

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

Kiss-Szemán Anna Júlia

**„Nyitott az újra, méretszelekció másképp”,
avagy a *Pyrococcus horikoshii* acilaminoacil-peptidáz
vizsgálata**

Dr. Harmat Veronika és Dr. Karancsiné Menyhárd Dóra

ELTE Kémiai Intézet
Szerves Kémia tanszék



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ———
—— Budapest, 2011 ——

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
1. Történeti áttekintés, előzmények.....	4
1.1. Az enzimek és a szerin-proteázok.....	4
1.1.2. Katalitikus megkötődés és hasítás mechanizmusa.....	4
1.2. A prolil-oligopeptidáz család.....	5
1.3. Az acilaminoacil-peptidázok.....	6
1.4. A klórmetil-keton inhibitorok.....	7
Célkitűzések.....	8
2. Fehérjekrisztallográfiai módszerek és alkalmazásuk.....	9
2.1. Bevezetés a fehérjekrisztallográfiába.....	9
2.1.1. Kristályosítás.....	9
2.1.2. Röntgendiffrakciós mérés és adatfeldolgozás.....	12
2.1.3. Modellépítés és szerkezetfinomítás.....	14
3. Molekuladinamikai számítások.....	17
3.1. Mozgásegyenlet és erőter.....	17
3.2. Energiaminimalizáció.....	18
3.3. Molekuladinamika.....	19
3.3.1. A dinamikai szimuláció globális algoritmus.....	19
3.4. A <i>Pyrococcus horikoshii</i> acilaminoacil-peptidáz rendszer vizsgálata.....	20
4. Eredmények és következtetések.....	22
4.1. A kezdeti feltevés.....	22
4.2. A meghatározott kristályszerkezet.....	22
4.3. A molekuladinamikai szimulációk eredményei.....	28
4.3.1. A ligandummentes és a komplexált állapotra vonatkozó eredmények összevetése.....	28
4.3.2. A számított és a röntgenszerkezetek összevetése.....	32
Összefoglalás és kitekintés.....	34
Abstract.....	36
Köszönetnyilvánítás.....	37
Rövidítések.....	38
Hivatkozások.....	39

Bevezetés

Az enzimek a szervezetben előforduló olyan fehérjemolekulák, amelyek élettani feladatok biokatalizátorai [1,2,3]. Szerkezetük és funkciójuk összefügg – működésük értelmezéséhez szerkezetük meghatározása jelentősen hozzájárulhat. A fehérjekrisztallográfia pontos információt szolgáltat a fehérjemolekulák térszerkezetéről. A meghatározott szerkezetek a reakciómechanizmusok megismerését, értelmezését, mutációk hatásának tanulmányozását segítik elő, ami orvostani és tudományos szempontból is elengedhetetlen.

Munkám során az acilaminoacil-peptidáz (AAP) fehérjecsalád egy tagjával foglalkoztam. Ezek proteázok: oligopeptidek hidrolízisét katalizálják. A közelmúltban kimutatták, hogy ez az enzimes család kapcsolatba hozható alapvető fontosságú élettani folyamatokkal, amelyek rendellenességei betegségekhez vezethetnek, mint pl. a kissejtes tüdő- és veserák [4,5] valamint az Alzheimer kór [6]. Az AAP enzimek képesek amiloidképzésre hajlamos béta peptideket hasítani. A hasítást követően létrejövő peptidrészletek ún. szabad β -éllel rendelkeznek és ennek következtében könnyebben formálnak aggregátumokat [7], ún. amiloid plakkokat. Neurobiológiai kutatások azt is kimutatták, hogy az AAP fehérjének szubsztrátjai egyes foszfát-észter típusú ingerületátvivő anyagok az emberi idegrendszerben [8]. Ezek alapján feltételezhető, hogy az enzim az acetilkolin-észterázéhoz hasonló, fontos szerepet tölt be az emberi agy kémiai folyamataiban is [9].

Tudományos diákköri munkám során a *Pyrococcus horikoshii* AAP-t (PhAAP) vizsgáltam, amely modellje az emberi enzimnek. Kovalens inhibitorral képzett komplexét kristályosítottam, szerkezetét meghatároztam, összevettem a családon belüli más fehérjével és molekuladinamikai számításokkal egészítettem ki a röntgen diffrakciós adatokat.

Eredményeink – reményeink szerint – elmélyíthetik az oligopeptidázokra illetve a szerin-proteázokra vonatkozó ismereteinket, másrészt lehetőséget nyújthatnak egy potenciális gyógyszer-célpont fehérje specificitásának és szabályozásának megértéséhez.

1. Történeti áttekintés, előzmények

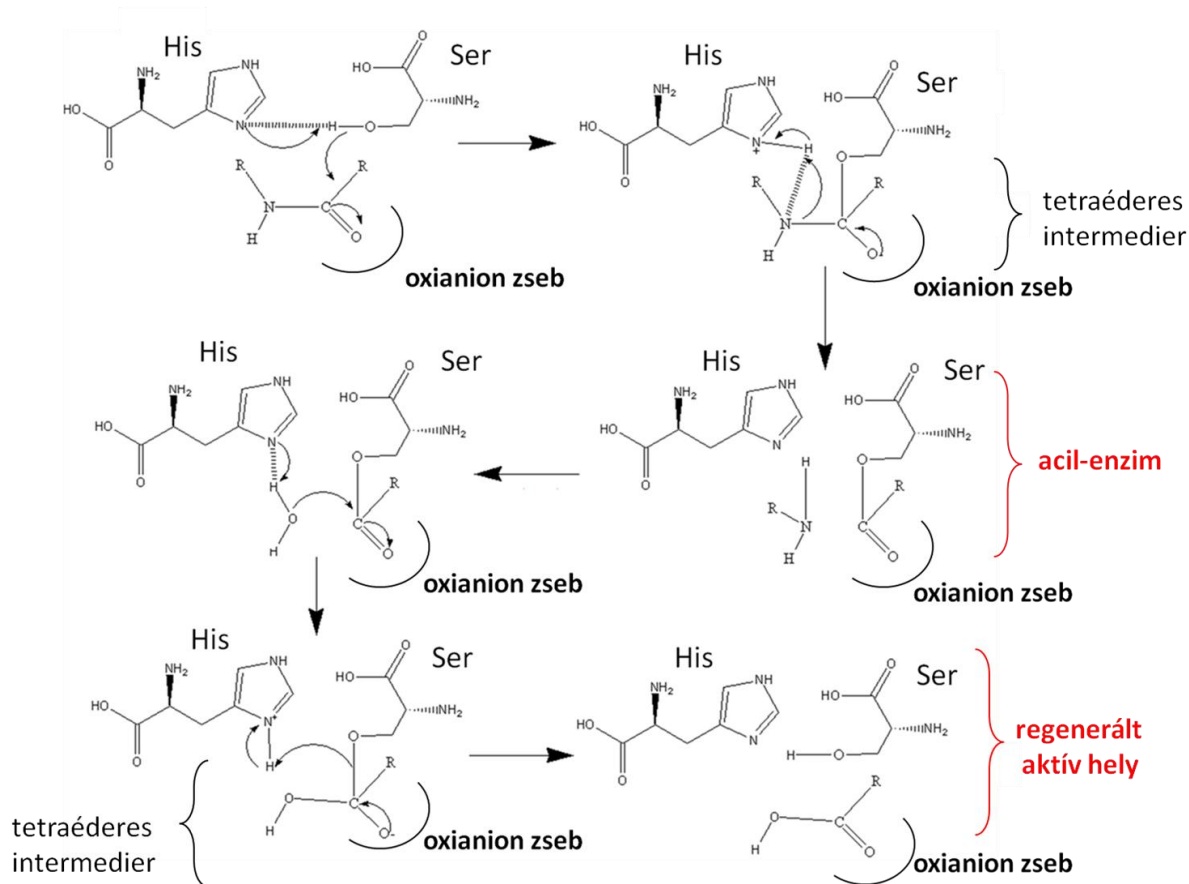
1.1. Az enzimek és a szerin-proteázok

A szerin-proteáz enzimcsalád tagjai fehérjéket (peptideket) hasítanak (peptidkötés hidrolízisét katalizálják), egy legtöbbször a molekula felszínén található árokban elhelyezkedő aktív hely segítségével. A szerin-proteáz típusú enzimek aktív helyén egy katalitikus triád található, amelyet három, térben egymáshoz közel elhelyezkedő aminosav, a szubsztráttal kémiai reakcióba lépő – névadó – szerin, egy hisztidin és egy aszparaginsav alkot. A család talán legtöbbet tanulmányozott képviselője a kimotripszin, amelynek működési mechanizmusát és az általa katalizált kémiai reakció kinetikáját részletesen vizsgálták [10].

1.1.2. Megkötődés és a katalitikus hasítás mechanizmusa

A hasítás első lépéseként a hasítandó fehérjemolekulának (peptid, szubsztrát) meg kell közelítenie az aktív helyet, és azon belül az aktív szerint [11]. A bekötés után a szerin hidroxil-oxigénje nukleofil támadást intéz a peptidkötés karbonil csoportja ellen és az aktív szerin észtere keletkezik (acilezés) (1. ábra). A szerin protonját átveszi a katalitikus hisztidin és a keletkezett pozitív töltést a katalitikus aszparaginsav negatív töltése semlegesíti. Az acilezési lépés során egy negatív töltésű, a megtámadott karbonil szén körül tetraéderes konfigurációjú ún. oxianion közti termék alakul ki, majd alakul tovább acilenzimmé (kovalens kötéssel összekötött enzim-szubsztrát). A hasonló nevű oxianion zseb stabilizálja a negatív töltést, két főláncbeli amid-hidrogén segítségével. A hisztidinen „tárolt” protont megkapja a szubsztrát távozó N-terminusa és amino-csoport keletkezik, szétesik az intermedier.

Az aktív hely felszabadulása egy vízmolekula segítségével megy végbe, ami előidézi az acilenzim hidrolízisét. Ennek következtében újra tetraéderes intermedieren keresztül megy végbe a reakció: a vízmolekula deprotonálódik a hisztidin javára és nukleofil támadást intéz az enzimhez kötött szénatom ellen, elhasad az enzim-szubsztrát észter kötés is (dezacilezés), a hisztidin protonálja a szerin „csupasz” oxigénjét így az aktív hely regenerálódik és új hasításra képes (1. ábra).



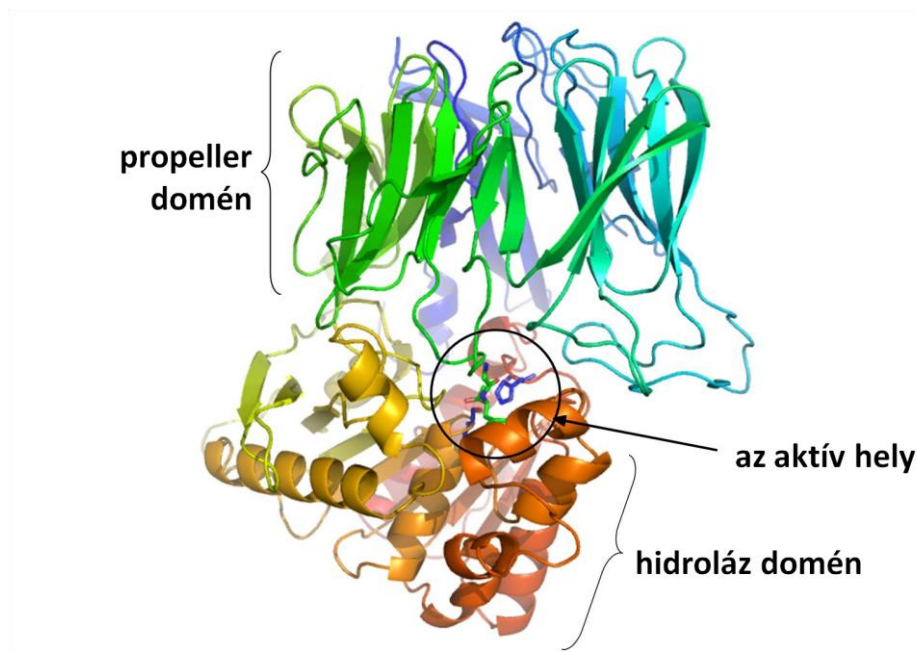
1. ábra A szerin-proteáz enzimesalád általános katalitikus mechanizmusa

A szerin-proteáz enzimek a bioszintézis során ún. előenzim formában jönnek létre. Ezeknek megfelelően aktiválódniuk kell (pl. szelektív hasítás hatására bekövetkező konformáció változás), hogy el tudják végezni a kijelölt feladatukat. Ez az elő és aktív forma biztosítja a megfelelő enzimaktivitás egyensúlyát.

1.2. A prolil-oligopeptidáz család

A szerin-proteáz családok közül a prolil-oligopeptidáz (POP) családot fedezték fel legkésőbb [12]. Élettani és gyógyászati szempontból is érdekes fehérjék tartoznak a családba: a névadó prolil-oligopeptidáz (POP, kognitív folyamatok), dipeptidil-peptidáz IV (DPP-IV, II típusú cukorbetegség), oligopeptidáz B (álomkór), és az általunk is vizsgált acilaminoacil-hidroláz. Közös tulajdonságuk a szubsztrátok méret szerinti szelektálása: csak maximum kb. 30 aminosavas oligopeptideket tudnak elhasítani, nagyobb fehérjéket nem.

