

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A humán ciklooxygenáz-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

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	2
2.1. Az aszpirin és a COX-1.....	2
2.2. Antitrombin.....	4
3. Az alkalmazott elméleti módszerek alapjai.....	7
3.1. Kvantummechanika.....	7
3.1.1. HF és MP2 módszerek.....	9
3.1.2. DFT módszerek.....	10
3.1.3. Bázisok.....	12
3.2. Molekulamechanika.....	13
3.3.1. Hibrid QM/MM módszerek.....	16
3.3.2. ONIOM módszerek.....	18
3.4. Molekuladinamika.....	20
3.4.1. Periódikus határfeltételek.....	20
3.4.2. A nyomás és a hőmérséklet szabályozása.....	21
3.4.3. Az oldószer hatásának figyelembevétele.....	21
3.4.4. Nemkötő kölcsönhatások.....	21
3.4.6. A dinamikai trajektória és analízise.....	22
3.4.6.1. A referenciától való eltérés - RMSD.....	22
3.4.6.2. Fluktuáció - RMSF.....	23
3.4.6.3. Főkomponens analízis.....	23
4. Célkitűzések.....	24
4.1. ASA-COX-1 célkitűzés.....	24
4.2. Antitrombin célkitűzés.....	25
5. Módszer.....	26
5.1. ASA-COX-1 komplex vizsgálata.....	26
5.1.1. Homológia modellezés és dokkolás.....	26
5.1.2. Modellépítés és QM/MM számítások.....	26
5.2. Az antitrombin modellek elkészítése.....	30
5.2.1. Modell a dinamikai futáshoz.....	30
6. Eredmények és diszkusszió.....	33
6.1. ASA-COX-1 eredmények.....	33
6.1.1. Homológia modellezés és dokkolás.....	33
6.1.2. Potenciális energia felületek.....	35
6.1.3. Geometria paraméterek.....	36
6.1.4. Aktivációs energiák.....	38
6.1.5. Imaginárius rezgések.....	40
6.1.6. A tetraéderes intermedier létezése.....	41
6.1.7. A negatív töltés helye a szalicilsav molekulán.....	42
6.1.8. A vízmolekulák lehetséges hatása a reakcióra.....	43
6.1.9. A kibővített geometriai optimálás hatása és a diszperzió korrigált sűrűségfunkcionál.....	45
6.2. Antitrombin eredmények.....	48
6.2.1. Homológia modellezés.....	48
6.2.2. Molekuladinamikai szimulációk.....	48
6.2.3. Másodlagos szerkezetek és időbeli változások.....	51

6.2.4. Referenciától való eltérés - RMSD	54
6.2.5. Konformációs rugalmasság - RMSF	56
6.2.6. RCL-szerkezetek	60
6.2.7. Általánosított korreláció és allosztéria	64
6.2.8. WISP analízis	68
6.2.9. Főkomponens analízis	71
7. Konklúzió	72
7.1. ASA-COX-1	72
7.2. Antitrombin	73
8. Összefoglalás	75
9. Summary	76
10. Irodalomjegyzék	77
11. Tárgyszavak - Subject words	91
12. Köszönetnyilvánítás	92
12.1. ASA-COX-1	92
12.2. Antitrombin	92
12.3. Személyes köszönetnyilvánítás	92
13. Függelék	93
13.1. Kiegészítés a disszertációhoz	93
13.2. Publikációk	97
13.3. Hazai- és nemzetközi konferenciákon tartott előadások, bemutatott posztterek	99

1. Bevezetés

A magasabb rendű élő szervezetekben a hemosztázis rendszerének feladata, hogy a keringő vért folyékonyállapotban tartsa az érpályákon belül, illetve az erek sérülése után védekezőrendszereket mozgósítva a vérzést csillapítsa, ideális esetben megszüntesse.

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszékén a hemosztázis normál és patológias 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. Az *in silico* latin kifejezést 1989-ben használták először annak jelzésére, hogy a kísérletet virtuálisan, a "számítógép processzorában" végezzük a biológiában elterjedt *in vivo*, *in vitro* és *in situ* kifejezések analógiájára. A dolgozat két *in silico* módszer, a kvantumkémiai és az empirikus erőter módszer hemosztázis kutatásokra történő alkalmazását mutatja be.

A kvantumkémia a kémia egyik ága, mely elméleti alapon, számítógépes módszerekkel tanulmányozza a molekulákat annak érdekében, hogy a kémiai tulajdonságokat megértsük, s végső célként akár tervezni tudjuk. A kvantumkémia a szintén friss tudományág, az alig 100 éves kvantummechanika eszköztárára támaszkodik. A jelenlegi teljesítőképességnek eléréséhez évtizedek óriási elméleti-metodikai erőfeszítéseire és a számítástechnikai forradalomra volt szükség. A metodikai fejlődés két irányban haladt: a "hagyományos" módszerek a Ψ hullámfüggvényre építenek, míg a sűrűségfunkcionál-elmélet alapú módszerek az elektronsűrűségre.

Az empirikus erőter módszerek esetében az atomok közötti kölcsönhatások leírására nem kvantumkémiai módszereket, hanem klasszikus fizikai erőket (harmonikus ("rugó") erők, Coulomb erők, stb.) használunk. Ez lehetővé teszi, hogy dinamikai szimulációkat is kivitelezünk több százezer atomos rendszerekre. Bár az az idő amit szimulációkkal ilyen rendszerekre lefedhetünk ma még "csak" ritkán éri el a miliszekundumos tartományt szuperszámítógépek alkalmazásával is. A szimulációkat időben követve ennek ellenére olyan fontos információkhoz juthatunk a mikrorendszerekről, melyeket máshogy nem-, vagy csak igen körülményesen lehetne felfedni.

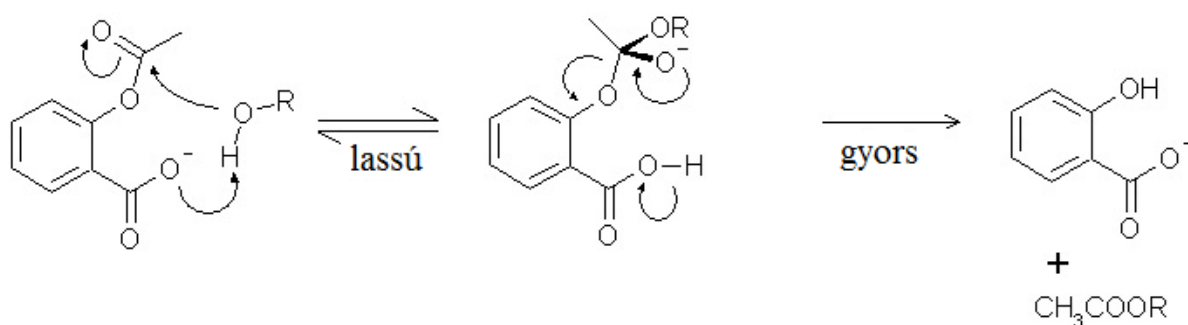
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az aszpirin és a COX-1

Az első, kereskedelmi forgalomban kapható szintetikus láz-, és fájdalomcsillapító, valamint 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 termelést [1]–[3]. Az aszpirin valóban csökkenti a prosztaglandin-H₂ szintet, ami a thromboxán-A₂ (egy hatékony vérlemezke aktivátor) prekursora. Az ASA ezt a hatást a ciklooxygenáz-1 (COX-1) enzim egyetlen szerin aminosav egységének (Ser530) acetilálásával éri el [4]–[8]. Ez az alapja annak a védőhatásnak, amit az aszpirin a thromboemboliás vaszkuláris eseményekkel szemben mutat [9]–[12]. 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 [13]–[16] térbelileg két elkülönülő reakció centrummal, amelyek mechanikusan kapcsoltak [13]–[15], [17]. A ciklooxygenáz centrum katalizálja az arachidonsav átalakulást prosztaglandin-G₂-vé (prostaglandin-G₂, PGG₂) [18], [19], ami egy hidroperoxid endoperoxid prosztaglandin), míg a peroxidáz [17] 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 [20]. A COX-1-ről tudjuk, hogy a PGH₂ termelésért felelős [13], [14], [21], amely közös kiindulópontja a prosztaglandin származékoknak. A COX-2 szintén szerepet játszik bizonyos normál fiziológiás folyamatokban [22], de az expressziója főként olyan kórélettani folyamatokhoz köthető, mint a gyulladás, ezért a nem-szteroid gyulladásgátló hatóanyagok célpontja [16], [23], [24]. Mind a COX-1, mind a COX-2 membránhoz kötött homodimerek, melyek ~70 kDa méretű alegységekből épülnek fel [25], [26]. 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 [15], [25]–[27]. A COX szerkezetek egyik jellegzetessége a membránkötő egységen lévő, hosszú bejáráttal bíró hidrofób csatorna.

Ebben találhatjuk 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 ciklooxygenáz izoforma esetén, és megfelel a juh COX-1 szekvenciának, amelynek 3D szerkezetét elsőként írták le [25]. Annak ellenére, hogy a COX-1 és COX-2 aktív centrumai között nagy a szerkezeti és szekvenciális hasonlóság, a megfelelő szubsztrátkötő üregek alakja valamelyest különbözik [22], [27]–[29], megteremtve a lehetőséget a szelektív COX inhibitorok fejlesztésére [23], [30]–[35].



1. ábra: Általános séma egy átészterezési reakcióra (R=H, alkil, enzim)

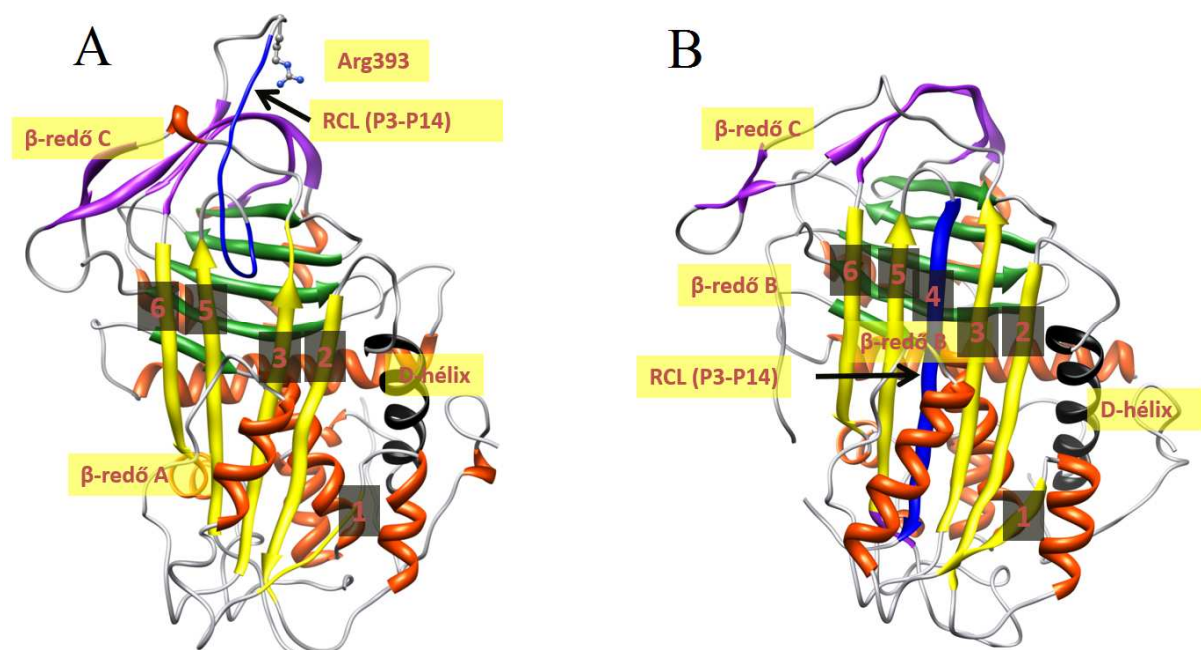
Kimutatták, hogy az ASA nukleofil reagensekkel történő reakciójának első lépésben a nukleofil közvetlen támadást indít a fenolos észter karbonil szénatomjára (1. ábra) anélkül, hogy anhidrid intermedier képződne [36]–[38]. Elméleti úton, QM/MM dinamikát futtatva és azon belül SCC-DFTB QM módszert használva [39] 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 acetyl csoportját C14 izotóppal jelezve vad típusú, illetve pontmutációval 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 [8]. Tudjuk, hogy míg a Tyr385 fontos szerepet játszik a ciklooxygenáz reakcióban, addig a Tyr348Phe, Tyr355Phe és az Arg120Ala mutációk csak részben képesek befolyásolni a ciklooxygenáz aktivitást [40]. Az acetylált enzim és a szalicilsav (termék) komplex röntgendiffrakciós szerkezete [26] azt mutatja, hogy a szalicilsav ~5Å 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.

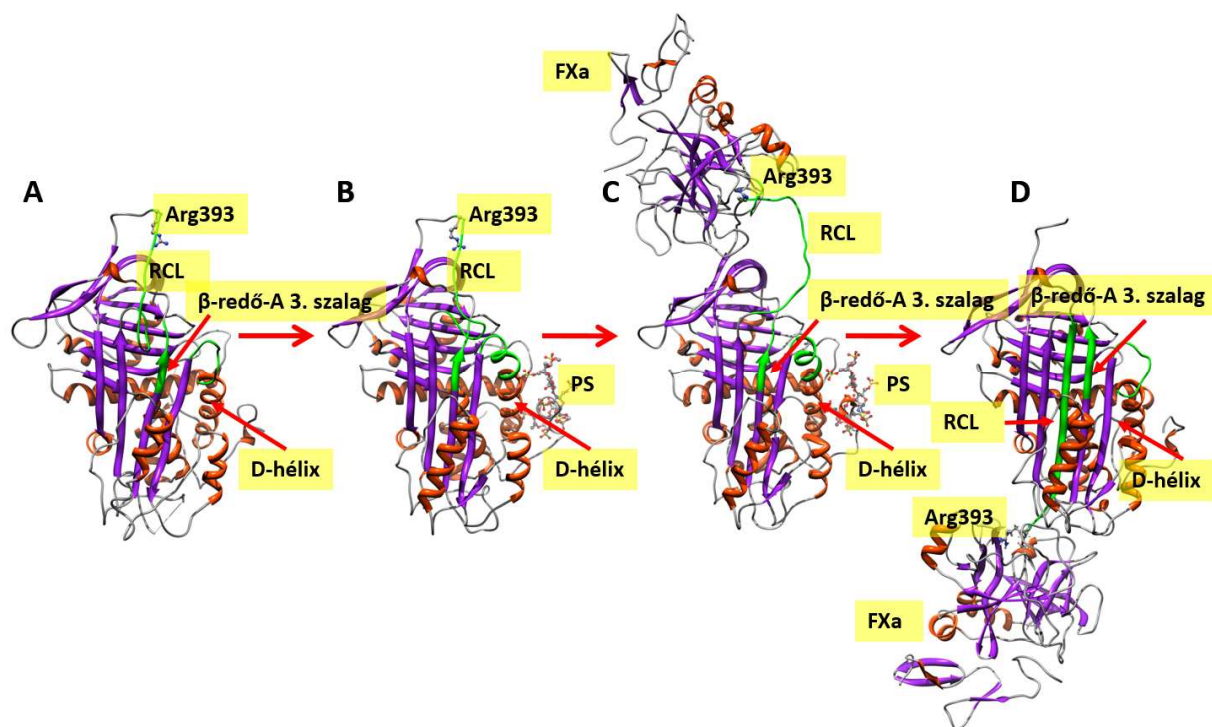
2.2. Antitrombin

Az antitrombin III (antitrombin, AT) egy nagyon hatékony endogén antikoaguláns fehérje [41]. Az antikoaguláns aktivitás alapja a szerin proteázokkal szemben mutatott gátló hatása. A magasabb rendű életformákban a szerin proteázok elsődleges fiziológiai inhibitorai a szerpinek [42], [43]. Jellemző példa a hemosztázis és a fibrinolízis folyamata [44], [45]. 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 vézést.

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 (2. ábra). A proteáz az RCL középső részén, inkább a C-terminálisához közelebb elhelyezkedő Arg393-Ser394 aminosav egységek kötötti P1-P1' peptid kötést hasítja és a reakció első lépésében acil-enzim intermediér 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 (2. ábra). Ebben a folyamatban a proteáz katalitikus centruma annyira megváltozik, 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 szerpín gátlási mechanizmusban (3. ábra) [44], [45].



2. ábra: Az antitrombin szerkezete, a kezdeti (A) és az RCL beépülése utáni (B) geometria natív és látens formákon szemléltetve. Kék színnel az RCL, míg a β -redő-A elemei számozva láthaóak.



3. ábra: Az antitrombin (AT) aktiválásához és az aktivált AT FXa-t gátló mechanizmusához tartozó konformációs változások sematikus ábrázolása [46].

A címkék a dolgozat rövidítéseinek megfelelően szerepelnek, a közlemény szerzőinek engedélyével.

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 [47]. A trombin gátlásában az AT-trombin közötti glükózaminoglikán híd képződése, míg a FXa és FIXa proteázok gátlásában a glükózaminoglikánok által kiváltott allosztérikus aktivációnak van kulcsszerepe. Az előbbihez hosszabb láncú heparin vagy heparán-szulfát szükséges [48], míg az allosztérikus aktivációhoz elegendő a megfelelő szulfatált pentaszacharid-fragmensek jelenléte [49]–[51]. Számos különböző mértékben aktivált AT röntgendiffrakciós szerkezet érhető el a proteinek szerkezeti adatbázisában [52]–[57]. Ezek alapján azt feltételezik, 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 (P-hélix képződés és D-hélix kiterjedés), majd a változásért felelős jel áttérjed távolabbi régiókra, például ekkor szabadul ki a csukló (hinge) régió a β -redő-A-ból [58], [59]. 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 [53], másikat csak a natív forma kristályosításával nyerték [60]. 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 [45], [61].

A protein adatbankban (PDB) elérhető számos röntgendiffrakciós AT szerkezet ellenére csak nagyon korlátozott mértékű és csak közvetett információt kaphatunk az AT aktiválását kísérő konformációs változásokról. Keveset tudunk a különböző monoszacharid egységek szerepéről, illetve a pentaszacharidok okozta indukált allosztérikus jel terjedésének mechanizmusáról is [62]. A véralvadási fehérjék *in silico* módszerekkel történő szerkezeti vizsgálatainak folyamatosan növekszik a jelentősége [63]. Találunk köztük rejtett szerkezeti események dinamikai szimulációval történő leírást [64] és szerpineken végzett molekuladinamikai tanulmányt is [65]–[68]. Meggyőződésünk szerint a későbbiekben részletezendő *in silico* vizsgálataink segíthetnek az AT fehérjére rendelkezésre álló kísérleti eredmények rendszerezésében és értelmezésében.

3. Az alkalmazott elméleti módszerek alapjai

3.1. Kvantummechanika

A XX. század elején kialakult új tudomány, a kvantummechanika egészen új szemléletet követelt meg: a mikrovilágban a részecskék mozgása elvileg nem követhető nyomon úgy, olyan részletességgel, mint ahogyan azt a makrovilágban, hétköznapi tapasztalataink alapján megszoktuk. A kvantummechanika a kvantumfizika eszköztárát használja egy mikrorendszer tulajdonságainak leírására. Ezeket a tulajdonságokat a Schrödinger-egyenlet alapján határozhatjuk meg, melyet időtől független, nem relativisztikus formában az (1) egyenlet szerint írhatunk fel [69], [70]. Matematikailag a rendszert legpontosabban a Dirac-egyenlet írja le, ami a (vegyészek számára) sokkal ismertebb Schrödinger-egyenlet relativisztikus általánosítása. A kinyerhető összes információt $\Psi(\mathbf{r}, t)$ komplexértékű reguláris függvény tartalmazza, melyet vagy hullámfüggvénynek, vagy állapotfüggvénynek nevezünk.

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V \right] \Psi = E \Psi \quad (1)$$

Az állapotfüggvényen túl, a kémiai problémák megoldása során, szükségünk van a molekuláris Hamilton-operátorra, melyet a klasszikus mechanikai analógia alapján kinetikus- és a potenciális energiatagok összegeként is kifejezhetünk (2. egyenlet). Az egyenlet jobb oldalán szereplő első tag n db elektron kinetikus energiaoperátora, a második tag a magok kinetikus energiáját írja le, míg a szögletes zárójelben lévő tagok a mag-mag taszítást, az elektron-elektron taszítást és a mag-elektron vonzást leíró potenciális energiatagok [71].

$$H = T + V = -\frac{\hbar^2}{2m} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{\alpha=1}^N \frac{\hbar^2}{2M_\alpha} \nabla_\alpha^2 + e^2 \left[\sum_{\alpha} \sum_{\beta < \alpha} \frac{Z_\alpha Z_\beta}{R_{\alpha\beta}} + \sum_i \sum_{j < i} \frac{1}{r_{ij}} - \sum_i \sum_{\alpha} \frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}} \right] \quad (2)$$

A rendszert főként a potenciális energia-függvénnyel jellemezhetjük, és ettől függ a megoldás nehézsége is, ugyanis a második tag, a kinetikus energia operátora univerzális és adott részecskeszám mellett mindig azonos. A Schrödinger-egyenlet analitikus megoldása csak a legegyszerűbb potenciálfüggvények esetén végezhető el. Azért, hogy bonyolultabb

rendszereket is jellemezhetünk, a hullámfüggvény változóit szét kell választanunk és numerikusan megoldanunk az egyenletet. Ez a módszer jelentősen csökkenti a figyelembe veendő pontok mennyiségét. Egy többváltozós függvény-változók szerinti szeparálása azonban általában csak valamilyen elhanyagolás, közelítés árán lehetséges. A célunk egy olyan reális kompromisszum megteremtése, mely megkönnyíti a számításokat, s egyben a lehető legkevésbé torzítja a fizikai tartalmat. Ennek megfelelően általánosan három közelítést szoktak alkalmazni a számítások során:

- Schrödinger-egyenlet nemrelativisztikus formáját oldjuk meg,
- Born-Oppenheimer közelítést (az elektronok követik a magok mozgását) alkalmazunk,
- Egyelektron módszerrel dolgozunk.

Ezen túl a módszereket feloszthatjuk annak megfelelően, hogy használnak-e kísérletesen vagy precíz számításokkal meghatározott paramétereket, vagy sem. Ez alapján két nagy csoportot képezhetünk, a szemiempirikus- és az *ab initio* módszereket. A DFT módszerek valójában a kettő között helyezkednek el, ugyanis ezek a He-ra vagy homogén elektron gázra paraméterezett funkcionálokat tartalmaznak.

Az *ab initio* módszerek (a latin „a kezdetektől” kifejezéssel összhangban) egyáltalán nem használnak kísérleti paramétereket, hanem kizárólag a kvantummechanika összefüggéseit és néhány fizikai állandót (fénysebesség, Planck-állandó, stb.) használnak fel a számításokhoz. Az egyes módszerek abban térnek el egymástól, hogy milyen közelítést alkalmaznak a Schrödinger-egyenlet megoldására.

A szemiempirikus módszerek (pl. MINDO/3, MNDO, AM1, PM3, stb.) viszont különböző kísérletekből származó paramétereket használnak a számítások egyszerűsítése érdekében, melyek segítségével a Schrödinger-egyenlet közelítő alakjait oldják meg. A számítási kapacitást (gépidejét) főként az egyes integrálok kiszámítása köti le. Ezek egy részének elhanyagolása vagy közelítő számítása jelentősen növeli a gyorsaságot. Bevált módszer, hogy csak a vegyérték elektronokat veszik figyelembe, a többi elektront pedig az atommaggal egy egységként kezelik. A szemiempirikus módszerek további közös jellemzője, hogy az átlapolási mátrix azonos lesz az egységmátrixszal, ami a Roothan-Hall egyenletet ($FC = SCE$) $FC = CE$ alakra egyszerűsíti. Az egyes módszerek paraméterkészletükben, valamint alkalmazásukat tekintve is eltérhetnek egymástól.[72]

3.1.1. HF és MP2 módszerek

Az *ab initio* típusú számításokhoz leggyakrabban a Hartree-Fock (HF) módszereket használjuk, melyek általában alapállapotú hullámfüggvények és energiák meghatározására alkalmasak, és azt feltételezik, hogy egy adott elektron a többi elektron átlagos terében mozog, más szóval a sokelektronos hullámfüggvény egyelektron hullámfüggvények szorzataként előállítható [69], [71].

$$\Psi_{\text{HF}} = A j_1(1) j_2(2) j_3(3) \dots j_n(n) = D_0 \quad (3)$$

Ezért egy n -elektronos rendszer egzakt hullámfüggvénye egyetlen Slater-determinánssal közelíthető, amely már figyelembe veszi a Pauli-elvet (a hullámfüggvénynek előjelet kell váltania, ha a két elektron hely- és spinkoordinátáit felcseréljük). A Hartree-Fock közelítést kapjuk egy alapállapotú hullámfüggvényre, ha ezzel a Slater-determinánssal, mint próbafüggvénnyel képezzük a Hamilton operátor várható értékét, és a variációs elv alkalmazásával meghatározzuk azokat a φ_i egyelektron pályákat, ahol ez a várható érték minimális. A φ_i pályák meghatározására önkonzisztens, nemlineáris egyenletrendszert kell iteratív úton megoldani, amihez valamilyen véges függvénybázis szerint kifejtjük a φ_i -ket és a kifejtési együtthatókat önkonzisztensen meghatározzuk. Mivel ez egy variációs eljárás, az így elért közelítő energia legfeljebb azonos lehet (de inkább magasabb), mint az egzakt energia.

A vegyértékhő bármilyen változásának (ionizációs, disszociációs és kötési energiák, vagy a két állapot különbségéből kapható aktiválási energia) kémiai pontosságú leírásához az elektronok mozgását figyelembe kell venni (poszt HF módszerek). Számos eltérő megvalósítás létezik erre a problémára, de közös pont ezekben, hogy egyetlen determináns helyett determinánsok lineáris kombinációjával írják le a hullámfüggvényt, melyeket úgy állítanak elő, hogy a betöltött pályák felett adódó, alapállapotban betöltetlen, virtuális pályákat felhasználva egyes elektronokat magasabb pályákra helyeznek. Ilyen módszer például a másodrendű Möller-Plesset perturbációs elmélet (MP2) [73]. Az MP2-szint általában a korrelációs energia 80-90%-át képes figyelembe venni, és ehhez a gépidő igénye csak 20-50%-kal magasabb, mint a HF módszernek (ez utóbbit nevezhetjük MP1-szintnek is) [71], így a számítások során ez az egyik legegyszerűbb és legolcsóbb módja az elektron korrelációs hatások figyelembe vételének. Fontos megjegyezni azonban, hogy az MP2

módszer a gyakorlatban a vártnál jobban teljesít, mert a szokásos értékelő-készletek (benchmark) az atomizálási energiákat hangsúlyozzák, ami a gyenge pontja MP2-nek, de ezek nem túl fontosak a legtöbb kémiai számítás esetében. Jól ismert, hogy az MP2 módszernél kis bázisok esetében a problémák rejtve maradnak (ilyen pl. a 6-31G(d) bázis) és inkább a kiterjesztett bázis készleteknél jelennek meg, például konvergencia problémák formájában.

3.1.2. DFT módszerek

Az előző alfejezetben megismert poszt Hartree-Fock módszereken túl, az elektronkorreláció figyelembe vételének egy további lehetséges módja a sűrűségfunkcionál elmélet (density functional theory, DFT), melynek két alapvető fontosságú tételét Hohenberg és Kohn fogalmazta meg [74]. Az első tételükkel bebizonyították, hogyha egy rendszer nemdegenerált alapállapotának elektronsűrűségét ismerjük, akkor az egyértelműen meghatározza a nemdegenerált rendszer alapállapot energiáját és minden egyéb alapállapot tulajdonságát. Bebizonyították, hogy egy adott sűrűségfüggvényhez csak egy adott külső potenciál tartozhat, tehát az meghatározza pl. az atommagok helyzetét és minőségét. Így a sűrűségfüggvény ismeretében a molekuláris Hamilton-operátor is egyértelműen meghatározott. A tétel csak azt mondja ki, hogy a sűrűségfüggvény és az alapállapot tulajdonságok között egy-egy értelmű megfeleltetés van, de nem mondja meg, hogy az hogyan írható fel és azt sem, hogy ismeretében hogyan számolhatnánk a rendszer energiáját és alapállapot tulajdonságait, tehát a funkcionál felírásához sem nyújt segítséget. A sűrűségfüggvény ismeretének nagy előnye lenne a molekuláris számításoknál, hiszen az csak három térbeli koordinátától függ, szemben a rendszer komplexitásával rohamosan növekedő, minden elektron három térbeli és egy spinkoordinátájától függő hullámfüggvénnyel.

Tegyük fel, hogy fel tudunk írni olyan próba elektronsűrűség-függvényeket, amelyek kielégítik az adott rendszerre érvényes peremfeltételeket, tehát pl. a teljes térre számított integráljuk a vizsgálni kívánt rendszer elektronjai számával egyenlő. Hogy ezek közül a legjobbat ki tudjuk választani szükséges még annak a bizonyítása, hogy az összes lehetséges próbafüggvény energia funkcionálja az egzakt energiánál mindig nagyobb vagy azzal legfeljebb egyenlő. Ezt a második Hohenberg-Kohn-tételt a hullámfüggvényekre vonatkozó variációs elvvel analóg, ezért Hohenberg-Kohn variációs elvnek is szokták nevezni. Ez azonban még mindig nem ad praktikus útmutatást arra, hogy hogyan írjuk fel a próbafüggvényt és arra sem, hogy abból hogyan számoljuk az energiát vagy más tulajdonságokat.

Kohn és Sham 1965-ben javasoltak egy módszert, amely megnyitotta az utat a DFT számítások nagyobb rendszerekre történő alkalmazása előtt [75]. Módszerük elvileg az energia és alapállapot tulajdonságok egzakt értékeinek megadására alkalmas, de mivel a funkcionálok nem ismertek, arra legfeljebb közelítő formák írhatók fel, így csak közelítő értékeket nyerhetünk.

Kiindulópontjuk egy nem valós rendszer (referencia rendszer), melyben nincs kölcsönhatás az elektronok között. Az elektronok ugyanazt a külső potenciált érzélik és feltételezésük szerint együttesen a vizsgálni kívánt rendszer külső potenciáljának megfelelő egzakt elektronsűrűséget szolgáltatják. Ekkor a referencia rendszerre a Hamilton-operátor egyszerűen felírható (4. egyenlet).

$$H_s = \sum_{i=1}^n \left[-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(r_i) \right] \quad (4)$$

Nem kölcsönható elektronokra az egyenlet viszonylag egyszerűen megoldható, és ily módon, a hullámfüggvényekhez hasonlóan nyerhető a referencia rendszer Kohn-Sham orbitálokból felépülő Slater-determinánsa.

Mivel az elektronok között kölcsönhatás van, ezért elektronsűrűségből (amit a 4. egyenlet alapján számolt pályák alapján kaphatunk) kiindulva fel lehet írni egy energiasűrűség-funkcionált a rendszerünkre, amelyben szerepeltetjük (az egyelőre még ismeretlen) elektron-elektron Coulomb kölcsönhatást és az elektronok közötti kicserélődési energiának, valamint az elektronok korrelált mozgásának megfelelő kicserélődési-korrelációs funkcionálokat:

$$E_{DFT}[\rho] = T_s[\rho] + E_{me}[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (5)$$

A rendszer energiája tehát az 5. egyenlet szerint írható fel. Itt az $E_{DFT}[\rho]$ a teljes sűrűség-funkcionál energia, a $T_s[\rho]$ a kinetikus energia (az elektronok kölcsönhatását elhanyagolva a 4. egyenlet szerint számítható), az $E_{me}[\rho]$ a mag-elektron kölcsönhatás, amely szintén ugyanezen egyenlet alapján számítható. Az 5. egyenlet az előzőhöz képest a $J[\rho]$ a Coulomb kölcsönhatás és az $E_{xc}[\rho]$ kicserélődési-korrelációs korrekciós tagokat tartalmazó funkcionálokban különbözik. A Coulomb energiát a klasszikus módon számítani tudjuk, az igazi nehézséget a kicserélődési-korrelációs funkcionál megadása jelenti.

