3-1 volt. A „link” atomokat az ONIOM-típusú számításainknál használt sémához hasonlóan definiáltuk, a „kettévágott” $C\alpha - C\beta$ 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. Elsőként geometria optimalizálást futtattunk 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). Geometriaoptimalizációkat 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 energiszámításokat: 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 algoritmusáé 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 zérusponti vibrációra történő energiakorrekciók számítása céljából, részben az imaginárius vibrációs frekvenciák meglétének ellenőrzésére az átmeneti állapotokban.

A Cys314 és His 373 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.

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. A szoftver a metadinamikai szimulációkhoz a PLUMED programmal is bővítve lett. A modell rendszerre 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. A “ekvilibrációs” 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. 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)

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. Ez a szerkezet monomer AT-nak (tehát nem egy „natív” és egy latens molekula dimerjének) felel meg. Ez a rendszer ligandumot nem tartalmazott.

A második rendszer ugyanezen a struktúrán alapult, azonban egy pentaszacharid molekulát, idraparinuxot helyeztünk el a szerkezetben. Az idraparinux konformációja oldatban korábban már vizsgálatra került egyetemünkön NMR mérések valamint molekuladinamikai szimulációk segítségével. A pentaszacharid kiindulási szerkezetét az 1NQ9 röntgendiffrakciós szerkezetben (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 szerkezetten alapult, amely az AT egy „részlegesen aktivált” állapotát mutatja egy pentaszachariddal alkotott komplexben. A szimulációhoz a pentaszacharidot itt is idraparinuxra módosítottuk. A röntgendiffrakciós szerkezetekből hiányzó hurkokra a kiindulási konformációkat a MODELLER szoftverrel nyertük.

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.

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). Ennek megfelelően a

pentaszacharid modellezésére ezt az erőteret választottuk, míg a fehérjére a CHARMM36m erőteret alkalmaztuk.

A szimuláció előkészítő lépéseihez és a topológia fájlok elkészítéséhez a CHARMM-GUI 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 szimulációkhoz az AMBER16 szoftvercsomag pmemd.cuda programját használtuk. 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.

A GAMD szimulációkat minden esetben egy 60 ns ekvilibrációs szakasz előzte meg. A szimulációknál kettős gyorsítást (dual boost) alkalmaztunk, tehát a rendszer teljes potenciális energiáját és a diéderes 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.

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. A fehérje másodlagos szerkezetét a DSSP módszer segítségével vizsgáltuk. 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 interglikozidos atomok távolságainak négyzetes középértékét határoztuk meg a szerkezetek között. A konformációváltozások jellemzése céljából reprezentatív konformációkat választottunk ki az egyes trajektóriákból, klaszteranalízis segítségével. 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 hasonlító konformációkat használtuk.

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

6. Eredmények és diszkusszió

6.1 A FXIII katalitikus mechanizmusának vizsgálata

6.1.1 A FXIII és az alfa-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. Az általunk kapott konformáció összhangban van a rendelkezésre álló enzimkinetikai mérések eredményeivel, valamint az NMR mérésekkel. 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 FXIII-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 oldalláncok 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. 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.

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. Kevesebb adat áll rendelkezésre a transzglutaminázok enzimsaládjá 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. 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. 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 zérusponti vibrációra korrigált energiákat is. 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. Ezzel szemben a számításaink alapján az aktivált FXIII A alegységében az ionpár forma lehet a stabilabb, a cisztein proteázokhoz hasonló módon.

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. 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 tetraédres intermedier (tio-félacetál anion) létezését. Iismaa és munkatársai a transzglutamináz 2 Trp241 (amely az FXIII

A alegységben a Trp279-nek felel meg) aminosavval kapcsolatos mutagenézises kísérleteikben azt találták, hogy a katalitikus hatékonyság jelentősen csökken, ha ez az aminosav például fenilalaninra cserélődik. Feltételezték, hogy a triptofán oldallánc a tetraédes intermedier stabilizálásában játszhat szerepet.

