

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A HUMÁN CIKLOOXIGENÁZ-1 ASZPIRINNEL TÖRTÉNŐ
GÁTLÁSÁNAK ÉS AZ ANTITROMBIN MŰKÖDÉSÉNEK IN
SILICO VIZSGÁLATA**

Tóth László

Témavezető: Dr. Komáromi István



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2015

A HUMÁN CIKLOOXIGENÁZ-1 ASZPIRINNEL TÖRTÉNŐ GÁTLÁSÁNAK ÉS AZ ANTITROMBIN MŰKÖDÉSÉNEK IN SILICO VIZSGÁLATA

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

Írta: Tóth László, okleveles vegyész

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

Témavezető: Dr. Komáromi István, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Erdódi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Bogár Ferenc, PhD

A doktori szigorlat helyszíne, időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Gyermekgyógyászati Intézet könyvtára
2015. május 27. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Ferenczy György, az MTA doktora
Dr. Bényei Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
bírálok: Dr. Ferenczy György, az MTA doktora
Dr. Bényei Attila, PhD
tagok: Prof. Dr. Erdódi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Bogár Ferenc, PhD

Az értekezés védésének helyszíne, időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. május 27. 13:00

1. AZ ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

A hemosztázis egy sokkomponensű, bonyolult rendszer, melynek a zavara vérzékenységet vagy trombózt okoz. Összetettségéből adódóan több ponton is beavatkozhatunk ebbe a rendszerbe, megelőzve így pl. a nem kívánt trombózt. A következőkben két ilyen beavatkozási pont legfontosabb szereplőivel kívánok foglalkozni.

1.1. Az aszpirin és a COX-1 enzim

Az első, kereskedelmi forgalomban kapható szintetikus láz-, fájdalomcsillapító- és gyulladáscsökkentő gyógyszer az aszpirin (angolul acetylsalicylic acid vagy ASA) volt, amelyet a 19. század végén a Bayer kezdett el forgalmazni. Később azt találták, hogy hasonlóan az egyéb, nem szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyagokhoz, az aszpirin is gátolja a prosztaglandin képződést. Az aszpirin valóban csökkenti a prosztaglandin-H₂ szintet, ami a thromboxán-A₂ (egy hatékony vérlemezke aktivátor) prekuzora. Az ASA ezt a hatást a ciklooxygenáz-1 (COX-1) enzim egyetlen szerin aminosav egységének (Ser530) acetilálásával éri el. Ez az alapja annak az aszpirin a thromboemboliás vaszkuláris eseményekkel szembeni védőhatásának. A COX-1 Ser530 acetilálásának pontos és egyértelmű reakciómechanizmusára azonban az eddigi kísérleti eredmények alapján nem lehetett javaslatot tenni.

A COX enzimek, más néven prosztaglandin-H szintetázok (prostaglandin-H synthases; PGHSs), bifunkciós enzimek térbelileg két elkülönülő reakció centrummal, amelyek mechanikusan kapcsoltak. A ciklooxygenáz centrum katalizálja az arachidonsav átalakulást prosztaglandin-G₂-vé (prostaglandin-G₂, PGG₂), ami egy hidroperoxid endoperoxid prosztaglandin), míg a peroxidáz reakciócentrum a PGG₂ → prosztaglandin-H₂ (PGH₂) redukcióért felelős. A PGH₂ ezután specifikus enzimek segítségével tovább alakul különböző prosztanglandinokká és thromboxán-A₂-vé. A COX enzimeknek két fő izoformája ismert, a COX-1 és a COX-2, bár

előfordul, hogy a COX-1 enzim splice variánsát COX-3-nak jelölik. A COX-1-ről tudjuk, hogy a PGH₂ termelésért felelős, amely közös kiindulópontja a prosztaglandin származékoknak. A COX-2 szintén szerepet játszik bizonyos normál fiziológias folyamatokban, de az expressziója főként olyan kórélettani folyamatokhoz köthető, mint a gyulladás, ezért a nem-szteroid gyulladásgátló hatóanyagok célpontja. Mind a COX-1, mind a COX-2 membránhoz kötött homodimerek, melyek ~70 kDa méretű alegységekből épülnek fel. Az alegységek egy rövid EGF domént, egy membránkötő domént és egy nagy C-terminális katalitikus domént tartalmaznak. Habár a COX-1 és a COX-2 egymáshoz viszonyítva csak ~ 60% aminosav azonossággal bírnak, de szerkezeti hasonlóságuk figyelemre méltó. A COX szerkezetek egyik jellegzetessége a membránkötő egységen lévő bejáratnál lévő, hosszú hidrofób csatorna. Ebben található az aktív centrumot, melyet az Arg120, Tyr355 és Glu524 aminosav egységek választanak el a csatorna bejáratától. A szerkezet alapú aminosav számozási rendszer általánosan alkalmazható mindkét ciklooxigenáz izoforma esetén, és megfelel a juh COX-1 szekvenciának, amelynek 3D szerkezetét elsőként írták le.

Kimutatták, hogy az ASA nukleofil reagensekkel történő reakciójának első lépésében a nukleofil közvetlen támadást indít a fenolos észter karbonil szénatomjára anélkül, hogy anhidrid intermedier képződne. Elméleti úton, QM/MM dinamikát futtatva és azon belül SCC-DFTB QM módszert használva igazolták, hogy a fenti mechanizmus igaz lehet az ASA-COX reakcióra is.

ASA-COX kölcsönhatásban, mind a COX-1 mind a COX-2 esetében, bizonyos aminosavak döntő szerepet játszanak abban, hogy a tapasztalati úton jól ismert átészterezési reakció lejátszódhasson. Az aszpirin acetil csoportját C14 izotóppal jelezve vad típusú, illetve pont mutációval módosított COX-2 enzim felhasználásával kísérleti módszerekkel igazolták, hogy a Tyr385 szerepe döntő fontosságú, míg az Arg120 és Tyr348 aminosav egységek hatása az átészterezési reakcióra valamennyivel kisebb mértékű. Tudjuk, hogy míg a Tyr385 fontos szerepet játszik a ciklooxigenáz reakcióban, addig a Tyr348Phe, Tyr355Phe és az Arg120Ala mutációk csak részben képesek befolyásolni a ciklooxigenáz aktivitást. Az acetilált enzim és a

szalicilsav (termék) komplex röntgendiffrakciós szerkezete azt mutatja, hogy a szalicilsav $\sim 5\text{\AA}$ távolságra van az ideális átmeneti állapot helyzetéhez képest. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az Arg120 szerepe valószínűleg az, hogy biztosítsa a szalicilsav megfelelő orientációját és nem az, hogy közvetlenül részt vegyen a reakcióban.

1.2. ASA-COX-1 célkitűzés

Az irodalomban csak egy COX enzim irreverzibilis gátlási mechanizmusának felderítését célzó, aszpirin átésztereződési reakció mechanizmusát vizsgáló közleményt találtunk. Ugyan a Tosco és munkatársai által javasolt, QM/MM dinamikai szimulációra alapozott reakciómechanizmus nagyon racionálisnak tűnik, de mindenképpen megerősítést igényel szofisztikáltabb elméleti és/vagy kísérleti módszerekkel. Míg a QM/MM dinamikai reakció út feltérképezés elvileg jó eredményt szolgáltat a reakció mechanizmusára, az ilyen szimulációk túlzottan függenek az alkalmazott kvantumkémiai módszertől. Ebből a szempontból, a statikus számításokhoz használt magasabb szintű kvantumkémiai elméletek nagy jelentőséggel bírnak, mint a dinamikus reakció-modellezések kiegészítői. Mivel vizsgálataink egy átfogóbb humán COX-1 kutatás részét képezték és a humán COX-1 enzimre röntgendiffrakciós szerkezet nem áll rendelkezésre, ezért célkitűzésünk volt annak komparatív modellezéssel történő származtatása.