A szerin-peptidázok tipikus 25-30 kDa-os tömegéhez képest a prolil-oligopeptidázok 80-120 kDa tömegűek. Tipikusan két szerkezeti egységből állnak: α/β -hidroláz domén és egy 7 „lapátból” felépülő β -propeller domén (2. ábra). A méretszelekció hátterében az áll, hogy az aktív hely a két domén közötti üregben helyezkedik el.



2. ábra A *Pyrococcus horikoshii* ősbaktérium eredetű aciaminoacil-peptidáz enzim

Az aktív helynél kék színnel van kiemelve a katalitikus triád (Ser466, His578, Asp546), zöld színnel az inhibitor

Más szerin-peptidázokkal ellentétben bioszintézisükkor azonnal aktív alak keletkezik, mivel a két doménes szerkezet meggátolja, hogy kontrollálatlanul elhasítsanak nem a szubsztrátjaik közé tartozó fehérjéket.

1.3. Az acilaminoacil-peptidázok

Az acilaminoacil-peptidázok (röv. AAP) más néven az acilpeptid-hidrolázok a szerin-proteázokon belül, a prolil-oligopeptidáz enzimesaládba tartoznak [13]. Ahogy a nevük is mutatja a hasítandó peptid N-terminusáról acilezett aminosavakat hasítanak le [14]. A lehasított acilező csoport lehet acetil-, klóracetil-, formil-, esetleg foszfátcsoport.

Számos emlős szervezetében (eukarióta sejtek) kimutatták az AAP-k jelenlétét, és meghatározták a patkányból, sertésből és emberből kinyert enzimek teljes aminosav sorrendjét [15,16,17]. A három enzimet egyenként 723 aminosav építi fel, amelyek sorrendje közel kilencven százalékban azonos, valamint a katalitikus triád elhelyezkedése is megegyező [12,18].

A legtöbb szerkezet-funkció összefüggés vizsgálat eddig az *Aeropyrum pernix* hőkedvelő ősbaktérium acilaminoacil-peptidáz enzimét célozta (ApAAP). Az ApAAP-ra a nyitott-csukott forma dinamikus egyensúlya jellemző, amikor a nyitott állapotban inaktiválódik az katalitikus hely [19]. A dolgozatomban vizsgált acilaminoacil-peptidáz, a *Pyrococcus horikoshii* szintén termofil ősbaktériumból származik (PhAAP). A fehérjét (PhAAP) *E. coli* baktériumban fejezték ki (MTA Enzimológiai Intézet, Polgár László

professzor kutatócsoportja), és tisztították, ezután használtuk fel az egyetem fehérjekristallográfiai laboratóriumában.

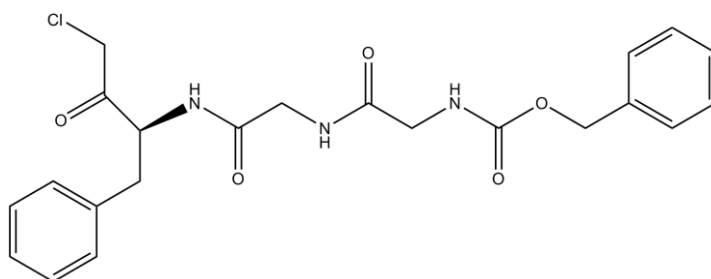
Különböző fajokból származó AAP-k különböző multimereket alkotnak: az ApAAP dimer [19,20,21], az emlős enzimek tetramer [15,16,17], a PhAAP hexamer felépítésű [22]. A vizsgálatok egyik fontos célja a multimerizáció funkcionális szerepének megértése.

1.4. A klórmetil-ke-ton inhibitorok

A klórmetil-ke-ton származékokat (CMK) nagyon régóta használják a szerin-proteázok kovalens inhibitoraként [8,23].

A mi esetünkben azért volt rá szükség, mert az enzim szubsztrátkötő mechanizmusát is vizsgálni akartuk. Ehhez szükség volt egy szubsztrát-szerű viszonylag kicsi molekulára, ami ugyanakkor kovalensen hozzákötődik az aktív helyhez [9,24]. Az inhibitor úgy működik, hogy bekötődik az aktív szerinhez, de a második lépés (aktív hely regenerálása) már nem tud lejátszódni, így a tetraédes állapot kovalensen rögzítve marad. Ugyanis az inhibitor epoxid-intermedieren keresztül a hisztidinhez is kovalensen hozzákötődik.

A PhAAP-hez adott inhibitor Z-Gly-Gly-Phe-CMK szekvenciájú, ahol Z benziloxi-karbonil csoportot, a Gly két glicint, a Phe egy fenilalanint és a CMK a klórmetil-ke-ton-t jelöli (3. ábra).



3. ábra Az alkalmazott inhibitor szerkezeti képlete
(CMK-Phe-Gly-Gyl-Z)

A fehérje az ELTE Fehérjekristallográfiai laboratóriumába – az inhibitor is tartalmazó – oldat formájában került, az inhibitor az enzimhez képest háromszoros feleslegben volt. Ebből az oldatból dolgoztunk a kristályosítás során (ld. lent).

Célkitűzések

A röntgenkristallográfiai vizsgálat elsődleges célja annak a kérdésnek megválaszolása volt, hogy a korábban meghatározott PhAAP szerkezetéhez képest [22], okoz-e változást az aktív helyen egy kovalens szubsztrát-szerű inhibitor kötődése, illetve hogy hatással van-e ez a kötődés a fehérje teljes térszerkezetére. Mivel az enzim ürege viszonylag kicsi, egy harminc aminosavas oligopeptid nehezen tudna megfordulni benne. Ez felveti azt a kérdést, hogy az enzim irányítja-e valamilyen módon az üreg bejáratánál az oligopeptid szubsztrátot.

A korábban meghatározott inhibitor nélküli szerkezet [22] valójában tartalmaz egy az aktív helyhez koordinálódott 1,6-hexándiol molekulát, így érdeemben nem tekinthető „üres”-nek. Molekuladinamikai szimulációval ezt a teljesen „üres” állapotot kívántuk modellezni, és megállapítani, hogy milyen konformációban található a katalitikus triád, amikor nem kényszerül kölcsönhatásra sem szubsztrát-, vagy szubsztrát jellegű molekulával, sem a kristályosító oldatból származó hexándiollal. A dinamikai modellezés során a PhAAP molekulát önálló monomerként vizsgáltuk, azzal a céllal, hogy további információt szerezzünk a két domén egymáshoz való térbeli viszonyáról.

Az általunk vizsgált ősbaktérium eredetű acilaminoacil-peptidázok szoros kapcsolatban állnak az emlős eredetű AAP fehérjékkel, amelyek szerkezet meghatározása eddig nem járt sikerrel. Ha megértjük ezeknek a rokonfehérjéknek a szerkezetét és működési mechanizmusát, közvetett információt szerezhethetünk az orvosbiológiai és gyógyszerészeti szempontból fontosabb eukarióta enzimfehérjéről.

2. Fehérjekrisztallográfiai módszerek és alkalmazásuk

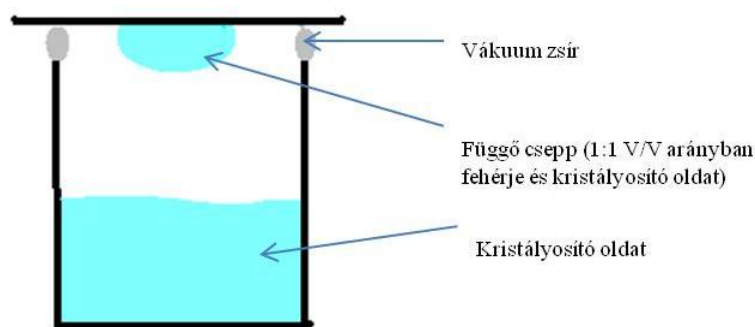
2.1. Bevezetés a fehérjekrisztallográfiába

A fehérjekrisztallográfia olyan szerkezetvizsgáló módszer, ahol atomok pontos térbeli helyzetéről – a molekulák térszerkezetéről – röntgendiffrakciós módszerrel információt nyerhetünk. Ennek a módszernek (diffrakció) alapja a sugárzás anyaggal való rugalmas kölcsönhatása, amelynek eredménye a diffrakciós kép. Az „egyszerű” optikai mikroszkópos vizsgálattal ellentétben a kristályokon szóródott sugarakat nem lehet egyszerű fizikai eszközökkel refokuszálni, ezért diffrakciós képet detektálunk, amelyből (a szórt sugarak fázisainak közelítő módszerekkel való meghatározása után) a tárgy képét matematikai módszerekkel (Fourier-transzformáció), számítógép segítségével számoljuk. A röntgensugárzás a töltéssel rendelkező részecskék elektromos terével lép kölcsönhatásba, de az atommagok hozzájárulása elhanyagolható, ezért a diffrakciós mintázatból a molekula elektronsűrűségi függvénye számítható ki. Ez egy „térkép”, aminek értelmezésével atomi koordinátákká fordítjuk le azt. A kristályszerkezetek a tapasztalat szerint általában a fehérje biológiailag aktív konformációját tükrözik [25].

2.1.1. Kristályosítás

Ahhoz, hogy a méréshez eljussunk, végre kell hajtanunk a talán legidőigényesebb feladatrészt: a fehérje kristályosítását, így készítjük elő a mintát a mérésre. A mérés alapvető feltétele, hogy nagyméretű, minél kevesebb kristályhibát tartalmazó egykristályt állítsunk elő ezt a fehérje-koncentráció változtatásával, a göcképződés és –növekedés folyamatainak befolyásolásával érhetjük el, valamint különböző kristályosító adalékokkal (pl. só, lecsapószer, puffer) lehet gyorsítani a kristályok kialakulását, illetve megakadályozni a nem kívánatos mellékfolyamatokat (pl. detergens adagolás a nem specifikus aggregáció elkerülésére). A kristályképződési folyamatot befolyásoló paramétereket (pl. pH, hőmérséklet, koncentráció stb.) is optimalizálni kell. Itt egy kis kreativitásra és türelemre van szükség. Az első széleskörű (tág pH, koncentráció, hőmérséklet tartományok) keresés után az ígéretes körülmények optimalizálását kell elvégezni, amíg végül megtaláljuk az ideális körülményt – ez próbálgatásos módszer, ezen kívül segítségünkre lehet néhány jól bevált, mások által már alkalmazott krisztallográfus fogás [26]. Elengedhetetlen a fehérje tisztasága (~99%). Kristályosító oldatot adunk a fehérjéhez (tartalmaz többek között kicsapó szert, ami csökkenti a fehérje oldhatóságát), pufferrel szabályozzuk a pH-t, és használatosak viszkozitás növelő

adalékok (pl. glicerín). A kristályok előállításához ún. függőcsepp módszert alkalmaztam (4. ábra), ami a gőzdiffúzió elvén alapszik. Az üvegfedélre pipettázott csepp (néhány μl) a kristályosító oldatra nézve hígabb, mint a mélyedés alján található kristályosító oldat és felülete görbült, ezért a két oldal feletti gőznyomás között különbség van, amelyek kiegyenlítődése során vízgőz távozik a cseppből, ezzel annak töményedését okozza, így megindulhat a gócképződés, majd a kristálynövekedés.

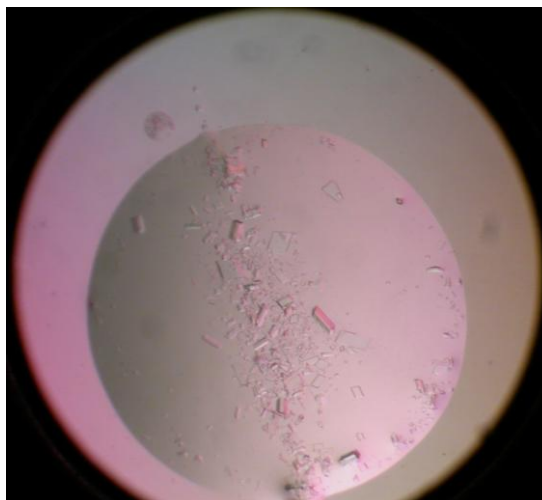


4. ábra A függőcsepp módszer

A *Pyrococcus horikoshii* ősbaktérium eredetű fehérjét *E. coli* baktériumból fejezték ki (a fehérjeoldat összetétele: [Enzim]=133 μM V=200 μl , [Inhibitor]= 336,4 μM (Z-Gly-Gly-Phe-CMK), puffer 10mM TRIS/HCl, pH=7,5). A kristályosítást a korábban bevált körülmények alapján terveztem. Mivel általános tapasztalat, hogy a fehérjeminta kis változása is (pl. mutáció, vagy eltérő komplexált ligandum) az optimális körülmények jelentős megváltozását okozhatják, a kristályosító körülményeket optimalám. Az első próbálgató körben 33-55 μl 3M MgCl_2 , 50 μl 1M Tris[hidroximetil]aminometán]/HCl (pH 7,2-8,5), 250-400 μl 5M 1,6-hexándiol kerül 500 μl végtérfogatú kristályosító elegybe. A cseppet pedig a körülményből 2 μl -t 2 μl fehérjeoldattal elegyítve készítettem Cyberlab kristályosító robot segítségével. Ezek közül a körülmények közül a 250 μl és 300 μl hexándiolt, 33 μl MgCl_2 -ot, 50 μl puffert (pH=8,5) tartalmazó 500 μl végtérfogatú elegy vált be – hét nap elteltével ebből nőtték a legformásabb (legvastagabb, lap alakú) kristályok. Ezek azonban elég kicsik voltak, úgyhogy nagyobb cseppet tettem fel, ezt már manuálisan, ahol 3 μl kristályosító oldathoz 3 μl fehérjeoldatot valamint 4 μl kristályosító oldathoz 4 μl fehérjeoldatot adtam.