Az acilezési lépés vizsgálata céljából két különböző reakciókoordináta-pár segítségével feltérképeztük a potenciálisenergia-felületet (d_1 - d_2 , valamint d_1 - d_3 ; d_1 : Cys314 kénatom-szubsztrát amid szénatom távolság, d_2 : szubsztrát amidcsoport C-N távolság, d_3 : szubsztrát amid N-proton távolság), két különböző módszerrel (MP2/6-31G(d) és M06-2X/6-31+G(d,p)). A d_1 (Cys314 kénatom-amid karbonil szénatom távolság) és d_2 (C-N távolság a szubsztrát amidcsoportjában) változók segítségével kapott energiafelületeken a legalacsonyabb energiájú konformáció mindkét esetben a Michaelis-komplex volt (körülbelül $d_1 = 2,0 \text{ \AA}$, $d_2 = 1,35 \text{ \AA}$ -nél). Az eredmények 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 intermediernek 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 $-\text{NH}_2$ 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 $-\text{NH}_2$ csoportra egy további „relaxed scan” segítségével is vizsgáltuk. Két potenciális energiafelület 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.

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 (d_2). A két „scan” a korábbiakhoz hasonlóan az alkalmazott módszerben különbözött egymástól. 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.

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.

Az öt stacionárius pont „scan”-ekből nyert geometriáit különböző módszerek és bázisok segítségével újraoptimalizáltuk, a reakciókoordinátákra vonatkozó rögzítések feloldásával. Az első átmeneti állapotra kapott energiák a zérusponti 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 keresztköési 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 sebességmeghatározó lépésnek feltételezzük, az aktiválási energia kb. 85 kJ/mol lenne a magas szintű MP2 számításaink alapján. Ezen a szinten a zérusponyi vibrációra 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 s⁻¹ kinetikai állandónak felel meg. Ezzel szemben az irodalomban különféle szubsztrátokra 16-490 s⁻¹ állandók szerepelnek. Ebből arra következtethetünk, hogy a hatékony katalízishez feltehetően a peptid több aminosavának jelenlétére is szükség van.

A Michaelis-komplex geometriája a d₁-d₄ „karakterisztikus” távolságok vizsgálata alapján szinte állandó a módszertől és az alkalmazott bázistól függetlenül. Az első átmeneti állapot és a tetraédres intermedier szerkezete meglehetősen közel áll egymáshoz, nagyon kicsi a különbség a d₁ és a d₂ távolságokban. A szerkezetben megfigyelhető a Trp279 és az amid karbonil szénatom közti hidrogénkötés, ez a tirtófán 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 tetraédres 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 (d₂) 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 d₁, a tioészter intermedier és kötött NH₃ esetén pedig a d₂ és d₄ 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. A szimulációnk során több protonátmenet is történt, mindkét irányban. A rendszer a His-protonált állapotokhoz képest jellemzően jóval rövidebb időintarvallumokban 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, 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. 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 labilisnak 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.

A szimuláció során nukleofil támadás először $\sim 1-54$ 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 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 állapotnak tekinthetők.

A kötődés mechanizmusának vizsgálata céljából GAMD szimulációkat futtattunk, az „Antitrombin pentaszacharid-kötődési mechanizmusának vizsgálata” szakaszban leírt protokoll szerint. 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 $2,5 \text{ \AA}$ alatti értékeket vett fel a szimuláció hosszabb szakaszában (A1 és B1). Ezekben a szimulációkban 1 \AA -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 A1 és a B1 trajektóriákból vett 1000 köztes állapot közül kiválasztottuk azt, ahol az RMSD legalacsonyabb volt, és az 1NQ9 röntgendiffrakciós szerkezetre illesztettük. Hasonlóan jártunk el az 1NQ9 rendszer $1 \mu\text{s}$ -os szimulációjánál. 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.