Kezdetekben a számításokhoz az úgynevezett lokális sűrűség közelítést (local density approximation, LDA) módszert használták. Ekkor feltételezték, hogy az elektronsűrűség a helykoordináták változtatásával csak kismértékben változik és alkalmazható a homogén elektron gázra kellő pontossággal származtatható kicserélődési-korrelációs funkcionál.

Molekulák és általában valós kémiai rendszerek leírásához azonban a homogén elektron gázra megadott kicserélődési-korrelációs funkcionál nem szolgáltatott kellő pontosságú eredményeket, így felmerült, hogy ne csak a referencia rendszerre kapott elektronsűrűséget, hanem annak mintegy sorfejtéseként a gradiensét is használják a DFT számolásokban. Ez az alapja kémiai rendszerekre igen gyakran és eredményesen alkalmazott általánosított gradiens közelítésnek (generalized gradient approximation, GGA).

Az úgynevezett hibrid módszereknél a kicserélődési kölcsönhatást részben HF szinten számítják ki. A kémiai számításokban igen gyakran használt B3LYP módszernél (amely egy hibrid GGA módszer) pl. az energia a 6. egyenletben megadott módon írható fel [76].

$$E_{xc}^{B3LYP}[\rho] = (1 - a - b)E_x^{LDA}[\rho] + aE_x^{HF} + bE_x^{B88}[\rho] + cE_c^{LYP}[\rho] + (1 - c)E_c^{VWN}[\rho] \quad (6)$$

ahol a , b és c (rendre 0,20, 0,72 és 0,81) empirikusan meghatározott paraméterek, $E_x^{LDA}[\rho]$ a kicserélődési energia tag LDA közelítése, E_x^{HF} valamint $E_x^{B88}[\rho]$ ugyanennek a HF alakja és Becke által javasolt [76] alakja. A korrelációs funkcionálokat Lee, Yang és Parr ($E_c^{LYP}[\rho]$, [77]), valamint Vosko, Wilk és Nusair ($E_c^{VWN}[\rho]$, [78]) javasolták.

A DFT módszereket kémiai problémákra alkalmazva a HF módszernél jobb, igen gyakran a MP2 módszerrel kapotthoz hasonló eredményeket kapunk sokkal kisebb számítási igény mellett.

Mivel az egzakt funkcionálok nem ismertek így azokra sokszor intuitív módon vagy különböző modell rendszerek parametrizálásával kell javaslatot tenni. Jelenleg nem ismert olyan általános eljárás, amely szisztematikusan javítaná a funkcionálok formáját és azokat végrehajtva az egzakt kicserélődési-korrelációs funkcionált fel tudnánk írni [71]. Ez lényeges eltérés a HF módszerből kiinduló *ab initio* számításoktól, ahol pl. a konfigurációs kölcsönhatás módszerrel egyre nagyobb bázist alkalmazva és egyre növelve a gerjesztett elektronok számát elérkezhetünk a nemrelativisztikus Schrödinger-egyenlet megoldásához.

3.1.3. Bázisok

A HF, MP2 és a DFT módszerek megoldásához szükség van bázisokra is, melyek jellemzően vagy Slater-típusú pályákból (STO) vagy Gauss-típusú pályákból (GTO) állnak (7. és 8. egyenlet).

$$\chi_{STO} = N r^{-1} \exp(-\xi r) Y_m^l(\vartheta, \varphi) \quad (7)$$

$$g_{kpq} = N x^k y^p z^q \exp(-\xi r^2) \quad (8)$$

Az STO-kkal ellentétben a GTO-k nem adják vissza a hidrogénszerű függvények éles csúcsát az atommag helyén és az exponenciális lefutás is rövidnek mondható, viszont számítástechnikai szempontból szerencsésebbek, manapság szinte csak ezeket használják (ezek például analitikusan integrálhatóak, illetve két Gauss-függvény szorzata is Gauss-típusú marad). Felmerül kérdés, hogy hova helyezzük el ezeket a bázisfüggvényeket a térben. Számos lehetőség közül a legelterjedtebb az atomon centrált bázisfüggvény, könnyű automatizálhatósága miatt. Minél nagyobb bázist használunk, várhatóan annál pontosabb eredményt kapunk már az első számítás során. Felső korlátot a számítási kapacitás jelent, alsó korlátot pedig az elektronok száma, illetve a szimmetria megmaradás. A p-típusú függvényekből három vagy a három többszöröse szükséges. A minimális bázishoz szükséges függvények számát úgy határozhatjuk meg, hogy minden atompályához rendelünk 1-1 megfelelő típusú (s, p, d, f) függvényt. A kontrahált bázis előállítás során GTO-k lineáris kombinációjával STO-kat jobban leíró függvényeket hoznak létre. Az eljárásnak az a lényege, hogy a lineárkombináció közel STO minőségű lesz, megtartva a GTO-k számítástechnikai előnyeit. A kontrakciós sémák közül több típus ismert, az általunk is leggyakrabban használt 6-31G(d) bázisban az atomok belső pályáit hat primitív Gauss-függvénnyel írja le, míg a vegyértékhéj pályáit két olyan pályával, melyek három, illetve egy primitív Gauss-függvényből állnak. A bázisokat gyakran polarizációs függvényekkel egészítik ki, azaz olyan atompályákhoz tartozó függvénykészlettel, amelyek az adott atomnál nem betöltöttek, pl. d-típusú függvények a C atomnál. Az előbbi példában a 6-31G(d)-bázisnál a (d) ezt a kiegészítést jelöli, azaz a molekula fentebbi típusú nem-hidrogén atomjaira egy sorozat (6 db) d-típusú függvényt helyezünk el, amelyek a bázist flexibilisebbé teszik, hatásuk észrevehetően javítja az elektronszerkezet leírását [71].

3.2. Molekulamechanika

A modellezés során felmerülő problémák vizsgálatakor sokszor olyan méretű rendszerekkel kell dolgoznunk, melyeket már nem tudunk leírni a kvantumkémia eszközeivel. Az egyik legegyszerűbben elképzelhető közelítő módszer a molekulamechanika, amely az atomok, mint merev golyók között fellépő kölcsönhatások leírására egyszerű egyenleteket alkalmaz. A rendszer atomjai különféle kölcsönhatásba kerülhetnek egymással. A molekulamechanika, más néven erőtér (force field) módszerek a kvantumkémiai módszerekkel ellentétben nem veszik figyelembe az elektronokat sem, hanem a rendszer

energiáját kizárólag a magok helyzete alapján származtatják. Ezért az ilyen módszerek nem alkalmazhatóak olyan esetekben, amikor elektron-átrendezéssel jellemezhető problémákat vizsgálunk. Más esetekben, megfelelő paraméterválasztás esetén, gyors és viszonylag pontos választ kaphatunk [69].

$$E_{MM} = \sum_{\text{kémiai kötések}} k_b (d - d_0)^2 + \sum_{\text{kötésszögek}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diéderes szögek}} k_\phi [1 + \cos(n\phi + \delta)] + \sum_{\text{nemkötő párok AB}} \left\{ \epsilon_{AB} \left[\left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}} \right)^6 \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_A q_B}{r_{AB}} \right\} \quad (9)$$

Ezeket a kölcsönhatásokat egyszerű analitikus függvényekkel írják le (9. egyenlet). Ezt a leírást nevezzük erőtérenk [77]. Az alkalmazott függvények és analitikus alakjuk erőterenként változhat, de általában háromféle kölcsönhatást vesznek figyelembe: kovalens, elektrosztatikus és van der Waals (vdW) kölcsönhatást, melyek a következő tagokból épülnek fel (sorrendben):

- kötési potenciál, ahol k_b a kötési erőállandó, d a kötéstávolság és d_0 referencia kötéstávolság,
- hajlítási potenciál, ahol k_θ a hajlítási erőállandó, θ a hajlítási kötésszög és θ_0 a referencia kötésszög,
- diéderes potenciál, k_ϕ az adott típusú torziós potenciál amplitúdója, ϕ a torziós szög, n és δ pedig a torziós potenciál periodicitását és a diéderes szög referenciapontját definiáló paraméterek,
- míg a nemkötő kölcsönhatások jellemzésére az utolsó tagban a Lennard-Jones (12,6) potenciálfüggvény: ϵ a potenciálgödör mélysége, σ_{AB} az a véges távolság, ahol a potenciál nullává válik, az utolsó tag pedig a
- Coloumb-potenciál, az ϵ_0 az abszolút permittivitás (dielektromos állandó), q_A és q_B ponttöltések, r_{AB} az ezek közti távolság.

A kvantummechanikában a szerkezetek leírásához atomokat rendelünk, a molekulamechanikában pedig atomtípusokat használunk. Egy adott elemhez gyakran egynél több atomtípus tartozik, mivel a paraméter meghatározás során figyelembe kell venni az atom rendszámán kívül a hibridizációját és a kémiai környezetét is.

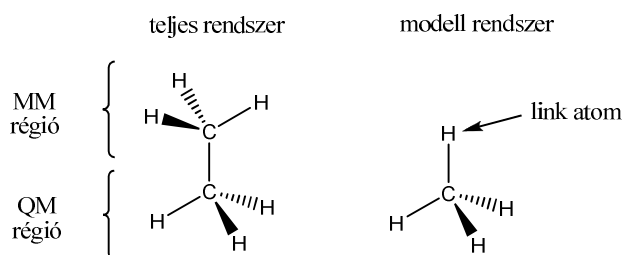
A számításokhoz a paramétereket az erőterek tartalmazzák. Ezeket az adatokat kísérleti úton vagy a kis molekulák kvantumkémiai számításaiból adódó potenciális energiafelületből visszaillesztéssel határozzák meg. Pontosságukat nem csak alakjuk, hanem legalább annyira az alkalmazott atomtípusok száma és a megfelelő paraméterezése is befolyásolja [78]. Ezért a paraméterkészletet minden esetben a megoldandó problémához kell kiválasztani. Széles körben alkalmazzák az erőtereket a molekuladinamikai (MD) számításoknál is.

3.3. Vegyes módszerek

3.3.1. Hibrid QM/MM módszerek

Nagy atomszámú rendszerek esetében (főként szerves-, illetve biokémiai reakciók) az előbbiekből következően kézenfekvő megoldás a kvantummechanika (QM) ötvözése a molekulamechanikával (MM). Ezt nevezzük röviden vegyes QM/MM módszernek. Ennek az a lényege, hogy a teljes rendszert kisebb alrendszerekre bontjuk fel, melyekben ezután eltérő pontosságú elméleti modelleket használunk. A belső réteghez a rendszer számunkra legfontosabb része tartozik, melyben valamilyen elektronszerkezeti változást szeretnénk leírni (kötésfelhasadást, illetve -képződést, töltésátmenetet, ionizációt, elektrongerjesztést stb.) és amely szükségessé teszi pontos kvantummechanikai potenciál alkalmazását. A külső rétegben azon atomok szerepelnek, amelyek elektronikus változásai az adott folyamatban elhanyagolhatók, azonban a központi részre gyakorolt hatásuk nem hanyagolható el. E részt molekulamechanikai módszerekkel tárgyaljuk. Törekedni kell a QM/ MM gazdaságosságának megtartására, azaz a QM pontosságú és MM gyorsaságú számítás közti egyensúly megtalálására [79], [80].

Az egyik nehézsége ezeknek a módszereknek a határon elhelyezkedő kötések modellezése. Ha a határ kémiai kötést érint, akkor az egyik megoldás erre a széles körben alkalmazott link atom (LA) módszer [76], [81]. Ennél a technikánál a külső részt egyetlen LA-mal helyettesítjük a belső részben, ami általában egy paraméterezett H atom (4. ábra).



4. ábra: A link atom módszer bemutatása egy etánmolekulán. Az egyik metilcsoportot egy paraméterezett hidrogénnel helyettesítettük a QM részben

A kötés irányában, rögzített skálafaktor által megadott távolságban helyezik el őket. Amennyiben a geometria optimalása során az eredeti C-C kötés változik, a változást követi az C-LA kötés is.

A QM/MM módszereket az energia kiszámítása alapján két csoportba oszthatjuk: szubtraktív és additív módszerek. A szubtraktív módszereknél a rendszer összenergiáját a teljes rendszerre számolt MM, a modell rendszerre számolt QM, és a modell rendszerre számolt MM energiatagokból számíthatjuk: $E_{QM/MM} = E_{MM}(\text{teljes rendszer}) + E_{QM}(\text{belső rész} + \text{link atom}) - E_{MM}(\text{belső rész} + \text{link atom})$. Előnye a szubtraktív módszereknek, hogy nincs szükség további explicit QM/MM tagokra, melyek segítségével összekapcsoljuk a két részt. A módszer képes a link atom által okozott hibákat is korrigálni (a kivonással), ha az MM rész jól reprodukálja a QM potenciált. A számítások elvégzéséhez az alkalmazott erőterben szerepelnie kell a belső rendszer leírásához szükséges MM paramétereknek, amely esetenként nehezen teljesíthető. Továbbá a héjak közötti kapcsolat leírása is kizárólag MM szinten történik, ez pontatlanságot eredményezhet az elektrosztatikus kölcsönhatások vizsgálatánál.

Ezzel ellentétben az additív módszereknél MM szinten csak a külső részt számítjuk. A rendszer összenergiáját az $E_{QM/MM} = E_{MM}(\text{külső rész}) + E_{QM}(\text{belső rész} + \text{link atom}) + E_{QM-MM}(\text{belső rész, külső rész})$ egyenlet alapján kapjuk meg, ahol az utolsó tag a két héj közti kölcsönhatásokat foglalja magába.

A másik nehézség a két rész egymásra gyakorolt kölcsönhatásának számítása. A „tradicionális” QM/MM módszer esetén egy, megfelelően felépített Hamilton-operátorral a rendszer leírható [80]:

$$\hat{H}_{\text{effektív}} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM-MM} + \hat{H}_{\text{határpot.}} \quad (10)$$

ahol a $\hat{H}_{QM-MM}$ tag, ami a módszer fő újítása és legfontosabb része, a környezet és központi rész kölcsönhatását hivatott jellemezni, és amely elektrosztatikus és kicserélődési kölcsönhatásokat tartalmaz, a $\hat{H}_{\text{határpot.}}$ pedig a távoli oldószer tömeget írja le.

A QM - MM rész közötti elektrosztatikus kölcsönhatás figyelembe vételére két módszer áll rendelkezésre. Az egyik a klasszikus vagy mechanikus beágyazás (mechanical embedding, (ME)), a másik az elektronikus beágyazás (electronic embedding, (EE)).

Az ME-nél a QM és az MM régió kölcsönhatását atomokon centrált parciális ponttöltések kölcsönhatásaként, MM stílusú formulával jellemezi. Ez egyszerű technika, de hibalehetőséget hordoz magában. Ez egyrészt abból adódik, hogy ponttöltéseket használunk töltéssűrűség helyett, másrészt, ha változik a QM szinten az elektronok elhelyezkedése az MM szintű számítás nem képes követni ezt a változást, ami nyilvánvalóan hibát okoz. Ez utóbbit a töltés-modell frissítésével ki lehet kiküszöbölni, de ekkor a potenciális energia felület nem lesz folytonos.

Az EE esetében a kvantummechanikai atomokra nem kell töltéssparamétereket megadni, mert az elektrosztatikus energia az MM ponttöltések és a QM atomi bázisfüggvények kölcsönhatásaként adódik a Hamilton-operátor egyelektronos részében (11. egyenlet), ami már (elvileg) sokkal pontosabb leírást ad a két rész között fellépő elektrosztatikus kölcsönhatásról.

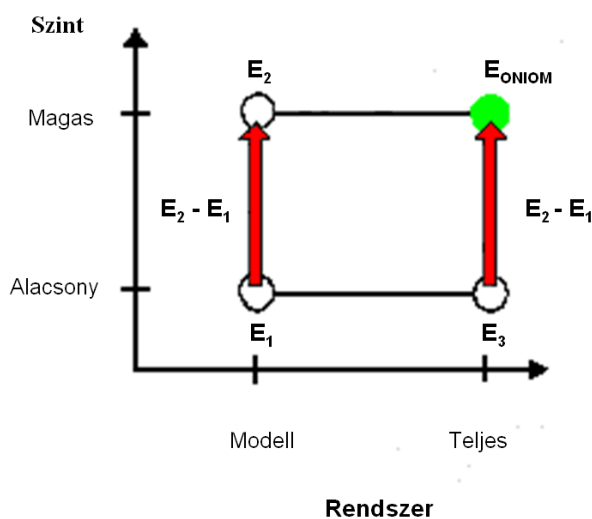
$$\hat{H}_{QM-MM}^{el.st.} = - \sum_i^{\text{elektronok (QM)}} \sum_M^{\text{parciális töltések (MM)}} \frac{q_M}{|r_i - R_M|} + \sum_\alpha^{\text{atommagok (QM)}} \sum_M^{\text{parciális töltések (MM)}} \frac{Z_\alpha q_M}{|R_\alpha - R_M|} \quad (11)$$

A 11. egyenletben az első tag számlálójában az egyes MM parciális ponttöltés (q_M) a nevezőjében ennek a ponttöltésnek (R_M) és a Q_M elektronoknak (r_i) a távolsága, összegezve minden MM parciális töltésre. A második tag számlálójában az adott magtöltés (Z_α) és a már említett parciális ponttöltések szorzata szerepel, a nevezőben pedig ezen töltések koordinátáinak különbsége, minden egyes ilyen kölcsönhatás-párra.

3.3.2. ONIOM módszerek

Az utóbbi időkben könnyű alkalmazhatósága és kódolhatósága miatt lett népszerű egy új extrapolációs séma, az ONIOM (*Our N-layer Integrated molecular Orbital molecular Mechanics*) modell [82]–[85]. A kétszintű modell esetén a rendszer extrapolált magas szintű leírásához három számítást kell végeznünk: a modellrendszerre (belső réteg) alacsony (E_1) és magas szintű (E_2) módszerrel, a teljes rendszerre (külső réteg) alacsony (E_3) szinten. A teljes rendszerre az extrapolált energiát az $E_{\text{ONIOM}} = E_3 - E_1 + E_2$ összefüggés alapján számolhatjuk ki (5. ábra). Ebben a formájában ez egy szubtraktív módszernek felel meg. Az így kapott energiaérték nyilvánvalóan különbözik a rendszer valódi energiájától. Amennyiben azonban a

hiba az adott rendszerre állandónak tekinthető, akkor a számítás eredménye a relatív energiákra pontos lesz.



5. ábra: A kétrétegű ONIOM módszer sematikus ábrája. A teljes rendszerre az extrapolált energiát az $E_{\text{ONIOM}} = E_3 - E_1 + E_2$ összefüggés alapján számolhatjuk ki.

A fentebb említett egyszerűség rovására, de természetesen ennél a módszernél is be lehet vezetni, hogy a rétegek közötti kölcsönhatást részben magas szinten, pontosan a 11. egyenletnek megfelelően számoljuk ki. Ezt a módszert, az additív módszereknél említett electronic embedding elnevezés alapján ONIOM-EE módszernek nevezik. A módszer feltételezi, hogy a rétegek közötti egyelektron kölcsönhatásokon túli tagok a Lennard-Jones tagokkal közelítően jól írhatók le.

3.4. Molekuladinamika

Nem minden kérdés válaszolható meg statikus állapotok vizsgálatával, olykor arra vagyunk kíváncsiak, hogyan változik az idő előrehaladtával egy rendszer. A molekuladinamika a részecskék mikroszkopikus dinamikájának leírásával foglalkozik. A számítási kapacitás korlátai miatt itt sem tehetjük meg, hogy Avogadro-számnyi részecskére felírjuk a klasszikus mozgásegyenletet, de néhány jól átgondolt egyszerűsítés után elég kevesebb számú részecskét szimulálunk ahhoz, hogy a termodinamikai tulajdonságokat vizsgálhassuk. Ilyenkor a rendszer részecskéi a rájuk ható erők hatására a klasszikus (newtoni) dinamika törvényei szerint mozognak. A mozgásegyenleteket kis időközöket választva integráljuk és így kapjuk a rendszert leíró atomi pozíciók időbeli változását (a trajektóriát).

Elvileg mind a kvantummechanikai- mind az empirikus erőter potenciálfelületen történő mozgások számíthatók. Nagyobb rendszerekre, ha hosszabb idő alatt kialakuló változásokat szeretnénk megfigyelni, akkor kizárólag csak az empirikus erőterek által leírt potenciálfelületen történő mozgásokat modellezhetjük.

3.4.1. Periódikus határfeltételek

A dinamikai szimulációt végezhetünk gázfázisban vagy oldószerben. Biokémiai reakciók során a környezetet az eredeti állapotnak megfelelően vizes közegben érdemes vizsgálni. Ennek kialakítása úgy történik, hogy a molekulát egy virtuálisan vízzel töltött doboz közepére helyezik, és a doboz méretét úgy határozzák meg, hogy a fala a molekulától kellő távolságban (8-15 Ångström) legyen. A molekula alakjától (és néha a reakciótól, konformáció-változás mértékétől) függ, hogy milyen a doboz geometriát választunk hozzá (ortogonális, hatszöges, csonkolt oktaéderes). Elképzelhető, hogy szimuláció során a definiált határfelületen kívülre is kerülhet egy vízmolekula, vagy akár a molekulakonformáció is megváltozhat annyira, hogy „kilógjon” a dobozból. Ennek megoldására a periódikus határfeltétel (periodic boundary conditions, PBC) technikát alkalmazzuk, azaz a dobozt az eltoltjaival vesszük körül, ennek következtében, ha egy vízmolekula az egyik oldalon kilép, az a szomszédos doboz ellentétes oldalán azonnal be is lép, így a vizsgált rendszerben a vízmolekulák száma állandó értéken tartható és a fehérje is ugyanolyan környezetben marad a szimuláció során. A vízdoboz méretét úgy kell megválasztani, hogy a fehérje és a szomszédos dobozban lévő fehérje közt ne lépjen fel kölcsönhatás [86].

3.4.2. A nyomás és a hőmérséklet szabályozása

A szimuláció hőmérsékletét termosztáttal, míg a nyomását barosztáttal szabályozhatjuk. Egy-egy csatolási állandóra is szükség van, amelyekkel az előre meghatározott értékre való visszaléptetés időközét tudjuk megadni. Ezt nem célszerű túl kicsire választani, mert az akadályozhatja a rendszer szabad mozgását, ha pedig túl nagyra állítjuk, akkor nagy lehet a hőmérséklet- és nyomásingadozás. A leggyakrabban használt algoritmusok a Berendsen-, a v-rescale és a Nose-Hoover-termosztát, illetve barosztát [87]–[90].

3.4.3. Az oldószer hatásának figyelembevétele

A szimulációk során az oldószert (legtöbbször vízmolekulát) vagy implicit, vagy explicit módon vehetjük figyelembe. Előbbinél az oldószer jelenlétét egy folytonos közegként írják le, és a közeg dielektromos állandójával hat az „oldott” anyagra és nem a tényleges oldószer molekulákkal történő kölcsönhatást veszik figyelembe, ahogy ezt az explicit eljárásnál teszik [91]. Számos vízmolekula modell létezik, mi a számításaink során az AMBER erőterben (is) megtalálható [92] explicit TIP3P modellt használtuk, amely hatékonyan számítható és széles körben elterjedt [93]. Még pontosabb környezet modellezéséhez a rendszerhez Na^+ - és Cl^- -ionokat adva a rendszerhez fiziológiás ionerősség is kialakítható.

3.4.4. Nemkötő kölcsönhatások

Az atomok közötti nemkötő kölcsönhatást a szomszédos atomokon túl, több kötésnek megfelelő távolságban is vizsgálnunk kell. Az előzőekben megismert van der Waals kölcsönhatás a távolsággal gyorsan lecseng, ezért bizonyos távolságon túl ez a kölcsönhatás elhanyagolhatóvá válik. Definiálhatunk egy távolságot, amelyen túl a vdW kölcsönhatásokat figyelmen kívül hagyjuk (cut-off távolságnak nevezzük), így csökkentve a számításigényt. Az elektrosztatikus kölcsönhatás esetén azonban nem tudjuk ezt a megközelítést alkalmazni, mert ott a kölcsönhatás nem cseng le olyan gyorsan. Ennek kezelésére egy bevált módszer az Ewald összegzés, pontosabban annak egy praktikus formája a Particle Mesh Ewald (PME)

módszer [94], mely során minden részecske kölcsönhat minden részecskével a végtelen rendszer periódikus celláiban definiált rácspontokra vetített parciális töltéseik révén [95].

3.4.6. A dinamikai trajektória és analízise

Különböző kezdeti feltételek választásával kapott MD szimuláció elsődleges eredményét trajektóriának nevezzük. A trajektória a rendszert alkotó részecskék helykoordinátáit tartalmazza az idő függvényében. Tetszőleges pontosságot érhetünk el ezek utólagos elemzésénél, ugyanis rajtunk (és természetesen a tárolási kapacitásunkon) múlik, hogy a minden szimulációs lépésköz után kimentjük-e ezt az adatsort, vagy csak minden n -edik pillanatképet (frame) raktározzuk el. A trajektóriák elemzésére, egymással történő összehasonlítására, többek között, az alábbi technikákat szokták alkalmazni.

3.4.6.1. A referenciától való eltérés - RMSD

A szimuláció során a rendszer translációs és rotációs szabadsági fokoktól megtisztított elmozdulását egy referenciaszerkezethez képest az angol *root mean square deviation* kifejezésből nyert RMSD–vel szokás jellemezni. A referenciaszerkezet lehet például egy röntgenkrisztallográfiai adatok alapján definiált szerkezet, vagy a szolvatált, 310K–re hozott, energetikailag egyensúlyban lévő átlagszerkezet, vagy bármely más állapotára jellemző, ismert szerkezet. A szimuláció során Δt lépésként kiszámíthatjuk az RMSD-t, ami egyensúly esetén az idő függvényében ábrázolva egy állandó érték körül ingadozik. Ha a rendszer nincs egyensúlyban, akkor a trajektória mentén az RMSD vagy felfele, vagy lefele mozdul el. A trajektória szerkezetei (A) és a referencia-szerkezet (B) közötti átlagos eltérést az alábbi formula írja le [96]:

$$RMSD = \sqrt{\left(1 / N_{C\alpha}\right) \sum_{i=1}^{N_{C\alpha}} \left(r_i^A(t) - r_i^B\right)^2} \quad (12)$$

ahol $N_{C\alpha}$ –vel az α szénatomok számát jelöljük, az $r_i^A(t)$ a vizsgált szerkezet i -edik α szénatomjának a t szimulációs időpillanatban vett koordinátája és az r_i^B a referenciaszerkezet i -edik α szénatomjának a koordinátája.

3.4.6.2. Fluktuáció - RMSF

Hasonló módon, egyes molekularészletek változékonyságát (fluktuációját) szintén az angol *root mean square fluctuation*, azaz RMSF paraméterrel jellemezhetjük, amelyet az alábbiak szerint határozhatunk meg:

$$RMSF = \frac{1}{T} \sqrt{\sum_{t_j=1}^T (r_i(t_j) - \bar{r}_i)^2} \quad (13)$$

ahol r_i –vel az i -edik $C\alpha$ atom koordinátáját jelöltük, r_i a koordinátának a trajektória kiválasztott szakaszára vett időátlag, T az átlagolás időtartama Δt egységben. A röntgenkrisztallográfiás mérések kiértékelésekor nyert B-faktorok kapcsolatban a következő összefüggésben állnak az atomi fluktuációkkal [96]:

$$RMSF = \sqrt{\langle \Delta r_i^2 \rangle} = \sqrt{3B_i / (8\pi^2)} \quad (14)$$

3.4.6.3. Főkomponens analízis

A főkomponens-analízis vagy főkomponens-elemzés egy többváltozós statisztikai eljárás, mely az adatredukciós módszerek közé sorolható és a faktoranalízis egy speciális esetének tekinthető [97]. Lényege, hogy egy nagy adathalmaz – melynek változói kölcsönös kapcsolatban állnak egymással – dimenzióit lecsökkentse, miközben a jelen lévő varianciát a lehető legjobban megtartsa [98]. A módszer ezt úgy éri el, hogy egy ortogonális transzformáció segítségével az adathalmaz lehetségesen korreláltatható változóit lineárisan korrelálatlan változók értékészletévé alakítja át, ezeket nevezzük főkomponenseknek. A főkomponensek száma szükségszerűen kisebb az eredeti változók számánál vagy azzal egyenlő. A transzformációra jellemző, hogy az első főkomponens rendelkezik a lehető legnagyobb varianciával, s minden utána következő komponens a fennmaradó legnagyobb varianciával fog rendelkezni, ha megfelel annak a feltételnek, hogy merőleges (azaz korrelálatlan) az azt megelőző komponensekre. A főkomponensek merőlegesek, mivel a kovariancia mátrix – ami szimmetrikus – sajátvektorai [99].

A principális komponensek számításakor, a sajátvektorok mellett adódnak sajátértékek is. Ezeket sorba rakva, a legnagyobb sajátértékhez tartozik az első főkomponens, a következő legnagyobbhoz a második, és így tovább. Ezekből a mozgásokból (különböző lineáris

kombinációk segítségével) fel lehet építeni a trajektóriát. A trajektória felépítése során az egyes sajátvektorok eltérő fontosságúak, kihagyásuk eltérő hibát generál. Míg a sokadik sajátvektor-sajátérték párosok, mint nagyfrekvenciás mozgások csak a lokális vegyértékrezgések leírását adnák, és nem mondanának semmit a globális mozgásról, a fentiek szerint sorba rakott első néhány páros, mint kisfrekvenciás rezgések, elsősorban a globális mozgást írják le. Az első frekvenciához vagy főkomponenshez tartozik a legnagyobb amplitúdó, tehát a globális mozgás szempontjából ez a legfontosabb.

4. Célkitűzések

4.1. ASA-COX-1 célkitűzés

Az irodalomban csak egy, a COX enzim irreverzibilis gátlási mechanizmusának felderítését célzó, aszpirin átésztereződési reakció mechanizmusát vizsgáló közleményt találtunk [39]. 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 [100], [101]. 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 ciklooxygenáz-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 [85], [102], [103], amely lehetővé teszi, hogy a hullámfüggvényt a környező parciális töltések polarizálni tudják. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a reakcióban a szerkezeti vízmolekulának 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 [80], [104], [105]. Számítások sorozatait végeztük 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?

4.2. Antitrombin célkitűzés

Az AT esetében az alloszterikus 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 feltárására.

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 szeretnénk 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 "kölcsonös információ" értékek kiszámítása szintén része volt célkitűzéseinknek. Az utóbbi adatok segíthetnek annak a megértésében, hogy az allosztérikus kölcsönhatást 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?

5. Módszer

5.1 ASA-COX-1 komplex vizsgálata

5.1.1. 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 [106]) és a YASARA szoftver felhasználásával [107] 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 [108] és verify3D [109] 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.