Az 5. ábrán látható csepp egy ún. átoltott csepp. Ez olyan túltelített csepp, amiben nem tud elindulni a gócképződési folyamat, mert ahhoz nem elég tömény az oldat. Ekkor egy másik cseppből kristálygócokat juttatunk át a célcseppbe. Általában macskabajusszal végigsimítva egy kristályt lemorzsolódik róla néhány mikroszkopikus kristálydarab, és feltapad a szála. Ezt a szálat keresztülhúzva a tiszta cseppen belemossuk a kristálygócokat. Abban az esetben,

ha a kristálynövekedésre alkalmas koncentrációtartományban van az oldat, néhány nap múlva megfigyelhető a jellegzetes „vonalminti” kristályképződés (5. ábra).

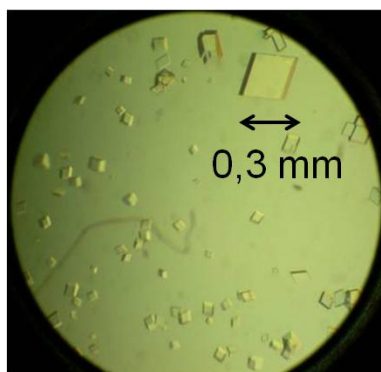


5. ábra Átoltott csepp és a benne jellegzetesen vonal mentén képződő kristályok

1. táblázat Az optimális körülmény összetétele (végtérfogat 500 μl)

Adalékanyagok	koncentráció
1,6-hexándiol	2,5 mol/dm ³
MgCl ₂	0,2 mol/dm ³
Tris[hidroximetil]aminometán/HCl puffer (pH=8,5)	0,1 mol/dm ³

A 6. ábrán látható kép egy 4 μl + 4 μl -es csepp fényképe, amely a méréshez felhasznált kristályt is tartalmazza. A klórmetil-keton inhibitort tartalmazó fehérje komplex (PhAAP/CMK) szerkezetmegoldása mellett feladatomb volt egy régebben megmért kristály szerkezetének (PhAAP/12) megoldása is, ami egy másik kristályformában kristályosodott (tizenkét monomer az elemi cellán belül).



6. ábra A PhAAP enzim kristályai

A jobb felső részen a mérhető példány, a többi szép kristály, de méretén aluli

2.1.2. Röntgendiffrakciós mérés és adatfeldolgozás

A fehérjekristályok mechanikai hatásokra érzékenyek, a molekulák között térrészeket az oldószer tölti ki, aminek elpárolgásával tönkremehet a kristály, és röntgensugárzás hatására roncsolódhatnak. Ezért célszerű hideg nitrogén áramban kb. 100 K-re hűtve kivitelezni a mérést. Fontos, hogy a mérés előtt a kristályt ún. krio-oldatba tegyünk, amelynek összetétele gátolja a kristályos jég képződését a lehűlés rövid ideje alatt, ugyanis a jégkristályok szórásukkal akadályoznák a mérés kiértékelését (100 K-en már nem képződnek jégkristályok, mert az amorf vízfázis a stabil). A mi esetünkben már a kristályosító körülmény krio-oldatként viselkedett viszonylag alacsony víztartalma (33,4 térfogat%) miatt.

Az adatgyűjtést a PhAAP/CMK esetében az ELTE Fehérjekrisztallográfiai Laboratóriumban található diffraktométeren (réz K_{α} sugárzás, Rigaku RU-H2R forgó anódos generátor, Rigaku R-AXIS IV++ image plate detektor) végeztük (240 felvétel, 15 perces expozíciós idő és $0,5^{\circ}$ oszcilláció felvételenként), a PhAAP/12 kristályról a European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Franciaország) BM14U sugárforrással gyűjtöttek diffrakciós adatokat. Az adatfeldolgozást az XDS és XSCALE programokkal [27] végeztem. Ennek során a diffrakciós képek feldolgozása történik, eredménye az elemi cella paraméterei, a szimmetria és a reflexiók amplitúdóinak adatsora (2. táblázat).

A röntgendiffrakciós mintázatból a szórt sugaraknak csak az intenzitása számítható közvetlenül, a fázisa nem. Ezért az elektronsűrűségi térkép számításához matematikai úton kell megoldani az ún. fázisproblémát.

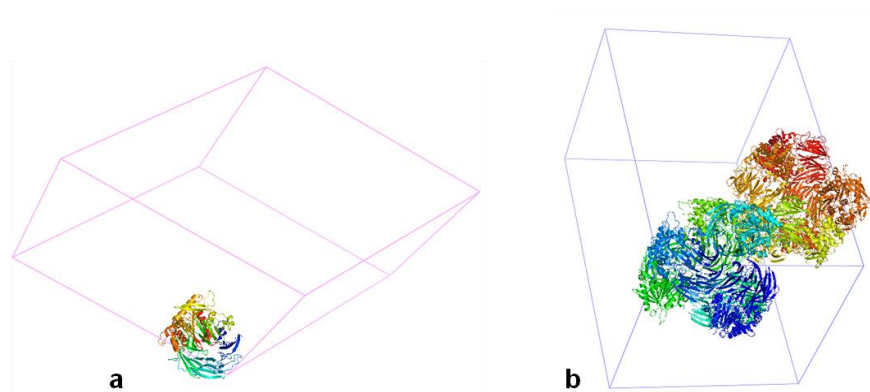
A fázisproblémát molekuláris helyettesítéssel, a CCP4 programcsomag MOLREP programjának [28,29] segítségével oldottam meg. A felhasznált modell molekula egy korábban meghatározott, az aktív helyen hexándiolot tartalmazó szerkezet [22] fehérje (PhAAP/hexándiol) része (a hexándiol- és vízmolekulákat, és ionokat kivettem, mert ezek eltérő helyzetben lehetnek a két szerkezetben). Erre a molekulára teljesül, hogy az aminosav sorrendjének legalább 25%-a megegyezik az általunk vizsgált molekuláéval, ekkor feltételezzük, hogy a két fehérje szerkezete alapvető vonásaiban hasonlít. (Esetünkben az egyezés 100%, de globálisan jelentős különbségek lehetnek a két domén relatív helyzetének akár csak kis különbsége miatt is.) Az ismert szerkezet modellül szolgál a meghatározandó molekulának. A molekuláris helyettesítés feladata, hogy megtalálja az meghatározni kívánt molekula helyét és orientációját az új elemi cellában. Ebből a modellből számítható fázisok adják azt a kiindulási fáziskészletet, amelynek segítségével az első elektronsűrűségi térképet számítjuk. A PhAAP/CMK esetében azonban izostrukturális volt a modell és a vizsgált

szerkezet, így az elemi cella is megegyezett, a kiindulási pozíciót csak merevtest finomítással igazítottuk, hogy a két domén helyzete közti kis különbséget figyelembe vegyük [30]. A H32 kristályszimmetria miatt a PhAAP/CMK hexamerben található hat fehérjemolekula pontos másolata egymásnak, konformációjuk nem térhet el (szimmetria-ekvivalens molekulák). A PhAAP/12 szerkezet esetén viszont az aszimmetrikus egységet tizenkét független monomer, azaz két hexamer alkotja (7. ábra), lehetővé téve a hexamerek esetleges torzulásának vizsgálatát, pl. kristálykontaktusok hatására.

2. táblázat A röntgenmérésből származó eredmények összefoglalása

Név	PhAAP/CMK	PhAAP/12
Kristályrendszer	trigonális	rombos
Cellaparaméterek (a, b, c / Å,	184,057 184,057 145,529	183,31 183,80 275,74
α, β, γ / °)	90,0 90,0 120,0	90,0 90,0 90,0
Térceport	H 3 2	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
R_{meas}^a	0,066	8,5
$I / \sigma(I)$	22,25	17,33
Felbontási tartomány	19,741 – 1,601	19,980 – 2,700
Összes/független reflexiók száma	861050/122438	1059014/241127
Teljesség	99,2 %	94,8%

$$^a R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{N}{N-1}} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

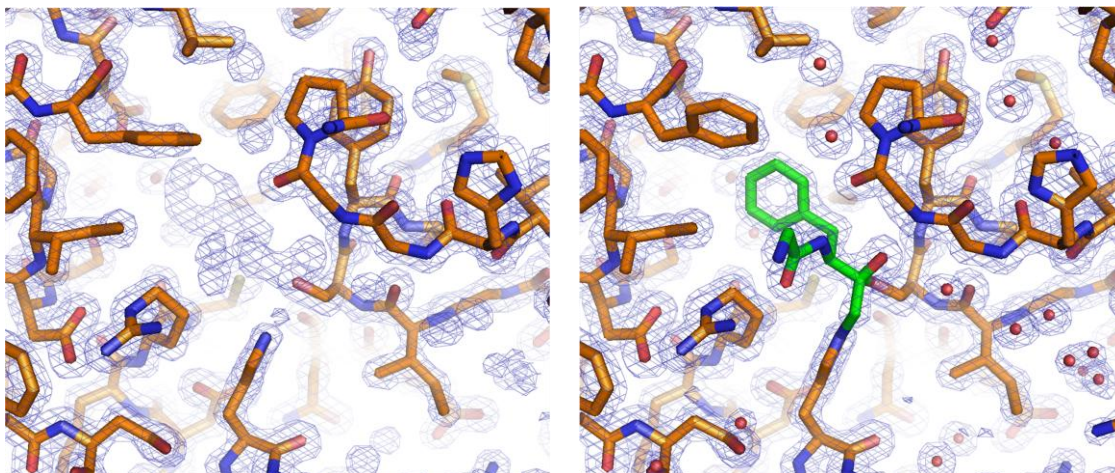


7. ábra A két elemi cella összehasonlítását szemléltető ábra

a) PhAAP/CMK trigonális elemi cellával b) PhAAP/12 rombos elemi cellával

2.1.3. Modellépítés és szerkezetfinomítás

Mivel a fázisprobléma megoldását molekuláris helyettesítéssel végeztem, a számítások eredményeképpen az elemi cellában elhelyezett és orientált modellmolekulát és az elektronsűrűségi térképet kaptam. Így a feladatom a modellmolekula térképéhez való hozzáigazítása volt úgy, hogy a nagy elektronsűrűségű régiókba illesztem/igazítom az atommagokat [31,32]. A modellen végrehajtott, helyi kézi javítások/igazítások (COOT program) [33], valamint a finomítás (REFMAC) [33] következtében a modellből számítható fázisok, és a velük számítható új elektronsűrűségi térkép is javul. Ezt modellépítési és finomítási lépések váltakozásával érhetjük el. Ekkor a térkép javulása a zajszint csökkenését is eredményezi (8. ábra).



8. ábra A finomítási és modellépítési ciklusok hatása az elektronsűrűségi térképre

Az ábrán az ún. differencia-elektronsűrűségi térkép látható, ami közelítőleg a valódi molekula térképének kétszerese és a modellmolekula térképének különbsége ($0,56e/\text{\AA}^3$)
(balra a molekuláris helyettesítés után, jobbra a finomítás végén)

A finomítási ciklusokat a PhAAP/CMK esetében REFMAC5 programmal [34] végeztem (CCP4 szoftver), amely során a modell modellhibával korrigált szórási függvényét illesztettem a mért szórási függvényhez. Ezekben a finomítási ciklusokban a program felhasznál fehérjeszerkezetekre vonatkozó általános ismereteket is (pl. sztereokémiai korlátozások, jellemző kötéshosszak, kötésszögek, torziós szögek stb.), ezekhez az „obszervációkhoz” is illeszti a szerkezetet. Ezeken kívül még alkalmaztam ún. TLS-finomítást (translation, libration, screw-rotation) is [35], amikor a modellmolekula egységesebb régióinak hőmozgási anizotrópiáját modellezhetjük. Ebben az esetben a fehérjemodell két doménje (hidroláz, propeller) volt a két kijelölt régió.