A kötődés folyamatának jellemzése céljából három alegység, a D, az F és a H RMSD-jét külön-külön is meghatároztuk. 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 $1 \mu\text{s}$ -os szimulációja 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. 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. 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. 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 \AA alatt volt. 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.

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 is megfigyelhetőek, vagy csak a teljesen aktivált állapotban. 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, amely nem

tartalmazza ezt a szerkezeti elemet. Ezekben az „előzetes” szimulációkban azonban javított mintavételezés mellett sem sikerült a P hélix kialakulására utaló jeleket észlelnünk. Emiatt a munkánkban a pentaszacharid kötődését egy olyan, nem-aktivált AT konformációhoz vizsgáltuk (1T1F), amely eleve tartalmazza a P-hélixet. A hélix a DSSP adatok alapján az összes GAMD (és az összes egyensúlyi) dinamikai szimulációban igen stabilnak bizonyult. 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. 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 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.

A hinge régió kimozdulása - a témában megjelent legfrissebb közlemények alapján - feltehetően az aktiváció második lépésében megy végbe. 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 molekularészt a „nyitott” állapotban.

A trajektóriákban a „hinge” régió konformációját a Val375 és a Ser380 aminosavak α -szénatomjai közötti távolsággal jellemeztük. 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 *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 „*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 voltak. A kiértékelést elvégeztük az összes GAMD szimulációra külön-külön, illetve a négy „nem aktivált AT és pentaszacharid” és a két „1NQ9” szimulációkból származó adatok egyesítésével. 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, 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.

A D-hélix jelentős meghosszabbodását kizárólag az egyik olyan szimulációban sikerült megfigyelni, amely az AT-pentaszacharid komplex szerkezeten (1NQ9, 1. szimuláció) alapult. A konformációváltozás körülbelül 720 ns-nál kezdődött, a trajektória ~850 ns utáni részében nagyobbrészt meghosszabbodott hélixet tartalmazó konformációk fordultak elő. A hélix ebben az állapotban körülbelül egy aminosavval rövidebb annál, ami az „aktivált” állapotok röntgendiffrakciós szerkezetében megfigyelhető. 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 mutatta. A tanszékünk egy korábbi munkájában hosszú 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 az 1T1F szerkezetből kiindulvasikerült kimutatnunk az átmenet lehetőségét a másik konformációba metadinamikai szimulációval.

A távolság jellemzésére az Arg236 és az Ile390 aminosavak α -szénatomjai közötti távolságot választottuk, ez alapján a két konformációs típus jól elkülöníthető. 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.

Azonban a javított mintavételezés ellenére is, vagy csak egyetlen átmenetet tapasztaltunk a két főbbkonformációs 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 konformációváltozásait szabadenergia-felületek segítségével is jellemeztük, az energiafelületeket „GAMD reweighting” segítségével számítottuk, az RCL, illetve a „hinge” régió pozícióját leíró két reakciókoordináta segítségével. Ebből arra következtethetünk, hogy az RCL két konformációs típusa közötti átmenetet valamilyen energiagát lassíthatja. Az is lehetséges azonban, hogy 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. Az allosztérikus folyamatokat a szimulációink kimenetéből Lange és Grubmüller módszere segítségével vizsgáltuk. 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*”), 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.

Ezen kívül vizsgáltuk, hogy a pentaszacharid kötődése hogyan befolyásolja az AT egyes aminosavainak flexibilitását. 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). 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 AT 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. Az RCL fluktuációjának csökkenése látszólag ellentmond annak, hogy korábbi közleményekben a hurok flexibilitásának növekedését mutatták ki MD szimulációk segítségével ligandkötődés hatására. 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.

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 véralvadásgátlók fejlesztéséhez. Másrészt az AT esetén leírtak több olyan mutációt, amelyek a heparin-kötés zavarát okozzák. 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) tudtunk 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 antitrombin (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-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 alrendszerrel 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 allostérikus 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 allostérikus szignál továbbításában a pentaszacharid-kötőhely felől az FIXa és az FXa faktorok „másodlagos” kötőhelye felé.



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.