Célunk volt továbbá az irreverzibilis ciklooxigenáz-1 aszpirin reakció mechanizmusának jellemzése hibrid ONIOM típusú QM/MM módszerekkel. A modell rendszereinken kivitelezendő magas szintű *ab initio* és DFT számítások során a reakciócentrumot körülvevő viszonylag nagy környező régióban található szomszédos aminosavak sztérikus és elektrosztatikus hatását is figyelembe kívántuk venni. Ezt az ONIOM *electronic embedding* módszerrel értük el, amely lehetővé teszi, hogy a hullámfüggvényt a környező parciális töltések polarizálni tudják. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a reakcióban a szerkezeti vízmolekuláknak van-e szerepe, és ha

igen, milyen. Az is célunk volt, hogy megtaláljuk az egzakt átmeneti állapot(ka)t és a lokális minimumokat a potenciális energiafelületen és vibrációs analízissel bizonyítsuk a létezésüket. Számítások sorozatait kívántuk elvégezni annak meghatározására, hogy az eredményeink mennyire függenek az alkalmazott QM módszertől és a bázis méretétől. Javaslatot kívántunk tenni arra, hogy az ASA-COX-1 komplex \rightarrow szalicilsav és acetilált COX-1 termék átalakulás egy vagy több elemi reakciólépésben történik-e.

1.3. Antitrombin

A szerpín (**szerin proteáz inhibitor**) fehérjecsaládhoz tartozó antitrombin III (antitrombin, AT) egy nagyon hatékony endogén antikoaguláns fehérje. Az antikoaguláns aktivitás alapja a szerin-proteázokkal szemben mutatott gátló hatása. A magasabb rendű életformákban a szerin proteázok elsődleges fiziológiai inhibitorai a szerpinek. Jellemző példa a hemosztázis és a fibrinolízis folyamata. A vérerekben a legnagyobb mennyiségben előforduló szerpín az AT, amely natív formájában csak gyenge inhibitora a véralvadási proteázoknak. Ez szükséges feltétele annak, hogy nagy koncentrációja ellenére elkerüljük a vérezést.

Az antitrombin vázát kilenc hélix (A-I) és három β -redő (A-C) alkotja, amelyek nagymértékben konzerváltak ebben a fehérje családban. A "reactive center loop" (RCL) jellemzően ~ 20 aminosavból áll, funkciója pedig a proteáz „csapdába ejtése” és elfogása. A proteáz az RCL középső részén, inkább a C-terminálisához közelebb elhelyezkedő P1-P1' peptid kötést hasítja és a reakció első lépésében acil-enzim intermedier alakul ki. A következő lépés az acil-enzim komplex hidrolízise lenne, azonban erre nem kerülhet sor, mivel a felhasított RCL konformációs változáson keresztül beépül a β -redő-A-ba, a harmadik és ötödik szalag közé. A folyamat során a proteáz katalitikus centruma annyira torzul, hogy az megakadályozza a további hidrolízist. Az RCL beépülése, melynek során az AT „átvezeti” a proteázt a másik

oldalra (kb. 70 Ångström távolságra a Michaelis komplexhez képest) közös minden szerpin gátlási mechanizmusban.

Az AT-nak speciális mechanizmusokra van szüksége, hogy csak ott és csak akkor érje el teljes, két-három nagyságrenddel nagyobb gátló hatását, ahol, és amikor ez szükséges. A trombin gátlásában az AT-trombin közötti glükózaminoglikán híd képződése, míg a FXa és FIXa proteázok gátlásában glükózaminoglikánok által kiváltott allosztérikus aktivációnak van kulcsszerepe. Az előbbihez hosszabb láncú heparin vagy heparán-szulfát szükséges, míg az allosztérikus aktivációhoz elegendő a megfelelő szulfatált pentaszacharid-fragmensek jelenléte. Számos különböző mértékben aktivált AT röntgendiffrakciós szerkezet érhető el a proteinek szerkezeti adatbázisában. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy az AT FXa és FIXa proteázokkal szemben mutatott, megfelelő pentaszacharidokkal (PS) kiváltott gátló hatása három elkülöníthető lépésben alakul ki. Elsőként az erősen negatív felülethez koordinálódik a PS ligandum. Ezt egy erősebb kötődés kialakulása követi, amely konformációs változásokat eredményez (döntően) a kötő régióban, majd a változásért felelős jel átkerül távolabbi régiókra, például ekkor szabadul ki a csukló (hinge) régió a β -redő-A-ból. Bár az AT-ról rendelkezésre álló röntgendiffrakciós szerkezetek felbecsülhetetlen értékű információt szolgáltatnak az allosztérikus aktivációs mechanizmusról, ezek alapvetően a dinamikus allosztérikus aktiválásról készített, kristályerők által befolyásolt statikus állapotoknak tekinthetők. Ezt kiválóan szemlélteti a két szulfatált glükózaminoglikán-mentes, eltérő RCL geometriával rendelkező natív szerkezet; egyiket a natív és látens forma együtt kristályosításával, másikat csak a natív forma kristályosításával nyerték. Ezek egyike sem alkalmazható az aktiváló PS nélkül is tapasztalható alap inhibíciós aktivitás magyarázatára, mert ezekben a szerkezetekben az RCL kitüntetett fontosságú Arg393 oldallánca a fehérje belseje felé mutat, azt a FXa aktív centruma nem tudja elérni. Ezért fel kell tételeznünk, hogy léteznek további RCL konformációk is.

A protein adatbankban (PDB) elérhető számos röntgendiffrakciós AT szerkezet ellenére csak nagyon korlátozott mértékű és csak közvetett információ

kaphatunk az AT aktiválását kísérő konformációs változásokról. Keveset tudunk a különböző monoszacharid egységek szerepéről, illetve a pentaszacharidok okozta indukált allosztérikus jel terjedésének mechanizmusáról is. A véralvadási fehérjék *in silico* módszerekkel történő szerkezeti vizsgálatainak folyamatosan növekszik a jelentősége. Találunk köztük rejtett szerkezeti események dinamikai szimulációval történő leírást, és szerpineken végzett molekuladinamikai tanulmányt is.

1.4. Antitrombin célkitűzés

Az AT esetében az allosztérikus mechanizmus pontos feltérképezéséhez szükséges térbeli és időbeli felbontás elérése kísérleti (pl. magmágneses rezonancia) módszerekkel még nem lehetséges. Ugyanakkor, megfelelő számítási kapacitást és alkalmas erőteret feltételezve, molekuláris dinamikai szimulációk elvileg alkalmasak lehetnek az allosztérikus jel terjedési útvonalainak feltérására.

Munkánkban a szabad, szulfatált glükózaminoglikán-mentes AT dinamikus tulajdonságainak *in silico* molekuláris dinamikai vizsgálatát tűztük ki célul. Vizsgálni kívántuk, hogy a szimuláció ideje alatt előfordul-e olyan RCL konformáció, amelynek hinge régiója még nem szabadult ki a β -redő-A-ból, de alkalmas lehet az AT – szerin proteáz Michaelis-komplex kialakulására. Célul tűztük ki, hogy információt szerezzünk a PS-kötő régió flexibilitásáról, ami döntő szerepet játszhat a megfelelő AT-PS komplex különböző formáinak képződésében. Tudni szerettük volna, hogy a PS jelenléte nélküli szimuláció trajektóriájában utal-e valamilyen jel az új P-hélix kialakulására vagy a D-hélix „kiterjedésére”. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy szimuláció során mennyire stabil a már kialakult P-hélix a szabad natív AT szerkezetekben. Arra is választ kívántunk kapni, hogy a RCL hinge régiójának kiszabadulása és a pentaszacharid-kötő régió mozgása között található-e kapcsolat a szimulációk trajektóriáiban? Az egyes régiók közötti, információ-elmélet alapú "kölsönös információ" értékek kiszámítása szintén része volt célkitűzéseinknek. Az utóbbi adatok segíthetnek annak a megértésében, hogy az allosztérikus kölsönhatást

kísérő szerkezeti változások hogyan, milyen úton jutnak el a hatásért felelős régióhoz és hogy ezek az „információs csatornák” léteznek-e már a szabad natív antitrombin esetében is.