A PhAAP/12 szerkezet esetében nehézséget okozott, hogy 12 db molekula (több mint 7000 aminosav) alkotta a legkisebb vizsgált egységet. A gyenge felbontás következtében pedig sok esetben nem volt olyan egyértelműen meghatározható aminosav oldalláncok konformációja, vízmolekulák helyzete, illetve a mozgékonyabb régiókban a főlánc konformációja sem. A finomításhoz a PHENIX [36] programot használtam. Ennek a programnak előnye (többek között a REFMAC5-tel szemben), hogy a minimalizáló célfüggvény különböző tagjainak (amplitúdók illesztése, ideális geometriának való megfelelés, nem-krisztallográfiai szimmetriák, hőmozgás modellezése) hatékonyabb a súlyozása. A finomítás során nem-krisztallográfiai szimmetriákat (NCS) is alkalmaztam. Ez olyan esetekben szükséges, amikor rossz felbontású a szerkezet (ilyenkor rosszabb az adat/atomi koordináta arány). A NCS csoportokat azok a régiók alkották, amelyek a monomerek egymásra illesztésekor hasonlóak voltak (4-48, 55-78, 85-340 aminosavak a propeller doménen és 353-356, 358-373, 377-456, 458-522, 524-618 aminosavak a hidroláz doménen).

A szerkezetek validálását („jóság vizsgálat”) a CCP4 programmal végeztem (3. táblázat).

3. táblázat A finomítások eredménye

Finomítás		
Név	PhAAP/CMK	PhAAP/12
Térceport	H 3 2	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
R-faktor ^b	0,1538	0,1889
<i>R</i> _{free} ^c	0,1841	0,2381
Atomok száma		
Fehérje atomok	5174	58521
Inhibitor (CMK)	16	-
1,6-hexándiol	88	216
Mg ²⁺ /Cl ⁻	5/1	23/2
Víz	667	1568

Átlagos négyzetes eltérés az ideális geometriától		
Név	PhAAP/CMK	PhAAP/12
Térceport	H 3 2	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Kötéshosszak (Å)	0,030	0,200
Kötésszögek (°)	2,253	9,719
Trigonális/általános síkok (Å)	0,013	0,074
Átlagos B-faktor (Å ²)	17,757	40,71
Átlagos koordinátahiba (Å)	0,068	0,36
Ramachandran térkép ^d		
φ / ψ a legkedvezőbb régióban	481 (87,5%)	5896 (90,5%)
φ / ψ a megengedett régióban	63 (11,5%)	551 (8,5%)
φ / ψ a bővített megengedett és tiltott régióban	6 ^e (1%)	51+14 ^e (0,8%+0,2%)

$$^b R = \frac{\left| \sum_{\underline{h}} |F_{obs}(\underline{h})| - k |F_{calc}(\underline{h})| \right|}{\sum_{\underline{h}} |F_{obs}(\underline{h})|}$$

^cAz adatkészlet 5%-át különítettük el az *R*_{free} számítására (validálás céljából).

^dA sztereokémiai paraméterek jellemzésére a PROCHECK [37] programot használtuk.

^eAz aktív hely szerinje, és a mozgékony régiókban található aminosavak.

3. Molekuladinamikai számítások

A molekuladinamikai számítások alkalmasak makromolekulák kedvezőtlen elrendeződéseinek optimalizálására, illetve fiziológiás, egyensúlyi állapotot leíró dinamikus sokaságok előállítására. A röntgendiffrakciós mérés során egyfajta merev, korlátozottan szolvatált szerkezetet vizsgálunk. Ezzel szemben a dinamikai vizsgálat lehetővé teszi, hogy a molekulát szolvatált közegbe helyezzük, így engedélyezzük a szabadabb mozgást. Ehhez szükséges egy megfelelő modellrendszer alkalmazása.

3.1. Mozgásegyenlet és erőter

Az elektronok sokkal gyorsabban mozognak, mint az atommagok, és ez a két mozgás különválasztható (Born–Oppenheimer közelítés). Az atommagok helyzetétől függő potenciális energiefelület a Schrödinger–egyenlet alapján lehetne számítani, ez azonban lehetetlen egy több ezer atommagot tartalmazó fehérjemolekula esetében. Ezért a molekulák szerkezetét és szerkezeti átalakulását vizsgálva, a molekulát rugókkal összekötött, töltéssel rendelkező tömegpontok összességének tekintjük (klasszikus modell-rendszer), ahol az atommagok mozgását követjük, amit az elektronfelhő kiátlagolt hatása befolyásol.

Az atommagok mozgásának leírására a Newton–féle mozgásegyenletet használjuk,

$$F_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} \quad (i=1 \dots N) \quad (1)$$

ahol F az erő, m a redukált tömeg, r az atom-atom távolság és t az idő.

A lokálisan ható erőket pedig egy empirikus potenciálfüggvényből számítjuk,

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad V(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (2)$$

Az empirikus energiaegyenlet matematikai alakját és a benne szereplő állandókat ún. erőterként (*forcefield*) definiáljuk. Fehérjékre vonatkozó számításokhoz alkalmazott legismertebb erőterek: AMBER, GROMOS, ECEPP, CVFF és az általunk is alkalmazott CHARMM27 [38].

Az energiafüggvény alakja:

$$\begin{aligned}
 V = & \sum_{bonds} k_b(b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} k_\phi[1 + \cos(n\phi - \delta)] \\
 & + \sum_{impropers} k_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \sum_{Urey-Bradley} k_u(u - u_0)^2 \\
 & + \sum_{nonbonded} \varepsilon \left[\left(\frac{R_{minij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{minij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{3}$$

ahol a tagok a kötéshosszak (1. tag), a kötésszögek változásához kapcsolódó (2. tag), a torziós szögek változásából eredő (3. tag), a nem-kötő kölcsönhatások leíró, atomok sík csoportból való kitéréséhez illetve a kiralitás-kényszerek megsértéséhez köthető (4. tag), illetve a szomszédos kötésen át ható Urey–Bradley erők (5. tag) valamint a sztérikus effektusokat leíró Van der Waals (6. tag) és a töltések közti Coulomb kölcsönhatásból (7. tag) eredő erők.

A képletekben szereplő paraméterek (erőállandók k_i), az ideális elrendeződést leíró geometriai paraméterek (b_0 , θ_0 , ϕ_0 , ω_0 , u_0 , R_{min}) és egyéb állandók (ε) röntgendiffrakciós mérésekből (a paraméterek átlagos értékei és szórásai egy adott vegyületcsaládon belül), spektroszkópiai analízisekből és kvantumkémiai számításokból származtatott adatok.

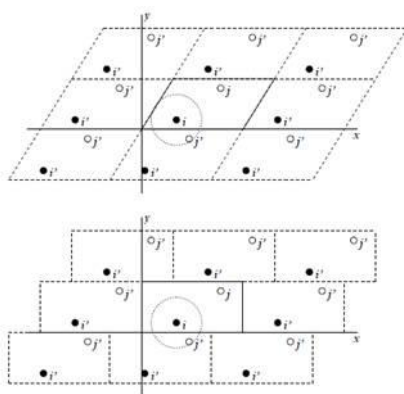
3.2 Energiaminimalizáció

Az energiaminimalizáció célja, a potenciálfelület legközelebb eső lokális minimumainak megkeresése, ahol a molekulánk számára energetikailag kedvező és feltételezhetően jellemző térszerkezetet vesz fel. Számításaink során két algoritmust alkalmaztunk, ezek közül az egyik a legmeredekebb esés módszere, ahol a következő potenciális energia-felületen való elmozdulás az energiafelület deriváltjának (gradiens) irányába történik egy vonalmenti keresés minimumpontjába (hátránya, hogy a minimum közelében rosszul konvergál). A másik módszer a konjugált gradiensek módszere, ahol a lépés irányához számított gradienst az előző lépések deriválási eredményeivel korrigáljuk. Mi a Polak-Ribiere konjugált gradiens módszert használtuk a minimum-közeli optimalizációs lépések során [39].

3.3. Molekuladinamika (MD)

Korábban már említettem, hogy célunk a fehérjemolekula dinamikus viselkedésének vizsgálata. Ennek kivitelezéséhez használtuk (1) és (2) egyenleteket – a rendszer mozgását newtoni mechanika alapján szimuláltuk, a rendszerben fellépő erőhatásokat pedig az energiafüggvényből számítottuk. Első lépésben az általunk választott hőmérsékletnek megfelelő atomi sebességeket, valamint δt integráláshoz szükséges „lépésintervallumot” határoztuk meg (tipikusan néhány femtoszekundum). Az időlépés hosszát úgy választottuk, hogy lényegesen kisebb legyen, mint a vizsgálni kívánt leggyorsabb mozgás frekvenciájának reciproka.

A molekulánkat egy oldószert tartalmazó dobozba foglaltuk, amelynek méretét úgy választottuk meg, hogy ha az azonos dobozokkal lenne körülvéve, akkor se érzékelje közvetlenül a szomszédos dobozban elhelyezkedő fehérje molekulát. Rendszerünket az ilyen módon létrehozott dobozzal azonos dobozokból felépített végtelen rendszernek tekintettük (9. ábra), így a szabad mozgás mellett az állandó anyagmennyiséget is biztosítani tudtuk (ha egy molekula „kiúszott” a dobozból, annak másolata az azonos szomszédos dobozból az ellenkező irányból „beúszott”), valamint a távolható kölcsönhatások (leginkább a töltések közötti Coulomb kölcsönhatás) egyértelműen meghatározott összegzését a Particle-Mesh Ewald módszerrel végezhetjük [40,41].



9. ábra A periodikus határfeltételek szemléltetése

3.3.1. A dinamikai szimuláció globális algoritmusa

1. Kiindulási feltételek megadása

A lehetséges kölcsönhatások és az atomi pozíciók megadása: összes lehetséges atom pozíciója (r) és kiindulási sebessége (v). Ez utóbbi a kezdeti lépésben egy véletlenszerűen generált sebesség-eloszlás, amely megfelel a kívánt szimulációs hőmérsékletnek (esetünkben 300 K), a többi lépésben az előző lépésben keletkezett adatok „öröklődnek”.

2. Az erők számítása

Egyetlen atomra ható erő számolása az

$$F_i = \sum_j F_{ij} \quad (4)$$

képlet alapján a kötő és az egymással nem közvetlenül kötött atompárok között, valamint a nemkötő-kölcsönhatásból származó erők számítása, majd ennek felhasználásával az atomi sebességek hozzárendelése. A potenciális, a kinetikus energiák és a nyomás tenzor számítása a sebességek szükség szerinti korrekciója a definiált kényszerfeltételek, illetve a kívánt hőmérséklet és nyomás értékeknek megfelelően.

3. Szerkezet módosítás

Az atomok elléptetése a választott időlépés figyelembevételével a Newton-féle mozgásegyenlet alapján numerikusan számítva. Esetünkben ez a velocity-Verlet algoritmust [42] használva történt.

4. Végso lépés

Atomi pozíciók, sebességek, energiák, hőmérséklet, nyomás összegzése és dokumentálása. A 2., 3. és 4. lépés addig kerül ismétlésre, amíg az előre megszabott szimulációs idő végére nem értünk.

3.4. A *Pyrococcus horikoshii* acilaminoacil-peptidáz rendszer vizsgálata

A rendszer energiáját több lépésben minimalizáltuk úgy, hogy csökkenő erősségű kényszereket alkalmaztunk a fehérje atomjaira. A minimalizáció első lépése során rögzített fehérje szerkezet mellett a vízmolekulák helyzetét optimáltuk, majd fokozatosan kiegészítettük a fehérje-atomok helyzetének lokális optimálásával. Ezután kezdődött a dinamikai szimuláció. A PhAAP rendszer tanulmányozásához 2 fs-os időlépést választottunk. Előkészítésként, ismét alkalmazva a fehérje atomokra a csökkenő erősségű rögzítő-kényszerek rendszerét, rövid (3 x 200 ps) „restrained”-dinamikai szimulációkat majd a rögzítő kényszerek kikapcsolása után egy nyomás-stabilizáló szimulációt végeztünk (200 ps) kanonikus sokaság alkalmazásával (rögzített anyagmennyiség, térfogat és hőmérséklet).

A szolvatált fehérje-rendszerünk egyensúlyba juttatása és az adatgyűjtés nagykanonikus sokaság alkalmazásával történt, ezért az anyagmennyiség mellett a rendszer hőmérsékletét és

nyomását is állandó értéken tartottuk, Nose-Hoover termosztát [43,44] és Berendsen barosztát [45] alkalmazásával. A ligandummentes illetve az 1,6-hexándiolt tartalmazó monomer szerkezeteken végzett szimulációk 60 ns-ig tartottak.

4. Eredmények értékelése és következtetések

4.1. Kezdeti feltevés

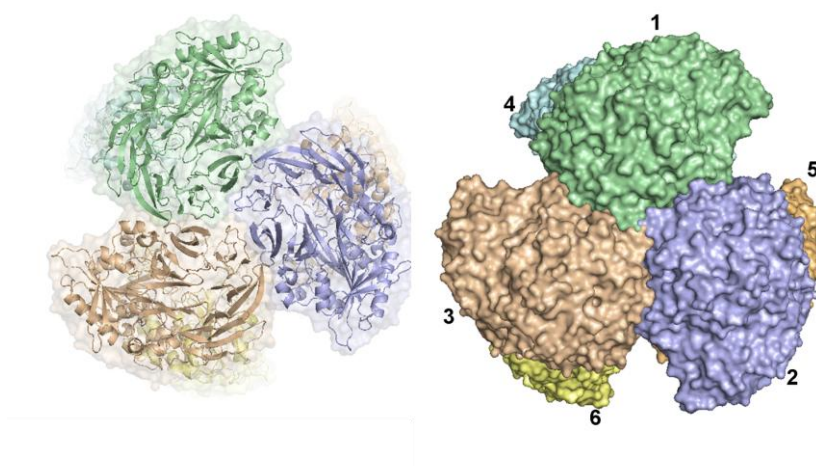
Vizsgálatunk célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy a korábban meghatározott oldószeres PhAAP/hexándiol szerkezethez képest, okoz-e változást az aktív helyen egy kovalens szubsztrát-szerű inhibitor kötődése, illetve hogy ez hatással van-e a fehérje globális térszerkezetére. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy hogyan valósul meg a méretszelekció és hasítási mechanizmus.