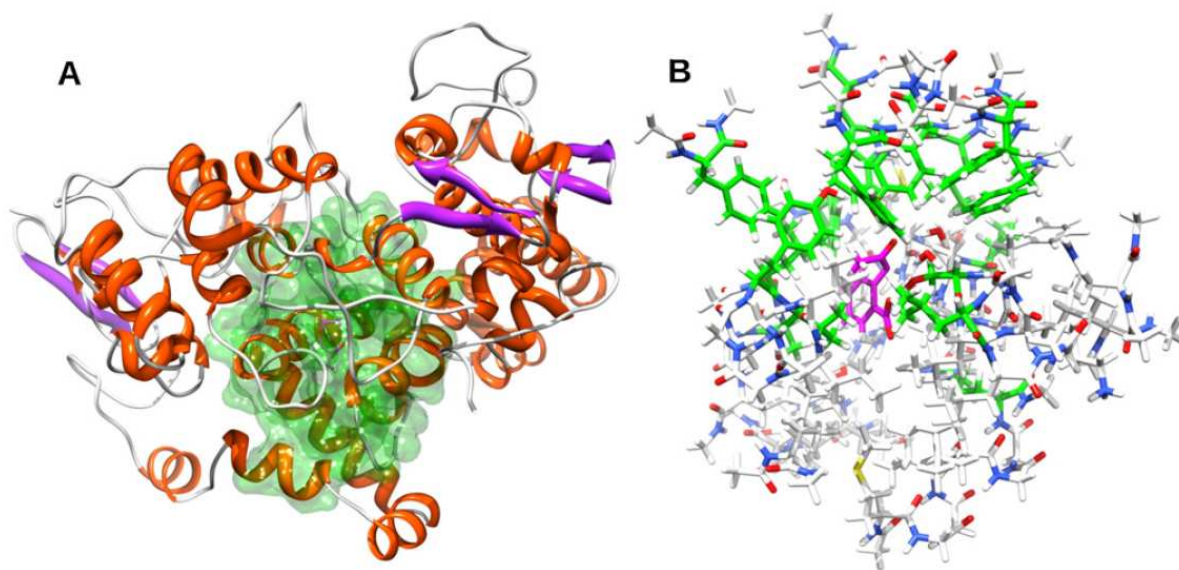
Ezt követően az ASA-t a humán COX-1 enzim aktív helyére dokkoltuk be az Autodock 4.0 szoftver grafikus felületét használva [110]. A dokkoláshoz Lamarcki genetikus algoritmust és merev receptor - flexibilis ligandum protokollt alkalmaztunk. A $98 \times 98 \times 122$ rácspont méretű dobozban, melynek közepét a Ser530 O γ 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.

5.1.2. Modellépítés és QM/MM számítások

A reakciócentrumot körülvevő régiót úgy definiáltuk, hogy azok az aminosavak tartozzanak bele, amelyek legalább egy atomja 7 Å-nél közelebb helyezkedik el a Ser530 O γ -vagy az ASA karbonil C atomjához (6A ábra). 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

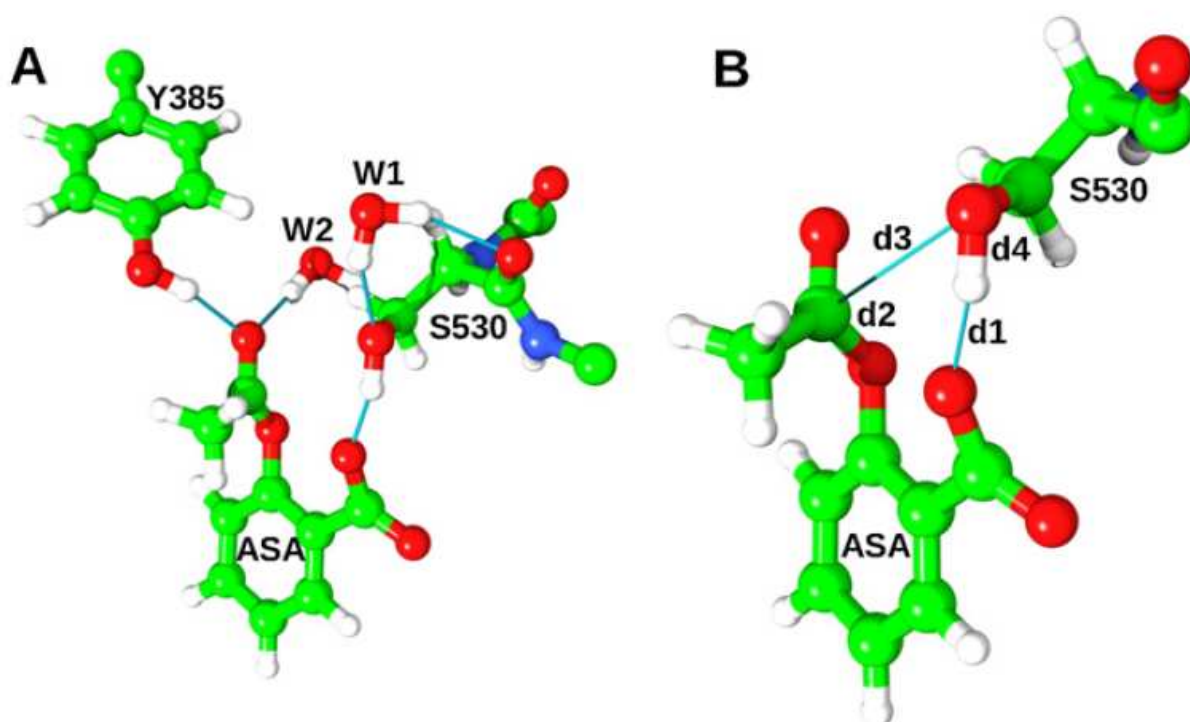
Gaussian stílusú input fájlra konvertáltuk, mely AMBER erőter atomtípusokat és hozzájuk tartozó parciális töltéseket [111] rendelte az atomokhoz.

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 alatt 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.



6. ábra: **A:** A homológia modellezés során előállított teljes humán COX-1 enzim „new cartoon” megjelenítéssel és áttetsző zöld jelöléssel ennek alrendszere, melyet a számításokhoz definiáltunk. **B:** A 6A ábrán szereplő alrendszer kinagyítva, pálcika megjelenítéssel látható. Ezen a modellen végeztük az ONIOM-típusú QM/MM számításokat. Az ASA molekulát lila színnel, a relaxáció alatt is mozgó aminosavakat pedig zölddel jelöltük.

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 (6B ábra). 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 (7A ábra).



7. ábra: **A:** A B modell belső rétege, amelyen magas szintű (kvantummechanikai) számításokat végeztünk az ONIOM módszerrel. A két vízmolekula helyzete W1 és W2.
B: Négy reprezentatív távolság (d1-d4), melyeket az ASA-COX reakció stacionárius pontjainak leírása során figyelembe vettünk.

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 [106], [112], [113]. 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 γ proton transzferéhez (7A ábra). 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).

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 γ -H γ kötéstávolsága, a másik a képződő O γ -C(ASA acetil szénatom) kötéstávolság (7B. ábra, d3 és d4 távolságok). 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 zérusponti 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 nyeregponatok 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 [114] által a DFT számításokhoz javasolt B97-D funkcionált [115] 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 [116], [117] végeztük. A megjelenítéshez a Molekel [118], Chimera 1.4 [119], VMD 1.9 [120], DPlot [121] és az ESPript [122] 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. A reakció részletesebben elemzett geometria paramétereit a 7B ábrán jelöltük.

5.2. Az antitrombin modellek elkészítése

5.2.1. Modell a dinamikai futáshoz

A molekuladinamikai szimulációknak egyik alapjául (1. szimuláció) a protein adatbázisban található 1e04 jelű AT szerkezet szolgált [53]. Ebben a szerkezetben a natív és a látens antitrombin formák együtt kristályosodnak. A második modell az háromszorosan mutált 1t1f PDB szerkezeten alapul, amelyben az AT monomer formában kristályosodott ki, és az RCL az AT felszínéhez képest lényegesen eltérő helyzetben [60] látható. Ekkor a natív-látens formák között az átalakulást a mesterséges Val317Cys és Thr401Cys mutációk, azaz új diszulfid híd létrehozása akadályozta meg. A Cys317 és Cys401 aminosavakat a modellünkben virtuálisan visszaalakítottuk a vad típusú szekvenciára míg a Ser137Ala mutációt megtartottuk. Az utóbbi szerepe csupán az, hogy miatta az Asn135 glikozilációja nem történik meg, így az aktívabb β -antitrombin van jelen a rendszerben. Ez megítélésünk szerint nem befolyásolja érdemben a várható eredményeket (2. szimuláció). A harmadik modellt a Ser137Ala/Val317Cys/Thr401Cys mutációt 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 rövid N-terminális régió és a hiányzó C-terminális Lys432 aminosav egységen kívül, hiányzott egy 10 aminosavnál hosszabb peptid szekvencia is. Ez a 22-45 (1e04) és 25-36 (1t1f) közötti szakasz különös jelentőséggel bír, mivel ez a fehérje PS kötő régiójához közel található. Ezeket az 1t1f szerkezet esetében a MODELLER szoftver [123] automatikus loop generáló algoritmusával, míg az 1e04 szerkezetnél a Schrödinger programcsomag [124] segítségével pótoltuk. Utóbbinál a kapott loop szerkezet finomítását a PLOP [125] szoftverrel tettük meg, mely a Schrödinger modellezési csomagban elérhető. A homológia modellezéssel kapott szerkezeteket a Procheck szoftverrel [108] ellenőriztük.

Az elkészült szerkezetek energia minimalizációját az AMBER '03 erőter alkalmazásával [126], [127] a GROMACS szoftvercsomaggal [128] 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 Å legyen az 1e04, és 15 Å az 1t1f modellnél. Az utóbbi értéket azért választottuk nagyobbra, mert az 1t1f kompaktabb szerkezetű, mint az 1e04. A rendszereket neutralizáltuk és a

fiziológiás ionerősség ($\sim 0,15M$) 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 ($P=10^5 Pa$) és állandó hőmérséklet ($T=310K$) mellett, periódikus határfeltételt (PBC) és TIP3P [93] explicit vízmodellt alkalmazva. A közti elektrosztatikus és a van der Waals kölcsönhatásokra 10Å cut-off távolságot alkalmaztunk. A nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatás korrekciót a Particle Mesh Ewald (PME) [95] módszer segítségével számoltuk. A hőmérséklet csatoláshoz a *v-rescale* [88], a nyomás csatoláshoz pedig a Berendsen algoritmust [87] használtuk. Ahhoz, hogy jó eséllyel vizsgálni tudjuk a nagy léptékű konformációs átmenetekhez tartozó konformációs ingadozásokat, a szimulációs időnek elég nagynak kell lennie. Ezt hatékonyabban érhetjük el, ha a szimulációs időléptéket hosszabbra választjuk. A virtuális atomi pozíció protokoll (*virtual sites protocol*) egy alternatívája a tömeg újrapartícionálási módszernek, amelyet a szimulációkban az időlépték hosszának növelésére használnak úgy, hogy a hidrogén atomok helyzetét a szomszédos nehézatomok függvényeként definálják [129], [130]. 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 [120] történt.

Számítottunk a Lange és Grubmüller által javasolt kölcsönös információ (mutual information, MI) alapú általánosított korreláció (general correlation) értékeket, amihez a *g_correlation* segédprogram letölthető a Max Plank Intézet Elméleti és Számítási Biofizika Kutatócsoport honlapjáról [131], [132]. A számításhoz a frame-eket a trajektóriából nyertük ki, minden egyes nanoszekundum végéről egyet-egyet, összesen 2000 db-ot.

A ProDy csomag [133] segítségével főkomponens analízis számításokat is végeztünk a dinamikai trajektória előbbi 2000 pillanatképét 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 [134] 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 4.5Å 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. Kivételt jelentett azoknak a kérdéseknek a megválaszolása, hogy az 1t1f- és az 1e04 PDB szerkezeteknek megfelelő RCL konformációk létezhetnek-e együtt oldat fázisban és hogy ezek között a konformációs állapotok között lehetséges-e átmenet, melyekre metadinamikai szimulációval tettük kísérletet [135].

A metadinamikai szimulációkat a PLUMED [136] és a GROMACS szoftver-együttes segítségével végeztük. Kollektív változókként (collective variable, CV) egyrészt a Met251-CA, a Glu255-CA és az RCL-t alkotó Ala384-, Ser385-, Thr386-, Ala387-, Val388-, Val389-, és az Ile390-CA atomok tömegközéppontja által bezárt szöget másrészt a Lys236- valamint a Val388-, Val389- és az Ile390-CA atomok tömegközéppontja között lévő távolságot definiáltuk. Minden CV-nél a Gauss potenciál magassága és szélessége egyformán 0,1 értékre volt beállítva, a mértékegységük pedig rendre kJ/mol, nanométer és radián. 1000 MD lépésenként 1 torzító potenciál lett elhelyezve. A vad típusú 1t1f rendszeren végzett szimuláció utolsó (egyensúlyi) szerkezetéből indítottuk a metadinamikai szimulációt. Ahhoz, hogy (az általunk használt modell keretein belül) közel egzakt szabadenergia felületet nyerjünk egy ilyen nagy és flexibilis rendszerre, hatalmas számítási kapacitásra lenne szükség. Ezért az eddigi eredményünket, melyet az 1t1f és az 1e04 RCL konformációs állapotok közötti átmenetre kaptunk, csupán durva becslésnek kell tekinteni.

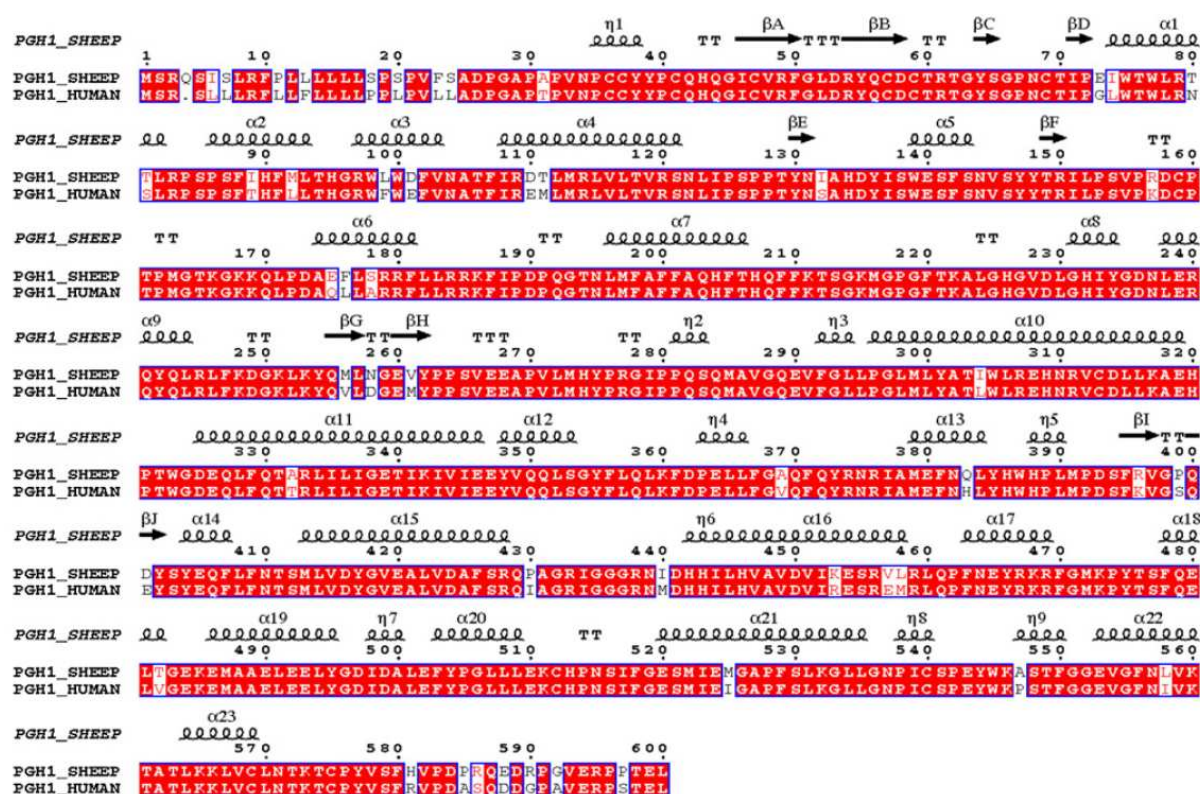
Az RCL pozíciója, mind a pentaszachariddal komplexet képező natív-látens dimer komplexben, mind az AT-proteáz komplexben, sokkal inkább hasonlít az 1e04 szerkezetben található RCL-re, mint az 1t1f-ben található. Ezért az 1e04-re vonatkozó szimulációt (1. szimuláció) tekintjük elsődleges szimulációnak és csak a karakterisztikus hasonlóságokra és/vagy különbségekre fogunk kitérni a 2. és 3. szimuláció vonatkozásában.

6. Eredmények és diszkusszió

6.1. ASA-COX-1 eredmények

6.1.1. 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 (8. ábra). Különösen magas aminosav azonosság látható a COX-1 katalitikus centrumnál és annak közelében. A juh szekvencia negyedik pozíciójában egy Gln deléció látható (8. ábra).

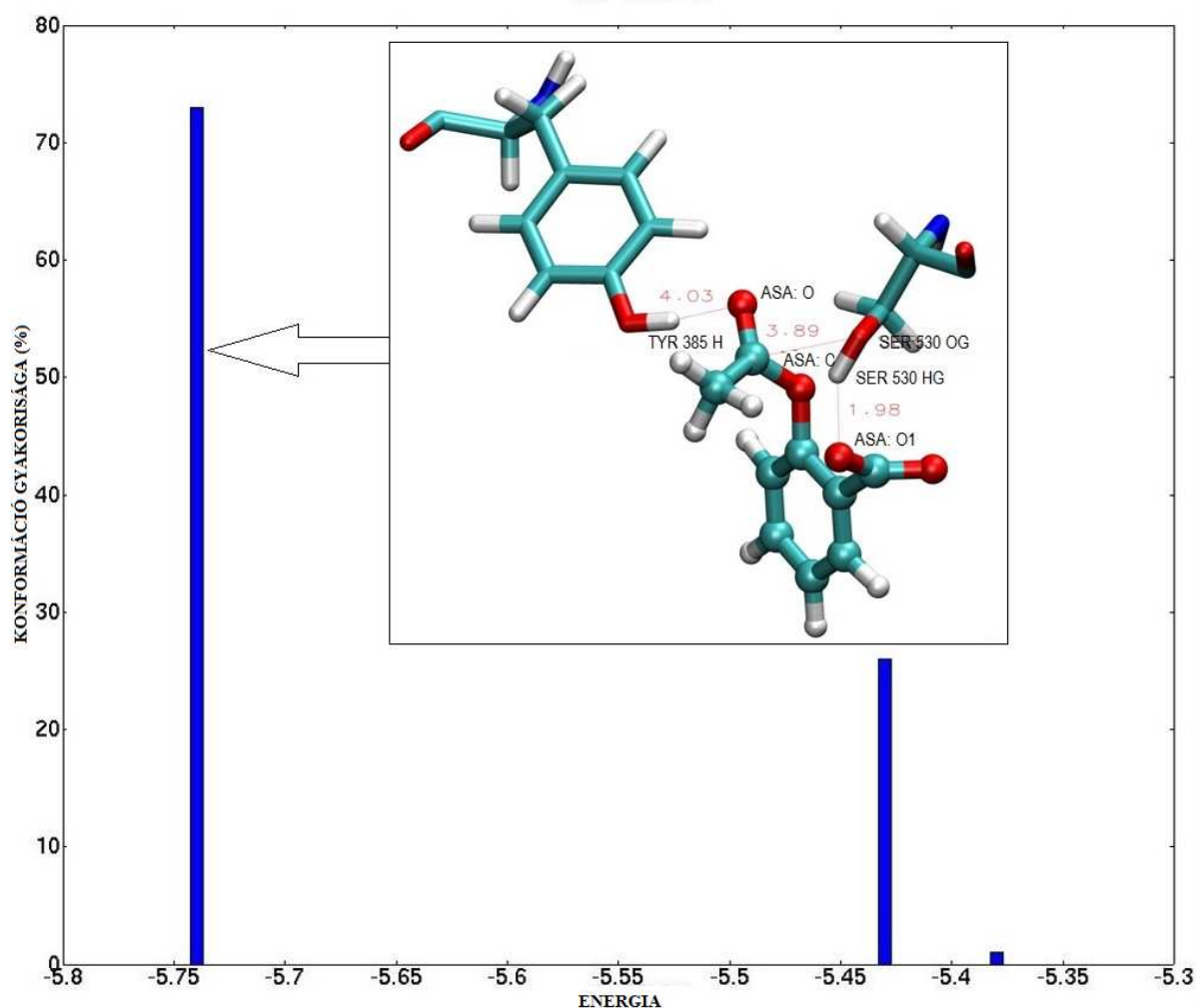


8. ábra: A juh és humán COX-1 enzimek szekvencia egyezése. Az ábrán látható másodlagos szerkezeti elemeket a juh COX-1 röntgendiffrakciós szerkezetéből adódtak. A β-redők nyíllal, míg a helikális szerkezeti elemek rugó-szerű jelöléssel láthatóak az ábrán.

Ez a különbség a humán és a juh enzimek között az oka annak, hogy humán szekvencia számozása ettől a pozíciótól a juh szekvenciától eggyel eltér (pl. juh: Ser530,

humán: Ser529). Ahogy ez a COX enzimek szerkezeti tanulmányaiban megszokott, mi is követni fogjuk a juh COX-1 számozást.

Az aszpirinnak a 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 során következő lépése bekövetkezzen (9. ábra).



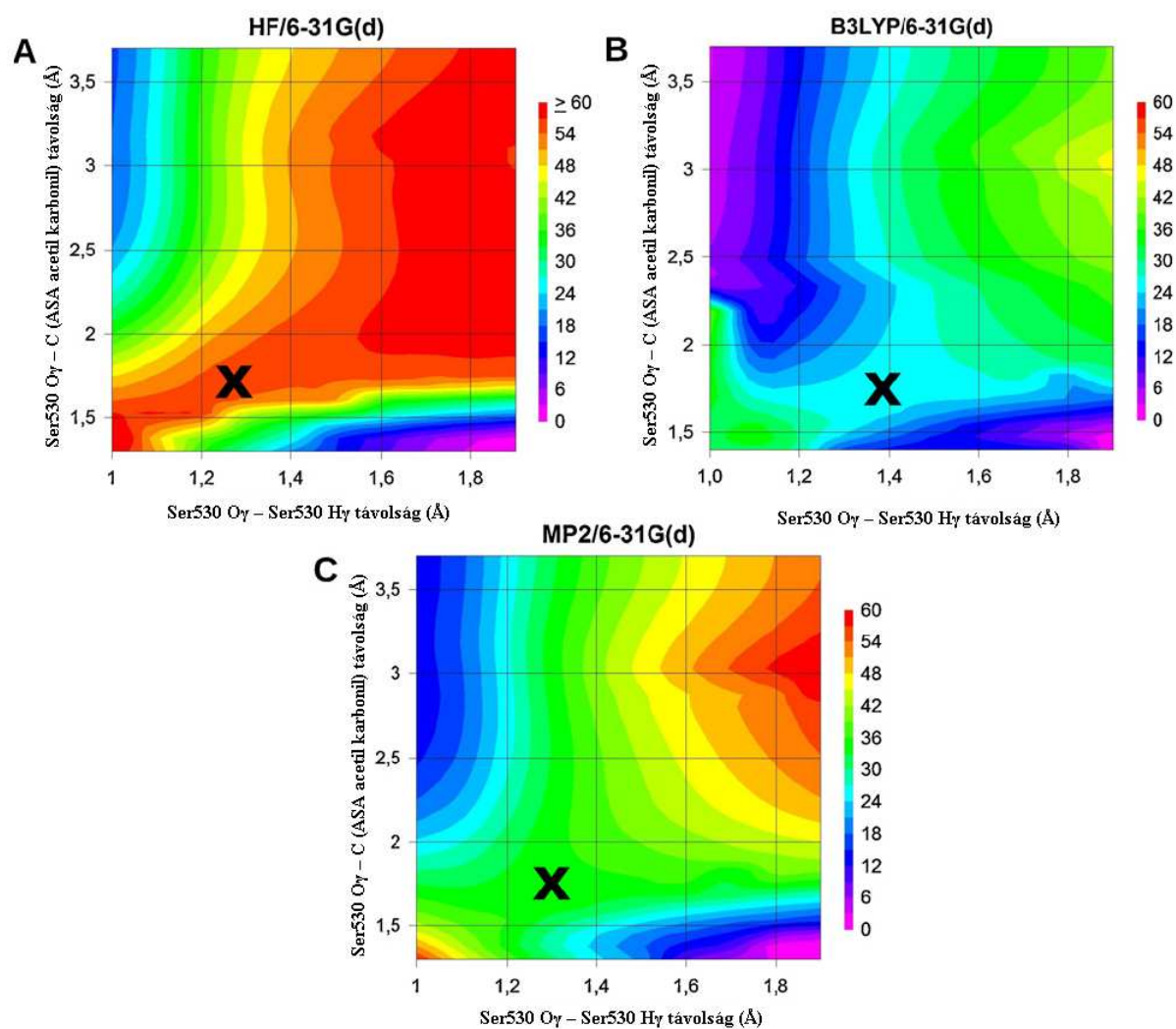
9. ábra: A humán COX-1-ASA dokkolással nyert konformációk energia szerinti százalékos megoszlása (AutoDock 4.0 szoftver) és a legstabilabb aszpirin konformer helyzete, illetve a reakcióban résztvevő atomok távolsága Ångströmben.

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 [39] 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.

6.1.2. 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 (10A-C ábrák). A nyeregpontok hozzávetőleges helyzetét 'x'-szel jelöltük a felületeken. 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 reakció-lépésnek, 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. A potenciálfelületek alapján az átmeneti állapotot (transition state (TS)) egy viszonylag rövid O γ – H γ távolság jellemzi. A felületek a nyeregpontnál, vagy annak közelében nagyon laposnak tűnnek. Ez azt jelenti, hogy nagyon kis perturbáció is nagy változást okozhat az átmeneti állapot helyzetében. A potenciálfelületek alapján arra következtethetünk, hogy az ASA, amikor nem kovalens módon kötődik a COX-1 enzimhez, jelentős energiagát átlépése nélkül viszonylag szabadon mozog, így a karbonil szénatomja könnyen megközelítheti a Ser530 O γ atomját és megtörténhet a nukleofil támadás.

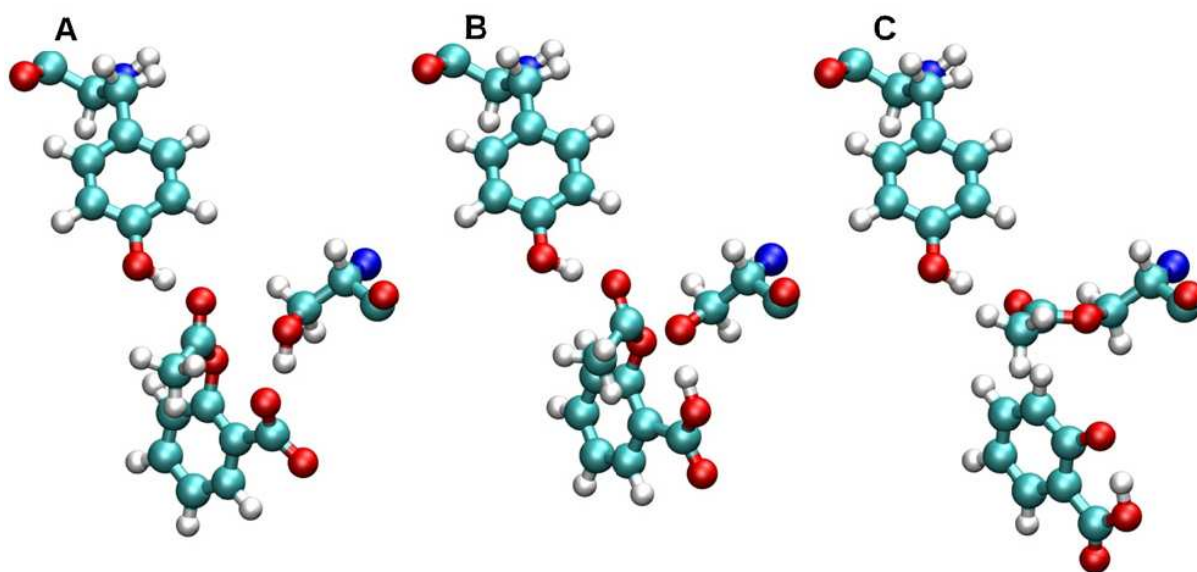


10. ábra: Az ONIOM (HF/6-31G(d):AMBER) (A), ONIOM (B3LYP/6-31G(d):AMBER) (B) és az ONIOM (MP2/6-31G(d):AMBER) (C) potenciális energia felületek a Ser530 O γ – Ser530 H γ és az Ser530 O γ – C (ASA acetyl karbonil) távolságok függvényében. A nyeregpontok hozzávetőleges helyzetét 'x'-szel jelöltük a felületeken.

6.1.3. Geometria paraméterek

A 11A-C ábrán a B1 modellre a dokkolt pozícióból, geometria-optimalás után kapott ASA-COX-1 komplex reakció centruma, az átmeneti állapot és az acetilált COX-1 – szalicilsav komplex látható. A három szerkezeten keresztül a Ser530 H γ és az ASA karboxil csoportjának egyik oxigén atomja közötti karakterisztikus hidrogén-kötés távolság változását követhetjük (d1 távolság, lásd a 7B ábrán és 1. táblázatban). Az ASA-COX-1 komplexben a H γ proton az általunk alkalmazott minden elméleti módszer szerint az O γ atomhoz

kapcsolódik (d4 távolság, lásd a 7B ábrán). 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 (d3 távolság, lásd 7B ábra) 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.



11. ábra: Reprezentatív példák az ASA, a Tyr385 és a Ser530 helyzetére: az ASA-COX-1 komplex rendszer (A), az átmeneti állapot (B) és az acetilált COX-1 és a szalicilsav termék (C) geometria.

Ami az átmeneti állapot geometriai paramétereit illeti (7B és 11B ábrák) érdemes megfigyelni, hogy a Ser530 H γ proton – ASA karboxil O távolságok közel vannak a normál O-H kötéstávolságokhoz, míg a Ser530 H γ – O γ távolságok sokkal hosszabbak. Úgy tűnik, mintha a proton transzfer megelőzné az O-C kötés kialakulását. Az újonnan képződő O-C kötéstávolságok 1,7-1,9 Å tartományban vannak. A bázis szett hatását vizsgálva azt tapasztaljuk, hogy a geometria paraméterekre kis befolyásuk van. A fenolos O – acetil karbonil C kötés az átmeneti állapotban jelentősen nyújtott helyzetben található, mivel ennek a kötésnek a felhasadása szükséges az acetilált szerin képződéséhez.

A termékre vonatkozóan (7B és 11C ábrák) különbségek figyelhetők meg a geometria paraméterekben (Ser530 H γ – Ser530 O γ és fenolos O – acetil karbonil C távolság) az

átmeneti állapot $\rightarrow$ szalicilsav reakciókoordináta mentén. 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 röntgendiffrakciós szerkezethez nagyon hasonló geometriát kaptunk a termékekre [26]. A B3LYP módszerrel számolt távolságok a két másik módszerrel kapottak között helyezkednek el. Fontos megjegyezni, hogy az a megfigyelés, hogy a proton a szalicilsav egyik karboxil oxigénjén található, megegyezik egy korábban született modellezési tanulmánnyal [39]. Az elméleti megfontolások és a kísérleti tapasztalatok [26] is arra utalnak, hogy a hidrogénnek a fenolos oxigénre kell vándorolnia. A proton áthelyeződését a fenolos O-re energiagát vagy ténylegesen magasabb energiájú karboxilát tautomer akadályozhatja. Ez utóbbit sem lehet kizárni, mert a fehérje belsejében az elektrosztatikus mező általában inhomogén, és az a tény, hogy SCC-DFTB QM módszerrel kivitelezett QM/MM dinamikai szimulációban a proton a karboxilát csoporton maradt [39] szintén ebbe az irányba mutat. Annak a lehetőségnek a kizárására, hogy az eredmény csak az SCC-DFTB módszer műterméke, a két izolált tautomert B3LYP/6-31G(d) módszerrel újra optimalták és úgy a fenolos formát találták stabilabbnak.