2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

2.1. ASA-COX-1 enzim

2.1.1. Homológia modellezés és dokkolás

Mivel a humán COX-1 enzimről nem állt rendelkezésre atomi felbontású 3D szerkezet, ezért egy juh COX-1 szerkezet (PDB azonosító: 2ayl) és a YASARA szoftver felhasználásával származtattuk a humán COX-1 geometriát. A homológia modellezés során simulated annealing típusú minimalizálást, explicit oldószer (víz) molekulákat és oldallánc optimalizációt állítottunk be, amely eredményeképpen a target végül $\sim 0,53$ Å RMSD eltérést mutatott a templáthoz képest. A javasolt szerkezetet PROCHECK és verify3D szoftverekkel ellenőriztük. Az ellenőrzés során azt kaptuk, hogy a Yasara szoftver által javasolt humán COX-1 szerkezet minősége formálisan legalább olyan jó, mint a templaté. Egyrészt az elvégzett tesztek eredménye miatt, másrészt pedig azért, mert funkcionális azonosság áll fenn a templát és a target között, nem végeztünk molekuladinamikai szimulációt a szerkezet stabilitásának ellenőrzésére.

Ezt követően az ASA-t a humán COX-1 enzim aktív helyére dokkoltuk be az Autodock 4.0 szoftver grafikus felületét használva. A dokkoláshoz Lamarcki genetikus algoritmust és merev receptor-flexibilis ligandum protokollt alkalmaztunk. A $98 \times 98 \times 122$ rácspont méretű dobozban, melynek közepét a Ser530 $O\gamma$ atomjához rendeltük, $0,177$ Å finomságú rácspont távolságot definiáltunk. Minden más értéket alapbeállítás szerint hagytunk. Két jellemző konformációs állapotot kaptunk eredményül, amiből a mélyebb energiájú ($\sim 70\%$ gyakorisággal előforduló) konformert használtuk a további munkához.

2.1.2. Modellépítés és QM/MM számításokhoz

A reakciócentrumot körülvevő régiót úgy definiáltuk, hogy azok az aminosavak tartozzanak bele, amelyek legalább egy atomja 7Å-nél közelebb helyezkedik el a Ser530 O γ - vagy az ASA karbonil C atomjához. A vágások miatt keletkező láncvégeket (N- és C-terminálisok) acetil és N-metil csoportokkal zártuk le. Az így létrehozott régió 81 aminosav egységet tartalmazott, melyből 61 „valódi” aminosav és 20 a lezáráshoz használt acetil vagy N-metil csoport. Egy erre a célra készített segédprogrammal a protein adatbázis típusú fájlt Gaussian stílusú input fájlra konvertáltuk, mely AMBER erőter atomtípusokat és hozzájuk tartozó parciális töltéseket rendelte az atomokhoz.

Kezdsnek két kiindulási rendszert definiáltunk a 81 aminosav egység alapján. Az egyik az A modell, amiben csak a Ser530 oldallánc és a Tyr385 oldallánc, valamint az ASA molekula mozgása volt megengedett az optimalálás alatt, a modell többi atomjának koordinátái a számítás során rögzítve voltak a Gaussian program egy erre alkalmas funkciójával. E modellnek belső rétege csak az ASA-t, valamint a Ser530 és a Tyr385 aminosavak oldalláncát tartalmazta, ezekre végeztünk el a magas szintű (azaz kvantummechanikai) számításokat.

A másik rendszer a B modell, amiben az Arg120, Phe198, Phe205, Phe209, Tyr348, Val349, Leu352, Ser353, Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387, Phe518, Ile525, Leu534 aminosavak oldalláncai, valamint a Ser530 és az ASA molekula volt ‘aktív’ a geometria-optimalizálás alatt, míg a többi atom helyzete rögzített volt. Ennek a modellnek a belső rétege az ASA molekulából, a teljes Ser530-ból (kiegészítve az ezt megelőző és követő aminosavak helyett a lezáró acetil és N-metil csoportokkal) és a Tyr385 aminosav oldalláncából áll.

A COX enzim belsejében található szubsztrátkötő csatorna erősen hidrofób karaktere ellenére a röntgenkristallográfiás szerkezet alapján előfordulhat benne szerkezeti víz, lásd például a 2ayl, 1q4g és 1eqg PDB azonosítójú szerkezeteket. Ezért a számításokat olyan modelleken is elvégeztük, amelyek egy vagy két vízmolekulát is

tartalmaznak a Ser530 közelében. Feltételeztük, hogy a vízmolekulák hozzájárulnak az átmeneti állapot stabilizálásához vagy a Ser530 $O\gamma$ proton transzferéhez. A B modellt ezután 4 alcsoportra bontottuk: B1 modellben nem szerepelt víz, a B2 és B3 modellekben egy-egy vízmolekula, míg a B4-ben mindkét víz pozíciót feltöltöttük (W1 és W2).

2.1.3. QM/MM számítások

Számos ONIOM-típusú QM/MM számítást végeztünk electronic embedding közelítéssel különböző szintű QM elméleti módszerekkel, kezdve a HF/6-31G-től egészen az MP2/6-31G(d,p)-ig. Az A modellen végzett számítások csak a potenciális energiafelület feltérképezését szolgálták a két belső koordináta függvényében: az egyik a felszakadó Ser530 $O\gamma$ -H γ kötéstávolsága, a másik a képződő $O\gamma$ -C(ASA acetil szénatom) kötéstávolság. A potenciális energiafelület elsődleges szerepe a későbbi átmeneti állapot keresési számítások alapjául szolgáló kezdő geometria kiválasztása volt.

A B1 modellen a HF, B3LYP és MP2 elméleti szinteken készültek számítások, különböző méretű bázisokat alkalmazva. A B1 modell esetében az ASA-COX-1 komplex, az átmeneti állapot és a „termék” optimált geometriáit minden elméleti módszerrel meghatároztuk. A zérusponthoz tartó rezgési energiával (Zero point vibration energy (ZPVE)) korrigált energiaszinteket az MP2, HF/6-31+G(d,p) és B3LYP/6-31+G(d,p) kivételével szintén kiszámítottuk minden módszerrel. Az elsőrendű nyeregponthoz tartó létezésének és lokális energiaminimumok bizonyítékának tekinthető az analitikusan számított egy vagy zérus imaginárius frekvencia. A B2, B3 és B4 modelleken csak B3LYP számításokat végeztünk.

Annak felderítésére, hogy aminosavak rögzítésének milyen hatása van a megfelelő geometriákra és energiaértékekre, a B1-B4 modellek analógiájára elkészítettük a B1'-B4' modelleket, melyeken úgy végeztünk B3LYP/6-31G(d) számításokat, hogy közben végig szabad, teljes mozgást biztosítottunk a B-modellnél

felsorolt aminosavakon túl a His90, Val435, Ile346, Tyr356, Leu360, Ile523, Gly526, Ala527, Pro528, Phe529, Leu531 egységeknek, továbbá a Met113, Val116, Leu117, I123, Thr206, Met522, Glu524 és Leu535 aminosavaknak csak a peptid kötéseit rögzítettük.

Az intermolekuláris diszperziós kölcsönhatások figyelembe vételére az előző B1'-B4' modellekre a Grimme által a DFT számításokhoz javasolt B97-D funkcionált használtuk, 6-31G(d) bázissal. A B1-B4 számításokhoz képest ezek sokkal több optimalizációs lépést és emiatt több CPU időt igényelnek, ráadásul nagyobb annak a valószínűsége, hogy lokális minimum csapdába esik a rendszer a minimalizálás során.

A számításokat Gaussian '03 és Gaussian '09 szoftvercsomaggal végeztük. A megjelenítéshez a Molekel, Chimera 1.4, VMD 1.9, DPlot és az ESPript szoftvercsomagokat használtuk. A B1, B2, B3 és B4 modellek rendre 988, 991, 991 és 994 atomból álltak, míg a QM alrendszer vízmolekula nélkül, egy vízmolekulával és két vízmolekula jelenlétében 56, 59 illetve 62 atomból épültek fel.