A kutatás adott pillanatában valószínűsítették, hogy a fehérje felszíni polaritása befolyásolja a szubsztrát szelekciót. Mivel a fehérje üregében elég szűk a hely, a behatolt szubsztrát már nem tud orientációt változtatni a molekula belsejében. Ezért kiemelt szerepet kap a molekula oldalán található „belépő kapu” polaritása.

4.2. A meghatározott kristályszerkezetek

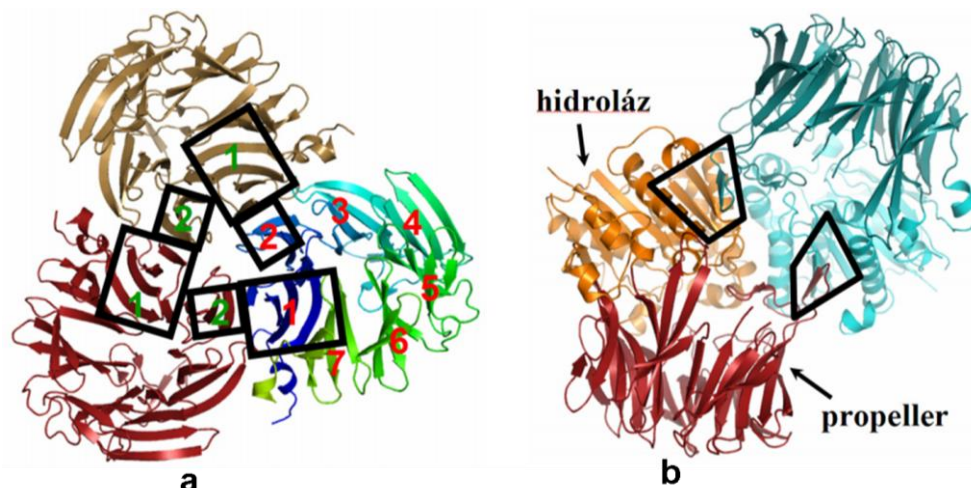
Az általam meghatározott PhAAP/CMK szerkezet jobb felbontással rendelkezik (1,6 Å) mint az eddigi mérések. A jobb felbontás előnye, hogy pontosabban megfigyelhetők a korábban kevésbé egyértelműen meghatározott pl. mozgékonyabb régiók. Ennek következtében beépítettem tizenegy további aminosavat (Glu51, Asp52, Gly53, Glu80, Glu81, Lys82, Lys83, Asp128, Lys373, Glu374, Gly375, Lys618), így már csak négy aminosav hiányzik a fehérjeláncban az N- és két aminosav a C-terminusról. Ezek azonban olyan mozgékony régiók, amelyek rendezetlenek a kristályban, és ezért az elektronsűrűségi térképen (ami a kristálybeli molekulák elektronsűrűségének átlaga) nem azonosíthatók.

A PhAAP/CMK komplex a biológiailag aktív hexamer formájában kristályosodik (10. ábra).



10. ábra A PhAAP/CMK hexamer alakja
(az egyes monomereket szám jelöli)

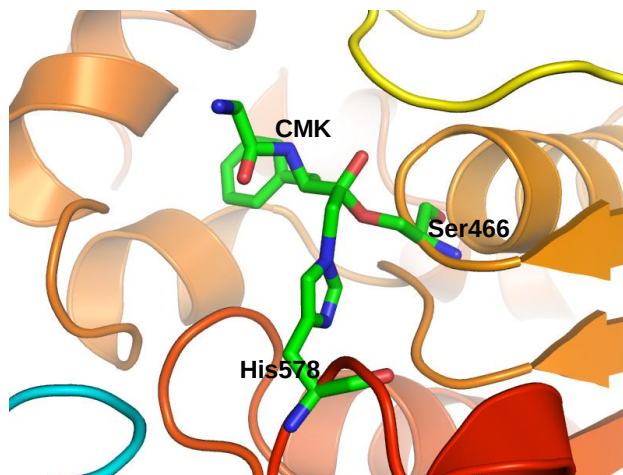
A hexamerizációban a propeller régióban az 1-es és a 2-es számú propeller lapát vesz részt (11. ábra, a), míg a hidroláz domén szabad β -éle lép kapcsolatba a szomszéd monomer 3. propeller lapátjában található inzercióval (11. ábra, b).



11. ábra A hexamerizációban résztvevő monomer régiók [22]

a) hexamerizáció a propelleren, b) a hidroláz és a propeller domén kapcsolata két monomer esetében

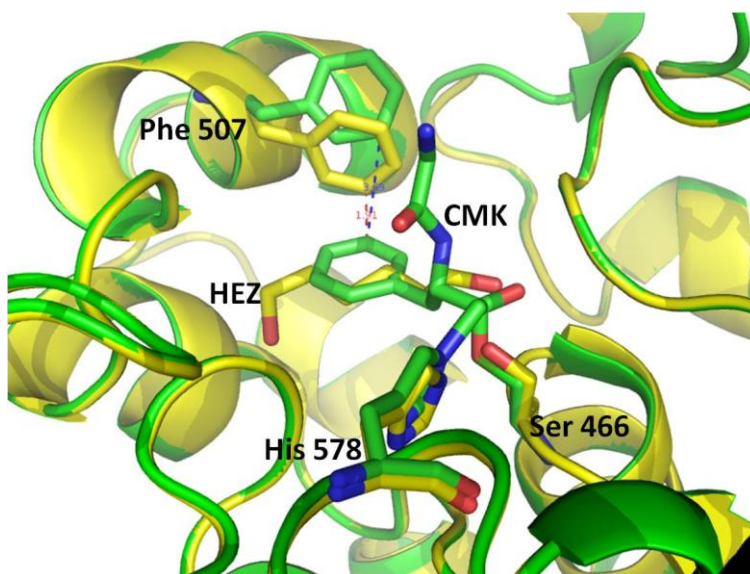
A megoldott szerkezetből megállapítottam, hogy a kovalens inhibitort tartalmazó szerkezet globális konformációja nem tér el – néhány kivétellel – az 1,6-hexándiolt tartalmazó szerkezettől. A kristályban megfigyelt aktívhely-konformáció is nagyon hasonló, annak ellenére, hogy a létrejött tetraédes elrendeződésű komplexben az inhibitor az aktív hely szerin és hisztidin oldalláncával is kovalens kötést alkot (12. ábra).



12. ábra A kovalensen kötött klórmetil-keton inhibitor (CMK) tetraédes konformációja az aktív hellyel

A klórmetil-keton (CMK-Phe-Gly-Gly-Z, szerkezeti képlet ld. 3. ábra) inhibitorból a CMK-csoport és az utána következő két aminosav látszik csak, a Z-védőcsoport egyáltalán nem, a második glicin pedig csak kevéssé volt látható az elektronsűrűségi térképen (12. ábra). Ennek a Z-Gly rész rendezetlensége lehet az oka, de az is lehetséges, hogy az inhibíció előtt lehasította az enzim.

A szubsztrát analóg kötődésekor kisebb, indukált átrendeződést tapasztaltam a Phe507 oldallánc konformációjában, ami elmozdult az inhibitorban található fenil-alanin gyűrű taszítása miatt (13. ábra).



13. ábra Konformáció változás az aktív helyen

Sárga színnel ábrázolva a hexándiolt (HEZ) tartalmazó, zöld színnel ábrázolva a kovalens inhibitor tartalmazó szerkezet

A két hexamert tartalmazó szerkezetben (PhAAP/12) a katalitikus szerin helyett alanin szerepel a monomerekben (katalitikusan inaktív mutáns forma), ezért értelemszerűen nem szolgáltatott új információt az aktív hely konformációjáról.

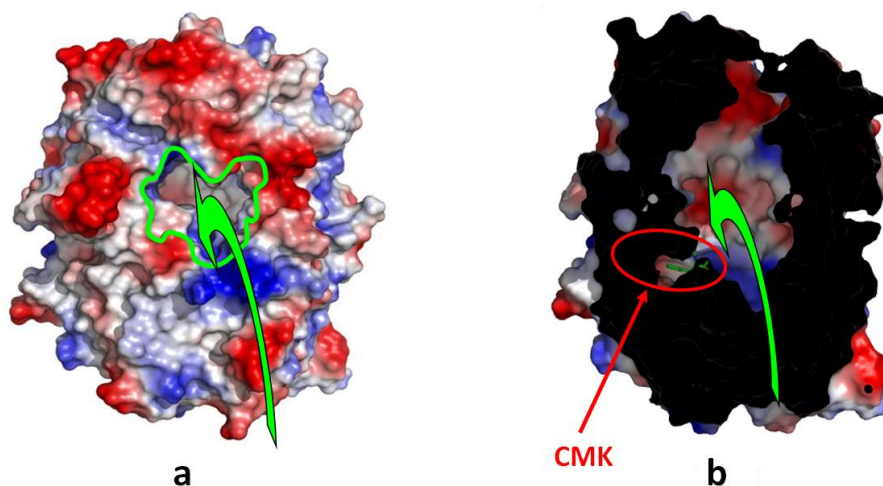
Az PhAAP/CMK és a PhAAP/hexándiol szerkezet ilyen nagymértékű hasonlósága arra utal, hogy az enzim egy előre formált aktív helyet tartalmaz (14. ábra).



14. ábra A PhAAP-oldószer komplex és a PhAAP inhibitorral képezett szerkezetének összehasonlítása

Sárga színnel ábrázolva a 1,6-hexándiol molekulát és zöld színnel ábrázolva a CMK kovalens inhibitor tartalmazó szerkezet

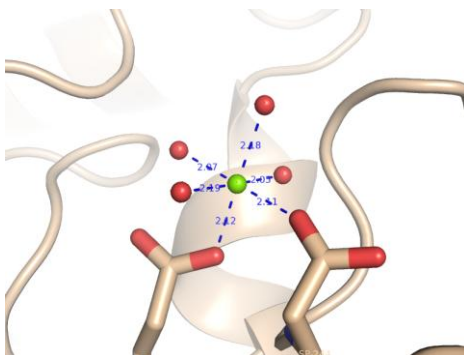
A szubsztrát kötés korai fázisának jobb megértéséhez vizsgáltam a molekulafelszín töltéseloszlását is. A 15. ábrán látható a belépőnyílás közvetlen környezetét meghatározó késsel jelölt pozitív polaritású felszín az üreg belsejében folytatódik. Ez valószínűleg a negatív töltésű C-terminálist vonzza maga felé, így megvalósulhat a szubsztrát megfelelő orientálódása már az enzimhez való kötődést megelőzően.



15. ábra A PhAAP molekuláris felszíne elektrosztatikus potenciál szerint színezve (kék:negatív, piros:pozitív)

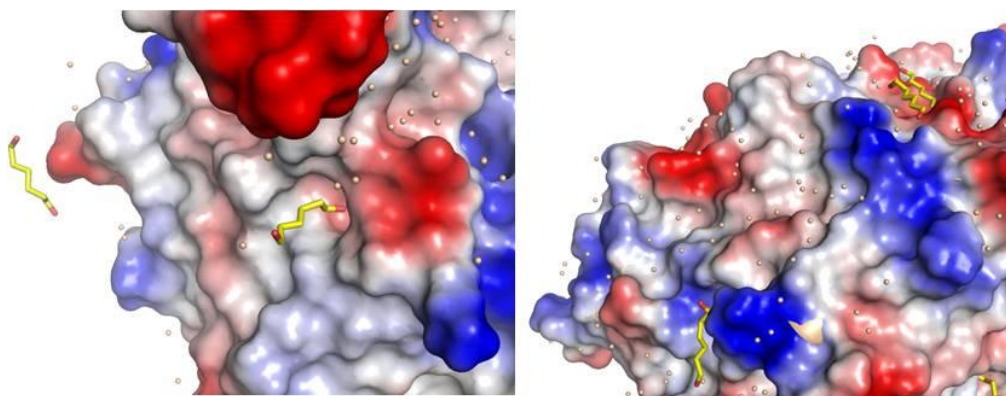
a) a belépőkapu környéke b) bekarikázva pirossal az inhibitor elhelyezkedése az enzim "üregében" (metszeti kép)

Azonosítottam a PhAAP/CMK szerkezetben öt (a PhAAP/12 szerkezetben huszonhárom) magnézium iont, amik oktaéderez elrendeződésben koordinálnak karboxil oldalláncú aminosavat (pl. két aszparaginsavat) és négy vízmolekulát (16. ábra). Ez előbbieknél fiziológias jelentőségük is lehet – az emberi szervezetben előfordulnak ún. Mg^{2+} által aktivált enzimek. Ezeknél az enzimeknél a Mg^{2+} hozzákapcsolódik az enzimhez, így részt vesz a szerkezet stabilizálásában, ezáltal az enzim aktivitását befolyásolja [46]. A PhAAP-ra vonatkozóan eddig nem merült fel, hogy ilyen enzimről lenne szó, mindazonáltal érdekes, hogy képes arra, hogy az oldószerben jelenlévő Mg^{2+} -ionokkal ilyen jellegű komplexet alkosson.