6.1.4. Aktivációs energiák

A B1 modell esetében ONIOM típusú QM/MM számításokkal kapott átmeneti állapotok eredményeit foglalja össze az 1. táblázat. Kvantummechanikai (magas) szinten HF számításokat alkalmazva az aktivációs energiák, azaz az ASA-COX-1 komplex átmeneti állapot modellek közötti energia különbségek rendre magasabbak, mint amelyeket B3LYP sűrűségfukcionál vagy MP2 módszerrel kaptunk. Ez nem meglepő, mivel a HF módszer figyelmen kívül hagyja a korrelációs energiát, amely lényegesen nagyobb az átmeneti állapotokban, mint „normál” kötési körülmények között [72], [137], [138]. Az alkalmazott bázis szett hatása kevesebb jelentőséggel bír, kivéve, ha a nem-hidrogén atomhoz polarizációs függvényt adunk. Ha a ZPVE korrekciót is figyelembe vesszük az aktivációs energia számításánál, akkor alacsonyabb értékeket kapunk, de a korrekció nagysága függ az alkalmazott elméleti szinttől.

1. táblázat: Reprezentatív d1, d2, d3 és d4 távolságok (lásd 2. ábra) [Å] és relatív energia értékek [kcal/mol] a stacionárius pontokban az ASA-COX-1 reakció B1 modellje alapján, különböző elméleti szinteken számolva. A TS-komplex (ASA-COX-1 komplex) és TS-termék (szalicilsav-komplex és acetilált-COX-1) aktivációs energiák a megfelelő előre és visszafelé reakciókhoz. A ZPVE korrekciós értékek is fel vannak tüntetve.

Módszer	bázis	ASA-COX-1 komplex				ASA-COX-1 TS				SA-Acetil-COX-1				TS-komplex		TS-termék	
		d1	d2	d3	d4	d1	d2	d3	d4	d1	d2	d3	d4	TS-C	TS-C ZPVE	TS-P	TS-P ZPVE
HF	6-31G	1.735	1.349	3.522	0.968	1.091	1.444	1.775	1.309	0.993	4.333	1.335	3.284	32.92	30.32	44.34	43.27
	6-31G(d)	1.806	1.328	3.526	0.960	0.995	1.417	1.872	1.603	0.986	7.212	1.323	6.202	40.16	39.48	59.89	60.48
	6-31G(d,p)	1.809	1.328	3.521	0.956	1.002	1.415	1.814	1.529	0.987	7.206	1.323	6.216	40.01	39.12	60.11	60.50
	6-31+G(d,p)	1.847	1.329	3.526	0.955	1.006	1.417	1.821	1.513	0.985	7.168	1.322	6.171	42.59	41.70⁺	64.18	64.57⁺
B3LYP	6-31G	1.638	1.376	3.446	1.044	1.086	1.536	1.740	1.372	1.071	4.536	1.357	3.654	18.59	17.13	34.78	35.16
	6-31G(d)	1.699	1.352	3.476	0.991	1.055	1.479	1.790	1.448	1.040	5.333	1.341	4.372	24.35	22.21	40.01	39.77
	6-31G(d,p)	1.682	1.352	3.467	0.990	1.052	1.495	1.736	1.433	1.052	5.083	1.340	4.180	23.77	21.28	39.80	39.24
	6-31+G(d,p)	1.725	1.354	3.456	0.986	1.054	1.513	1.704	1.434	1.090	6.965	1.347	6.236	27.05	24.56[#]	50.94	50.38[#]
MP2	6-31G	1.713	1.399	3.395	1.001	1.089	1.552	1.807	1.407	1.057	4.699	1.378	3.728	22.74	20.25[#]	32.30	31.74[#]
	6-31G(d)	1.708	1.358	3.368	0.992	1.095	1.470	1.801	1.370	1.050	3.989	1.345	2.978	24.31	21.82[#]	34.47	33.91[#]
	6-31G(d,p)	1.664	1.359	3.313	0.987	1.076	1.481	1.752	1.372	1.062	3.888	1.346	2.927	23.42	20.93[#]	33.63	33.07[#]

⁺ HF/6-31G(d,p) elméleti szinten számolt ZPVE-vel korrigált különbség

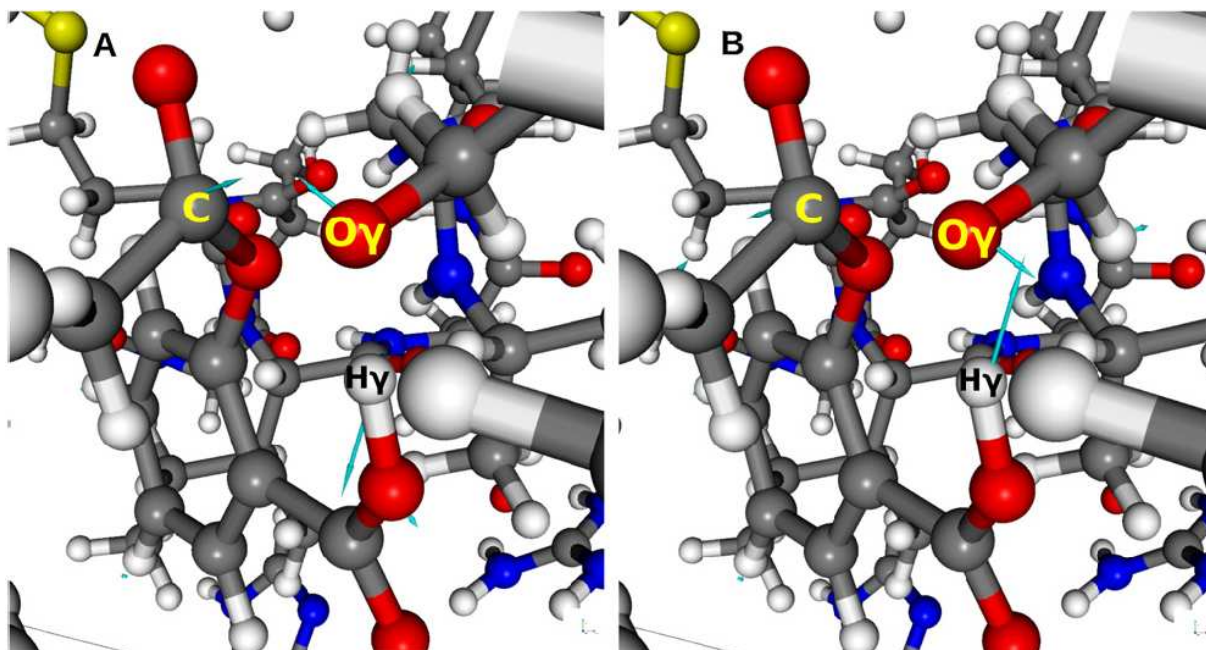
[#] B3LYP/6-31G(d,p) elméleti szinten számolt ZPVE-vel korrigált különbség

Az ASA-COX-1 komplex, illetve a szalicilsav-acetilált COX-1 komplex közötti energiakülönbséget szintén kiszámoltuk. Ahogy az 1. táblázatban is látható, függetlenül a számításhoz használt módszertől, a termék mindig lényegesen alacsonyabb energiájú, azaz sokkal stabilabb, mint az ASA-COX-1 komplex, ezért az inverz reakció-útvonalak elhanyagolható valószínűségűek. Ez a tapasztalat összhangban van a gátlási mechanizmus irreverzibilis jellegével [16], [139], valamint a korábbi modellezési eredményekkel [39].

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 [39]. 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 engedtük mozogni a geometria optimalás során. Tosco és munkatársai az átészterezési reakciót úgy modellezték, hogy egy sokkal inkább közelítő QM módszert használtak a QM/MM számításokhoz, amely viszont lehetővé tette, hogy a teljes ASA-COX-1 rendszer részt vegyen a dinamikai szimulációban.

6.1.5. Imaginárius rezgések

Minden esetben csak egy imaginárius frekvenciát kaptunk az átmeneti állapotra, az összes ASA-COX-1 és szalicilsav-acetilált COX-1 komplex geometriákra pedig csak pozitív frekvencia-értékek adódtak. Az imaginárius frekvenciához tartozó normál mód (12. ábra) azt mutatja, hogy a proton mozgása a Ser530 Hy és az ASA karboxilát oxigén atomja között és a kötés kialakulása a Ser530 Oy 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 Hy proton vándorlása az ASA karboxil csoportjára már majdnem teljesen megtörténik, ez egy érdekes eredménynek mondható.



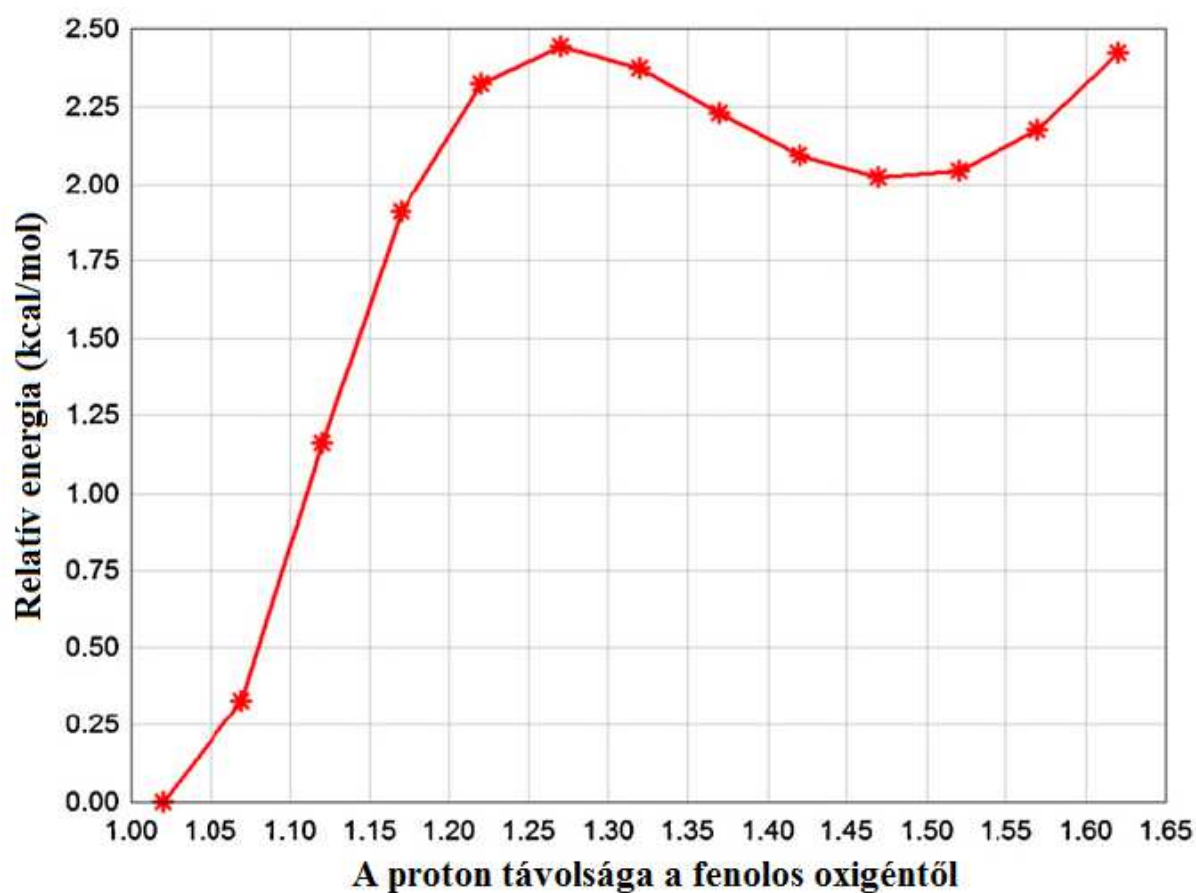
12. ábra: Az átmeneti állapotban ONIOM (B3LYP/6-31G(d):AMBER) szinten számított imaginárius frekvenciához tartozó rezgési mód. Az ASA acetil karbonil szénatomja, a Ser530 O_γ és a Ser530 H_γ atomok rendre C, O_γ és H_γ jelöléssel, a vibrációs rezgések halványkék nyillal jelölve láthatóak. Az ábra **A** és **B** része a reakciókoordináta előre és visszafelé irányát mutatja be.

6.1.6. A tetraéderes intermediér létezése

Egy másik fontos kérdés, hogy létezhet-e az úgynevezett tetraéderes intermediér. 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 optimálásokat végeztünk az átmeneti állapothoz közeli, de már azon túli, a feltételezett tetraéderes intermediér irányába mutató geometriákból kiindulva. Az optimálások nem a köztitermékhez, hanem kivétel nélkül a termékekhez vezettek. Bár ez nem egy egzakt bizonyíték annak, hogy nem létezik a tetraéderes intermediér, de azt valószínűsíti, hogy termék oldalon nincs olyan energiagát, amely megakadályozná a termék képződését és egy köztes állapotot (tetraéderes intermediert) stabilizálna.

6.1.7. A negatív töltés helye a szalicilsav molekulán

Azt találtuk (lásd 6.1.3 fejezet), hogy az átészterezési reakció befejezése után a Ser530 Hy protonja az újonnan képződött szalicilsav karboxilát oxigénjéhez kapcsolódik. A vízben közel semleges a pH, így a protonnak inkább a fenolos oxigénen kellene elhelyezkedni, sem mint a karboxilát oxigénen [140]. 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 (13. ábra).



13. ábra: Potenciális energia grafikon, a proton – szalicilsav fenolos oxigén távolság függvényében a termék geometriánál. A számítás ONIOM (B3LYP/6-31G(d):AMBER) elméleti szinten készült.

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 energiagát, amely a karboxil oxigénre történő vándorlást gátolná nagyon alacsony, kisebb, mint 0,5 kcal/mol. Ezt az akadályt a termikus mozgás is legyőzheti.

6.1.8. A vízmolekulák lehetséges hatása a reakcióra

Ahogy már említettük, a röntgendiffrakciós szerkezetek alapján strukturális víz előfordulhat a COX-1 szubsztrátkötő helyén. Ez felveti a kérdést, hogy az ASA vajon hagy-e szabadon helyet a vízmolekulának (vagy vízmolekuláknak) a hidrofób csatornában, és ha igen, akkor hogyan befolyásolja mindez a reakció mechanizmusát és/vagy az aktiválási energiát? A kérdések megválaszolásához számításokat végeztünk a B2, B3 és B4 modelleken. Ezeknél a futásoknál az ONIOM számítások QM részében csak B3LYP módszert, de különböző bázisokat használtunk. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

A B2 modellben a vízmolekula olyan pozícióban van, hogy hidrogén-kötést létesíthet az O γ atommal, ezért azt várjuk, hogy ez elősegítheti a proton transzfert az O γ -ról az ASA karboxilát csoportjára (7A ábra, W1 víz). Annak ellenére, hogy az O γ -ról könnyebb a proton transzfer, az aktivációs energia megközelítőleg hasonló marad (vagy a 6-31G bázist alkalmazva egy kicsit magasabb) ahhoz képest, amikor nincs jelen vízmolekula a számítás során (B1 modell). Az egyik lehetséges magyarázat erre az, hogy az átmeneti állapotban a proton szinte teljesen átkerült az ASA karboxilát csoportjára, még a B1 modellnél is. A víz és a Ser530 O γ között kialakuló új H-kötés nagyon kis mértékben járul hozzá a folyamathoz. Még ez a kis hozzájárulás is kompenzálható, ugyanis a H-kötött vízmolekula csökkenti a Ser530 O γ nukleofilicitását, amely az aktiválási energia kismértékű növekedését okozhatja. Az átmeneti állapotban a Ser O γ - H γ kötéshossz nagyobb, mint a B1 modell esetén. A számítások azt mutatják ugyanakkor, hogy ez a vízmolekula nem befolyásolja jelentősen az ASA-COX-1 nemkötő komplex geometriai paramétereit (2. táblázat).

2. táblázat: Az ASA-COX-1 komplex B2, B3 és B4 modellrendszereire számolt reprezentatív d1, d2, d3 és d4 távolságok (lásd 7. ábra) [Å] és relatív energia értékek [kcal/mol], melyeket B3LYP DFT módszerrel, különböző bázis szettek alkalmazásával számítottunk. Az aktivációs energiát, mint az átmeneti állapot (TS) energiájának és az ASA-COX-1 komplex (C) energiának a különbségét valamint ennek a ZPVE korrigált értékét is megadtuk.

rendszer	bázis	ASA-COX-1 komplex				ASA-COX-1 TS				TS-C	TS-C ZPVE
		d1	d2	d3	d4	d1	d2	d3	d4		
B2	6-31G	1.560	1.379	3.433	1.016	1.200	1.531	1.730	1.400	25.02	22.01
	6-31G(d)	1.622	1.354	3.462	1.001	1.006	1.513	1.756	1.677	24.18	23.44
	6-31G(d,p)	1.591	1.354	3.449	1.001	1.003	1.531	1.708	1.656	24.41	23.61
B3	6-31G	1.664	1.367	3.546	1.003	1.111	1.495	1.777	1.327	18.42	16.80
	6-31G(d)	1.723	1.344	3.546	0.990	1.072	1.449	1.831	1.409	24.63	22.80
	6-31G(d,p)	1.712	1.344	3.542	0.988	1.069	1.460	1.780	1.398	24.02	22.36
B4	6-31G	1.590	1.370	3.565	1.013	1.029	1.533	1.720	1.550	20.48	19.44
	6-31G(d)	1.655	1.346	3.555	1.013	1.015	1.471	1.801	1.613	24.16	23.19
	6-31G(d,p)	1.632	1.346	3.550	0.997	1.013	1.484	1.746	1.591	24.28	23.27

A B3 modellben a vízmolekula egy olyan pozíciót foglal el, amelyben H-kötést képezhet az ASA acetyl-csoportjának karbonil oxigénjével (7A ábra, W2 vízmolekula). Azt feltételezzük, hogy az átmeneti állapot egy tetraédes intermedierhez hasonlít, a plusz H-kötés pedig stabilizálja az átmeneti állapotot. A hasonló H-kötésben résztvevő Tyr385 aminosav jelenléte alapvető fontosságú az ASA-COX-1 átészterezési reakcióban [8]. Ezt a hipotézist nem sikerült számításokkal alátámasztani (2. táblázat). Azt találtuk, hogy a H-kötés stabilizáló hatása az átmeneti állapot energiájára és geometriájára elenyésző volt. A fentebbi eredményekhez hasonlóan, a B4-es modellben két vízmolekulával betöltve mindkét korábban említett pozíciót, sem az átmeneti állapot geometriájára, sem az aktivációs energiára nem tapasztaltunk jelentős hatást.

6.1.9. A kibővített geometriai optimalás hatása és a diszperzió korrigált sűrűségfukcionál

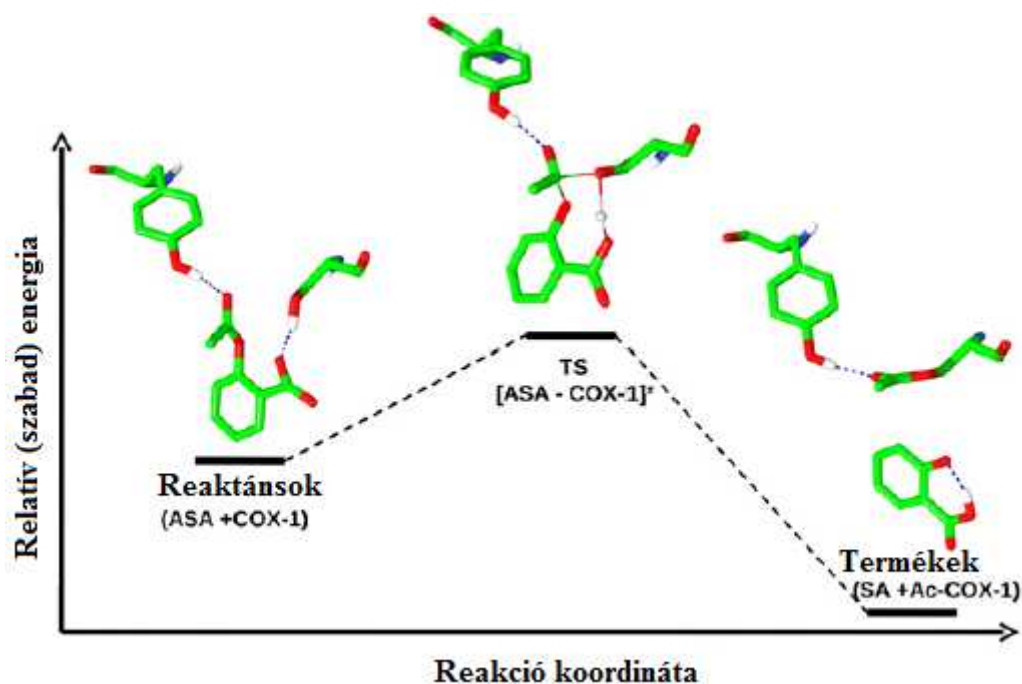
A B1', B2', B3' és B4' modellek B3LYP/6-31G(d) optimalását azért végeztük el, hogy megvizsgáljuk, hogyan befolyásolja a kibővített, szabad mozgással bíró aminosavak relaxációja az előzőekben részletezett eredményeket. Ekkor az optimalás során a B1'-B4' rendszerek jóval nagyobb alrendszerre mozoghatott szabadon, mint a B1-B4 rendszereknél.

A 3. táblázatban szereplő B3LYP/6-31G(d) értékeket összehasonlítva az 1. és 2. táblázat megfelelő eredményeivel, egyértelműen látszik, hogy a kibővített geometriai változók optimalása nem változtat jelentősen sem a reprezentatív változók értékein, sem pedig a reakció aktiválási energiáján. Kissé más helyzet figyelhető meg, mikor a B97-D funkcionál eredményeit hasonlítjuk össze a B3LYP elméleti szinttel. A B97-D módszer szignifikánsan alacsonyabb (~3-4 kcal/mol) aktiválási energia értéket valószínűsít, mint a B3LYP. A megfelelő geometriai paraméterek meglehetősen hasonlóak, kivéve a d4 értékeket, amelyekre a B97-D időnként lényegesen magasabb értéket ad. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a jól ismert tényt, hogy a DFT energia számítás esetében a diszperziós kölcsönhatások nem elhanyagolhatóak. A B1'-B4' rendszereken végzett ONIOM (B3LYP/6-31G(d):AMBER és B97D/6-31G(d):AMBER) számításokkal is kísérletet tettünk arra, hogy a potenciális energiafelületen találjunk tetraédes intermedierhez tartozó lokális energia minimumokat.

3. táblázat: Az ASA-COX-1 komplex B1', B2', B3' és B4' modell-rendszereire számolt reprezentatív d1, d2, d3 és d4 távolságok (lásd 7. ábra) [Å] és relatív energia értékek [kcal/mol], melyeket B3LYP és B97-D DFT módszerekkel és 6-31G(d) bázis szettek alkalmazásával számítottunk. Az aktivációs energiát, mint az átmeneti állapot (TS) energiájának és az ASA-COX-1 komplex (C) energiának a különbségét, valamint ennek a ZPVE korrigált értékét is megadtuk.

rendszer	bázis	ASA-COX-1 komplex				ASA-COX-1 TS				TS-C	TS-C ZPVE
		d1	d2	d3	d4	d1	d2	d3	d4		
B1'	B3LYP/6-31G(d)	1.694	1.352	3.514	0.992	1.058	1.466	1.823	1.448	23.89	22.05
B1'	B97-D/6-31G(d)	1.669	1.362	3.312	0.999	1.042	1.515	1.787	1.526	20.17	19.00
B2'	B3LYP/6-31G(d)	1.616	1.354	3.507	1.002	1.007	1.492	1.800	1.683	23.31	22.41
B2'	B97-D/6-31G(d)	1.578	1.365	3.303	1.013	1.003	1.547	1.778	1.769	19.06	18.55
B3'	B3LYP/6-31G(d)	1.715	1.345	3.629	0.991	1.068	1.442	1.849	1.422	25.2	23.30
B3'	B97-D/6-31G(d)	1.708	1.353	3.451	0.997	1.046	1.481	1.808	1.515	21.16	20.21
B4'	B3LYP/6-31G(d)	1.650	1.357	4.011	1.004	1.012	1.463	1.821	1.640	24.78	23.78
B4'	B97-D/6-31G(d)	1.621	1.355	3.464	1.008	1.004	1.513	1.766	1.743	20.02	19.59

Az optimalizálások során az átmeneti állapot geometriát vettük alapul, de a Ser530 H γ atomot a Ser530 O γ -H γ szakasz mentén az O γ vagy a H γ -O(ASA-karboxilát) szakasz mentén az O(ASA-karboxilát) irányába a távolság egy tizedével toltuk el. Az így induló geometriai optimalizálás ezekből a pontokból kivétel nélkül a reaktánsok vagy a termékek geometriáit eredményezte. Tetraédres intermedierek megfelelő geometriát nem találtunk.



14. ábra: Az ASA-COX-1 átészterezési reakció sematikus ábrázolása az általunk végzett számítások alapján. Az átészterezési reakció egy elemi lépésben játszódik le, ahol egy átmeneti állapot köti össze a reagenseket és a termékeket.

Ez az észrevétel megerősíti azt is, hogy az elsőrendű átmeneti állapot összeköti a kezdeti ASA-COX-1 komplexet az acetilált-COX-1:szalicilsav termékekkel és további igazolást ad arra nézve, hogy nem létezik a tetraédres intermedierek-szerű köztitermék.

Az eredményeket vázlatosan a 14. ábrán látható módon lehet összefoglalni. Első lépésként az ASA megközelíti a COX-1 szubsztrátkötő üregét, nem kovalens kölcsönhatásokat alakít ki és egy jól meghatározott komplexet alkot a COX-1 enzimmel. Míg az orientáció kialakításában nagy valószínűséggel az Arg120, addig a nem kovalens kölcsönhatás kialakításában a Tyr385 játszik kulcsfontosságú szerepet. Ezt a kezdeti komplexet tekinthetjük reaktánsoknak (14. ábra).

Ebben a komplexben az ASA acetil karbonil szénatomja olyan helyzetben van, hogy a Ser530 O γ támadást tud indítani felé. Ez vezet az átmeneti állapot szerkezetéhez,

ahogy ez az ábrán is látható. 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 jelenti azt, 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 és a köztitermék nem alakul ki, ez az átmeneti állapot vezet a termékek képződéséhez, amelyben a H γ proton még mindig a szalicilsav karboxilát oxigénjén található. A H γ proton könnyen átvándorol a karboxilát csoport oxigénjéről a fenolos oxigénre. Ez a folyamat már nem látható a 14. ábrán.

6.2. Antitrombin eredmények

6.2.1. Homológia modellezés

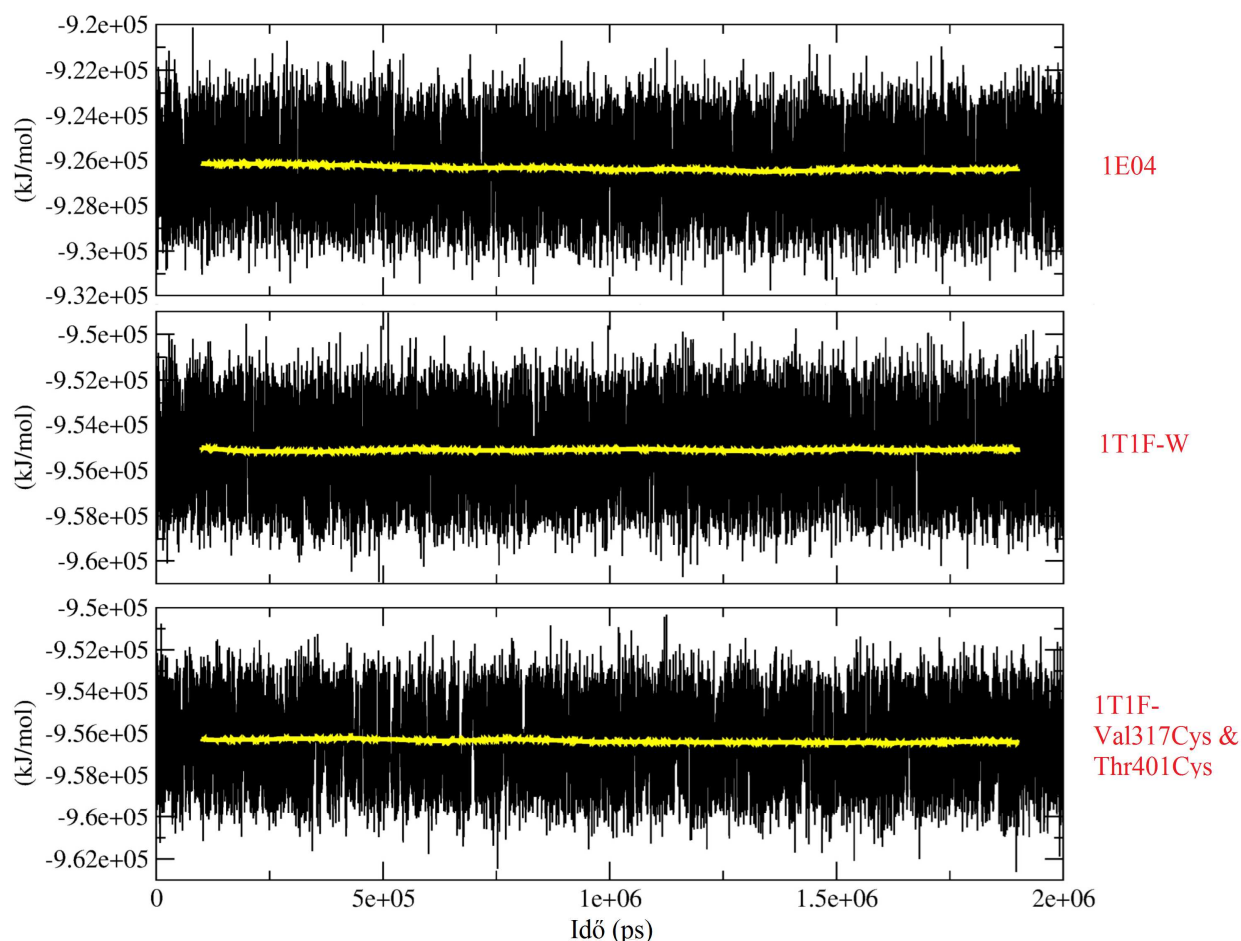
Az 1e04 és 1t1f protein adatbankból letöltött szerkezeteiben hiányzó peptidszakaszokat a Modeller, valamint a Schrödinger szoftvercsomagban elérhető Prime modul segítségével pótoltuk. A Procheck szoftverrel ellenőrizve a generált szerkezeteket a tiltott régióban nem találtunk nem-glicin ϕ - ψ diéderes szögpárokat, illetve még azok az értékpárok is, melyek a “nagyvonalúan megengedett tartományba” (*generously allowed regions*) estek, közel voltak a “megengedett”-hez. Meg kell ugyanakkor említenünk, hogy a röntgendiffrakciós szerkezetek nem-feloldott N-terminális régióiban lévő szekvencia hosszúsága miatt (ez a szakasz egyetlen röntgendiffrakciós felvételen sem látható), nagy valószínűséggel több különböző loop konformáció együttesen létezhet. Ez azt jelenti, hogy az általunk előállított loop szerkezet csak egy a számos lehetőség közül.