2.2. Antitrombin

2.2.1. Molekuladinamikai szimulációk

A molekuladinamikai szimulációink egyik alapjául (1. szimuláció) a protein adatbázisban található 1e04 jelű AT szerkezet szolgált. Ebben a szerkezetben a natív és a látens antitrombin formák együtt kristályosodnak. A második modell az 1t1f.pdb szerkezeten alapul, amelyben az AT monomer formában kristályosodott ki, és az RCL az AT felszínéhez képest lényegesen eltérő helyzetben látható. Ekkor a natív-látens formák között az átalakulást a mesterséges Val317Cys és Thr401Cys mutáció, azaz új diszulfid híd létrehozása akadályozta meg. Ezeket a Cys317 és Cys401 aminosavakat a modellünkben virtuálisan visszaalakítottuk a vad típusú szekvenciára (2. szimuláció). A harmadik modellt a Ser137Ala/Val317Cys/Thr401Cys mutációkat tartalmazó (eredeti) 1t1f szerkezet alapján építettük (3. szimuláció).

A fentebb említett, protein adatbankban található antitrombin struktúrák (PDB azonosító: 1e04, 1t1f) hiányzó peptidszakaszait pótoltuk, hogy teljes antitrombinon tudjunk dinamikai szimulációt futtatni. A kapott loop szerkezet finomítását a PLOP szoftverrel tettük meg, mely a Schrödinger modellezési csomagban elérhető. A modellezéssel kapott szerkezeteket a Procheck szoftverrel ellenőriztük.

Az elkészült szerkezetek energia minimalizációját az AMBER '03 erőter alkalmazásával a GROMACS szoftvercsomaggal végeztük. Az eredeti röntgendiffrakciós struktúrák szerkezeti vízmolekuláit megtartottuk. A modelleket ezután (virtuálisan) dodekaéder dobozba helyeztük és szolvatáltuk. A doboz méretét úgy állítottuk be, hogy a doboz fala és a falhoz legközelebb eső protein atom közötti távolság legalább 12\AA legyen az 1e04, és 15\AA az 1t1f modellnél. Az utóbbi értéket azért választottuk nagyobbra, mert az 1t1f kompaktabb szerkezetű, mint az 1e04. A rendszereket neutralizáltuk, és a fiziológias ionerősség ($\sim 0,15\text{M}$) eléréséig Na^+ és Cl^- ionokat adtunk hozzájuk. Egy rövid, 2 ns-os simulated annealing periódus alatt fűtöttük fel a rendszert 310K-re. Ezt követően 2000 ns produkciós dinamikát futtattunk állandó részecskeszám (N), állandó nyomás ($P=10^5\text{Pa}$) és állandó hőmérséklet ($T=310\text{K}$) mellett, periódikus határfeltételt (PBC) és TIP3P explicit vízmodellt alkalmazva. Az elektrosztatikus és a van der Waals kölcsönhatásokra 10\AA cut-off távolságot alkalmaztunk. A nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatás korrekciót a Particle Mesh Ewald (PME) módszer segítségével számoltuk. A termosztát csatoláshoz a v-rescale a barosztát csatoláshoz pedig a Berendsen algoritmust használtuk. Ahhoz, hogy jó eséllyel vizsgálni tudjuk a nagy léptékű konformációs átmenetekhez tartozó konformációs ingadozásokat, a szimulációs időnek elég nagyoknak kell lennie. Ezt hatékonyabban érhetjük el, ha a szimulációs időléptéket hosszabbra választjuk. A virtuális atomi pozíció protokoll (virtual sites protocol) egy alternatívája a tömeg újraparticionálási módszernek, amelyet a szimulációkban az időlépték hosszának növelésére használnak úgy, hogy a hidrogén atomok helyzetét a szomszédos nehézatomok függvényeként definiálják. Munkánkban ezt alkalmazva mindegyik szimulációnál 4 fs-ra tudtuk növelni az

időléptéket. A három rendszer mérete (N), beleértve a virtuális pozíciókat is, rendre 85566, 88291 és 88165 részecskéből állt. A GROMACS szoftvercsomagot használtuk minden szimulációhoz és trajektória analízishez. A fehérje szerkezet megjelenítése a VMD 1.9.1 szoftverrel történt.

A Lange és Grubmüller által javasolt kölcsönös információ alapú általánosított korreláció értékeket, a `g_correlation` segédprogrammal számítottunk. A számításhoz a pillanatnyi koordinátákat ("frame"-eket) a trajektóriából nyertük ki, minden egyes nanoszekundum végéről egyet-egyét, összesen 2000 db-ot.

A ProDy csomag segítségével főkomponens analízis számításokat is végeztünk a dinamikai trajektória előbbi 2000 pillanatképet felhasználva. Ehhez grafikus interfészként a VMD molekulagrafikai szoftver "normál mód" funkcióját (normal mode wizard) használtuk. A normál mód számításokhoz a kovariancia mátrixokat csak a $C\alpha$ atomi elmozdulásokra készítettük el és csak a tíz legnagyobb amplitúdójú mozgást számítottuk ki a szoftver alap beállításait használva. Az allosztérikus útvonalakat is a trajektóriából nyert (fentebb említett) pillanatképekből számítottuk ki a WISP program segítségével, mely szintén integrálható volt a VMD grafikus csomagba. A Lys114-től a Ser380-ig tartó allosztérikus útvonal számítását az aminosavak $C\alpha$ atomjaira, mint "csomópontokra" végeztük el. A WISP kontakt csomópont meghatározási határértéket 4.5\AA értékre állítottuk be és 20 allosztérikus útvonalat generáltattunk.

Ebben a munkában elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a natív, szabad AT egyensúlyi dinamikai tulajdonságaiban hogyan észlelhetők egy későbbi konformáció változásra vagy allosztérikus jeltovábbításra utaló elmozdulások. Ezért az általunk vizsgált rendszerekre majdnem kizárólagosan egyensúlyi "brute force" NPT dinamikai szimulációkat végeztünk.

3. ÚJ EREDMÉNYEK

3.1. ASA-COX-1 enzim

A humán COX-1 szerkezetet juh COX-1 röntgendiffrakciós felvétel alapján homológia modellezéssel készítettük el, majd az ASA molekulát dokkolással pozícionáltuk az enzim szubsztrát kötőhelyébe. Számos ONIOM típusú QM/MM számítást végeztünk *electronic embedding* közelítéssel, különböző szintű QM elméleti módszerekkel az ASA-ra és az azt körülvevő aminosavakra azért, hogy egy elfogadható reakciómechanizmust találjunk az ASA-COX-1 átészterezési reakcióra. Meghatároztuk, a tanulmányhoz készített modellek keretein belül, az egzakt átmeneti állapotot és lokális minimum geometriákat valamint a megfelelő ZPVE korrigált energiaértékeket. Azt találtuk, hogy az ASA-COX-1 komplex képződését és a szalicilsav belső protonvándorlását figyelmen kívül hagyva az egész reakció lényegében egyetlen elemi lépésből áll. Az ASA-COX-1 komplexet tekinthetjük a reaktánsoknak. A komplex kialakulása során az ASA megközelíti a COX-1 aktív centrumát, egy kezdeti konformációval képez komplexet a COX-1 enzimmel. Míg az orientációban nagy valószínűséggel az Arg120, addig a kötés kialakításában a Tyr385 játszik kulcsfontosságú szerepet. Ebben a komplexben az ASA acetil karbonil szénatomja egy olyan helyzetben van, hogy a Ser530 O γ támadást tud indítani felé. Ez eredményezi az átmeneti állapot szerkezetet. Ebben az átmeneti állapotban a C (acetil karbonil szénatom)-O γ és az O (ASA-karboxilát)-H γ kötés kialakulása, valamint a Ser530 O γ -H γ kötés és a C (acetil karbonil szénatom)-O (ASA fenolos) kötés felhasadása egy elemi lépésben játszódik le. Meg kell jegyezni, hogy ez nem azt jelenti, hogy a kötések felhasadása és képződése teljesen szinkron folyamat lenne. Számításaink szerint például a H γ vándorlás megelőzi a C (acetil karbonil szénatom)-O γ kötés kialakulását. További átmeneti állapot nélkül rögtön termék képződik (acetilált-COX-1:szalicilsav), amelyben az O γ proton még mindig a szalicilsav karboxilát oxigénjén található. A H γ proton könnyen vándorol át a karboxilát csoport oxigénjéről a fenolos oxigénre.