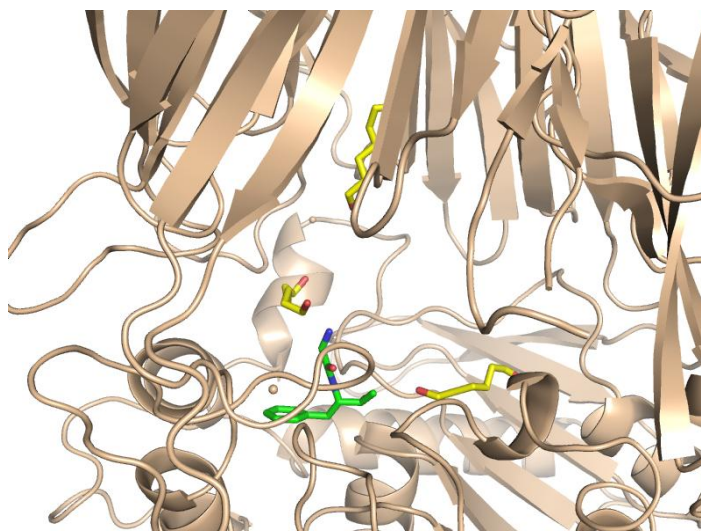


16. ábra Mg^{2+} ion oktaéderez koordináció kialakítása a Asp244 (bal), a Glu263 (jobb) és négy vízmolekula segítségével

Meghatároztam tíz (a PhAAP/12 szerkezetben huszonhét), az oldószerből a fehérje felszínén másodlagos kötésekkel stabilizálódott hexándiol molekula helyzetét is. A PhAAP/12 szerkezetben megfigyelt hexándiol molekulák helyzete megegyezett a PhAAP/CMK szerkezetében találhatókéval. Hét a molekula külső felszínén, kettő a hidroláz domén zsebében, egy pedig a propeller doménben a lapátok között kötődött meg (17., 18. ábra).

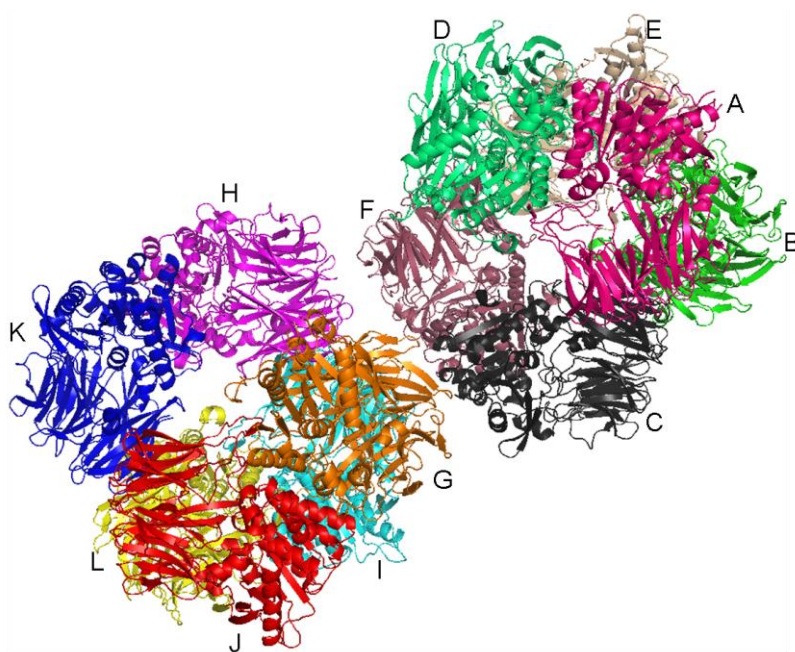


17. ábra A molekulafelszín közelében található 1,6-hexándiol molekulák (sárga színnel ábrázolva)



18. ábra Az enzim belsejében található 1,6-hexándiol molekulák (sárga színnel ábrázolva, zöld színnel a kovalens inhibitor)

A PhAAP/12 szerkezetből megállapítottam, hogy a tizenkét monomert egymáshoz képest hasonló (4. táblázat). A domének nyílásszöge gyakorlatilag megegyezik a két hexamer negyedleges szerkezete is igen hasonló egymáshoz és a másik kristályformában látott hexamerhez is. A monomerek közötti eltéréseket a hexamerek külső, intermolekuláris kontaktusokban részt nem vevő felszínén található oldalláncok, a propeller domén csúcsán található aminosavak és a mozgékony (magas hőmozgékonyági faktorról jellemezhető) régiókban (I, J, K és L monomerek) tapasztaltam (19. ábra).



19. ábra A tizenkét monomert tartalmazó szerkezet
(az egyes monomerek A, B, ... stb. jelöléssel)

4. táblázat A tizenkét monomer (A,B,...stb. jelöléssel) egymásra illesztéséből kapott alfa szénatomok átlagos négyzetes eltérése

	B→A	C→A	D→A	E→A	F→A	G→A	H→A	I→A	J→A	K→A	L→A
rms/Å	0,313	0,310	0,313	0,311	0,312	0,343	0,341	0,697	0,711	0,682	0,695

Az alfa szénatomok átlagos négyzetes eltérésére kapott értékekből látszik, hogy az egyes monomereken belül a két domén helyzete adott. A hexamer téralkata szimmetrikus ebben a szerkezetben is. Az, hogy a hexamerek nagyon hasonló szerkezetűek az eltérő molekuláris környezet ellenére is, arra utal, hogy a hexamer merev szerkezetű, nincs nyíló/csukódó mozgása.

4.3. A molekuladinamikai szimulációk eredményei

A számítás alapját az a kérdésfeltevés adta, hogy vajon a röntgenszerkezetben az aktív helynél megfigyelt oldószer molekula [22] rendelkezik-e szerkezetformáló hatással, vagy az előre formált, merev szerkezetű kötőhelyre kötött be.

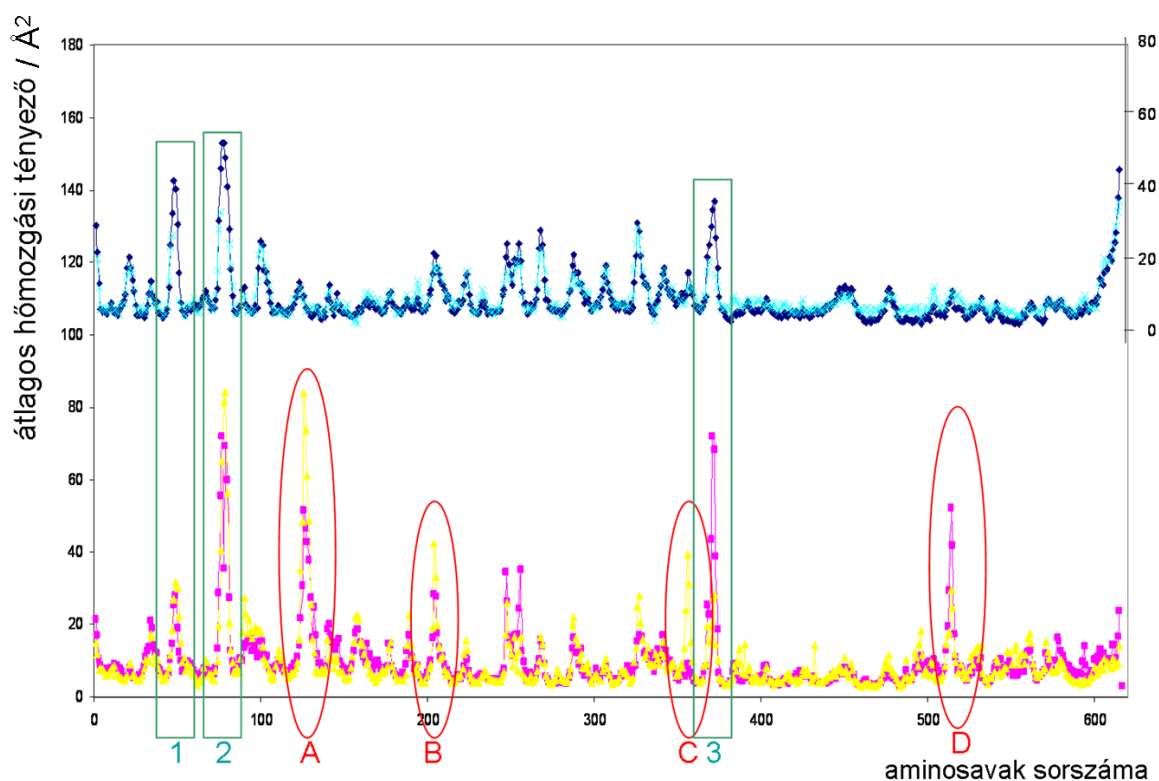
A PhAAP enzim ligandummentes (PhAAP/üres) állapotára és az 1,6-hexándiollal képzett komplexére (PhAAP/hexándiol) végeztem molekuladinamikai szimulációkat. A PhAAP a természetben és kristályszerkezeteiben is hexamer. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a PhAAP-t a hexamerből kivéve és oldatbeli dinamikáját monomerként vizsgálva milyen torzulások következnek be a szerkezetben, például változik-e az aktív hely konformációja.

4.3.1. A ligandummentes és a komplexált állapotra vonatkozó eredmények összevetése

A számított trajektóriákból (a szimuláció időbeli lefutását jellemző függvényből) az egyensúlyi szakaszon átlagszerkezetet képeztem, és ezen a modellen vizsgáltam a fehérjemolekulán belüli egyes kisebb régiók mozgékonyaságát (20. ábra, 5. táblázat). Mindkét esetben tapasztaltam, hogy azok a régiók rendelkeztek a legnagyobb hőmozgási tényezőkkel, amelyek a kristályszerkezetben is kevésbé jól definiált, mozgékony régiókat alkottak (20. ábrán rendre 1,2,3 számokkal jelölve a Glu51-Gly53, Glu80-Lys83, Lys373-Gly375). A két szerkezet közötti eltéréseket is tapasztaltam, ezek olyan régiók, amelyek hexamer szerkezet kialakulásáért felelős kontaktusokban résztvevő aminosavak, valamint a 4. propeller lapát felső régiója (ami a propeller későbbi elmozdulására utal) alkotnak (20. ábrán rendre A-val, B-vel, C-vel, D-vel jelölve az Asp128-Phe133, Ile359, Asn207, Pro516-Asn519). A mért és számított atomi mozgástényezők hasonlósága és a különbségek kézenfekvő magyarázata igazolja, hogy a szimulációk kielégítően leírják a vizsgált rendszer alapvető adottságait, így megfelelő modellt biztosítanak a molekuláris kölcsönhatások részletesebb elemzéséhez.

5. Táblázat Az átlagos hőmozgástényezők eltérésének és hasonlóságának értelmezése a kristályszerkezetben és a dinamikai modellen

A molekuladinamika során legmozgékonyabb régiók			
PhAAP/CMK kristályban mozgékony		PhAAP/CMK kristályban merev	
1	Glu51-Gly53	A	Asp128-Phe133
2	Glu80-Lys83	B	Asp207
3	Lys373-Gly375	C	Ile359
		D	Pro516-Asn519



20. ábra Az egyes aminosavak hőmozgási tényezője (300K)

Késsel ábrázolva a röntgenszerkezetek, világoskékkel a hexándiol (PhAAP/hexándiol), sötétkéssel az inhibitort (PhAAP/CMK) tartalmazó szerkezet, eltolva 100 Å²-mel a dinamikai modellekhez képest, saját y értékét ld. jobb oldali függőleges tengelyen. Rózsaszínnel ábrázolva az „üres” (PhAAP/üres), sárgával ábrázolva a hexándiol (PhAAP/hexándiol) tartalmazó szerkezet molekuladinamikai modellje.

Fontos megfigyelni, hogy a PhAAP ligandummentes és az 1,6-hexándiollal képzett komplexének szimulációja jellegében igen hasonló atomi mozgástényező-eloszláshoz vezetett. A dinamikus sajátosságokon túl a két átlagszerkezet szerkezetileg is igen hasonló, a fehérjegerinc jól illeszthető egymáshoz: az illesztés után a gerincatomok helyzetének átlagos négyzetes eltérése az összes aminosavra 1,0 Å, a propeller doménre 1,1 Å, míg a konzerváltabb hidroláz doménre 0,9 Å (21. ábra).