6.2.2. 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 allosztrérikus útvonalak létezésére.

A teljes energiát az idő függvényében ábrázolva megfigyelhető, hogy a meglehetősen rövid, 2 ns *simulated annealing* felfűtési szakaszt követően a rendszer már jó közelítéssel egyensúlyba került (15. ábra). Miközben az energiaingadozások figyelemre méltóak (± 4000 kJ/mol közöttiek, a szimulációs dobozban lévő nagy részecskeszám és véges időközű integrálásnak köszönhetően), a futó, 10 ns időtartamra átlagolt értékek azt mutatják, hogy a teljes energia közel állandó és a szimuláció második felétől az energiaértékekben gyakorlatilag nincs állandó irányú mozgás sem lefelé, sem felfelé. Kijelenthetjük tehát, hogy a szimulációk energetikai szempontból konvergáltak.



15. ábra: A teljes GROMACS energia az idő függvényében. A molekuladinamikai szimulációkat különböző (1e04 és 1t1f PDB) konformációs állapotban lévő antitrombinra végeztük. Az utóbbi szerkezet esetében mind a vad típusú (1t1f-w), mind a Val317Cys/Thr401Cys diszulfid hidat tartalmazó modellt vizsgáltuk.

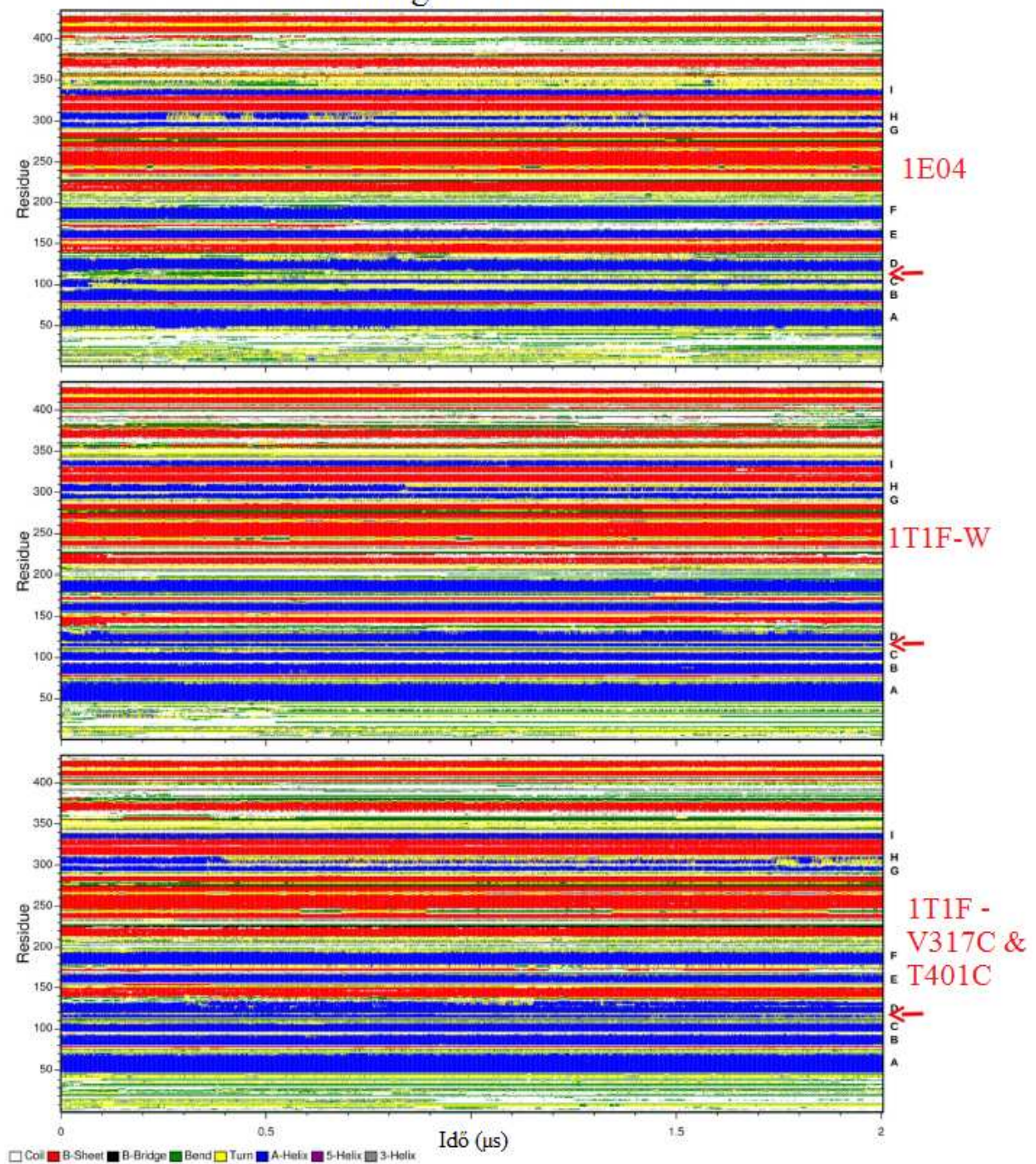
Konformációs szempontból hasonló konklúzió megfogalmazása sokkal problémásabb, mert az ilyen nagyméretű proteinek számos konformációs állapotot tölthetnek be, és ezek között a dinamikai trajektóriákban folyamatos átmenetek várhatóak. Ilyen esetben valamilyen konformációval összefüggő tulajdonság, pl. a referencia szerkezettől való eltérés időfüggése jelezheti a konformáció-változásokat vagy éppen a konvergenciát [141].

6.2.3. Másodlagos szerkezetek és időbeli változásuk

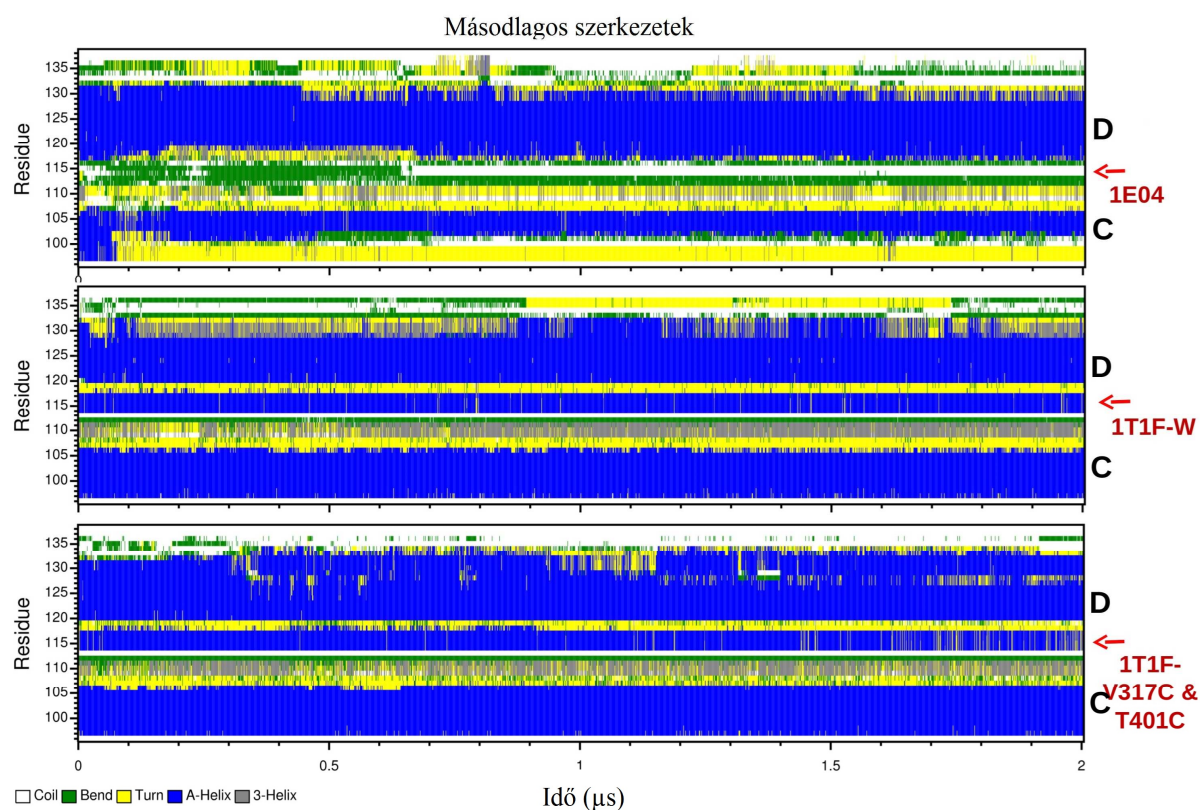
A natív AT másodlagos szerkezeti elemeinek időbeli változását a DSSP szoftver [142] segítségével a dinamikai trajektóriából nyertük. A 16. ábra függőleges tengelyén az AT aminosav egységei szerepelnek, a vízszintes tengelyen az idő található μ s léptékben. Az egyes aminosav egységekhez tartozó másodlagos szerkezeti elemek színkóddal vannak jelölve. A színkód időbeli változásán keresztül követhetjük az adott aminosavat érintő másodlagos szerkezet megváltozását. Látható, hogy ezek a szerkezeti elemek viszonylag stabilak, nincsenek például felbomló helikális vagy β -redő elemek, illetve hasonló típusú új elemek sem képződnek. Ez összhangban van az AT másodlagos szerkezeti elemeinek állandó jellegével, annak ellenére, hogy pl. a natív forma termodinamikailag instabil. Bizonyos régiókban a másodlagos szerkezeti elemek kisebb stabilitást mutatnak az elért szimulációs időintervallum alatt és néhány belső átalakulás is végbe megy köztük. Ez utóbbi jelenség figyelhető meg a G- és H-hélixek közelében, illetve a C- és D-hélixeknél is.

A fehérje különböző állapotaira elérhető röntgendiffrakciós szerkezetek alapján elfogadott, hogy a pentaszacharid kötő régióban a C- és D-hélixek között egy új P-hélix (16. és 17. ábrákon nyilakkal jelölve) képződik, amikor a pentaszacharid az AT-hoz asszociálódik. Azt gondolták erről, hogy ez a PS–AT kölcsönhatás következménye, de meglepő módon, ez a hélix a szabad monomer AT kristályszerkezetben (1t1f) is létezik [60]. Ezt a különböző konformációval bíró szerkezetek közötti érzékeny egyensúllyal magyarázták, amelyek a szabad monomer natív AT-nál is működnek. A feltételezés szerint az egyensúly a környezettől függően eltolható az egyik irányba (1e04-hez hasonló loop) vagy másik (1t1f-szerű helikális szerkezet) környezettől függően. A D-hélix C-terminális végének kiegészülése szintén a pentaszacharid megötés szerkezeti következményeként ismert. Mindazonáltal, létezik olyan szerkezet is a PDB adatbázisban, amelyben a PS már bekötődött, de a D-hélix még nem egészült ki [143].

Másodlagos szerkezetek



16. ábra: Az antitrombin másodlagos szerkezeti elemei az idő függvényében, különböző (1e04 és 1t1f PDB) konformációs állapotban lévő antitrombinra. Az utóbbi szerkezet esetében a szimulációkat mind a vad típusú (1t1f-w), mind a Val317Cys/Thr401Cys diszulfid hidat tartalmazó modellre is elkészítettük. A potenciális P-hélix és a D-hélix C-terminális kiterjedését tartalmazó C- és D-hélix régiókat nyíllal jelöltük.

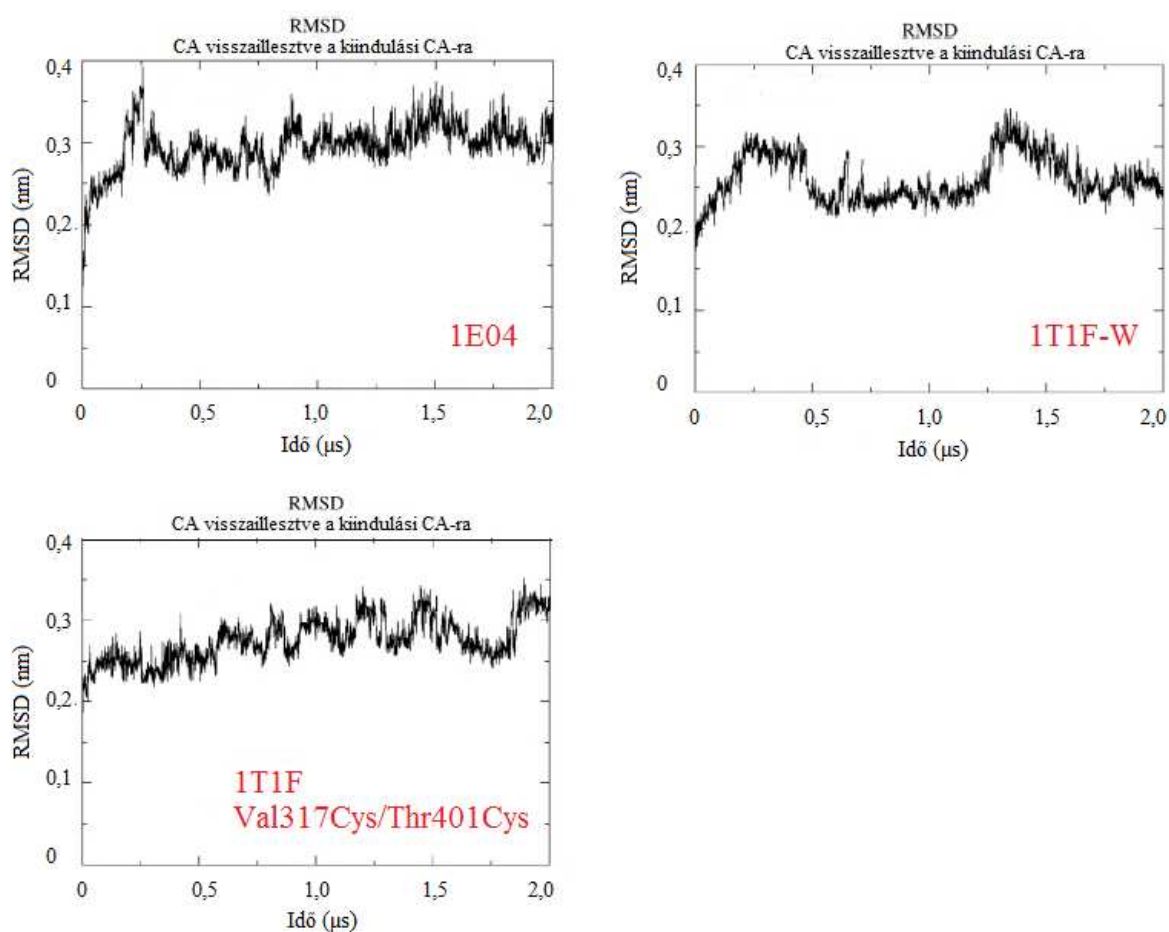


17. ábra: Az antitrombin másodlagos szerkezeti elemei az idő függvényében, különböző (1e04 és 1t1f PDB) konformációs állapotban lévő antitrombinra; a 16. ábráról a 95-135 szekvencia-részletének nagyítása.

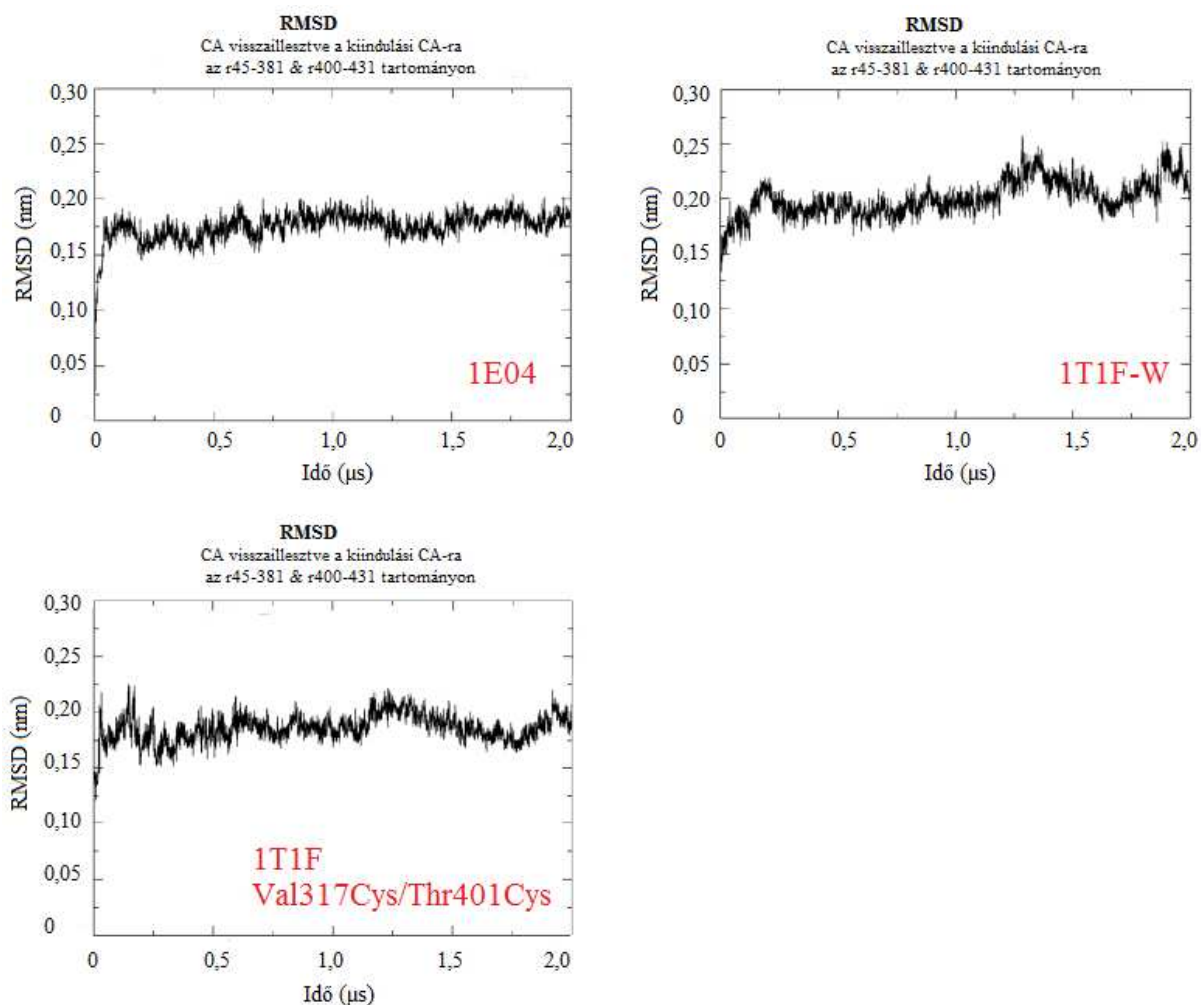
Részletesen elemezve a 17. ábrát látható, hogy az 1e04 szimuláció alatt a megfelelő régióban időnként megjelennek a P-hélixre emlékeztető másodlagos szerkezeti elemek. Bár ezeket a 3-hélix szerkezeti elemeket csak a hélix kialakulás kezdeti lépésének tekinthetjük, mégis arra utal, hogy a megfelelő szekvencia részlet, még ha csekély mértékben is, de hajlandóságot mutat hélix kialakítására. Ha már kialakult a P-hélix, akkor az 1t1f kiindulási szerkezetből végrehajtott szimulációink szerint meglehetősen nagy stabilitást mutat (17. ábra). Ahogy várható volt, a 17. ábrán ennél sokkal kevésbé észlelhető a D-hélix kiterjedése. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy második lépésként (vagy már előtte) a P-hélix képződik, összhangban a már ismertett AT-PS komplex három lépéses elmélettel [58], [59]. A D-hélix kiterjedése az utolsó (harmadik) lépés az AT-PS komplexképződésben, amely során a harmadik és ötödik β -szalag közül a RCL N-terminálisa (hinge) kiszabadul és a két szalag összezár. Ezen mozgások eredményezik a teljesen aktivált AT konformációt.

6.2.4. Referenciától való eltérés - RMSD

A kiindulási geometriáktól, mint referenciáktól a 3. egyenlet szerint számolt eltéréseket a szimulációs idő függvényében mutatják a 18. és 19. ábrák. A röntgendiffrakción alapuló kiindulási szerkezetekhez képest mért alap eltéréseket a mérések (mérési hiba) és a számolások belső pontatlansága (erőtér elégtelensége és a numerikus hiba) továbbá az magyarázhatja, hogy a szimulációt (virtuális) oldat fázisban végezzük, míg a röntgen felvételek szilárd fázisra vonatkoznak.



18. ábra: Az antitrombin megfelelő CA atomjainak RMSD-je az idő függvényében. A kiindulási geometria CA atomjaira illesztettük vissza a dinamikai szimuláció pillanatképeiből kinyert CA atomokat. Az ábrákat két különböző (1e04 és 1t1f PDB) konformációs állapotban lévő antitrombinra illetve az utóbbinak a Val317Cys/Thr401Cys diszulfid hidat tartalmazó modelljére is elkészítettük.



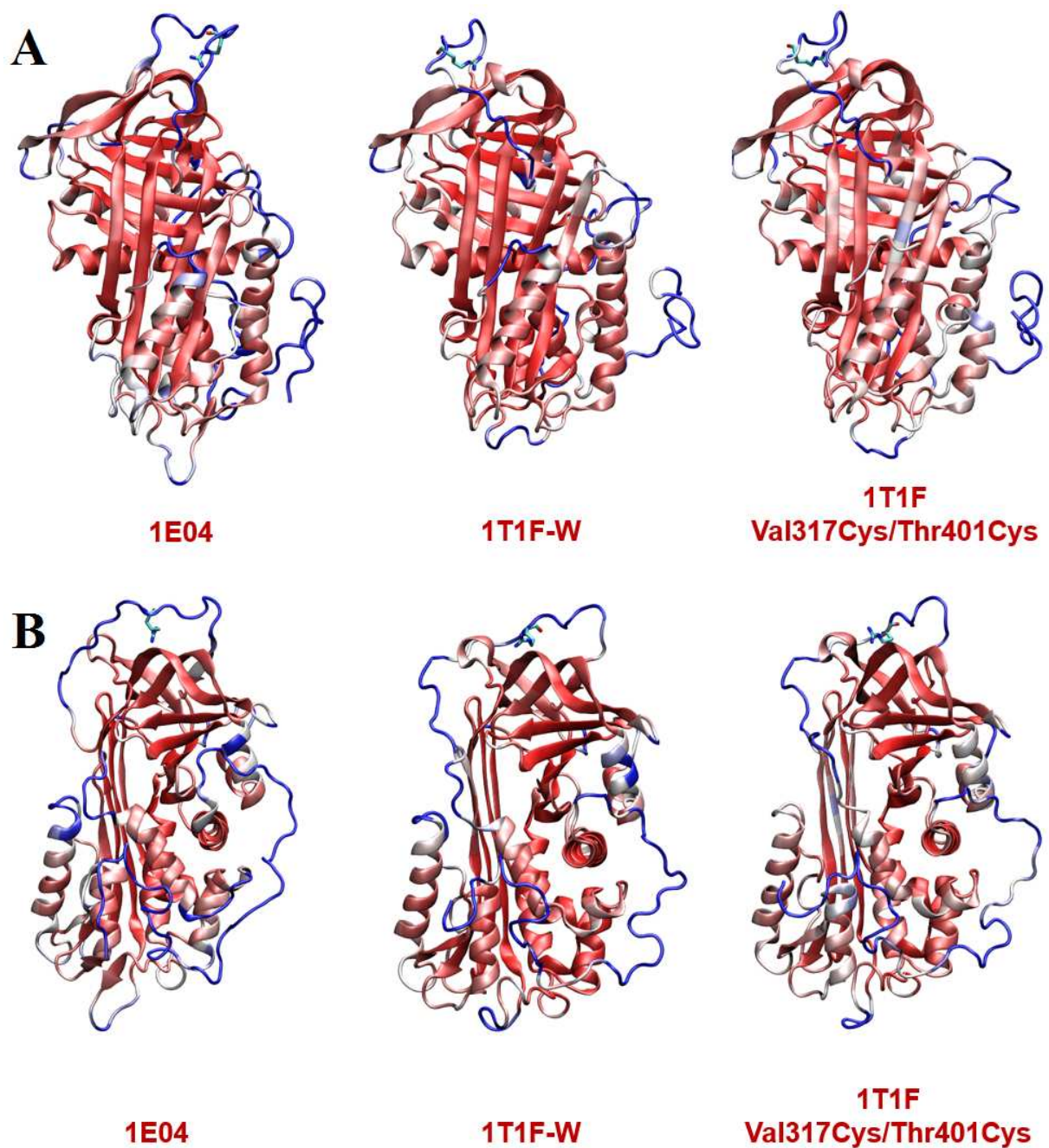
19. ábra: Az antitrombin megfelelő CA atomjainak RMSD-je az idő függvényében. A kiindulási geometria CA atomjaira illesztettük vissza a dinamikai szimuláció pillanatképeiből kinyert CA atomokat. A 18. ábrával ellentétben itt a rendkívül flexibilis N-terminális régiót és az RCL-t töröltük a szerkezetből. Az ábrákat két különböző (1e04 és 1t1f PDB) konformációs állapotban lévő antitrombinra, illetve az utóbbinak a Val317Cys/Thr401Cys diszulfid hidat tartalmazó modelljére is elkészítettük.

A fentiek ellenére a kiindulási geometriától számított RMSD eltérések nem különösebben nagyok, az RCL nélküli AT-ra visszaillesztve 0,15-0,20 Ångström közöttiek. 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 és környezete kivételével, rosszul, vagy éppen nem kiértékelhető diffrakciós mintázattal rendelkezik, ami világosan mutatja, hogy ez a régió flexibilis mind az 1e04, mind az 1t1f röntgendiffrakciós szerkezetben. Számottevő

változékonyságot feltételeztünk az RCL régióra is, ahogy ezt korábban már megállapították [66]. Ezért ezeket a peptid szakaszokat kihagyva az RMSD számításból, lényegesen kisebb értékeket kaptunk, ahogy az a 19. ábrán látható. A szimuláció során ez kb. $\sim 0,2$ nm körüli értéknél stabilizálódik. Érdekességgéppen megjegyzendő, hogy ez nagyjából megegyezik a röntgendiffrakciós szerkezetek felbontásának tartományával. A 18. és 19. ábrákon szintén megfigyelhető, hogy az RMSD értékek kb. 1000-1500 ns alatt stabilizálódtak, azaz konvergáltak.

6.2.5. 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 (20-21. ábrák), ami összhangban van azzal, hogy ezekben a régiókban a peptid szakaszokhoz röntgendiffrakciós 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. Ezek a tapasztalatok jól egyeznek a korábban leírt 8 ns-os molekuladinamikai szimuláció eredményeivel, melyet a már aktivált AT-ból származtatott szabad AT formára végeztek el [141].

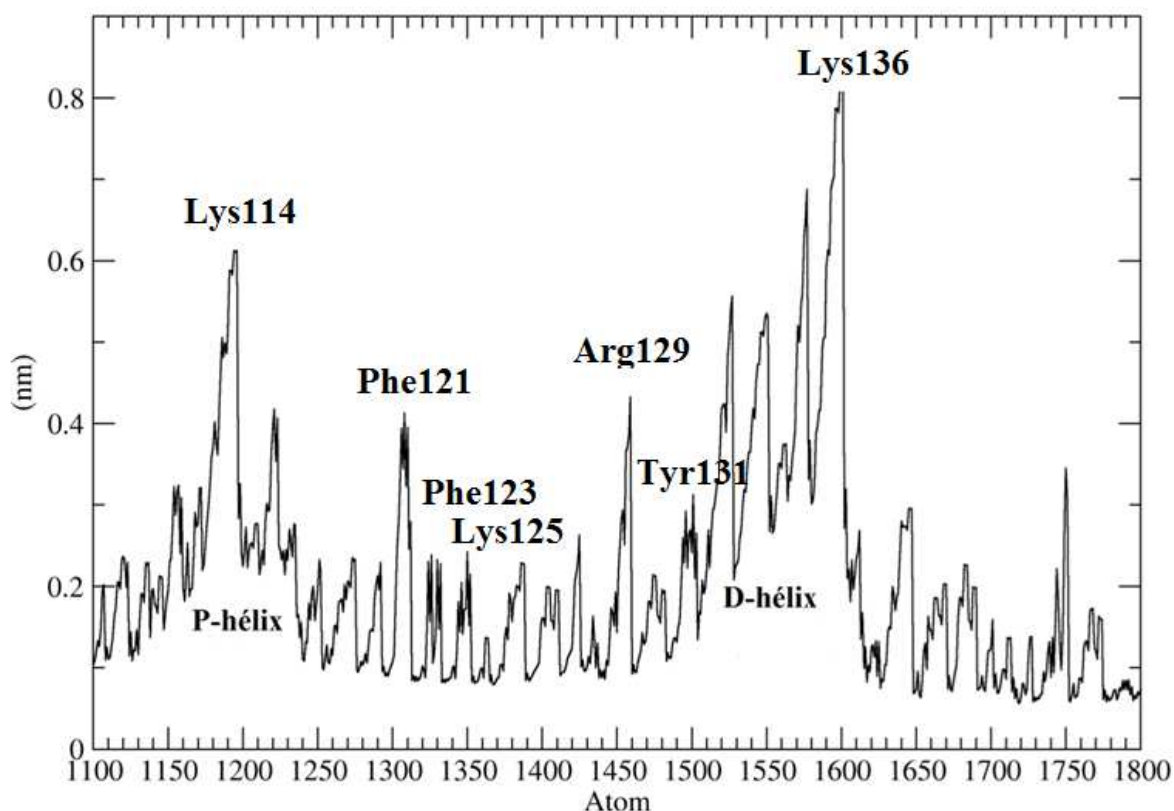


20. ábra: Az AT 1e04, 1t1f-w és 1t1f (Val317Cys/Thr401Cys) szerkezetek szimulációiból származtatott rms fluktuációk grafikus megjelenítései a „new cartoon” módon ábrázolt fehérje szerkezetre vetítve. Pirossal jelöltük a legkisebb és kékkel a legnagyobb flexibilitással bíró régiókat. A megjelenítésnél a szokásos AT orientációt (A) és annak a függőleges tengely körül $\sim 90^\circ$ -kal elforgatottját (B) alkalmaztuk. Az Arg393 aminosav pálcika modellel jelölve.

A 20. ábrán látható, hogy az aminosavak túlnyomó többsége kis effektív ingadozást (piros szín) mutat minden általunk vizsgált rendszeren. Ezek az aminosav egységek szinte teljesen megegyeznek az AT első (és legnagyobb) merev vázával, amelyet az antitrombin különböző állapotaira rendelkezésre álló röntgendiffrakciós szerkezetek összehasonlításakor már definiáltak [58]. Megfigyelhető, hogy néhány hurok szekvencia még ezekben a merev részekben is nagyobb ingadozást mutat. 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 proteázt nem kötő) röntgendiffrakciós AT szerkezet, amelynek megfelelő peptidszakaszához a szórési képből nem lehetett egyértelmű szerkezetet rendelni, szintén a loop különösen nagy fluktuációjára utal [144]. Az F-hélix C-terminálisa átlagosan 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 összezárodásakor illetve az RCL negyedik β -szalagként beépülésekor is el kell mozdulnia. Szimulációink alapján (2. és 3. szimuláció) sokkal kisebb amplitúdójú mozgásokkal jellemezhető a már kialakult P-hélix, ami arra utal, hogy az adott másodlagos szerkezet, ha már egyszer kialakult, akkor viszonylag stabil.