Az átmeneti állapot létezését frekvencia analízissel bizonyítottuk. Az imaginárius frekvencia főként a Ser530 Hy proton transzfert és a Ser530 O γ -C (ASA acetil szénatom) kötés-nyújtás rezgéseket mutatja, ami szintén azt bizonyítja, hogy a proton transzfer és az O γ -C kötés kialakulása egy elemi lépéssel jellemezhető reakció.

A szerkezeti vízmolekulák vizsgálatából arra következtethettünk, hogy a lehetséges hidrogénkötés stabilizáló hatása az átmeneti állapot energiájára és geometriájára elenyésző, függetlenül attól, hogy hány vízmolekulát alkalmaztunk és milyen elméleti módszerrel számoltunk.

Az optimalizálható geometriai változók számának növelése nem változtat jelentősen sem a reprezentatív változók értékein, sem pedig a reakció aktiválási energiagátján. Ettől eltérő következtetésre jutottunk a B97-D diszperziós funkcionállal kapott eredményeket hasonlítva össze a B3LYP elméleti szinten kapottakkal. A B97-D módszer szignifikánsan (~3-4 kcal/mol-lal) alacsonyabb aktiválási energia értéket jósol, mint a B3LYP. A megfelelő geometriai paraméterek meglehetősen hasonlóak, kivéve a d4 értékeket, amelyekre a B97-D időnként lényegesen magasabb értéket mutat.

3.2. Antitrombin

2 μ s-os molekuladinamikai szimulációkat végeztünk a szabad AT natív formáin. Azt találtuk, hogy a korrelált konformációs átmenetek, amelyek az allosztérikus információt közvetíthetik a glükózaminoglikánok kötőhelyétől az RCL-hez, vagy az RCL hinge régiójához, a glükózaminoglikánok jelenléte nélkül is léteznek. Számításokkal valószínűsítettük, hogy az Arg393 oldallánc specifikus konformációja, amely a szerin proteázok megkötéséhez szükséges, nem elhanyagolható valószínűséggel fordul elő még a ki nem nyílt RCL konformációban is. Ez magyarázza az AT alapszintű gátlási képességét. Az 1e04 szerkezetből kiinduló szimulációban, ahol a P-hélix még nem alakult ki, a megfelelő szekvencia különösen

nagy fluktuációt mutatott és a megvalósult szerkezetek között előfordulnak hélix-szerű konformációs állapotok is.

Kimutattuk, hogy a D-hélix kiterjedésében érintett fehérje szekvencia-részlet szintén nagy RMS fluktuációval jellemezhető. A kölcsönös információ (MI) elemzések jelentős (általánosított) korrelációt mutattak azok között a régiók között, melyek a röntgendiffrakciós szerkezetek alapján az AT-PS komplexek kialakulásakor konformációs változást szenvednek el. Azt is kimutattuk, hogy az allosztérikus információ-terjedés útvonalai már az AT nem aktivált natív formájában is megjelennek. A trajektóriák alapján hasonló következtetést lehet levonni főkomponens analízissel és WISP analízissel is. Metadinamikai számításokat végeztünk a PLUMED-hez illesztett GROMACS molekuladinamikai csomag segítségével azért, hogy reális minimum energia útvonalakat és átmeneti állapotokat találjunk, amelyek összekötik a szabad natív antitrombin eddig leírt két különböző típusú (1e04 és 1t1f) RCL konformációját. A szimulációkból azt a következtetést tudtuk levonni, hogy ilyen útvonal (vagy útvonalak) létezhetnek és a két konformációs osztályt viszonylag csekély, már hőmozgással is legyőzhető energiagát választja csak el.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. ASA-COX-1 enzim

4.1.1. Homológia modellezés és dokkolás

Az aminosav azonosság a juh és humán COX-1 szekvenciák között majdnem teljes (több, mint 90%), ami nagy valószínűséggel azt jelenti, hogy a származtatott szerkezet helyes. Különösen magas aminosav azonosság látható a COX-1 katalitikus centrumnál és annak közelében.

Az aszpirinnek humán COX-1 aktív helyére való dokkolásával nyert legstabilabb és a leggyakoribb konformere egy olyan komplexhez tartozik, amely

geometriáját tekintve alkalmas arra, hogy a reakció soron következő lépése végbemenjen. Ebben a pozícióban a Ser530 O γ atomja egy nukleofil támadáshoz elég közel van az ASA acetil csoportjának karbonil szénatomjához, míg a Ser530 H γ közel helyezkedik el a karboxilát csoport oxigénjéhez, amely segít a Ser530 O γ atomhoz kapcsolódó H atomnak a távozásban. Meg kell említeni, hogy azonos módon, de eltérő paraméterekkel végzett dokkolás eredményeként egy olasz munkacsoport egy ASA-Arg120 ion-párhoz tartozó pozíciót talált legstabilabbnak. Valószínűleg mindkét említett pozíció jelentős statisztikai valószínűséggel bír. Az ion-pár képződés szerepet játszhat az ASA megfelelő orientációjában, míg az általunk talált konformer az átészterezési reakcióhoz szükséges.

4.1.2. Potenciális energia felületek

Az egyszerűbb modell esetében (A modell), a Ser530 O γ -C (ASA acetil karbonil) és Ser530 H γ -Ser530 O γ távolságok függvényében felvett, különböző elméleti módszerrel kapott potenciális energia felületek azt mutatják, hogy a reakció mindegyik ONIOM QM/MM számítás szerint csupán egy nyeregponthoz jellemezhető. A potenciális energia felületek ugyanakkor kissé különböznek egymástól. A B3LYP/6-31G(d):AMBER módszerrel számított felület esetében viszonylag szűk völgy vezet a nyeregponthoz. Sem a HF/6-31G(d):AMBER sem a MP2/6-31G(d):AMBER felület nem hasonlít ehhez. Nincs jele egy jól elkülöníthető reakciólépésnek, melyben az O γ oxigén atom H γ protonjának az ASA karboxilát csoportjára történő transzferét vagy az O γ -atomnak az ASA karbonil szénatomjára indított nukleofil támadását külön láthatnánk.

4.1.3. Geometria paraméterek

Az ASA-COX-1 komplexben a H γ proton az általunk alkalmazott minden elméleti módszer szerint az O γ atomhoz kapcsolódik. A karbonil szén és a fenolos oxigén közötti kötés normál hosszúságú. A Ser530 O γ és az ASA acetil csoportjának

karbonil szénatomja között az újonnan képződő kötés hídatomjai közötti távolság 3,5 Å körül van; ez az érték csak kis mértékben függ az alkalmazott QM/MM módszertől. Ez egy kicsit hosszú a következő reakciólépés (nukleofil támadás) indításához, de a potenciális energiafelületek tanulmányozása során láthattuk, hogy közeledésük kis energiabefektetéssel megvalósítható folyamat.

Míg az MP2 számítások szerint a szalicilsav mérsékelten távolodik a reakció centrumtól, addig a HF módszer jelentősebb eltávolodást valószínűsít (kivéve a 6-31G bázist). A 6-31G(d) és 6-31G(d,p) bázis szettek használatával a röntgendiffrakációs szerkezethez nagyon hasonló geometriát kaptunk a termékre. A B3LYP módszerrel számolt távolságok a két másik módszerrel kapottak között helyezkednek el.