21. ábra A molekuladinamikai szimulációval kapott átlagszerkezetek összehasonlítása

1,6-hexándiol-enzim komplex (sárga színnel ábrázolva) és a ligandummentes szerkezet (kék színnel ábrázolva) összehasonlítása

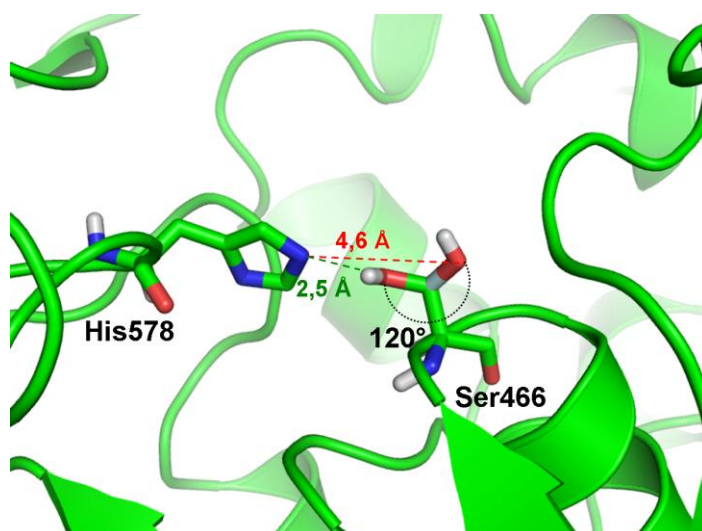
Míg a katalitikus reakció lejátszódásának előfeltétele a katalitikus triád aminosavai közötti két hidrogénkötés (Ser-His és His-Asp), mindkét szimulációban azt tapasztaltam, hogy a szerin hidroxil-oxigénje (OG) és a hisztidin oldallánc nem protonált nitrogénje (NE2) H-híd kötő távolságon kívülre kerülnek egymástól (6. táblázat), a hisztidin oldallánc protonált nitrogénje (ND1) azonban szinte végig kapcsolatban marad a triád harmadik tagjával, az aszparaginsav OD2 oxigénjével.

6. táblázat A katalitikus triád karakterisztikus távolságai a PhAAP ligandummentes illetve az 1,6-hexándiollal képzett komplexének molekuladinamikai szimulációja alapján

A oszlop a távolságot (Å-ben), B oszlop azon szerkezetek arányát mutatja, melyekben az adott két atom közt H-híd formálódik. Pirossal jelölve a H-híd távolságon kívül, zölddel a H-híd távolságon belül és feketével a köztes távolságban található atomok

	PhAAP/üres		PhAAP/hexándiol	
	A	B	A	B
Ser466 OG – His578 NE2	4,6 Å	0,2 %	4,0 Å	0,0 %
His578 ND1 – Asp546 OD1	3,4 Å	20,9 %	3,4 Å	12,7 %
His578 ND1 – Asp546 OD2	2,9 Å	96,1 %	2,9 Å	94,8 %
Ser466 OG – HEZ O1	-	-	4,5 Å	0,6 %
Ser497 OG – HEZ O6	-	-	2,9 Å	94,6 %
Arg548 O – HEZ O6	-	-	4,9 Å	0 %
Gly387 O – HEZ O1	-	-	2,9 Å	83,1 %

Az átlagszerkezetben azt is megfigyeltem, hogy az aktív szerin, bár nincs H-hidas kapcsolatban a hisztidinnel, olyan konformációban található, amely a triád-beli aktív konformációnak természetes rotamere, így egy C-C kötés menti 120°-os fordulattal megfelelő közelségébe kerülhet (2,5 Å) a His578 gyűrűjéhez (22. ábra).



22. ábra Az "üres" átlagszerkezet aktív hely konformációja a Ser466 két megkülönböztetett rotamerével és az atomtávolságok (His NE2-Ser OG) feltüntetésével

A szerin oldallánc elmozdulását mindkét esetben a kiterjedtebb solvatációval lehet magyarázni. A katalitikus Ser466 és a His578 közé mindkét szimulációban beférkőzik egy vízmolekula, úgy, mint az 1,6-hexándiollal képzett komplex szerkezetének vizsgálatakor a Ser oldallánc és a hexándiol molekula közé. A két domén közti üregben közel 100 vízmolekula található a szimuláció során (7. táblázat).

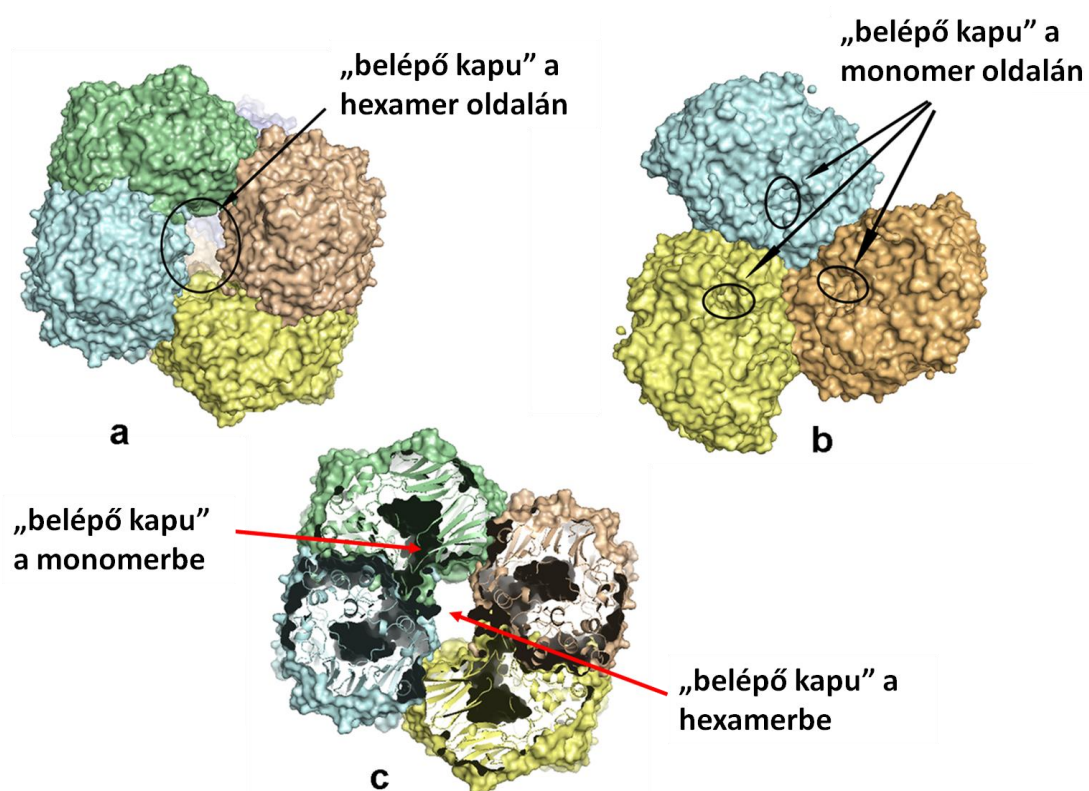
7. táblázat Az alacsony hőmozgás-tényezőjű vízmolekulák előfordulási valószínűsége hidrogénkötésben a katalitikus Ser és His aminosav oldalláncokkal (utolsó 2 ns)

Ratamirukus Ser466-His578 aminosav-bridgénekkel (utolsó 2 His)		
PhAAP/üres	van vízmolekula hidrogénkötésben	van vízmolekula mindkét aminosavval hidrogénkötésben
Ser466	91,6 %	22,4 %
His578	98,8 %	
1,6-hexándiol komplex		
Ser466	100 %	22,6 %
His578	81,9 %	

Megállapítottam, hogy a szimuláció során a szerkezet végig „nyitott” konformációban van, vagyis a szubsztrát a két domén közti nyíláson keresztül szabadon hozzáférhetne az aktív helyhez. Ezzel szemben az ApAAP esetében a nyitott szerkezetekben a katalitikus triád inaktív, hasításra képtelen állapotban van, az enzim emiatt nem tud nagyobb méretű fehérjéket elhasítani, amelyek csak az enzim nyitott állapotában férnének az aktív helyhez [19]. A PhAAP esetében a katalitikus aszparaginsav és hisztidin közötti kapcsolat nem szűnik meg, és a Ser466 is olyan konformációt vesz fel, ami lehetővé teszi, hogy be tudjon

kapcsolódni a triádba, tehát könnyen össze tud „szerelődni” az aktív hely. A szubsztrát kötődése kényszeríti az aktív szerint egy magasabb energiájú állapotba (feszített konformációba), ez biztosíthatja a szubsztrát hasításához szükséges többletenergiát is [47].

A PhAAP esetében tehát a nem szubsztrát fehérjék és peptidek védelmét más mechanizmusnak kell biztosítania. Eredményeink szerint ez a hexamerizáció, amely két egyre szűkülő belépő nyílason kényszeríti át a szubsztrátot (23. ábra).

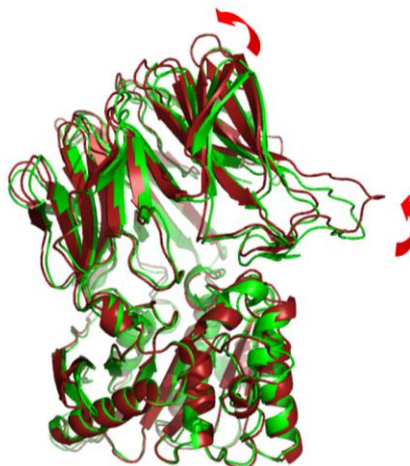


23. ábra A PhAAP-CMK rendszerben a hexamerizáció által kialakított csatornarendszer

- a) a hexamer oldalán található nyílás (mérete 10x30 Å)
- b) a monomerek oldalán található nyílások (mérete 10x20 Å) a hexamer belsejéből tekintve
- c) a csatornarendszer szemléltetése, a kétféle belépő nyílás elhelyezkedése egymáshoz képest (metszeti kép)

4.3.2. A szimulációval kapott oldatbeli szerkezetek összevetése a kristályszerkezetekkel

Az összehasonlításhoz rendelkezünk kellett egy megfelelően hosszabb szimulációval (60 ns). A modellen a meghosszabbított szimuláció utolsó szakaszában a solvatáció okozta általános relaxáció mellett, egyfajta nyílási folyamatot figyeltem meg a propeller doménen (24. ábra). A hidroláz domén kristályszerkezetére valódi illesztése után a gerincatomok átlagos négyzetes eltérése a hidroláz és propeller doménre rendre 0,8 Å és 3,6 Å. Ez feltehetőleg azzal hozható összefüggésbe, hogy a molekuladinamika során monomer alakban vizsgáltam a fehérje molekulát, a kristályos és biológiailag aktív formája azonban a hexamer.



24. ábra A domének közötti elmozdulás

Zöld színnel a kristályszerkezet, vörös színnel a molekuladinamikai szimulációból számított átlagszerkezet

A monomer és a hexamer szerkezetek globális konformációja közti különbségeket úgy foglalthatjuk össze, hogy a szimuláció során érvényesülő teljesebb solvatáció következtében fellazul a monomer szerkezete, a partnermolekulák távolléte pedig azt eredményezi, hogy a két domén közti üreg képessé válik egyfajta mérsékelt felnyílásra, azonban még így is elég szűk ahhoz, hogy a szubsztát méretszelekciót biztosítsa. A hexamerizáció tehát nem pusztán a monomer oldali belépőnyílás „leárnyékolásáért”, hanem a hidroláz doménen található szabad β -él (a központi β -redő szélső β -szála, „ragadós” széle) védelméért is felelős.

Az enzimes család többi tagjával összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy a család szabad β -élel rendelkező tagjainál (dipeptidil-peptidáz IV, acilaminoacil-peptidázok (PhAAP, ApAAP)) fenn áll az aggregáció veszélye [7].

A molekuladinamikai szimulációk kimutatták, hogy ezek monomer formájában viszonylag stabilak, a szabad β -él védelmét pedig multimerizációval biztosítják (PhAAP hexamer, DPP-IV és ApAAP dimer). A család többi tagjánál szerkezetileg „fedett” ez a katalitikus hisztidin szerkezeti stabilizálásában fontos β -szál, így monomer formában fordulnak elő.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a korábbi megfigyelésekkel [7] összhangban a PhAAP és az ApAAP multimerizációja feltehetőleg nem a monomer stabilitásának növekedését szolgálja, hanem a nem specifikus aggregáció elleni védekezés.

Összefoglalás és kitekintés

A jelenleg folyó kutatások (ApAAP, PhAAP) arra a kérdésre keresik a választ, hogy milyen paraméterek befolyásolják az acilaminoacil-peptidáz enzimek szelektivitását. A domén szerkezetből adódóan (hidroláz és propeller domén, közöttük viszonylag mozgékony összekötő szakasz) azt feltételeztük, hogy a sejtben az enzim előfordulhat „nyitott” illetve „csukott” formában is. De vajon mitől függ, hogy az egyik, vagy a másik, esetleg mindkét forma fordul-e elő?