RMS fluktuáció



21. ábra: A PS kötőrégióban kulcsszerepet játszó néhány aminosav RMS fluktuációja.

A 21. ábra az eddigi tanulmányok [145]–[149] alapján néhány, a loop-ok → helikális szerkezetűvé való átrendeződésében (P-hélix képződés és D-hélix kiterjedés) kulcsfontosságúnak talált aminosavak atomi rms fluktuációit mutatja be, melyeket az 1e04 proteinből kiinduló szimuláció (1. szimuláció) trajektóriáiból származtattunk. A számításaink alapján azt mondhatjuk, hogy a D-hélixet alkotó aminosavak oldalláncai, függetlenül attól, hogy szolvatáltak-e vagy sem, nagy amplitúdójú mozgásokkal írhatók le. A rendelkezésre álló kísérleti adatokkal összhangban, az 1. szimulációból különösen nagy oldallánc fluktuáció figyelhető meg néhány aromás és bázikus oldalláncnál. Ezek közül kiemelkednek a Phe121 és Arg129 aminosavak, amelyek szignifikánsan nagyobb fluktuációval jellemezhetőek, mint a közvetlen szomszédaik. Eredményeink megerősítik ezeknek az aminosavaknak a konformációs átmenetek során és/vagy a PS kötődéssel kapcsolatban leírt kulcsszerepét, pl. az Arg129-nek “hotspot” természetére [145], vagy a nem ionos hozzájárulás aktivált állapot stabilizáló szerepére [148] vonatkozóan. Összefoglalva kijelenthető, hogy a konformációs

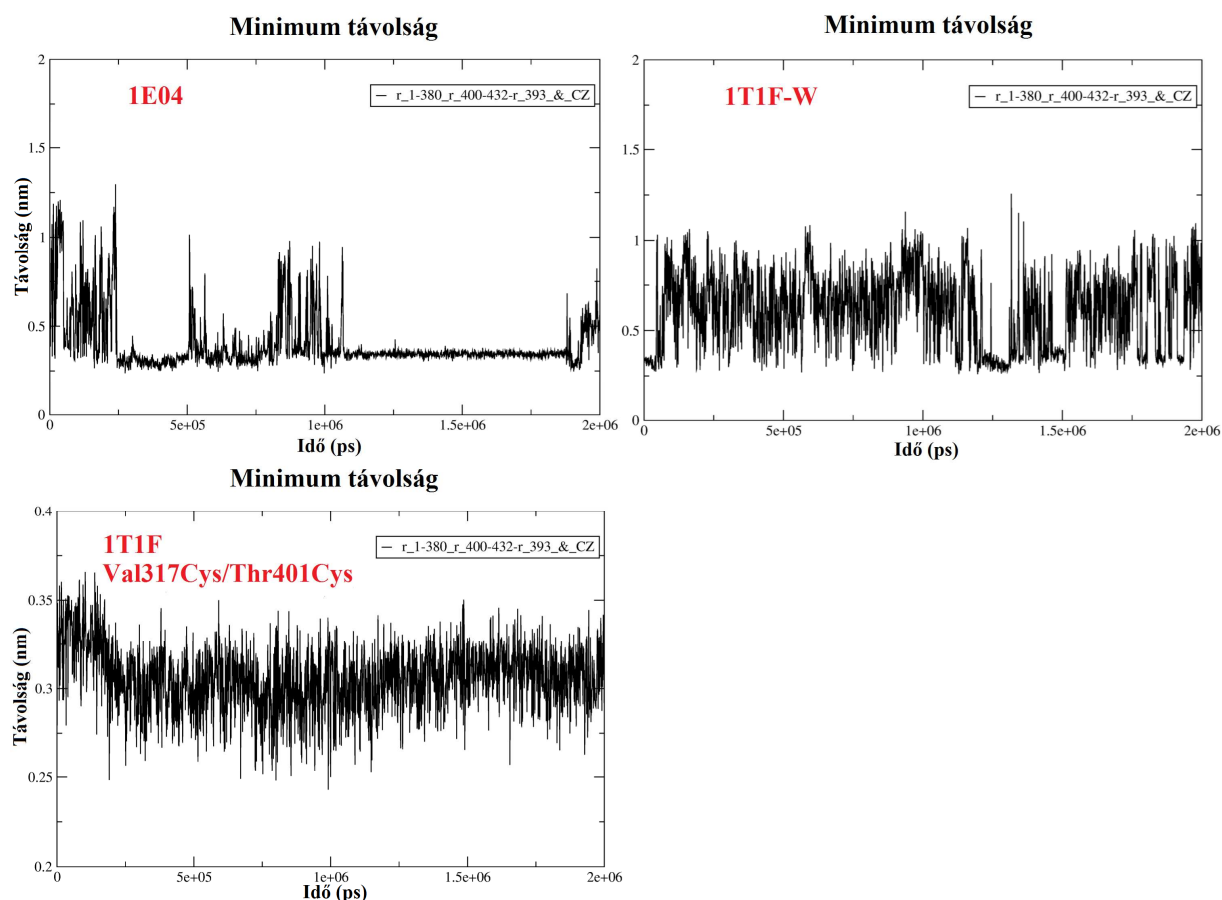
átmenetekben részt vevő régiók (P-hélix képződés és D-hélix kiterjedés) jóval az átlag feletti RMSF értékekkel jellemezhetőek, amelyek nem korlátozódnak az oldalláncokra.

6.2.6. 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 [55], [57], [61], [150]. Mivel a proteináz megkötésében az Arg393 oldallancának döntő szerepe van, ezért ennek a konformációnak vagy nem elhanyagolható gyakorisággal kell megjelennie a szabad AT-ban vagy az AT-proteináz kölcsönhatásban kell indukálódnia.

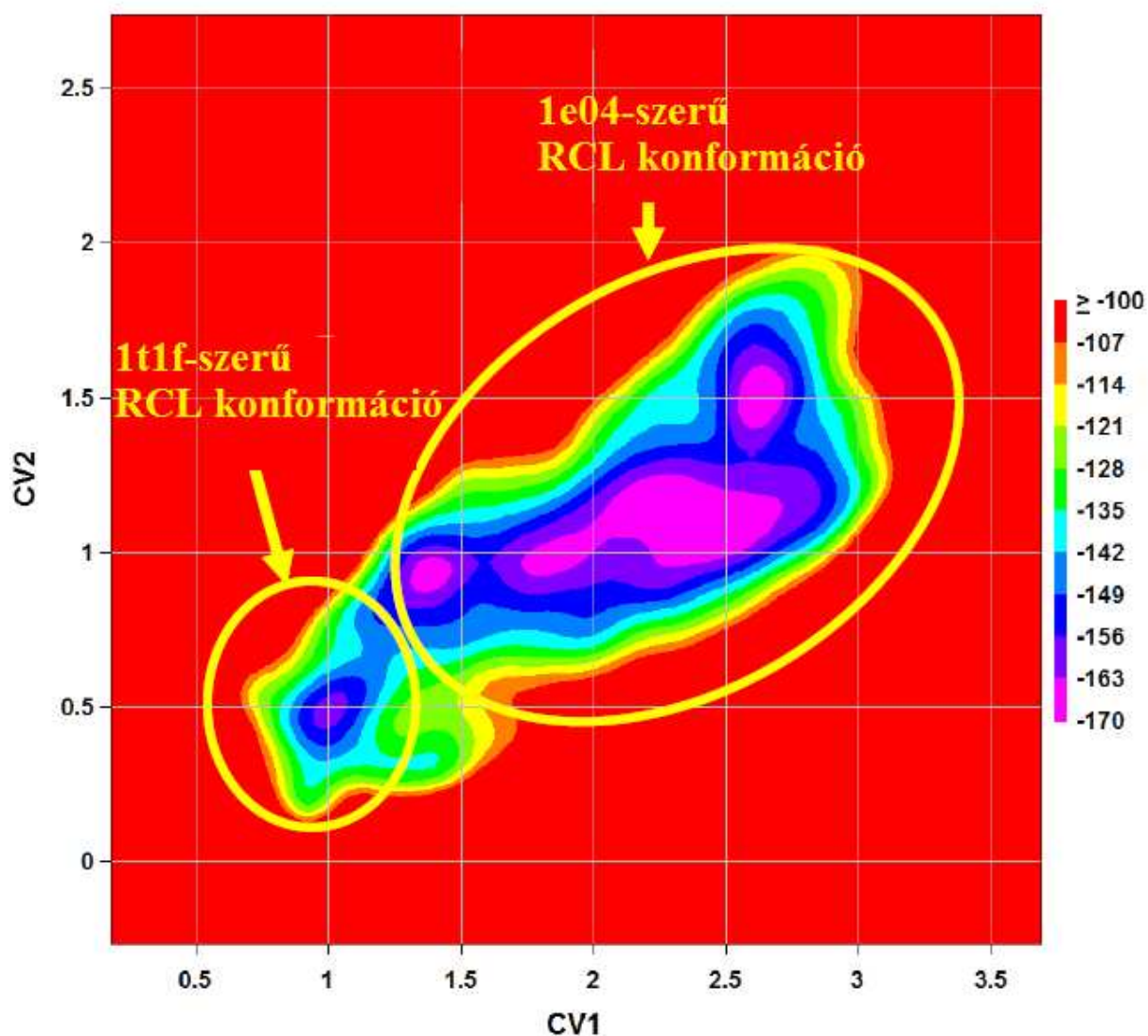
Az 1e04 szerkezetnél [53] talált RCL konformáció esetében a guanidínium csoport felülethez kötött, ami a feltételezések szerint az együtt kristályosított dimer (natív + látens) AT szerkezetben a kristályerők következménye. A monomer natív PS nélküli AT protein adatbankban elhelyezett 1t1f kódjelű szerkezete teljesen más RCL konformációval rendelkezik, amelyben az Arg393 oldallánc egy Arg393-Glu237 sóhídon keresztül [60] szintén a felülethez kötődik. Az 1e04 konformációból kiinduló a 2 µs-os dinamikai szimuláció alatt az RCL konformáció nagymértékű változásait figyelhattunk meg. Az 22. ábrán a guanidínium csoport C ζ atomja és az AT bármely atomja (amely nem része az RCL-nek) közötti távolságot ábrázoltuk a szimulációs idő függvényében, mindhárom szimulációra. Az 1e04 rendszernél (1. szimuláció) a ~0,3 nm távolság egyértelműen megfelel a felülethez kötött guanidínium-csoportnak. A nagyobb, 0,5-1,4 nm értékek pedig azokhoz a konformációkhoz tartozik, amelyek legalább részlegesen oldószer által hozzáférhetőek, azaz olyanok, amelyek potenciálisan Michaelis-komplexet képezhetnek a proteázokkal. Az 1t1f vad típusú proteinre végzett szimuláció trajektóriájának elemzése az Arg393 oldallánc helyzetében az előbbinél nagyobb flexibilitást mutat. 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 (22. ábra). Megjegyzendő, hogy nemcsak a sóhíd stabilizálja ezt a pozíciót, hanem az Arg393 oldallancának szoros illeszkedése is. Annak ellenére, hogy a 2, vad típusú 1t1f szerkezetből kiinduló szimulációban az RCL nagy konformációs teret jár be, ezen

konformációk egyike sem fed át az 1e04 szerkezetből kiinduló szimulációkban bejárt RCL konformációkkal.



22. ábra: Az Arg393 C ζ atomjának távolsága az AT bármely atomjához képest (amely nem az RCL része) az idő függvényében. Az ábrákat két különböző (1e04 és 1t1f PDB) konformációs állapotban lévő antitrombinra, illetve az utóbbinak a Val317Cys/Thr401Cys diszulfid-hidat tartalmazó mutációjára is elkészítettük.

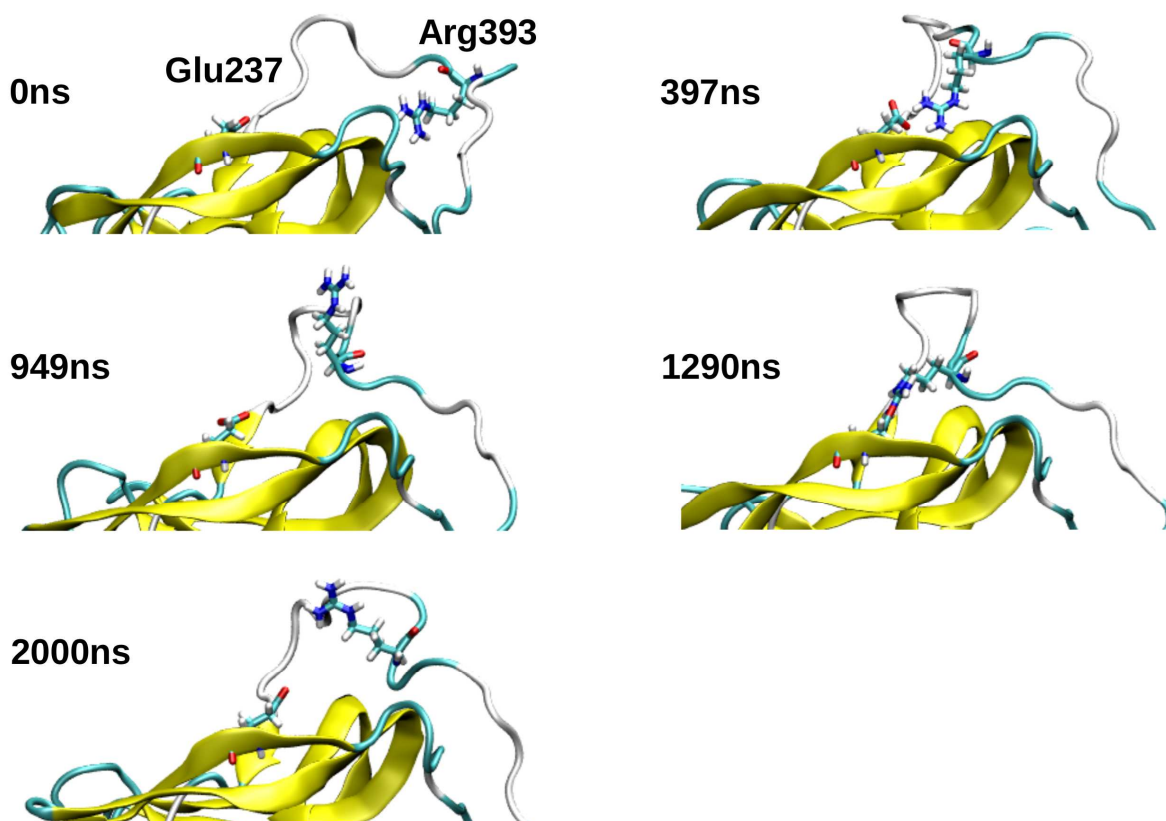
Annak ellenőrzésére, hogy ezen RCL konformációs „osztályok” között lehetséges-e átmenet, metadinamikai szimulációt végeztünk. A számításokat [135] a 2. szimuláció utolsó egyensúlyi helyzetéből a GROMACS programcsomaghoz [128] illesztett PLUMED szoftver segítségével hajtottuk végre [136]. Ilyen nagy és sok konformációs lehetőséggel bíró rendszere közel egzakt (a használt modell keretein belül) szabadenergia/szabadentalpia felület meghatározása óriási számítási kapacitást igényelne, ezért a számításainkból nyert, az 1t1f és 1e04 RCL állapotok közötti konformációs átmenethez tartozó aktivációs szabadentalpiát csak közelítő becslésként kezelhetjük. A 23. ábrán látható, hogy az 1t1f-szerű RCL konformációs állapot 1e04-szerű konformációvá átalakulását csupán ~15-20 kJ/mol magas energiagát akadályozza.



23. ábra: Az RCL mozgásokhoz tartozó Gibbs-féle szabadentalpia felület két kollektív változó (CV) függvényében. A CV1-el a Lys236 és a Val388, Val389 illetve Ile390 tömegközéppontjának távolságát, a CV2-vel pedig a Met251-CA, Glu255-CA és az Ala384-, Ser385-, Thr386-, Ala387-, Val388-, Val389-, illetve Ile390-CA atomok tömegközéppontja által bezárt szöget definiáltuk.

Feltételezve, hogy a becslés hibája nem túl nagy, a konformációs átmenetre kapott energiagát elegendőnek tűnik arra, hogy *brute force* szimulációban a szimuláció időtartama alatt (2 μ s) megakadályozza a két (1t1f-szerű és 1e04-szerű) konformációs osztály keveredését. Az átmenethez szükséges energia ugyanakkor abba a tartományba esik, amely hőmozgások segítségével számottevő valószínűséggel küzdhető le, még ha nem is 2 μ s alatt.

Fontos megjegyezni, hogy a fenti konformációs átmenet során a hinge régióknak nem kellett kiszabadulnia a β -redő-A harmadik és ötödik β -szalagjai közül, tehát az ismert konformációs átmenet a natív szabad antitrombinnál is megtörténhet. Tehát feltételezhető, hogy konformációs egyensúly áll fenn. Mivel az 1t1f szerkezetben a P-hélix már kialakult, azért azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a P-hélix kialakulása megelőzheti pentaszacharid bekötődését.



24. ábra: Néhány jellegzetes pillanatkép az antitrombin szerkezetek közül az 1e04 konformációból kiinduló szimuláció alatt, „new cartoon” és pálcika (Glu237 és Arg393) megjelenítést alkalmazva. A helikális, β -redő és a bend/coil másodlagos szerkezeti elemek rendre lila, sárga és cián/szürke színnel vannak jelölve.

Az 1e04 rendszeren végzett 1. szimuláció trajektóriáiból kiválasztottunk néhány jellegzetes RCL-t ábrázoló pillanatképet (24. ábra). Az Arg393-Glu237 sóhíd, amelyet eredetileg már az 1980-as évek végén feltételeztek [151] és később az 1t1f szerkezetben megfigyeltek [60], ~400 ns szimulációs idő után kialakul. Az oldószer által hozzáférhető Arg393 konformáció a szimuláció alatt többször is létrejöhet. Az RCL gerince, azonban

minden esetben különbözik azoktól, amely az 1t1f röntgendiffrakciós szerkezetben találtak (az ábrán nem látható). A valószínű ok az lehet, hogy a megfelelő konformációs átmenet ritka eseménynek számít azon az időskálán, amelyet a szimuláció lefedett. Ennél is fontosabb, hogy a rendszer (a mi modellünkben) kikerülhet a meglehetősen sűrűn populált (Arg393-Glu237 só híd) RCL konformációból és benépesítheti azokat, amelyekben az AT-hoz képest az Arg393 oldalláncai kifelé mutatnak (24. ábra). Ehhez nem szükséges sem a PS-AT komplex képződése, sem a hinge régió kiszabadulása. Egy ilyen konformációban aztán lehetőség van arra, hogy az antitrombin az RCL-en keresztül Michaelis komplexet képezzen proteínázokkal. Megemlítendő, hogy a mi tanulmányunktól eltérően aktivált AT formából (PDB azonosító: 1e03) kiindulva, 8 ns-os molekuladinamikai szimulációkat futtatva [66] kimutatták, hogy az oldószerhatásnak kitett Arg393 aminosav oldallánca számottevő flexibilitással rendelkezik.

6.2.7. Általánosított korreláció és allosztéria

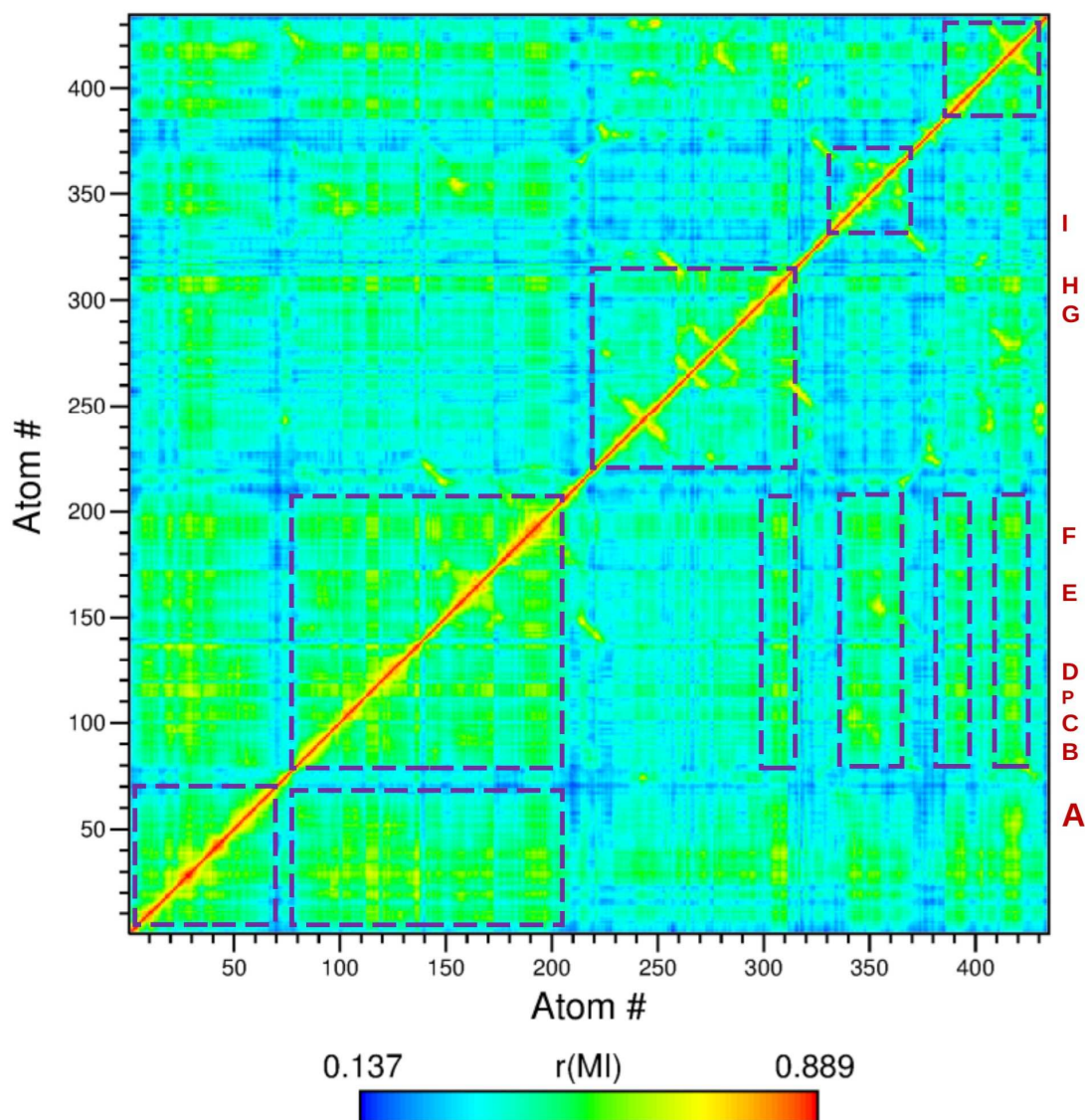
Az antitrombinon végzett szerkezeti tanulmányok és azok, amelyekben a különböző AT formákat (natív, látens, pentaszacharid kötött és proteáz kötött) hasonlítják össze egymással, többnyire feltételeztek egy-egy lehetséges allosztérikus jel terjedési útvonalat [45], [152]. Mindazonáltal, az még továbbra sem teljesen ismert, hogy a konformációs változásokat okozó jel terjedését mi és hogyan indítja-e el. Egyik kézenfekvő lehetőség az, hogy az AT-PS komplex kialakulása, amely végül a fehérje másik oldalán az RCL hinge régiójának kiszabadulását, és ennek következtében a FXa és FIXa faktorokkal szembeni teljes inhibíciós potenciál elérését eredményezi. Mivel ebben a munkában csak a natív, nem komplex formában lévő AT-ra végeztünk molekuladinamikai szimulációkat, a PS-dal való kölcsönhatásból kiinduló konformációs változásokat vizsgálni nem tudjuk. Az viszont feltételezhető, hogy már a natív szabad AT esetében is léteznek azok az információt továbbító csatornák, amelyek az allosztérikus információt a fehérje egyik oldaláról a fehérje másik oldalára továbbítják. Ezekről az információs csatornákról szerzett ismeretek hasznos kiegészítései lehetnek a statikus röntgendiffrakciós szerkezetek alapján megszerzetteknek.

Az allosztérikus jel terjedésére vonatkozó kézenfekvő feltételezésnek tűnik az, hogy hálózati csomópontokon (aminosav egységek, régiók) keresztül terjed a hatás, amelyek kölcsönhatva egymással észlelik és továbbítják a más csomópontokon történő változás/mozgást. Ezért a régiók közötti kovariancia és általánosított korreláció egy lehetséges módja a jel terjedés nyomon követésére. Megjegyzendő, hogy míg a kovariancia mátrixon az aminosavak / régiók / domének közötti lineárisan korrelált mozgások láthatóak [131], [153],

addig az általánosított korreláció (információ elmélet alapú kölcsönös információ [131]) sokkal komplexebb módon, ugyanakkor sokkal érzékenyebben jelzi a fehérjékben korrelált mozgásokat, mivel a korrelált mozgásoknak a lineáris komponensén túl azok nem lineáris összetevőit is megjeleníti.

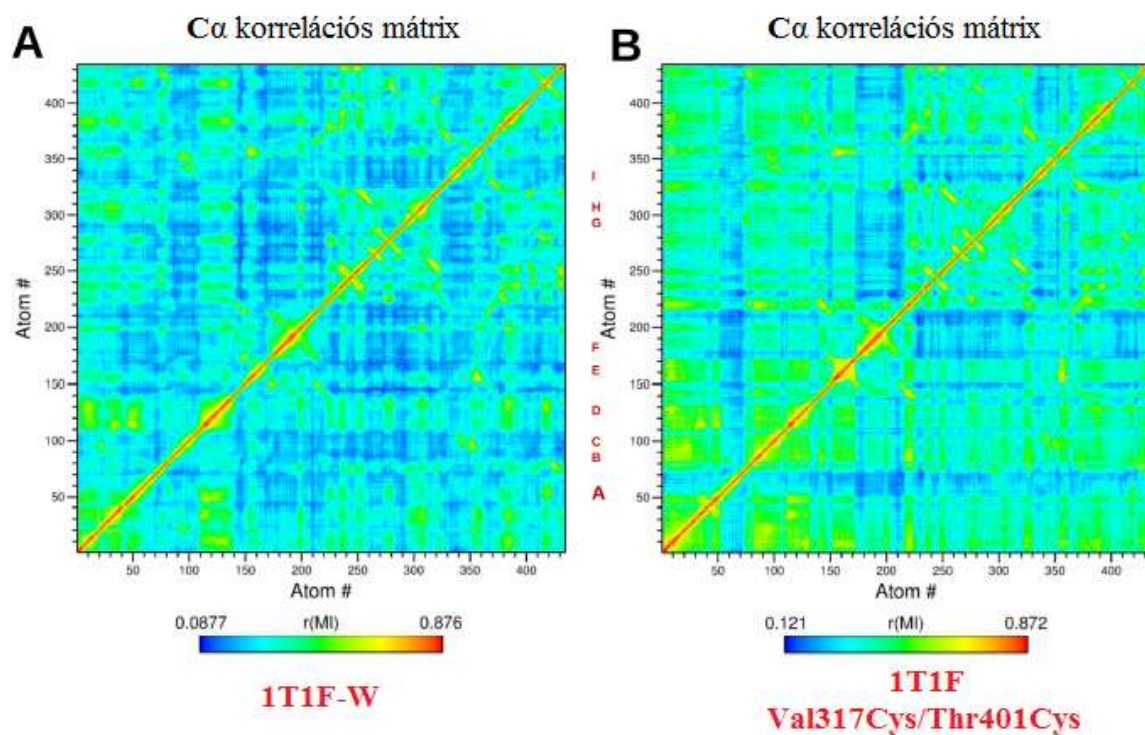
Az általánosított korreláció mátrixot a Lange és munkatársai [131] által javasolt módon számítottuk. A 25. ábrán látható, hogy az 1. szimuláció a 80-200 szekvencia részleten belül figyelemre méltó korrelációt jelez. Ez összhangban van azzal az előzetes tapasztalattal, hogy a teljes D-hélix N-terminálisának peptid szekvenciái, illetve az E- és F-hélixeknek C-terminális végei számottevő korrelációt mutatnak [58]. 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.

Ca korrelációs mátrix



25. ábra: Az antitrombin CA atomjainak mozgásához tartozó általánosított korrelációs mátrix az 1e04 konformációs állapotban végzett szimuláció alapján. A korrelált régiók potenciális szerepét az allosztérikus jel terjedésben szaggatott téglalapokkal jeleztük. Az A-I hélixek helyzetét pedig a megfelelő piros nagybetűvel jelöltük.

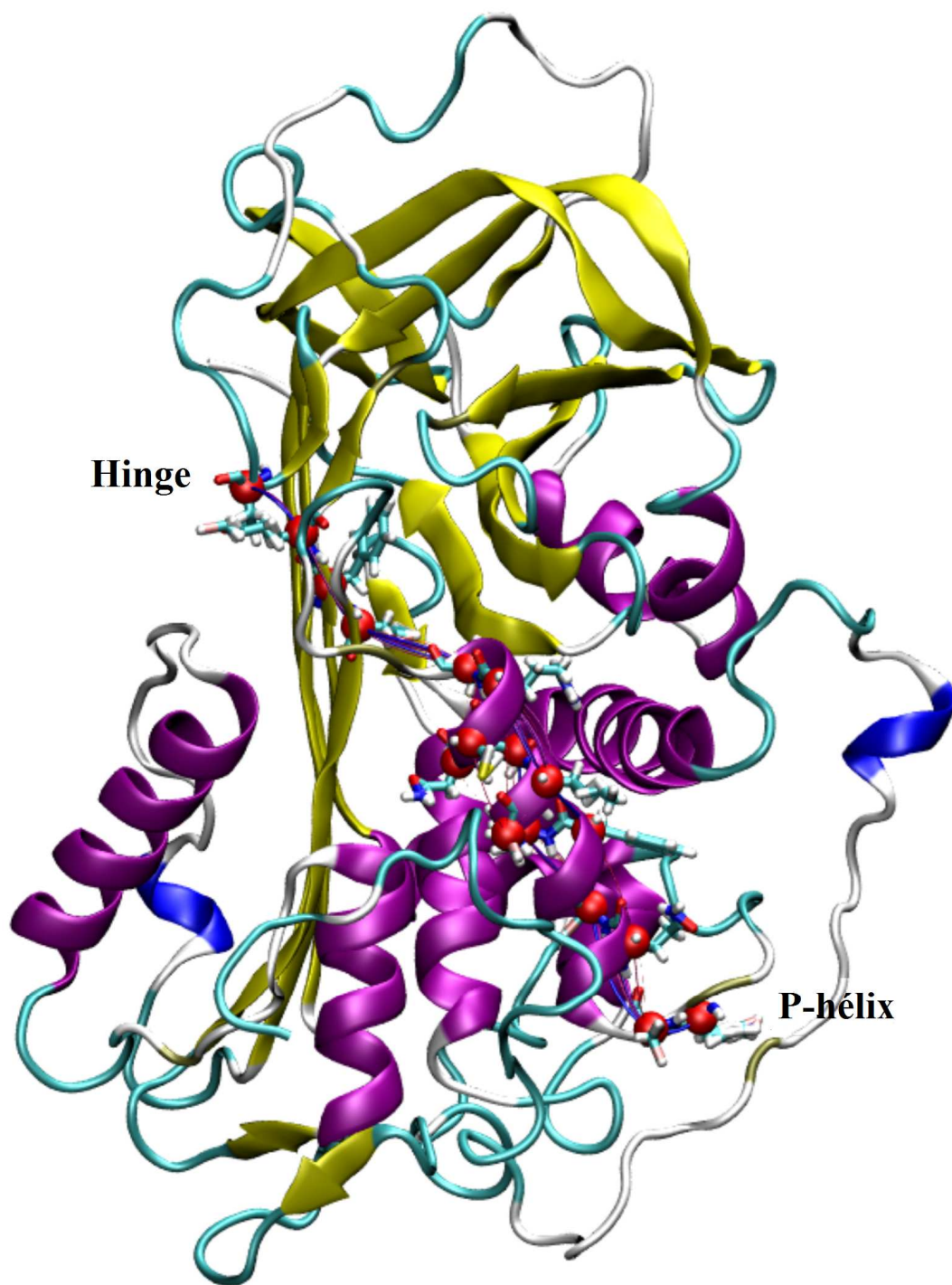
A 2. és 3. szimulációhoz tartozó általánosított korrelációs mátrixokból lényegében hasonló következtetés szűrhető le, néhány szembetűnő különbséggel (26. ábra). Mindkettő a korrelált mozgások ugyanolyan regionális elkülönülését mutatja, mint amelyet az 1. szimuláció esetében megfigyelhettünk. Megjegyzést érdemel, hogy az 1t1f szerkezetből induló szimulációk nagyobb, gyengén korrelált régiókat mutatnak. Különösen igaz ez arra a rendszerre, ahol nincs jelen extra diszulfid-kötés (26A ábra).