4.1.4. Aktivációs energiák

Az aktivációs energiára nem találtunk kísérleti értéket a szakirodalomban. Tosco és munkatársai kimutatták, hogy a QM/MM típusú számítás alkalmazása során az SCC-DFTB QM módszer valószínűleg alábecsüli az aktiválási energiát. A B3LYP/6-31G(d) korrekció használatával számolt SCC-DFTB potenciális energia felület ~10 kcal/mol aktivációs energia értéket valószínűsített. Mi a sűrűségfunkcionál módszerrel és MP2 elméleti szinten is viszonylag magasabb, ~20-22 kcal/mol körüli ZPVE korrigált aktivációs energia értékeket kaptunk. Ennek az eltérésnek a számításokhoz használt modellek közötti különbség lehet az oka. A mi célunk ugyanis az volt, hogy meghatározzuk az egzakt átmeneti állapot geometriáját különböző szintű elméleti módszerekkel, s ehhez csak a COX-1 alrendszerét engedjük mozogni a geometria optimalás során. Tosco és munkatársai az átszterezési reakciót úgy modellezték, hogy egy sokkal inkább közelítő QM módszert használtak a QM/MM számításokhoz, amely viszont lehetővé tette, hogy a teljes COX-1–ASA rendszer részt vegyen a dinamikai szimulációban.

4.1.5. Imaginárius rezgések

Minden esetben csak egy imaginárius frekvenciát kaptunk az átmeneti állapotokra, az összes ASA-COX-1 és szalicilsav-acetilált COX-1 komplex geometriákra pedig csak pozitív frekvencia-értékek adódtak. Az imaginárius frekvenciához tartozó normál mód azt mutatja, hogy a proton mozgása a Ser530 H γ és az ASA karboxilát oxigén atomja között és a kötés kialakulása a Ser530 O γ és ASA acetil csoportján lévő karbonil szénatom között erősen csatolt, ugyanabban az elemi lépésben történik meg, még ha nem is teljesen szinkron folyamatban. Tekintettel arra, hogy az átmeneti állapotban a H γ proton vándorlása az ASA karboxil csoportjára már majdnem teljesen megtörténik, ez egy érdekes eredménynek mondható.

4.1.6. A tetraéderes intermedier létezése

Egy másik fontos kérdés, hogy létezhet-e az úgynevezett tetraéderes intermedier. Ebben az esetben egy lokális minimumnak kell lenni a potenciális energia felületen, amely egy már kialakult O γ -C (ASA-karbonil) kötéshez és egy ezzel együtt létező fenolos O-C (ASA-karbonil) kötéshez tartozik. Minden igyekezetünk ellenére ezt az intermediert nem sikerült megtalálnunk. Ezek után geometriai optimalásokat végeztünk az átmeneti állapothoz közeli, de már azon túli, a feltételezett tetraéderes intermedier irányába mutató geometriákból kiindulva. Az optimalások nem a köztitermekhez, hanem kivétel nélkül a termékekhez vezettek. Bár ez nem egy egzakt bizonyítéka annak, hogy nem létezik a tetraéderes intermedier, de azt valószínűsíti, hogy termék oldalon nincs olyan energiagát, amely megakadályozná a termék képződését és egy köztes állapotot (tetraéderes intermediert) stabilizálna.

4.1.7. A negatív töltés helye a szalicilsav molekulán

Azt találtuk, hogy az átészterezési reakció befejezése után a Ser530 H γ protonja az újonnan képződött szalicilsav karboxilát oxigénjéhez kapcsolódik. A

vízben közel semleges a pH, így a protonnak inkább a fenolos oxigéneken kellene elhelyezkedni, sem mint a karboxilát oxigéneken. Ugyanez volt várható az általunk vizsgált rendszernél is. Mivel a fehérje (COX-1) belsejében elektrosztatikus teret az atomok parciális töltései inhomogénné tehetik, így a proton helyzetére előzetesen nem következtethetünk teljes bizonyossággal. Ezért relaxált potenciális energia szkennelést végeztünk, ahol a proton pozícióját a karboxilát oxigén atom és a fenolos oxigén atom között 0,05 Ångströmként változtattuk. A potenciális energiagörbét B3LYP/6-31G(d):AMBER szinten számoltuk.

A fehérje elektrosztatikus mezejét itt is az electronic embedding módszerrel vettük figyelembe, ahogyan korábban is tettük. A 13. ábra azt mutatja, hogy a proton inkább a fenolos oxigénhez kötődik, bár az energia nyereség nem különösebben nagy. A feltételezett energia gát, amely a karboxil oxigénre történő vándorlást gátolná nagyon alacsony, kisebb, mint 0,5 kcal/mol. Ezt az akadályt a termikus mozgás is legyőzheti.

4.1.8. A vízmolekulák lehetséges hatása a reakcióra

Az aktív centrumban vízmolekulákat tartalmazó modellekre is futtattunk ONIOM számításokat. A QM részében csak a B3LYP módszert alkalmaztunk, de ezt különböző bázisokkal használtuk. A számítások azt mutatják ugyanakkor, hogy ezek a vízmolekulák nem befolyásolják jelentősen sem az ASA-COX-1 nemkötő komplex sem az átmeneti állapot geometriai paramétereit. A vízmolekulák jelenlétének nem volt számottevő hatása az aktiválási energia értékekre sem.

4.2. Antitrombin

4.2.1. Molekuladinamikai szimulációk

Az általunk kivitelezett 2 mikroszekundumos dinamika szimulációs időintervallum nem elegendő a natív \rightarrow látens átmenet vagy akár az antitrombin aktiváció megfigyeléséhez, mivel ezek ritka eseménynek mondhatók ezen az

időskálán. Mindazonáltal más molekuladinamikai tulajdonságok kinyerhetőek a trajektóriákból. Ilyenek pl. a loop konformációs flexibilitás, konformációs ingadozások nagysága (rmsf) vagy a proteinek egyes régiói közötti korrelált mozgások. Ezen tulajdonságok alapján értékes információkat kaphatunk a konformációs átmenetek kezdeti szakaszára vagy az allosztérikus útvonalak létezésére.

4.2.2. Referenciától való eltérés - RMSD

A kiindulási geometriától számított RMSD eltérések nem különösebben nagyok. Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy a referenciaként választott AT szerkezetek egy kinetikai csapdába kerülve lokális minimumban (natív állapot) vannak és a szimulációs intervallum alatt mindvégig ott is maradnak. Az N-terminális első 45 aminosav egysége, a diszulfid-híddal rögzített Cys8-Cys128 és környezete kivételével, rosszul kértékelhető, vagy éppen nem kiértékelhetetlen diffrakciós mintázattal rendelkezik, ami világosan mutatja, hogy ez a régió flexibilis mind az 1e04, mind az 1t1f kristályszerkezetben. Számottevő változékonyságot feltételeztünk az RCL régióra is, ahogy ezt korábban már megállapították. Ezért ezeket a peptid szakaszokat kihagyva az RMSD számításból, lényegesen kisebb értékeket kaptunk. A szimuláció során ez kb. ~0,2 nm körüli értéknél stabilizálódik. Érdekeséggé válik, hogy ez nagyjából megegyezik a röntgen diffrakciós szerkezetek felbontásának tartományával.

4.2.3. Konformációs rugalmasság - RMSF

Az RMSF értékek hasznos információkat szolgáltatnak a fehérje különböző régióinak flexibilitásáról. A teljes fehérjére vonatkozó RMSF értékek kiszámolásakor azt találtuk, hogy az AT N-terminális régiói ezen szimulációk alapján jelentős rms fluktuációval jellemezhetőek, ami összhangban van azzal, hogy ezekben a régiókban a peptid szakaszokhoz a röntgen diffrakciós szórásképek alapján nem mindig sikerült

koordinátákat rendelni. Emiatt az várható volt, hogy az általunk kiegészített (teljes szerkezet N-terminálisának fluktuációja is nagy lesz. Az RCL-ek fluktuációja is átlag fölötti, ami szintén nem meglepő, mivel az alapszintű gátló hatást nem lehet értelmezni ebben a régióban végbemenő konformációs változások nélkül.

Érdekes, hogy nemcsak a hurkok, hanem a merev vázhoz sorolt periférikus hélix szerkezetek, és a 400-410 aminosavakból felépülő β -redő is (a mesterséges Val317Cys-Thr401Cys mutáció kivételével) jelentős fluktuációval bír. Ahogyan várható volt, nagyok az ingadozások a PS kötő régiót szegélyező A- és D-hélixnél, az újonnan képződő P-hélixnél, valamint a fehérje N-terminális régiójánál is. Az utóbbiak fluktuációs szabadsága jól magyarázható azzal, hogy részt vesznek az optimális PS kötő régió kialakításában és ez az egyébként szabad állapotban egymást elkerülni igyekvő pozitív töltésű oldalláncok nagy átrendeződésével jár, ami feltételezi a flexibilitást.