A munkám során meghatározott PhAAP-inhibitor komplex térszerkezete jó közelítéssel megegyezett az aktív helyen 1,6-hexándiolt tartalmazó szerkezettel. Kivételt képezett egy az aktív helyhez közeli fenil-alanin (Phe507), amelynek gyűrűje elbillent, mert az inhibitor fenil-alaninjának nagyobb a térigénye a karcsú hexándiol molekuláéhoz képest. A molekuladinamikai szimulációkkal igazoltam, hogy az 1,6-hexándiol jelenléte nem okoz jelentős változást a ligandummentes állapothoz képest, így a két kristályszerkezet, az „üres” és a szubsztrát kötött állapot összehasonlításához alkalmazható. A két szerkezet nagyfokú hasonlósága arra utal, hogy az enzim előre formált aktív helyet tartalmaz, és az ApAAP enzim esetében tapasztaltakkal ellentétben nem mutat „nyitott-csukott” átalakulást szubsztrát kötődéskor. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a méretszelektivitásról az enzim oldalán található „belépőkapu”, illetve a hexamerizáció gondoskodik.

Az oldatfázisú szimulációink kimutatták, hogy a katalitikus triád hidrogénkötés rendszere szubsztrátmentes állapotban általában nem teljes, de a szerin oldallánc elfordulásával könnyen helyreállítható. Lehetséges, hogy a szubsztrát megkötődésekor tolódik el ebbe az irányba a konformációs egyensúly. Ennek a hipotézisnek a vizsgálatára molekuladinamikai szimulációt tervezünk az enzim-szubsztrát komplexszel. A molekuladinamikai szimulációból kapott modelleken megmutattam, hogy a fehérje monomer alakban, nagymértékű solvatáció hatására mérsékelt felnyílásra képes (erre hexamer alakban nincs lehetősége a szoros kapcsolat miatt). Azonban ebben a globálisan fellazult állapotban is könnyen aktiválható marad a katalitikus triád.

Összefoglalva, a *Pyrococcus horikoshii* acilaminoacil-peptidáz monomerének sajátos „nyitott” szerkezete az ApAAP-val szemben egy meglehetősen merev, a nyitott és a csukott szerkezet közötti átmeneti állapotban található. Míg az ApAAP dimerek a nyitott (inaktivált) és a csukott (aktív) formák dinamikus egyensúlyaként várják a szubsztrát érkezését a PhAAP merev hexamer szerkezete komplex kettős „beléptető rendszert” hoz létre. Egy tágasabb

nyílás található a monomer egységek között, amelyen áthaladva a szubsztrátnak még a monomer oldalán nyíló annak belsejébe vezető szűkebb csatornán is át kell haladnia. Eddig még nem sikerült röntgenkristallográfiával eukarióta eredetű AAP-t vizsgálni, ezért a közeljövőben tervezzük a sertés eredetű acilaminoacil-peptidáz enzim kristályosítását és szerkezetének meghatározását.

Abstract

During my work I studied the structure and function of *Pyrococcus horikoshii* acylaminoacyl peptidase (PhAAP). This protein is a target of biological research because it has a catalytic activity in cleavage of certain acylated N-terminal amino acids of oligopeptides, and is indirectly involved in the regulation of neuropeptide levels as well.

I crystallized its complex with a covalent inhibitor, determined the structure, compared it with those of other members of the oligopeptidase protein family, and carried out molecular dynamics calculations to amend the X-ray diffraction data. The most important question of the ongoing studies of different AAPs is which parameters affect the selectivity of enzymes. Due to the common domain structure of oligopeptidases (hydrolase and propeller domains, between them a relatively mobile connecting section), we assumed that the enzyme in the cell may be in an "open" or in a "closed" form as well. Further aims of the present study were to determine whether there is a structural effect of a 1,6-hexanediol molecule being coordinated to the active site of the previously solved crystal structure and whether it can cause global changes in protein structure if an inhibitor binds covalently to the active site.

The crystal structure of PhAAP determined by us is a hexamer formed of monomers of the "open" conformation. The monomer PhAAP we subjected to molecular dynamics simulations so that we can model the truly "empty" structure, in which neither the ligand nor substrate is present near the active site, and to detect any structure destabilization effect of the removal of the oligomeric mates. The molecular dynamics simulation models showed that the high level of solvation of monomeric form of protein causes only a slight opening, the overall structure remains intact. However, in this relaxed condition the catalytic triad can be easily activated.

Based on the above, we concluded that the monomer structure is not the effect of hexamerization, but the hexamer is formed by "stable" monomers as a protection against the edge-to-edge aggregation. We compared the crystal structure and the model structures derived from dynamics, and formed a model structure of the unligated state of PhAAP. The determined particularly "opened" structure of the *Pyrococcus horikoshii* acylaminoacyl peptidase creates a narrow entrance door on the side of the molecule, and through hexamerization it creates a channel system that carries out substrate size selection in a novel way.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Harmat Veronikának, aki lehetőséget adott arra, hogy a kutatási projektbe bekapcsolódjak, megtanított a röntgenkrisztallográfia alapjaira és hasznos tanácsokkal látott el a szerkezetépítés és finomítás során. Türelméért és az átadott tudásért hálával tartozom.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Karancsiné Menyhárd Dórának, akinek segítségével nem születhetett volna meg a dolgozat molekuladinamikai számításokkal foglalkozó részlete. Köszönöm a kitartást, lelkesedést és biztatást a reménytelen helyzetekben.

Köszönöm Dr. Perczel Andrásnak, amiért az MTA Fehérjemodellező Kutatócsoportban végezhettem a munkát.

Köszönettel tartozom a MTA Enzimológiai Intézetnek a fehérjék előállításáért (Polgár László professzor kutatócsoportja).

Köszönöm Végh Ádámnak a Cyberlab kristályosító robot használatának ismertetését és felügyelését.

Köszönöm Orgován Zoltánnak az ApAAP párhuzamosan végzett vizsgálatát és a hasznos tanácsait a modellépítés során.

Végül köszönöm mindenkinek, akik segítettek és biztattak a kutatási illetve szövegalkotási fázisban.

Rövidítések

AAP: acilaminoacil-peptidáz

APH: acilpeptid-hidroláz, az acilaminoacil-peptidáz szinonimája

AAP: acilaminoacil-peptidáz

ApAAP: *Aeropyrum pernix* AAP

DPP-IV: dipeptidil-peptidáz IV

NCS: nem-krisztallográfiai szimmetria

PhAAP: *Pyrococcus horikoshii* AAP

PhAAP/CMK: klórmetil-keton inhibitort tartalmazó fehérje komplex (1. kristály, 1. szerkezet)

PhAAP/12: a tizenkét monomert tartalmazó elemi cellájú szerkezet (2. kristály, 2. szerkezet)

PhAAP/hexándiol: az aktív helyen 1,6-hexándiol molekulát tartalmazó (3. szerkezet)

PhAAP/üres: a ligandummentes aktív hellyel rendelkező (dinamikai szimulációhoz készített) szerkezet

POP: prolil-oligopeptidáz

Hivatkozások

1. Perona, J.J., Craik, C.S., *Protein Sci.* **4**(3):337-60 (1995)
2. Di Cera, E., *IUBMB Life* **61**(5): 510–515 (2009)
3. Hollósi, M., Laczkó, I., Asbóth, B., *Biomolekuláris kémia I.* 238-251., Nemzeti Tankönyvkiadó (2005)
4. Naylor, S.L., Marshall, A., Hensel, C., Martinez, P.F., Holley, B., Sakaguchi, A.Y., *Genomics* **4**:355-360 (1989)
5. Erlandsson, R., Boldog, F., Persson, B., Zabarovsky, E.R., Allikmets, R.L., Sumegi, J., Klein, G., Jornvall, H., *Oncogene* **6**:1293-5 (1991)
6. Yamin, R., Zhao, C., O'Connor, P.B., McKee, A.C., Abraham, C.R., *Mol. Neurodegen.* **4**:33-43 (2009)
7. Richardson, J.S., Richardson, D.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **5**,**99**(5):2754-9 (2002)
8. Duysen, E.G., Li, B., Xie, W., Schopfer, L. M., Anderson, R. S., Broomfield, C.A., Lockbridge, J., *Pharmacol. Exp. Ther.* **299**:528-535 (2001)
9. Poulos, T.L., Alden, R.A., Freer, S.T., Birktoft, J.J. Kraut, J., *J. Biol. Chem.* **251**:1097-1103 (1976)
10. Bender, M.L., Gibian, M.J., Whelan, D.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**(3):833-9 (1966)
11. Hedstrom, L., *Chem. Rev.* **10**:4501-4523 (2002)
12. Rawlings, N.D., Polgar, L., Barrett, A.J., *Biochem. J.* **279**(3):907-8 (1991)
13. Polgar, L., *Cell. Mol. Life Sci.* **59**(2):349-62 (2002)
14. Kiss, A.L., Pallo, A., Naray-Szabo, G., Harmat, V., Polgar, L., *J. Struct. Biol.* **162**:312 (2008)
15. Scaloni, A., Jones, W.M., Pospischil, M., Scheewind, O., Popowicz, A., Bossa, F. et al., *J. Lab Chin. Med.* **120**:546-552 (1992)

16. Mitta, M., Asada, K., Uchimura, Y., Kimizuka, F., Kato, I., Sakiyama, F. et al., *J. Biochem.* **106**:548-551 (1989)
17. Kobayashi, K., Lin, L., Yeadon, J., Klickstein, L., Smith, J., *J. Biol. Chem.* **264**:8892-8899 (1989)
18. Polgar, L., *FEBS Lett.* **311**:281-281 (1992)
19. Harmat, V., Domokos, K., K. Menyhard, D., Pallo, A., Szeltner, Z., Szamosi, I., Beke-Somfai, T., Naray-Szabo, G., Polgar, L., *J. Biol. Chem.* **286**:1987-1998 (2011)
20. Bartlam, M., Wang, G., Yang, H., Gao, R., Zhao, X., Xie, G., Cao, S., Feng, Y., Rao, Z., *Structure*, **12**:1481-8 (2004)
21. Kiss, A.L., Hornung, B., Radi, K., Gengeliczki, Z., Sztaray, B., Juhasz, T., Szeltner, Z., Harmat, V., Polgar, L., *J. Mol. Biol.*, **368**:509-20 (2007)
22. Tichy-Racs, E.I., *Tudományos Diákköri Dolgozat*, ELTE Kémiai Intézet, Egy hexamer acilpeptid-hidroláz szerkezete, a méretszelektivitás újszerű módja, 14-21 (2009)
23. Richards, P.G., Johnson, M.K., Ray, D.E., *Mol. Pharmacol.* **58**:557-583 (2000)
24. Powers, J.C., Odake, S., Oleksyszyn, J., Hori, H., Ueda, T., Boduszek, B., Kam, C., *Agents Actions Suppl.* **42**:3-18 (1993)
25. Bocskei, Z., *Röntgendiffrakció (egyetemi jegyzet)*
26. Bergfors, T.M., *A Laboratory Manual, (International University Line, La Jolla, (2002)*
27. Kabsch, W., *J. Appl. Cryst.* **26**:795-800 (1993)
28. Dodson, E.J., Winn, M., Ralph, A., *Methods Enzymol.* **277**:620-33 (1997)
29. Unge, J., Mueller-Dieckmann, C., Panjikar, S., Tucker, P.A., Lamzin, V.S., Weiss, M.S., *Acta Crystallogr.* **D67**(Pt8):729-38 (2011)
30. Sheldrick, G.M., *Acta Cryst.* **A64**:112-122 (2008)
31. Ramachandran, G.N., Srinivasan, R., *Fourier Methods in Crystallography*, Wiley, New York (1970)
32. Oppenheim, A.I.V., *Proc. IEEE* **69**:529-35 (1980)

33. Emsley, P., Cowtan, K., *Acta Cryst.* **D60**:2126-2132 (2004)
34. Vagin, A.A., Dodson, E.J., *Acta Cryst.* **D53**:240-255 (1997)
35. Winn, M., Isupov, M., Murshudov, G.N., *Acta Cryst.* **D57**:122-133 (2001)
36. Adams, P.D., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.W., Ioerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Read, R.J., Sacchettini, J.C., Sauter, N.K., Terwilliger, T.C., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**(Pt 11):1948-54 (2002)
37. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., *J. App. Cryst.* **26**:283-92 (1993)
38. MacKerel, A.D, et. al., *J. Phys. Chem.* **B102**:3586-3616 (1998)
39. Zimmerman, K., *J. Comp. Chem.* **12**:310–319 (1991)
40. Darden, T., York, D., Pedersen, L., *J. Chem. Phys.* **98**:10089–10092 (1993)
41. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L.G., *J. Chem. Phys.* **103**:8577–8592 (1995)
42. Swope, W.C., Andersen, H.C., Berens, P.H., Wilson, K.R.A., *J. Chem. Phys.* **76**:637–649 (1982)
43. Nose, S.A., *Mol. Phys.* **52**:255–268 (1984)
44. Hoover, W.G., *Phys. Rev.* **A31**:1695–1697 (1985)
45. Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., DiNola, A., Haak, J.R., *J. Chem. Phys.* **81**:3684–3690 (1984)
46. Varga, M., *Bioszervetlen kémia (egyetemi jegyzet)* 54-55., ELTE Eötvös Kiadó (2006)
47. Goetting, P., Groll, M., Kim, J.S., Huber, R., Brandstetter, H., *EMBO J*, **15**;21(20):5343-52 (2002)