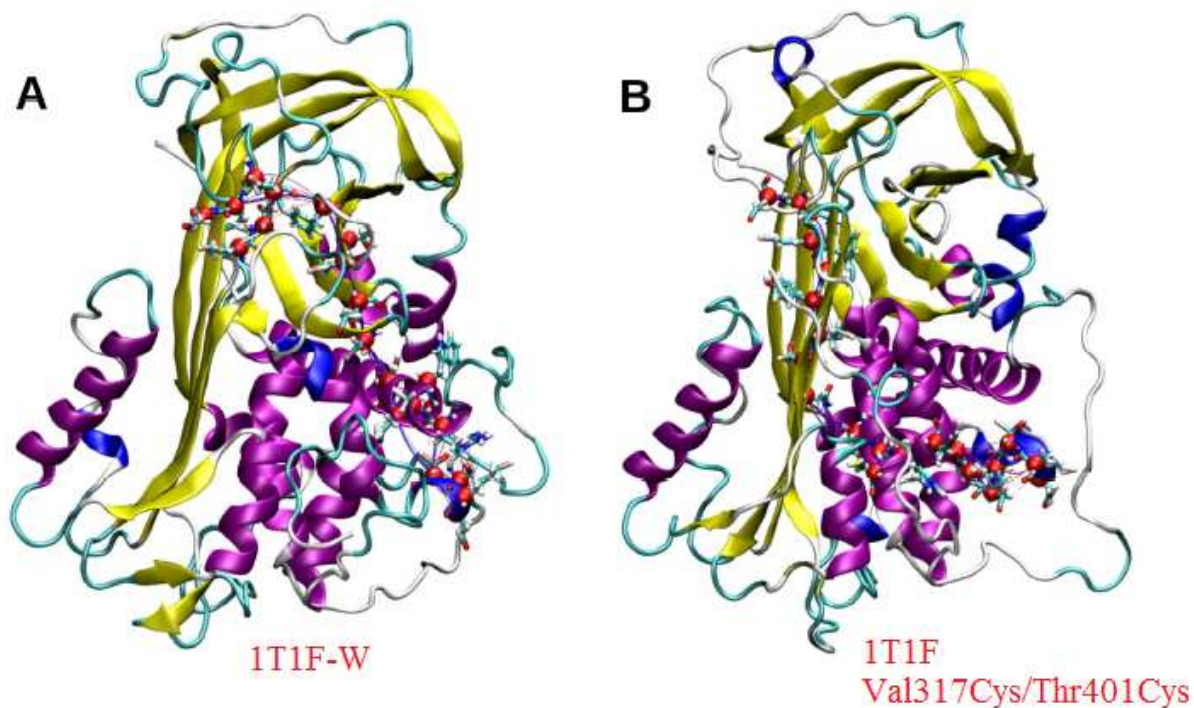
26. ábra: Általánosított korreláció mátrix grafikus reprezentációja az antitrombin CA atomjaira az 1t1f (A) konformációs állapotból és annak 1t1f Val317Cys/Thr401Cys diszulfid hidas mutációjából (B) induló szimulációk alapján. Az A-I hélixek helyzetét a megfelelő piros nagybetűvel jelöltük.

6.2.8. WISP analízis

A közelmúltban jelent meg a WISP (*Weighted implementation of suboptimal path*) módszer [134], 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 (27. ábra), a 2. szimuláció egy részben belső útvonalat javasol, amelyben az A-hélix N-terminális vége vesz részt (28A. ábra). Ez is elképzelhető lehet, mivel tudjuk, hogy a Trp49 fontos szerepet játszik az aktivált állapot stabilizálásában [154]. A 3. szimuláció szerint előnyösebb egy a P- és E-hélixen, valamint a β -redő-A második és harmadik szálán keresztül vezető út (28B. ábra). 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 (1e04) megfigyelhettünk. Így feltételezhető, hogy az 1t1f $\rightarrow$ só-hidat tartalmazó 1e04-szerű konformáció átmenet megelőzi az aktiválódást.



27. ábra: Lehetséges allosztérikus útvonalak az antitrombin potenciális P-hélice és a hinge régiója között, WISP szoftverrel számolva. A szimulációt az 1e04 PDB szerkezethez tartozó kiindulási konformációból végeztük.

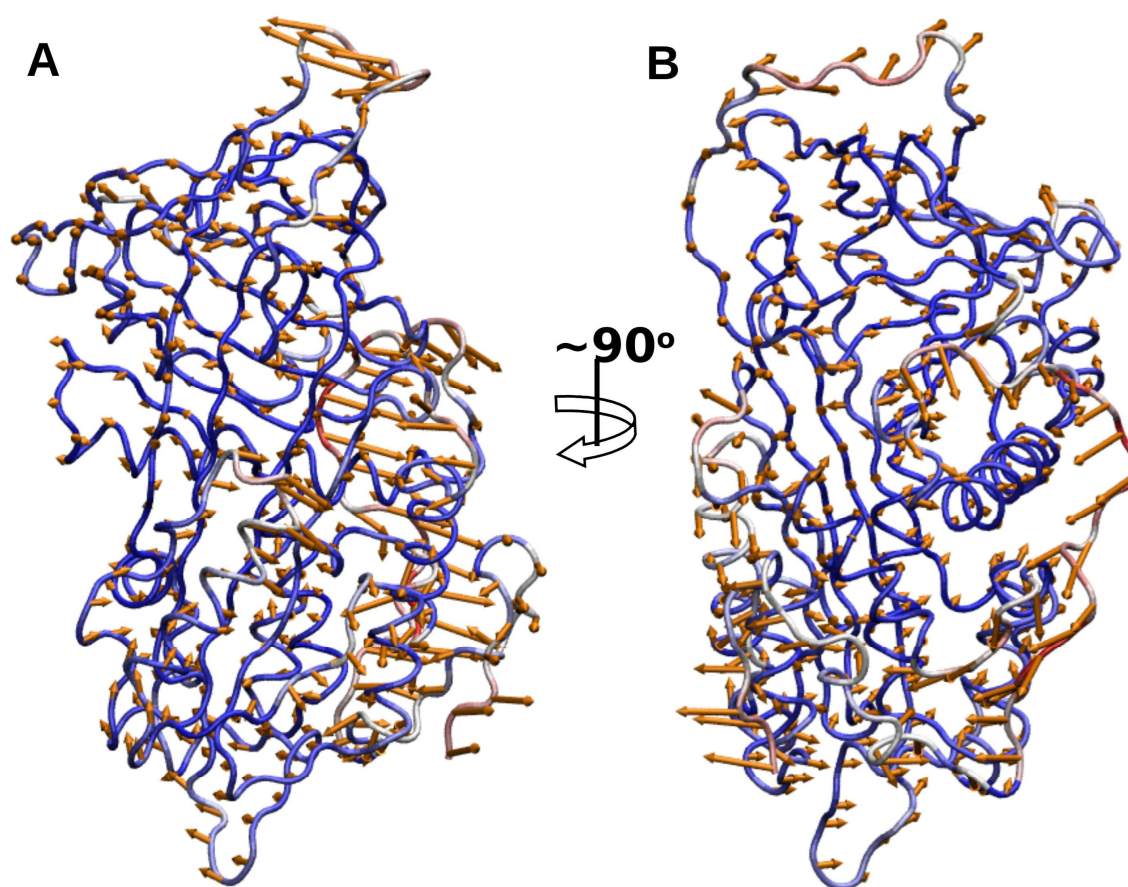


28. ábra: Lehetséges allosztérikus útvonalak az antitrombin potenciális P-hélice és a hinge régiója között, WISP szoftverrel számolva. Az ábra bal oldalán az 1t1f PDB szerkezetéhez tartozó kiindulási konformációból kapott útvonal (A), a jobb oldalán pedig az 1t1f konformációs állapot Val317Cys/Thr401Cys diszulfid hidas mutációjára számolt allosztérikus útvonal látható (B).

A fenti eredmények elemzése alapján arra következtethetünk, hogy ha a PS kötődhet a natív AT különböző konformációjú állapotaihoz, a kötődésről az információ nem biztos, hogy azonos allosztérikus útvonalon terjed. További vizsgálatokat igényel, hogy a valószínűsített útvonal függ-e (ha igen, akkor hogyan) a módszertől, amelynek felhasználásával az eredményt kapjuk. Mindazonáltal úgy tűnik, hogy a teljes D-hélixnek (főként az Ile119, Phe122, Phe123 és Leu130 aminosavaknak), az F-hélix C-terminális részének (Val165, Tyr166) illetve a β -redő-A második szál N-terminális végének (Leu140) és a β -redő-A harmadik szál C-terminális végének (Phe221) szerepe van az allosztérikus jeltovábbításban.

6.2.9. Főkomponens analízis

A translációs és rotációs szabadsági fokok eltávolításával nyert globális belső mozgások főkomponensekre bonthatóak. Ezek a főkomponensek nagy amplitúdójú (alacsony frekvenciájú) rezgések és feltételezhetjük, hogy a konformációs átmenetek ezen rezgések mentén kezdődnek el. A ProDy szoftverrel számolt első komponenshez (legnagyobb amplitúdó) tartozó mozgásokat láthatjuk a 29. ábrán.



29. ábra: A legkisebb frekvencia - legnagyobb amplitúdójú rezgési mód, amely az 1e04 konformációs állapothoz tartozik és a molekuláris dinamika során nyert trajektóriából számolt kovariancia mátrixból kaptunk. A B ábra a bal oldali szerkezet $\sim 90^\circ$ -os, függőleges tengely körül történő elfogatásával készült.

Ezekhez a módokhoz azokban a régiókban a legnagyobb a hozzájárulás, ahol legnagyobb a fluktuáció, ilyenek az N-terminális régió, a pentaszacharid kötő régió, az 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

allosztérikus információban [155], [156], de a módusok csatolt atomi mozgásai révén segítenek megérteni az allosztéria jelenségét.

7. Konklúzió

7.1. ASA-COX-1

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 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 H γ 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 optimálandó 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.

7.2. 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 megkötéshez 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 1. szimulációban, ahol a P-hélix még nem alakult ki, a megfelelő szekvencia különösen nagy fluktuációt mutatott és a megvalósult szerkezetek között előfordulnak a hélix-szerű konformációs állapotok is.

Kimutattuk, hogy a D-hélix kiterjedésében érintett fehérje szekvencia-részlet szintén nagy RMS fluktuációval jellemezhető. A kölcsönös információ 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.

8. Összefoglalás

Acetilszalicilsav (aszpirin) gátolja a prosztaglandin-H₂ termelést, amely a tromboxán-A₂ prekursora. Az aszpirin acetilezőszerként hat, amelynek acetyl-csoportja kovalensen kapcsolódik a ciklooxygenáz-1 (COX-1) enzim aktív centrumában található Ser530 aminosav oldalláncához. A reakció pontos mechanizmusát mindeztáig sem kísérleti- sem kvantumkémiai módszerekkel nem sikerült megnyugtatóan tisztázni. A humán COX-1 enzim modell arachidonsav kötő üregébe dokkoltuk be az acetyl-szalicilsav molekulát. Az acetilezési reakció potenciális energiatárolata, illetve a reakció stacionárius pontjainak és azok energiáinak meghatározása érdekében számos ONIOM-típusú kvantummechanikai / molekulamechanikai számítászt 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 nyeregponatok (egy negatív sajátértékkel) tartoznak. 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 elemi lépésben történik.

Az antitrombin (AT) a vérárvadási kaskád egyik legfontosabb fiziológiás inhibitora. Gátolja az aktivált X-es faktort (FXa), a trombint és más szerin proteáz típusú vérárvadási faktorokat, például a FXIa és a FIXa faktort. Célunk volt annak megértése, hogy az AT egyik (glükózaminoglikán kötő) régiójának konformációs változása milyen specifikus konformációs folyamatokon keresztül indukál változásokat a protein távoli régióiban. 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 vegyünk.

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

9. Summary

Acetylsalicylic acid (aspirin) suppresses the generation of prostaglandin H₂, which is the precursor of thromboxane A₂. Aspirin acts as an acetylating agent. Its acetyl group is covalently attached to a serine residue (Ser530) in the active site of the cyclooxygenase-1 enzyme. The exact reaction mechanism has not been revealed by experimental methods. The acetylsalicylic acid was docked into the arachidonic acid binding cavity of the human cyclooxygenase-1 enzyme model.

To characterize the shape of the potential energy surface of the acetylating reaction and to determine the relative energies of the stationary points on the surface, a series of ONIOM-type quantum mechanical/molecular mechanical calculations were carried out at different quantummechanical levels of theories applying electronic embedding approximations. The acetylsalicylic acid and the surrounding amino acids were included in these calculations. Frequency analyses were performed to prove the existence of first order saddle points (representing transition states) and local minima on the potential energy surface.

It was found that all levels of theories predicted similar transition state geometries. The activation energy values, however, demonstrated significant dependence on the methods that were applied. All the applied “dependable” *ab initio* and density functional theory methods predicted that the breakage of the Ser530 O γ -H γ and formation of the O γ -C (acetylsalicylic acid carbonyl) bonds occur in a single elementary step.

Antithrombin (AT) is one of the most important physiological inhibitor of the blood coagulation cascade. AT inhibits thrombin and other serine protease coagulation factors, e.g. FXa, FXIa and FIXa. Our goal was to understand how the conformational change, which caused by pentasaccharide binding, at one site of the AT resulted in a specific conformational change at the distant site of the protein. To understand the small basic inhibitory potential of AT, which cannot be explained by the available X-ray structures, was also aimed. To these end, a relatively long molecular dynamics simulation on the AT has been carried out mimicking the real physiological conditions.

It was found that correlated conformational transitions which can conduct the conformational information from the glycosaminoglycan binding site to the reactive center loop (RCL) are exists even without the presence of glycosaminoglycans. Computational evidence revealed that specific conformation for Arg393 side chain, suitable for serine protease binding, can exist even at the non-expulsed RCL conformation with non negligible probability. It explains the basal inhibitory potential of AT.

10. Irodalomjegyzék

- [1] J. B. Smith, A. L. Willis, "Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets," *Nat New Biol*, vol. 231, no. 25, pp. 235–237, 1971.
- [2] S. H. Ferreira, S. Moncada, J. R. Vane, "Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen," *Nat New Biol*, vol. 231, no. 25, pp. 237–239, 1971.
- [3] J. R. Vane, "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs," *Nat New Biol*, vol. 231, no. 25, pp. 232–235, 1971.
- [4] G. J. Roth, N. Stanford, P. W. Majerus, "Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 72, no. 8, pp. 3073–3076, 1975.
- [5] G. J. Roth, C. J. Siok, "Acetylation of the NH₂-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin," *J Biol Chem*, vol. 253, no. 11, pp. 3782–3784, 1978.
- [6] G. J. Roth, C. J. Siok, J. Ozols, "Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland," *J Biol Chem*, vol. 255, no. 4, pp. 1301–1304, 1980.
- [7] G. J. Roth, E. T. Machuga, J. Ozols, "Isolation and covalent structure of the aspirin-modified, active-site region of prostaglandin synthetase," *Biochemistry*, vol. 22, no. 20, pp. 4672–4675, 1983.
- [8] G. P. Hochgesang, S. W. Rowlinson, L. J. Marnett, "Tyrosine-385 is critical for acetylation of cyclooxygenase-2 by aspirin," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, no. 27, pp. 6514–6515, 2000.
- [9] J. L. Mehta, B. Mohandas, "Aspirin resistance: Fact or fiction? A point of view," *World J Cardiol*, vol. 2, no. 9, pp. 280–288, 2010.
- [10] A. Szczeklik, J. Musial, A. Undas, M. Sanak, "Aspirin resistance," *J Thromb Haemost*, vol. 3, no. 8, pp. 1655–1662, 2005.
- [11] B. Pamukcu, "A review of aspirin resistance; definition, possible mechanisms, detection with platelet function tests, and its clinical outcomes," *J Thromb Thrombolysis*, vol. 23, no. 3, pp. 213–222, 2007.
- [12] E. D. Michos, R. Ardehali, R. S. Blumenthal, R. A. Lange, H. Ardehali, "Aspirin and clopidogrel resistance," *Mayo Clin Proc*, vol. 81, no. 4, pp. 518–526, 2006.
- [13] R. J. Kulmacz, W. A. van der Donk, A. L. Tsai, "Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2," *Prog Lipid Res*, vol. 42, no. 5, pp. 377–404, 2003.

- [14] W. L. Smith, I. Song, "The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2," *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, vol. 68–69, pp. 115–128, 2002.
- [15] R. G. Kurumbail, J. R. Kiefer, L. J. Marnett, "Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 11, no. 6, pp. 752–760, 2001.
- [16] A. L. Blobaum, L. J. Marnett, "Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition," *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 7, pp. 1425–1441, 2007.
- [17] A. L. Tsai, R. J. Kulmacz, "Prostaglandin H synthase: Resolved and unresolved mechanistic issues," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 493, no. 1, pp. 103–124, 2010.
- [18] G. Wu, J. M. Lu, W. A. van der Donk, R. J. Kulmacz, A. L. Tsai, "Cyclooxygenase reaction mechanism of prostaglandin H synthase from deuterium kinetic isotope effects," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, no. 3, pp. 382–390, 2011.
- [19] L. J. Marnett, "Cyclooxygenase mechanisms," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 4, no. 5, pp. 545–552, 2000.
- [20] K. L. Roos and D. L. Simmons, "Cyclooxygenase variants: the role of alternative splicing," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 338, no. 1, pp. 62–69, 2005.
- [21] C. A. Rouzer, L. J. Marnett, "Structural and functional differences between cyclooxygenases: fatty acid oxygenases with a critical role in cell signaling," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 338, no. 1, pp. 34–44, 2005.
- [22] T. Grosser, S. Fries, G. A. FitzGerald, "Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities," *J Clin Invest*, vol. 116, no. 1, pp. 4–15, 2006.
- [23] L. Navidpour, M. Amini, H. Shafaroodi, K. Abdi, M. H. Ghahremani, A. R. Dehpour, A. Shafiee, "Design and synthesis of new water-soluble tetrazolide derivatives of celecoxib and rofecoxib as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 16, no. 17, pp. 4483–4487, 2006.
- [24] J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M. Leahy, W. G. Smith, P. C. Isakson, K. Seibert, "Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no. 8, pp. 3228–3232, 1994.
- [25] D. Picot, P. J. Loll, R. M. Garavito, "The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1," *Nature*, vol. 367, no. 6460, pp. 243–249, 1994.
- [26] P. J. Loll, D. Picot, R. M. Garavito, "The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase," *Nat Struct Biol*, vol. 2, no. 8, pp. 637–643, 1995.

- [27] R. M. Garavito, D. L. DeWitt, "The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1441, no. 2–3, pp. 278–287, 1999.
- [28] M. P. Gauthier, C. Michaux, S. Rolin, C. Vastersaegher, X. de Leval, F. Julemont, L. Pochet, B. Masereel, "Synthesis, molecular modelling and enzymatic evaluation of (+/-)3,5-diphenyl-2-thioxoimidazolidin-4-ones as new potential cyclooxygenase inhibitors," *Bioorg Med Chem*, vol. 14, no. 4, pp. 918–927, 2006.
- [29] K. E. Furse, D. A. Pratt, N. A. Porter, T. P. Lybrand, "Molecular dynamics simulations of arachidonic acid complexes with COX-1 and COX-2: insights into equilibrium behavior," *Biochemistry*, vol. 45, no. 10, pp. 3189–3205, 2006.
- [30] L. Shi, Z. L. Li, Y. Yang, Z. W. Zhu, H. L. Zhu, "Design of novel N-phenylnicotinamides as selective cyclooxygenase-1 inhibitors," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 21, no. 1, pp. 121–124, 2011.
- [31] G. Dannhardt, W. Kiefer, "Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects," *Eur J Med Chem*, vol. 36, no. 2, pp. 109–126, 2001.
- [32] V. Limongelli, M. Bonomi, L. Marinelli, F. L. Gervasio, A. Cavalli, E. Novellino, M. Parrinello, "Molecular basis of cyclooxygenase enzymes (COXs) selective inhibition," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 12, pp. 5411–5416, 2010.
- [33] A. S. Nies, M. J. Gresser, "Cyclooxygenase-2 inhibitors," *Adv Protein Chem*, vol. 56, pp. 115–141, 2001.
- [34] R. J. Flower, "The development of COX2 inhibitors," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 2, no. 3, pp. 179–191, 2003.
- [35] P. A. Datar, E. C. Coutinho, "A CoMFA study of COX-2 inhibitors with receptor based alignment," *J Mol Graph Model*, vol. 23, no. 3, pp. 239–251, 2004.
- [36] A. R. Fersht, A. J. Kirby, "The hydrolysis of aspirin. Intramolecular general base catalysis of ester hydrolysis," *J Am Chem Soc*, vol. 89, no. 19, pp. 4857–4863, 1967.
- [37] T. St Pierre, W. P. Jencks, "Intramolecular catalysis in the reactions of nucleophilic reagents with aspirin," *J Am Chem Soc*, vol. 90, no. 14, pp. 3817–3827, 1968.
- [38] D. S. Kemp, T. D. Thibault, "The Hydrazinolysis of Salicyloylsalicylic Acid. The Irrelevance of an Anhydride Intermediate," *J Am Chem Soc*, vol. 90, no. 25, pp. 7154–7155, 1968.
- [39] P. Tosco, L. Lazzarato, "Mechanistic insights into cyclooxygenase irreversible inactivation by aspirin," *ChemMedChem*, vol. 4, no. 6, pp. 939–945, 2009.

- [40] S. W. Rowlinson, J. R. Kiefer, J. J. Prusakiewicz, J. L. Pawlitz, K. R. Kozak, A. S. Kalgutkar, W. C. Stallings, R. G. Kurumbail, L. J. Marnett, "A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 46, pp. 45763–45769, 2003.
- [41] W. H. Seegers, J. F. Johnson, C. Fell, "An antithrombin reaction to prothrombin activation," *Am J Physiol*, vol. 176, no. 1, pp. 97–103, 1954.
- [42] G. A. Silverman, P. I. Bird, R. W. Carrell, F. C. Church, P. B. Coughlin, P. G. Gettins, J. A. Irving, D. A. Lomas, C. J. Luke, R. W. Moyer, P. A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G. S. Salvesen, J. Travis, J. C. Whisstock, "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 36, pp. 33293–33296, 2001.
- [43] P. G. Gettins, "Serpins structure, mechanism, and function," *Chem Rev*, vol. 102, no. 12, pp. 4751–4804, 2002.
- [44] J. C. Rau, L. M. Beaulieu, J. A. Huntington, F. C. Church, "Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis," *J Thromb Haemost*, vol. 5, pp. 102–115, 2007.
- [45] J. A. Huntington, "Serpins structure, function and dysfunction," *J Thromb Haemost*, vol. 9 Suppl 1, pp. 26–34, 2011.
- [46] Muszbek L, Bereczky Z, Kovacs B, I. Komaromi, "Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis," *Clin Chem Lab Med*, vol. 48 Suppl 1, pp. S67–78, 2010.
- [47] S. T. Olson, I. Bjork, R. Sheffer, P. A. Craig, J. D. Shore, J. Choay, "Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement," *J Biol Chem*, vol. 267, no. 18, pp. 12528–12538, 1992.
- [48] B. Bray, D. A. Lane, J. M. Freyssinet, G. Pejler, U. Lindahl, "Anti-thrombin activities of heparin. Effect of saccharide chain length on thrombin inhibition by heparin cofactor II and by antithrombin," *Biochem J*, vol. 262, no. 1, pp. 225–232, 1989.
- [49] A. R. Rezaie, "Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by a template mechanism. Evidence that calcium alleviates Gla domain antagonism of heparin binding to factor Xa," *J Biol Chem*, vol. 273, no. 27, pp. 16824–16827, 1998.
- [50] A. R. Rezaie, S. T. Olson, "Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by promoting the assembly of an intermediate heparin-antithrombin-

- factor Xa bridging complex. Demonstration by rapid kinetics studies,” *Biochemistry*, vol. 39, no. 39, pp. 12083–12090, 2000.
- [51] G. Izaguirre, W. Zhang, R. Swanson, T. Bedsted, S. T. Olson, “Localization of an antithrombin exosite that promotes rapid inhibition of factors Xa and IXa dependent on heparin activation of the serpin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 51, pp. 51433–40, Dec. 2003.
- [52] J. C. Whisstock, R. N. Pike, L. Jin, R. Skinner, X. Y. Pei, R. W. Carrell, A. M. Lesk, “Conformational changes in serpins: II. The mechanism of activation of antithrombin by heparindagger,” *J Mol Biol*, vol. 301, no. 5, pp. 1287–1305, 2000.
- [53] A. J. McCoy, X. Y. Pei, R. Skinner, J. P. Abrahams, R. W. Carrell, “Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin’s heparin affinity and activity,” *J Mol Biol*, vol. 326, no. 3, pp. 823–833, 2003.
- [54] G. Izaguirre, S. T. Olson, “Residues Tyr253 and Glu255 in strand 3 of beta-sheet C of antithrombin are key determinants of an exosite made accessible by heparin activation to promote rapid inhibition of factors Xa and IXa,” *J Biol Chem*, vol. 281, no. 19, pp. 13424–13432, 2006.
- [55] D. J. D. Johnson, W. Li, T. E. Adams, J. a Huntington, “Antithrombin-S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation,” *EMBO J.*, vol. 25, no. 9, pp. 2029–37, May 2006.
- [56] J. Langdown, K. J. Belzar, W. J. Savory, T. P. Baglin, J. A. Huntington, “The critical role of hinge-region expulsion in the induced-fit heparin binding mechanism of antithrombin,” *J Mol Biol*, vol. 386, no. 5, pp. 1278–1289, 2009.
- [57] D. J. D. Johnson, J. Langdown, J. a Huntington, “Molecular basis of factor IXa recognition by heparin-activated antithrombin revealed by a 1.7-A structure of the ternary complex,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 2, pp. 645–50, Jan. 2010.
- [58] J. Langdown, K. J. Belzar, W. J. Savory, T. P. Baglin, J. a Huntington, “The Critical Role of Hinge-Region Expulsion in the Induced-Fit Heparin Binding Mechanism of Antithrombin,” *J. Mol. Biol.*, vol. 386, no. 5, pp. 1278–1289, Mar. 2009.
- [59] S. Schedin-Weiss, B. Richard, S. T. Olson, “Kinetic evidence that allosteric activation of antithrombin by heparin is mediated by two sequential conformational changes,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 504, no. 2, pp. 169–76, Dec. 2010.

- [60] D. J. D. Johnson, J. Langdown, W. Li, S. A. Luis, T. P. Baglin, J. A. Huntington, "Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 46, pp. 35478–35486, 2006.
- [61] W. Li, D. J. Johnson, C. T. Esmon, J. A. Huntington, "Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 11, no. 9, pp. 857–862, 2004.
- [62] J. C. Whisstock, S. P. Bottomley, "Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 16, no. 6, pp. 761–768, 2006.
- [63] B. O. Villoutreix, O. Sperandio, "In silico studies of blood coagulation proteins: from mosaic proteases to nonenzymatic cofactor inhibitors," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 20, no. 2, pp. 168–179, 2010.
- [64] T. Schlick, *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*, no. 21. New York, NY,: Springer, 2010.
- [65] I. Kass, C. F. Reboul, A. M. Buckle, "Computational methods for studying serpin conformational change and structural plasticity," *Methods Enzym.*, vol. 501, pp. 295–323, 2011.
- [66] H. Verli, J. A. Guimaraes, "Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulations," *J Mol Graph Model*, vol. 24, no. 3, pp. 203–212, 2005.
- [67] V. Chandrasekaran, C. J. Lee, P. Lin, R. E. Duke, L. G. Pedersen, "A computational modeling and molecular dynamics study of the Michaelis complex of human protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) and factor Xa (FXa)," *J Mol Model*, vol. 15, no. 8, pp. 897–911, 2009.
- [68] I. Kass, A. S. Knaupp, S. P. Bottomley, A. M. Buckle, "Conformational properties of the disease-causing Z variant of alpha1-antitrypsin revealed by theory and experiment," *Biophys J*, vol. 102, no. 12, pp. 2856–2865, 2012.
- [69] "Molecular modelling Principles and applications, 2e - A R Leach." .
- [70] J. F. Frisch, "Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods." 1994.
- [71] T. Veszprémi, M. Fehér, *A kvantumkémia alapjai és alkalmazása*. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 2002.
- [72] I. N. Levine, *Quantum Chemistry*. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2009.
- [73] M. Head-Gordon, J. A. Pople, M. J. Frisch, "MP2 Energy Evaluation by Direct Methods," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 153, no. 6, pp. 503–506, 1988.

- [74] P. ;W. K. Hohenberg, "Inhomogeneous electron gas," *Phys. Rev. A*, vol. 136, pp. 8854–871, 1964.
- [75] W. K. L. J. Sham, "Self-consistent equations including exchange and correlation effects," *Phys. Rev. A*, vol. 140, pp. 1133–1138, 1965.
- [76] A. Mándi, "Szénhidrátok acetál származékainak, valamint antibiotikum- származékok cikloaddíciós reakcióinak kvantumkémiai és dinamikai vizsgálata.," 2011.
- [77] J. MacKerell, A.D., "Empirical Force Fields for Biological Macromolecules: Overview and Issues," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, pp. 1584–1604, 2004.
- [78] J. A. Yin, D. MacKerell, "Combined Ab initio/Empirical Approach for the Optimization of Lennard-Jones Parameters," *J. Comput. Chem.*, vol. 19, pp. 334–348, 1998.
- [79] H. Lin, D. G. Truhlar, "QM/MM: what have we learned, where are we, and where do we go from here?," *Theory Chem. Acc.*, vol. 117, pp. 185–199, 2007.
- [80] H. M. Senn, W. Thiel, "QM/MM methods for biological systems," *At. Approaches Mod. Biol. From Quantum Chem. to Mol. Simulations*, vol. 268, pp. 173–290, 2007.
- [81] "White Papers and Technical Notes." [Online]. Elérhető: http://www.gaussian.com/g_tech/white.htm.
- [82] K. Morokuma, R. D. Froese, S. Dapprich, I. Komaromi, D. Khoroshun, S. Byun, D. G. Musaev, C. L. Emerson, "The ONIOM (our own integrated N-layered molecular orbital and molecular mechanics) method, and its applications to calculations of large molecular systems.," *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, vol. 215, pp. U218–U218, 1998.
- [83] S. Dapprich, I. Komaromi, K. S. Byun, K. Morokuma, M. J. Frisch, "A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives," *J. Mol. Struct.*, vol. 462, pp. 1–21, 1999.
- [84] F. M. J. Vreven T., Morokuma K., Farkas Ö., Schlegel H.B., "Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I: Microiterations and constraints," *J. Comput. Chem.*, vol. 24(6), pp. 760–769, 2003.
- [85] T. Vreven, K. S. Byun, I. Komaromi, S. Dapprich, J. A. Montgomery, K. Morokuma, M. J. Frisch, "Combining quantum mechanics methods with molecular mechanics methods in ONIOM," *J Chem Theory Comput*, vol. 2, no. 3, pp. 815–826, 2006.
- [86] Baranyai András; Schiller Róbert, *Statisztikus mechanika vegyészeknek*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2003.