A D-hélix C-terminálisa és az azt követő β -redő-A harmadik β -szalagja közötti peptidszakasz fluktuációja nagyobb, mint a proteinben található legtöbb loop szekvenciáé. Abból, hogy van olyan szabad (sem PS-ot, sem proteázot nem kötő) röntgendiffrakciós AT szerkezet, amelynek megfelelő peptidszakaszához a szórási képből nem lehetett egyértelmű szerkezetet rendelni, szintén a loop különösen nagy konformációs változatosságára utal. Az F-hélix C-terminálisa átlagosat meghaladó termikus mozgásának megértéséhez pedig elegendő annak figyelembe vétele, hogy ennek a régiónak a β -redő-A harmadik és ötödik β -szalagjainak a pentaszacharid kötődését kísérő összezáródásakor illetve az RCL negyedik β -szalagként beépülésekor is el kell mozdulnia.

4.2.4. RCL-szerkezetek

Az AT szerkezet-funkció tanulmányokban az RCL dinamikus tulajdonságainak értelmezése még annak szabad natív konformációjában is kivételes jelentőséggel bír. A szabad antitrombinra eddig rendelkezésre álló összes

röntgendiffrakciós szerkezetben az Arg393 guanidínium csoportja az AT belseje felé mutat. Az RCL olyan konformációját, amelyben az Arg393 oldallánca az AT belsejétől kifelé mutat, eddig csak AT-proteináz komplexben mutatták ki. Mivel a proteináz megkötésében az Arg393 oldallancának döntő szerepe van, ezért ennek a konformációnak vagy nem elhanyagolható gyakorisággal kell megjelenie a szabad AT-ban vagy az AT-proteináz kölcsönhatásban kell indukálódnia.

Az 1e04 szerkezetnél talált RCL konformáció esetében a guanidínium csoport felülethez kötött, ami a feltételezések szerint az együtt kristályosított dimer (natív+látens) AT szerkezetben a kristályerők következménye. A monomer natív PS nélküli AT protein adatbankban elhelyezett 1t1f kódjelű szerkezete teljesen más RCL konformációval rendelkezik, amelyben az Arg393 oldallánc egy Arg393-Glu237 sóhídon keresztül szintén a felülethez kötődik. Az 1e04 konformációból kiinduló 2 μ s-os dinamikai szimuláció alatt az RCL konformáció nagymértékű változásait figyelhettünk meg. A guanidínium csoport C ζ atomja és az AT bármely atomja (amely nem része az RCL-nek) közötti távolságot követtük a szimulációs idő alatt, mindhárom szimulációra. Az találtuk, hogy az 1e04 rendszernél (1. szimuláció) a legtöbbször előforduló $\sim 0,3$ nm távolság egyértelműen megfelel a felülethez kötött guanidínium-csoportnak. A nagyobb, 1,0-1,4 nm értékek pedig azokhoz a konformációkhoz tartoznak, amelyek legalább részlegesen oldószer által hozzáférhetőek, azaz amelyek potenciálisan Michaelis-komplexet képezhetnek a proteázokkal. Az 1t1f vad típusú proteinre végzett szimulációból hasonló következtetés vonható le azzal a különbséggel, hogy itt a nagyobb értékek fordulnak elő gyakrabban. Érdekes módon, amikor az RCL C-terminális vége diszulfid-híddal stabilizált, az RCL flexibilitása nem elég nagy ahhoz, hogy az Arg393 guanidínium csoportja kiszabaduljon a Glu237 karboxilátjával alkotott sóhíd fogságából.

4.2.5. Általános korreláció és allosztéria

Az 1. szimuláció a 80-200 szekvencia részleten belül figyelemre méltó korrelációt jelez. Ez összhangban van azzal az előzetes tapasztalattal, hogy a teljes D-hélix N-terminálisának peptid szekvenciái, illetve az E- és F-hélixeknek C-terminális végei számottevő korrelációt mutatnak. Ezeknek a peptidszekvenciáknak illetve a 412-420, és a 305-310 szakaszoknak a korrelációja részlegesen magyarázható azzal a ténnyel, hogy közel vannak egymáshoz. A D-, E- és F-hélixek megfelelő részei és az RCL között, illetve a 340-350 peptid szakasz között (mely a PS kötő régió felől nézve hátul helyezkedik el) észlelt általánosított korreláció már kevésbé egyértelmű. A 2. és 3. szimulációhoz tartozó általánosított korrelációs mátrixokból lényegében hasonló következtetés szűrhető le, néhány szembetűnő különbséggel. Mindkettő a korrelált mozgások ugyanolyan regionális elkülönülését mutatja, mint amelyet az 1. szimuláció esetében megfigyelhettünk. Megjegyzést érdemel, hogy az 1t1f szerkezetből induló szimulációk nagyobb, gyengén korrelált régiókat mutatnak. Különösen igaz ez arra a rendszerre, ahol nincs jelen extra diszulfid-kötés.

4.2.6. WISP analízis

A közelmúltban jelent meg a WISP (**w**eighted **i**mplementation of suboptimal **p**ath) módszer, mely segítségével a molekuladinamikai trajektóriákból allosztérikus útvonalakra vonatkozó információkat lehet kinyerni. Ezt a módszert alkalmazva a trajektóriáinkra azt találtuk, hogy az AT-PS kölcsönhatás lehetséges helyéről (esetünkben pl. a Lys114) a hatás helyéhez (az RCL hinge régiója) vezető allosztérikus útvonalra a WISP módszer három szimuláció trajektóriáiból három némileg különböző útvonalat ajánl. Míg az 1. szimuláció azt mutatja, hogy a jel a D-hélix mentén terjed, a 2. szimuláció egy részben belső útvonalat javasol, amelyben az A-hélix N-terminális vége vesz részt. Ez is elképzelhető lehet, mivel tudjuk, hogy a Trp49 fontos szerepet játszik az aktivált állapot stabilizálásában. A 3. szimuláció szerint előnyösebb egy a P- és E-hélixen, valamint a β -redő-A második és harmadik

szálán keresztül vezető út. Míg az 1. szimulációból kapott útvonal tűnik a legkézenfekvőbbnek, ez utóbbiak sem zárthatók ki teljesen. Meg kell jegyezni azonban, hogy az AT-proteináz komplexekben az RCL konformáció sokkal inkább hasonlít ahhoz, amelyet az 1. szimulációban megfigyelhettünk. Így feltételezhető, hogy az 1t1f → só-hidat tartalmazó 1e04-szerű konformáció átmenet megelőzi az aktiválódást.

4.2.7. Főkomponens analízis

A translációs és rotációs szabadsági fokok eltávolításával nyert globális belső mozgások főkomponensekre bonthatóak. Ezek a főkomponensek megfelelnek a nagy amplitúdójú (alacsony frekvenciájú) rezgések és feltételezhetjük, hogy a konformációs átmenetek ezen rezgések mentén kezdődnek el. Ezekhez a módusokhoz azokban a régiókban a legnagyobb a hozzájárulás, ahol legnagyobb a fluktuáció, ilyenek az N-terminális régió, pentaszacharid kötő régió, E- és F-hélixek, valamint az RCL, valószínűsítve, hogy ezek egymáshoz kapcsolt mozgások. Bár ez nem egy teljes bizonyítéka annak, hogy ezeknek a mozgásoknak közvetlen szerepe van az allosztérius információban, de a módusok csatolt atomi mozgásai révén segítenek megérteni az allosztéria jelenségét.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszékén a hemosztázis normál és patológiás folyamatainak kutatása az egyik fő kutatási irány. Ezekhez a területekhez kapcsolódóan a ciklooxygenáz-1 aszpirinnel történő gátlási mechanizmusának valamint az antitrombin III alap inhibíciós potenciáljával összefüggésbe hozható dinamikus tulajdonságainak in silico vizsgálata voltak munkám fő célkitűzései.