- [87] H. J. C. Berendsen Postma, J. P. M., DiNola, A., Haak, J. R., "Molecular dynamics with coupling to an external bath,," *J. Chem. Phys.*, vol. 81, pp. 3684–3690, 1984.
- [88] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, "Canonical sampling through velocity rescaling," *J Chem Phys*, vol. 126, no. 1, p. 14101, 2007.
- [89] S. Nose, "A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble," *Mol. Phys.*, vol. 52, pp. 255–268, 1984.
- [90] W. G. Hoover, "Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions," *Phys. Rev. A*, vol. 31, pp. 1695–1697, 1985.
- [91] D. Young, *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*, vol. 9. 2004.
- [92] J. M. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, "Development and testing of a general amber force field," *J Comput Chem*, vol. 25, no. 9, pp. 1157–1174, 2004.
- [93] W. L. Jorgensen Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R.W., Klein, M. L., "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water," *J. Chem. Phys.*, vol. 79, pp. 926–935, 1983.
- [94] P. Ewald, "Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale," *Ann. Phys.*, vol. 369, pp. 253–287.
- [95] T. Darden, D. York, L. Pedersen, "Particle mesh Ewald-an NlogN method for Ewald sums in large systems,," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, pp. 10089–10092, 1993.
- [96] Kövesi István, *Funkcionális jelentőségű kis molekulák (antagonisták és alloszterikus effektorok) kötődésének hatása a fehérjeszerkezetre . Számítógépes szimulációs vizsgálatok c. doktori értekezés.* 2009.
- [97] L. I. Smith, "A tutorial on Principal Components Analysis," 2002. [Online]. Elérhető: http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf.
- [98] I. T. Jolliffe, *Principal Component Analysis*. 2002.
- [99] "Főkomponens analízis." [Online]. Elérhető: <http://hu.wikipedia.org/wiki/F%C5%91komponens-anal%C3%ADzis>.
- [100] O. Acevedo, W. L. Jorgensen, "Advances in Quantum and Molecular Mechanical (QM/MM) Simulations for Organic and Enzymatic Reactions," *Acc. Chem. Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 142–151, 2010.
- [101] X. L. Pan, F. C. Cui, W. Liu, J. Y. Liu, "QM/MM Study on the Catalytic Mechanism of Heme-Containing Aliphatic Aldoxime Dehydratase," *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 19, pp. 5689–5693, 2012.

- [102] D. Bakowies, W. Thiel, "Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches," *J Phys Chem*, vol. 100, no. 25, pp. 10580–10594, 1996.
- [103] I. Komaromi, L. Muszbek, "Applications of the IMOMM (Integrated Molecular Orbital Molecular Mechanics) Method for Biopolymers," in *Frontiers of Multifunctional Nanosystems*, P. Scharff, Ed. Kluwer Academic Publishers, 2002, pp. 17–28.
- [104] R. A. Friesner, V. Guallar, "Ab initio quantum chemical and mixed quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods for studying enzymatic catalysis," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 56, pp. 389–427, 2005.
- [105] H. M. Senn, W. Thiel, "QM/MM Methods for Biomolecular Systems," *Angew. Chemie-International Ed.*, vol. 48, no. 7, pp. 1198–1229, 2009.
- [106] K. Gupta, B. S. Selinsky, P. J. Loll, "2.0 angstroms structure of prostaglandin H2 synthase-1 reconstituted with a manganese porphyrin cofactor," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 62, no. Pt 2, pp. 151–156, 2006.
- [107] "YASARA." www.yasara.org, 2009.
- [108] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.," *J. Appl. Cryst.*, vol. 26, pp. 283–291, 1993.
- [109] J. U. B. D. Eisenberg, R. Lüthy, "VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles," *Methods Enzymol.*, vol. 277, pp. 396–404, 1997.
- [110] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *J Comput Chem*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, 2009.
- [111] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, "A 2nd Generation Force-Field for the Simulation of Proteins, Nucleic-Acids, and Organic-Molecules," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 19, pp. 5179–5197, 1995.
- [112] K. Gupta, B. S. Selinsky, C. J. Kaub, A. K. Katz, P. J. Loll, "The 2.0 Å resolution crystal structure of prostaglandin H2 synthase-1: structural insights into an unusual peroxidase," *J Mol Biol*, vol. 335, no. 2, pp. 503–518, 2004.
- [113] P. J. Selinsky, B.S., Gupta, K., Sharkey, C.T., Loll, "Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations," *Biochemistry*, vol. 40, pp. 5172–5180, 2001.

- [114] S. Grimme, "Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction," *J. Comput. Chem.*, vol. 27, no. 15, pp. 1787–1799, 2006.
- [115] L. A. Burns, A. Vazquez-Mayagoitia, B. G. Sumpter, C. D. Sherrill, "Density-functional approaches to noncovalent interactions: A comparison of dispersion corrections (DFT-D), exchange-hole dipole moment (XDM) theory, and specialized functionals," *J. Chem. Phys.*, vol. 134, no. 8, 2011.
- [116] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. Montgomery J. A., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, "Gaussian 03, Revision C.02," *Gaussian, Inc., Wallingford CT*, 2004.
- [117] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Montgomery J. A., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, "Gaussian 09, Revision A.1," *Gaussian, Inc., Wallingford CT*, 2009.

- [118] U. Varetto, “Molekel 5.4.” Swiss National Supercomputing Centre, Manno (Switzerland), 2009.
- [119] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, “UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis,” *J Comput Chem*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612. , 2004.
- [120] W. Humphrey Dalke, A., Schulten, K., “VMD - Visual Molecular Dynamics,” *J. Molec. Graph.*, vol. 14, pp. 33–38, 1996.
- [121] “DPlot.” <http://www.dplot.com/index.htm>.
- [122] P. Gouet, X. Robert, E. Courcelle, “ESPrpt/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3320–3323, 2003.
- [123] A. Fiser Sali, A., “Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models,” *Methods Enzym.*, vol. 374, pp. 461–491, 2003.
- [124] SchrödingerLLC., “Schrödinger Release 2013-2: Prime.” Schrödinger, LLC, , New York, NY, , 2013.
- [125] M. P. Jacobson, D. L. Pincus, C. S. Rapp, T. J. Day, B. Honig, D. E. Shaw, R. A. Friesner, “A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction,” *Proteins*, vol. 55, no. 2, pp. 351–367, 2004.
- [126] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, P. Kollman, “A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations,” *J Comput Chem*, vol. 24, no. 16, pp. 1999–2012, 2003.
- [127] M. C. Lee, Y. Duan, “Distinguish protein decoys by using a scoring function based on a new AMBER force field, short molecular dynamics simulations, and the generalized born solvent model,” *Proteins*, vol. 55, no. 3, pp. 620–634, 2004.
- [128] S. Pronk, S. Pall, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, “GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit,” *Bioinformatics*, vol. 29, no. 7, pp. 845–854, 2013.
- [129] H. J. C. Berendsen, W. F. van Gunsteren, “Molecular dynamics simulations: Techniques and approaches,” in *in: Molecular Liquids - Dynamics and Interactions*, vol. 135, no. 135, A. J. A.J. Barnes, W. J. Orville-Thomas, Y. J., Eds. Dordrecht, The Netherlands : Reidel , 1984, pp. 475–500.

- [130] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, A. R. van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, K. A. Feenstra, van Drunen R., H. J. C. Berendsen, "Gromacs User Manual version 4.5.4, www.gromacs.org ." 2010.
- [131] O. F. Lange, H. Grubmüller, "Generalized correlation for biomolecular dynamics," *Proteins*, vol. 62, no. 4, pp. 1053–1061, 2006.
- [132] Helmut Grubmüller; Olivier Lange, "Department of Theoretical and Computational Biophysics, Generalized Correlation for Biomolecular Dynamics." [Online]. Elérhető: http://www.mpibpc.mpg.de/grubmueller/g_correlation.
- [133] A. Bakan, L. M. Meireles, I. Bahar, "ProDy: protein dynamics inferred from theory and experiments," *Bioinformatics*, vol. 27, no. 11, pp. 1575–1577, 2009.
- [134] A. T. Van Wart, J. Durrant, L. Votapka, R. E. Amaro, "Weighted Implementation of Suboptimal Paths (WISP): An Optimized Algorithm and Tool for Dynamical Network Analysis," *J Chem Theory Comput*, vol. 10, no. 2, pp. 511–517, 2014.
- [135] A. Barducci, M. Bonomi, M. Parrinello, "Metadynamics," *Wiley Interdiscip. Rev. Mol. Sci.*, vol. 1, no. 5, pp. 826–843, 2011.
- [136] G. A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi, C. Camilloni, G. Bussi, "PLUMED 2: New feathers for an old bird," *Comput. Phys. Commun.*, vol. 185, no. 2, pp. 604–613, 2014.
- [137] I. Komaromi, J. M. J. Tronchet, "Quantum chemical reaction path and transition state for a model cope (and reverse cope) elimination," *J. Phys. Chem. A*, vol. 101, no. 19, pp. 3554–3560, 1997.
- [138] J. J. Zheng, Y. Zhao, D. G. Truhlar, "Representative benchmark suites for barrier heights of diverse reaction types and assessment of electronic structure methods for thermochemical kinetics," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 3, no. 2, pp. 569–582, 2007.
- [139] D. L. DeWitt, E. A. el-Harith, S. A. Kraemer, M. J. Andrews, E. F. Yao, R. L. Armstrong, W. L. Smith, "The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases," *J Biol Chem*, vol. 265, no. 9, pp. 5192–5198, 1990.
- [140] D. M. Friedrich, Z. Wang, A. G. Joly, K. A. Peterson, P. R. Callis, "Ground-state proton-transfer tautomer of the salicylate anion," *J. Phys. Chem. A*, vol. 103, no. 48, pp. 9644–9653, 1999.
- [141] H. Verli, J. a Guimarães, "Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulations.," *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 24, no. 3, pp. 203–12, Dec. 2005.

- [142] W. Kabsch, C. Sander, "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features," *Biopolymers*, vol. 22, no. 12, pp. 2577–2637, 1983.
- [143] D. J. D. Johnson, J. A. Huntington, "Crystal structure of antithrombin in a heparin-bound intermediate state," *Biochemistry*, vol. 42, no. 29, pp. 8712–8719, 2003.
- [144] H. A. Schreuder, B. de Boer, R. Dijkema, J. Mulders, H. J. Theunissen, P. D. Grootenhuis, W. G. Hol, "The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin-proteinase interactions," *Nat Struct Biol*, vol. 1, no. 1, pp. 48–54, 1994.
- [145] U. Desai, R. Swanson, S. C. Bock, I. Bjork, S. T. Olson, "Role of arginine 129 in heparin binding and activation of antithrombin," *J Biol Chem*, vol. 275, no. 25, pp. 18976–18984, 2000.
- [146] V. Arocas, S. C. Bock, S. Raja, S. T. Olson, I. Bjork, "Lysine 114 of antithrombin is of crucial importance for the affinity and kinetics of heparin pentasaccharide binding," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 47, pp. 43809–43817, 2001.
- [147] S. Schedin-Weiss, U. R. Desai, S. C. Bock, P. G. Gettins, S. T. Olson, I. Bjork, "Importance of lysine 125 for heparin binding and activation of antithrombin," *Biochemistry*, vol. 41, no. 15, pp. 4779–4788, 2002.
- [148] M. A. Jairajpuri, A. Lu, U. Desai, S. T. Olson, I. Bjork, S. C. Bock, "Antithrombin III phenylalanines 122 and 121 contribute to its high affinity for heparin and its conformational activation," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 18, pp. 15941–15950, 2003.
- [149] R. G. dela Cruz, M. A. Jairajpuri, S. C. Bock, "Disruption of a tight cluster surrounding tyrosine 131 in the native conformation of antithrombin III activates it for factor Xa inhibition," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 42, pp. 31668–31676, 2006.
- [150] A. Dementiev, M. Petitou, J. M. Herbert, P. G. Gettins, "The ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-heparin reveals the basis of inhibitor specificity," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 11, no. 9, pp. 863–867, 2004.
- [151] M. C. Owen, C. H. Beresford, R. W. Carrell, "Antithrombin Glasgow, 393 Arg to His: a P1 reactive site variant with increased heparin affinity but no thrombin inhibitory activity," *FEBS Lett*, vol. 231, no. 2, pp. 317–320, 1988.
- [152] S. T. Olson, B. Richard, G. Izaguirre, S. Schedin-Weiss, P. G. W. Gettins, "Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors," *Biochimie*, vol. 92, no. 11, pp. 1587–96, Nov. 2010.

- [153] T. Ichiye, M. Karplus, “Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations,” *Proteins*, vol. 11, no. 3, pp. 205–217, 1991.
- [154] B. H. Monien, C. Krishnasamy, S. T. Olson, U. R. Desai, “Importance of tryptophan 49 of antithrombin in heparin binding and conformational activation,” *Biochemistry*, vol. 44, no. 35, pp. 11660–11668, 2005.
- [155] A. W. Van Wynsberghe, Q. Cui, “Interpreting correlated motions using normal mode analysis,” *Structure*, vol. 14, no. 11, pp. 1647–1653, 2006.
- [156] Q. Cui, M. Karplus, “Allostery and cooperativity revisited,” *Protein Sci*, vol. 17, no. 8, pp. 1295–1307, 2008.

Az online hivatkozások (81, 97, 99, 107, 121, 130, 132) mindegyike elérhető 2015.04.15-én.

11. Tárgyszavak - Subject words

tárgyszavak:

ciklooxigenáz-1 enzim

aszpirin

reakciómechanizmus

kvantummechanika

molekulamechanika

átmeneti állapot

antitrombin

molekuladinamika

konformációs változás

reaktív központi hurok

alapszintű gátlási képesség

allosztérikus információ

subject words:

cyclooxygenase-1 enzyme

aspirin

reaction mechanism

quantum mechanics

molecular mechanics

transition state

antithrombin

molecular dynamics

conformational change

reactive center loop

basic inhibitory potential

allosteric information

12. Köszönetnyilvánítás

12.1. ASA-COX-1

Köszönöm a támogatást a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatalnak (Jedlik Ányos ösztöndíj, NKFP-07-A1-2008-0127), a Magyar Nemzeti Információs Infrastruktúra Fejlesztési Programnak (NIIF 1057) és a Magyar Tudományos Akadémiának (MTA 11003).

12.2. Antitrombin

Ezt a munkát 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.

12.3. Személyes köszönetnyilvánítás

Köszönöm dr. Pápai Imrének és dr. Kovács Gábornak, hogy kvantumkémia előadásukkal felkeltették az érdeklődésemet a számítási kémia irányába.

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Komáromi Istvánnak, hogy bevezetett a molekulamodellezés rejtelseibe és közös munkánk során folyamatosan hasznos tanácsokkal látott el. Fekete Attila kollégámnak és Balogh Gábornak szintén köszönettel tartozom.

Köszönet illeti dr. Muszbek László akadémikus urat és dr. Bereczky Zsuzsannát, hogy a vezetésük alatt álló Intézetben minden feltételt megteremtettek a nyugodt munkához. Köszönöm az Intézet valamennyi jelenlegi és volt dolgozójának a barátságos légkört.

Végül pedig szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a töretlen támogatást.

13. Függelék

13.1. Kiegészítés a disszertációhoz

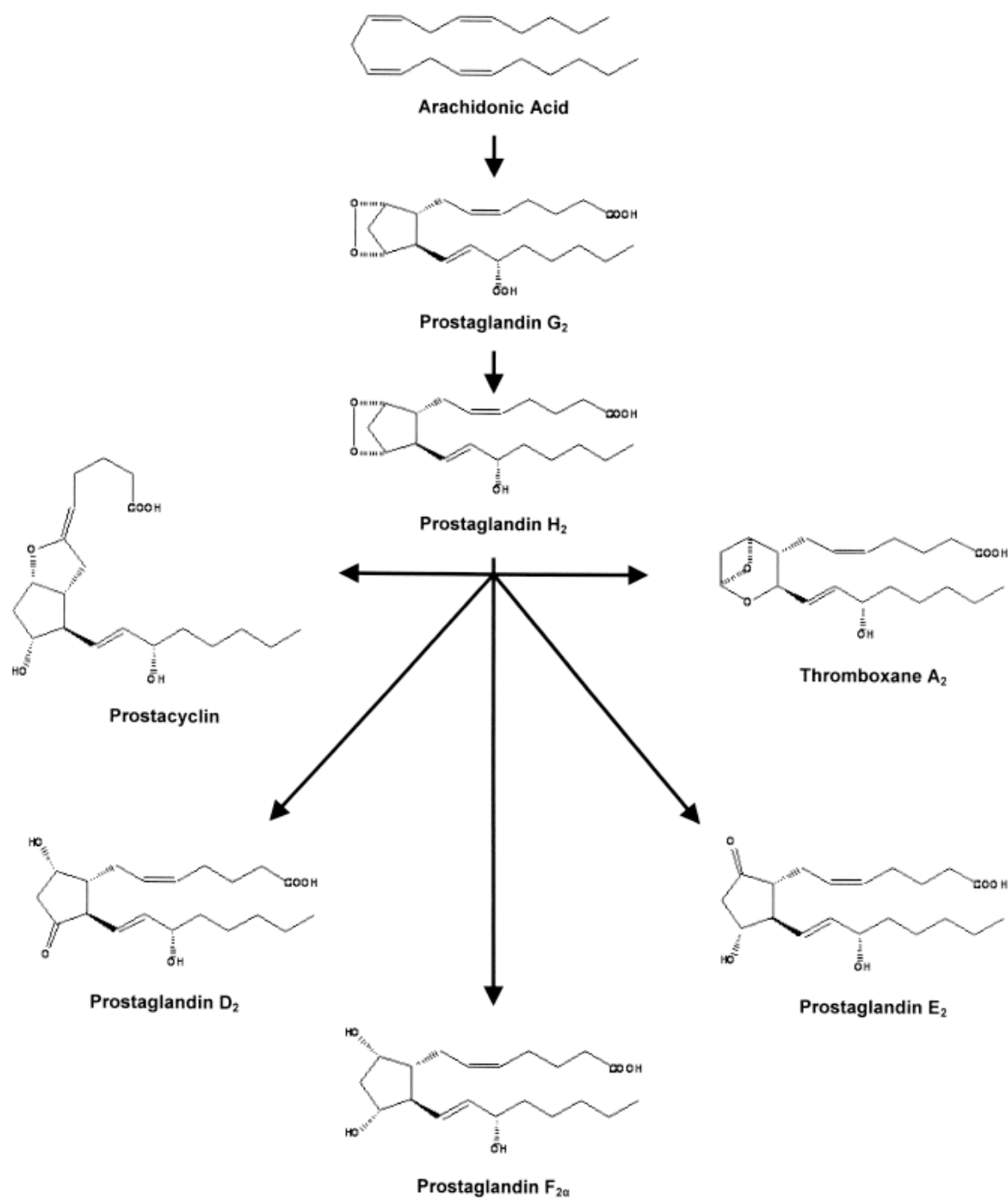
- ASA-COX-1

Az arachidonsav egy négyszeresen telítetlen ω -zsírsav, amely esszenciális zsírsavnak tekinthető, mivel a szervezetünk csak más esszenciális zsírsavakból tudja előállítani. Az arachidonsav az emberi szervezetben a májban, agyban, zsírokban és mirigyekben található meg. Jellemzően glicerofosfolipidek 2-acil pozíciójában észterifikálva fordul elő. Az arachidonsav két féle úton válhat szabaddá: az egyik a foszfolipáz-A2 (PLA₂) izoenzimek hatására, a másik pedig a foszfolipáz-C és diacyl-glicerol-lipáz enzimek hatására történik és elsősorban a vérlemezékben fordul elő.

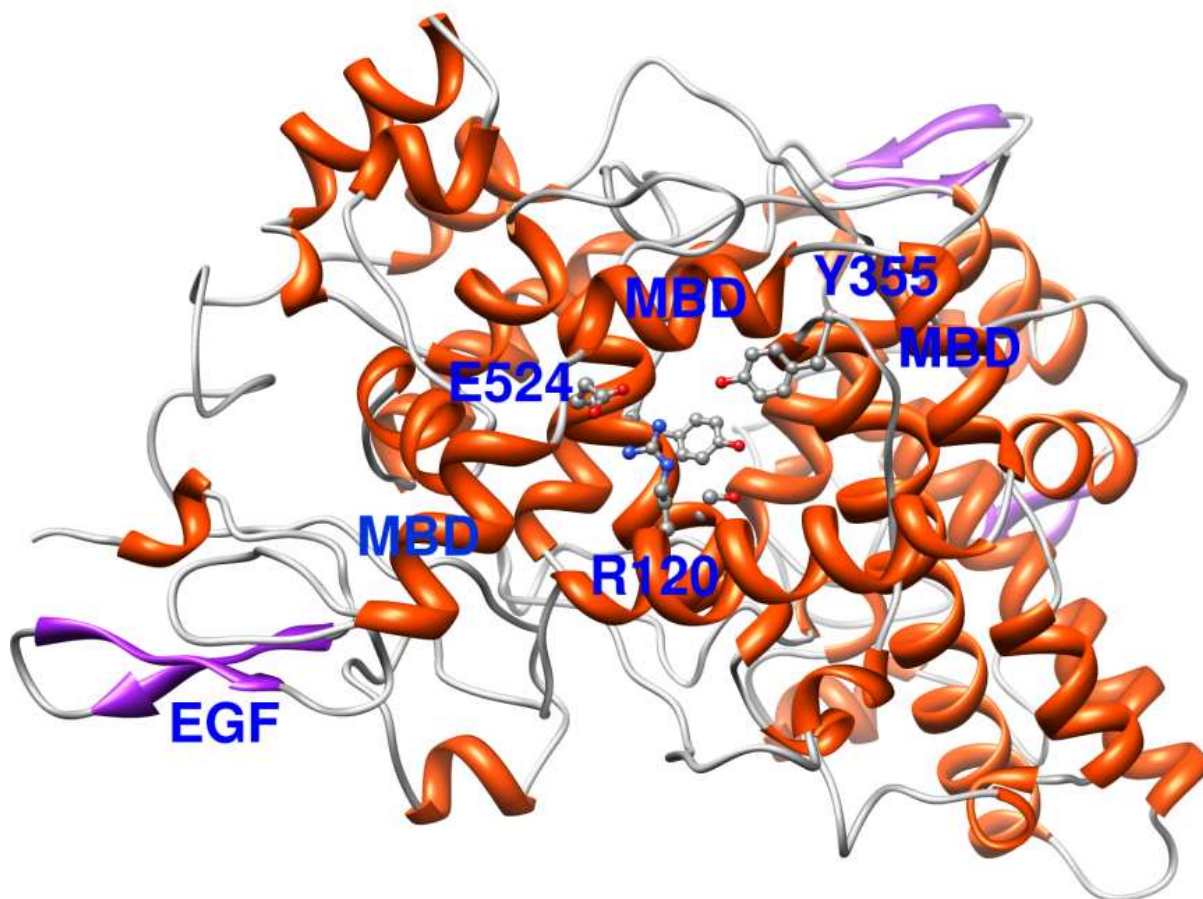
A felszabadult arachidonsav három féle átalakulásban vehet részt: kikerülhet a sejtből, észterifikálódhat koenzim-A-val és a keletkezett arachidonil-CoA újra beépül a foszfolipidekbe, vagy oxidálódhat.

Az oxidáció folyamatát mutatja be az F1 ábra. Első lépésben egy ciklizációt és oxidációt láthatunk (endoperoxid és hidroperoxid képződés, prosztaglandin G₂), második lépésben egy redukció során a 15-OH származék képződik, prosztaglandin H₂). Ez utóbbi molekula a központi elem a további átalakulások során. A prosztaciklin vérlemezke aggregációt gátolja (értágító hatás), míg a tromboxán A₂ a vérlemezke aggregációt indukálja (érszűkítő hatás).

A ciklooxygenáz enzim (COX) felelős a fenti átalakulási folyamat első lépéséért. Két aktív helye van az enzimnek, az egyik a ciklizációért felelős, a másik pedig az oxidációért. A COX enzim irreverzibilis gátlásával a prosztaglandin szintézist blokkolni lehet. A COX-1 enzim szerkezetét az F2. ábrán a membránköti domének (MBD) felől láthatuk.



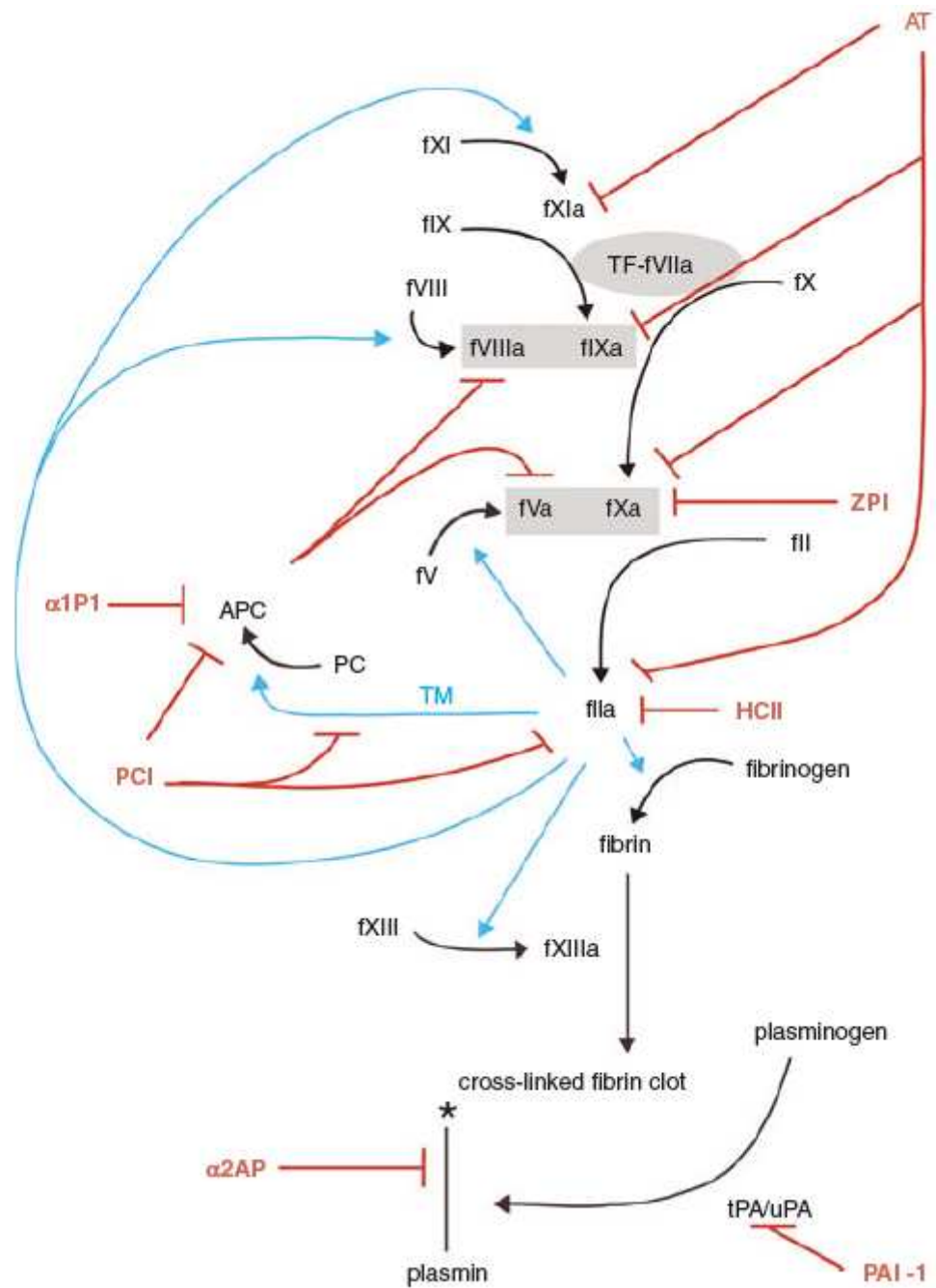
F1. ábra: Az arachidonsav oxidációja (Zachary A. Stacy, Pharm.D., Paul P. Dobesh, Pharm.D., FCCP, Toby C. Trujillo, Cardiovascular Risks of Cyclooxygenase Inhibition Pharm.D.Disclosures Pharmacotherapy. 2006;26(7):919-938.



F2. ábra: Humán COX-1 szerkezete a membránkötő domének (MBD) felől nézve, középen az aszpirin kötőhely látható, valamint a pálcika modellel kiemelve a Tyr 355, Arg120. Az EGF domén az ábra bal alsó oldalán található.

- **Antitrombin**

Az antitrombin számos véralvadási faktort gátol (F3. ábra). Az antitrombin alap inhibíciós potenciálja alacsony, de heparin, heparán szulfát vagy bizonyos megfelelően szulfatált pentaszacharidok jelenlétében drámaian (2-3 nagyságrenddel is) megemelkedhet. Fő célpontjai FIXa, FXIa, de különösen a FXa valamint a FIIa, azaz trombin. Az említetteken kívül gátolja még a FVIIa-t, inaktiválja a kallikreint és a plazmint. Megjegyzendő, hogy a fenti véralvadásban érintett szerin proteázokon kívül gátolja pl. a tripszint is. Vizsgálatainkban, többek között a pentaszacharid (azaz heparin-hatás) nélküli alap inhibíció számítási kémiai módszerekkel történő igazolását tűztük ki célul.



F3. ábra: A koagulációs-, protein-C- és fibrinolitikus útvonal szerepniei (piros színnel jelölve). Az antitrombin (AT) gátolja a FXIa, FIXa, FXa, valamint az FIIa véralvadási faktorokat. (JC Rau et al., J Thromb Haemost.Jul 2007; 5(Suppl 1): 102–115.)

13.2. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



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

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. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ 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 impakt faktora: 10,394

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,005

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

Debrecen, 2015.01.26.



13.3. Hazai- és nemzetközi konferenciákon tartott előadások, bemutatott posztterek

Előadások:

- Tóth L., Komáromi I., Muszbek L.: A humán ciklooxygenáz enzim gátlása Aspirinnel, *in silico* kísérletek, Laki Kálmán Emlékkülés, MTHT, 2009. szeptember 26., Abádszalók
- 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
- Tóth L., Fekete A., Komáromi I.: Az antitrombin aktivációja és konformációs átmenetei molekuladinamikai tanulmányok alapján, Tavaszi szél 2014 konferencia, 2014. március 21-23, Debrecen
- 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
- 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

Posztterek:

- 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
- 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
- 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
- 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

- 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