Acetilszalicilsav (aszpirin) gátolja a prosztaglandin-H₂ termelést, amely a tromboxán-A₂ prekursora. Az aszpirin acetilezőszerként hat, amelynek acetil-csoportja kovalensen kapcsolódik a ciklooxygenáz-1 enzim aktív centrumában található Ser530 aminosav oldalláncához. A reakció pontos mechanizmusát mindeztáig sem kísérleti- sem kvantumkémiaili módszerekkel nem sikerült megnyugtatóan tisztázni. Mivel a vizsgálni kívánt humán ciklooxygenáz-1 enzim röntgendiffrakciós szerkezete alapján, homológia modellezéssel tettünk javaslatot. Ezt követően az enzim arachidonsav kötő üregébe dokkoltuk be az acetilszalicilsav molekulát. Az acetilezési reakció potenciális energiefelülete, illetve a reakció stacionárius pontjainak és azok energiáinak meghatározása érdekében számos ONIOM-típusú kvantummechanikai / molekulamechanikai számítást végeztünk. A számításokban az acetilszalicilsavra és az azt körülvevő aminosavakra különböző szintű kvantummechanikai módszereket alkalmaztunk az elektronikus beágyazás (electronic embedding) közelítés keretein belül. Geometriai második deriváltakkal igazoltuk, hogy az általunk talált átmeneti állapotokhoz elsőrendű nyeregpontok (egy negatív sajátértékkel) tartoznak. A lokális minimumokban minden második derivált pozitívnak adódott a translációs és rotációs szabadsági fokokat figyelmen kívül hagyva. Az aktiválási energia értékek azonban jelentősen függenek az alkalmazott módszertől. Minden alkalmazott megbízható ab initio és sűrűség-funkcionál módszer szerint a Ser530 O γ -H γ kötés felhasadása és az O γ -C (acetilszalicilsav karbonil) kötés képződése egy lépésben történik.

Az antitrombin (AT) a véralvadási kaszkád egyik legfontosabb fiziológiás inhibitora. Az AT a proteinek speciális hajtogatódással jellemezhető szerpin családjába tartozik, gátolja az aktivált X-es faktort (FXa), a trombint és más szerin proteáz típusú véralvadási faktorokat, például a FXIa és a FIXa faktort. A szerpinekben közös, hogy viszonylag hosszú reaktív központi hurokkal (RCL) rendelkeznek, amely szerin proteáz megkötő funkcióval bír. Az AT esetében azonban az RCL részlegesen, az úgynevezett „hinge” (csukló) régiójával illeszkedik a β -redő-A szerkezetbe, ahonnan a jelentős negatív töltéssel bíró glükózaminoglikán – AT kölcsönhatás során allosztérikus mechanizmus útján szabadul ki. Ennek eredményeképpen az AT FXa gátló hatása drámaian megemelkedik.

Célunk volt annak megértése, hogy az AT egyik (glükózaminoglikán kötő) régiójának konformációs változása milyen specifikus konformációs folyamatokon keresztül indukál változásokat a protein távoli, RCL és hinge régióiban. Más szavakkal, hogyan terjed az allosztérikus információ a protein régiói között. Szintén célunk volt az AT alap inhibíciós képességének megértése, amely nem magyarázható az eddig publikált röntgendiffrakciós szerkezetek alapján. Ezen célok elérése érdekében molekuladinamikai szimulációkat végeztünk az AT-ra úgy, hogy a szimulációban fiziológiás környezetet a lehetőség szerint figyelembe veszünk.

Azt találtuk, hogy olyan korrelált elmozdulások, amelyek nagy valószínűséggel szerepet játszanak a konformációs információk a glükózaminoglikánok kötőhelyétől a „hinge” régióhoz és az RCL-hez történő terjedésében, a glükózaminoglikánok jelenléte nélkül is léteznek. Számításokkal valószínűsítettük, hogy az RCL-en található Arg393 specifikus konformációja, amely a szerin proteázok megkötéséhez szükséges, nem elhanyagolható valószínűséggel fordul elő még a nem-kinyílt RCL esetében is. Ez magyarázhatja az AT alapszintű gátlási képességét.

6. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. A megjelent közlemények hivatalos jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Nyilvántartási szám: DEENK/16/2015. PL
Tételezszám: Publikációs Lista
Tárgy:

Jelölt: Tóth László
Neptun kód: MH276T
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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. Epub ahead of print (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2014.986525>
IF:2.983 (2013)
2. **Tóth, L., Muszbek, L., Komáromi, I.:** Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as predicted by QM/MM calculations.
J. Mol. Graph. 40, 99-109, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2012.12.013>
IF:2.022



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. o Postacím: 4010 Debrecen, PF.45. o Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciosok@lib.unideb.hu o Honlap: lib.unideb.hu



További Közlemények

3. Owen, M.C., Tóth, L., Jójárt, B., Komáromi, I., Csizmadia, I.G., Viskolcz, B.: The Effect of Newly Developed OPLS-AA Alanyl Radical Parameters on Peptide Secondary Structure.
J. Chem. Theory Comput. 8 (8), 2569-2580, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ct300059f>
IF: 5.389

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 10,394

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
5,005

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

Debrecen, 2015.01.26.



6.2. A dolgozat témakörében bemutatott előadások (E) és poszterek (P) jegyzéke

- Tóth L., Komáromi I., Muszbek L.: A humán ciklooxygenáz enzim gátlása Aspirinnel, in silico kísérletek, Laki Kálmán Emlékülés, MTHT, 2009. szeptember 26., Abádszalók (E)
- Tóth L., Komáromi I., Muszbek L.: A humán ciklooxygenáz-1 enzim aspirinnel történő gátlásának mechanizmusa. In silico kísérletek. QSAR szimpózium, 2010. április 29-30., Szeged (E)
- Tóth L., Fekete A., Komáromi I.: Az antitrombin aktivációja és konformációs átmenetei molekuladinamikai tanulmányok alapján, Tavaszi szél 2014 konferencia, 2014. március 21-23, Debrecen (E)
- Tóth L., Fekete A., Komáromi I.: Az antitrombin aktivációja és konformációs átmenetei molekuladinamikai tanulmányok alapján, I. Innováció a természettudományokban 2014 konferencia, 2014. május 2-3, Szeged (E)
- Tóth L., Fekete A., Komáromi I.: A humán ciklooxygenáz-1 enzim aspirinnel történő gátlásának mechanizmusa. In silico kísérletek. QSAR szimpózium, 2014. május 22-23., Szeged (E)
- Tóth L., Komáromi I., Muszbek L.: Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as QM/MM predict, 6th International Conference of Structure and Stability of Biomacromolecules, 2009. szeptember 9-11., Kassa, Szlovákia (P)
- Tóth L., Muszbek L., Komáromi I.: Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as quantum mechanical/molecular mechanical calculations predict, 21st International Thrombosis Congress, 2010. július 6-9., Milánó, Olaszország (P)
- Tóth L., Muszbek L., Komáromi I.: How Aspirin Inhibits Human Cyclooxygenase-1? Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) Calculations on the Mechanism, XXIV. Congress of the

- international society on thrombosis and haemostasis, 2013. június 29-július 3.,
Amszterdam, Hollandia (P)
- Tóth L., Muszbek L., Komáromi I.: Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as QM/MM predict, 8th International Conference of Structure and Stability of Biomacromolecules, 2013. szeptember 9-11., Kassa, Szlovákia (P)
 - Tóth L., Muszbek L., Komáromi I.: Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as predicted by QM/MM, I. Innováció a természettudományokban 2014 konferencia, 2014. május 2-3., Szeged (P)

A kutatások megvalósítását a Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj (TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001), valamint az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA K-106294, K-105459, PD101120), továbbá a NIIF-1057, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP-4.2.2.C-11/1 /KONV-2012-0010.1 programjai és ösztöndíjai támogatták.

A kutatómunkát támogatta továbbá a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal (Jedlik Ányos ösztöndíj, NKFP-07-A1-2008-0127), a Magyar Nemzeti Információs Infrastruktúra Fejlesztési Program (NIIF 1057) és a Magyar Tudományos Akadémia (MTA 11003).