

Tudományos Diákköri Dolgozat

Orgován Zoltán

Kémia BSc IV. évfolyam

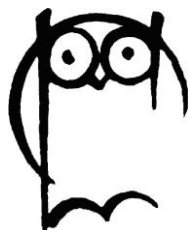
**Egy oligopeptidáz méretszelektivitásának,
szubsztrátkötésének és katalitikus mechanizmusának
tanulmányozása röntgendiffrakcióval és in silico
módszerekkel**

Dr. Harmat Veronika (adjunktus)

Dr. Karancsiné Menyhárd Dóra (tudományos főmunkatárs)

ELTE Kémiai Intézet

Szerves Kémia Tanszék



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
1. Irodalmi áttekintés	4
1.1 A szerin-proteázok katalízise	4
1.2 A prolil-oligopeptidáz család	5
1.3 A POP család tagjainak szerkezeti vonatkozásai	6
1.3.1. Az acilaminoacil-peptidáz szerkezete	8
1.4 Az aktivitás és méretszelekció együttes mechanizmusa	9
1.5 Klórmetil-ke-ton inhibitor	11
2. Célkitűzések	13
3. Módszerek	14
3.1. Röntgenkristallográfiai módszerek	14
3.2. Molekulamodellézési számítások	20
3.3. Monte Carlo Multiple Minimum módszer (MCMM)	21
3.4. Molekuladinamikai szimuláció (MD)	22
4. Eredmények és következtetések	23
4.1. Kristallográfiai vizsgálatok: a kovalens inhibitor kötődésének vizsgálata az enzim nyitott és csukott formájában	24
4.2 Az aktív helyhez vezető csatornák feltérképezése	27
4.3 Heptapeptid szubsztrát kötődésének vizsgálata molekuladinamikai szimulációval	29
Összefoglalás, kitekintés	32
Köszönetnyilvánítás	34
Függelék	35
Irodalomjegyzék	36

Bevezetés

A fehérjék olyan szerves makromolekulák, amelyek aminosavak lineáris polimerjei. Az élő szervezetekben előforduló fehérjék igen jelentős része valamilyen biokémiai folyamat katalizátoraként segíti elő a sejt életben maradását, ezeket a speciális funkciójú fehérjéket enzimeknek nevezzük. Napjainkra az enzimek felépítése, működésük megértése igen fontos feladattá vált. Az enzimek működésének megértésében sokat segít a szerkezet-meghatározás, mely a szerkezet-funkció összefüggések felderítésére ad lehetőséget, amely számos tudományterületen, többek között az orvoslásban is jelentőséggel bírhat.

Jelen dolgozat témája egy sokat vizsgált enzimes család, a prolil-oligopeptidáz (POP) család egy tagjának, az acilaminoacil-peptidáznak (AAP) a vizsgálata. A POP család tagjai szerkezeti jellemzőik alapján a szerin-proteázok SC csoportjába tartoznak. A SP enzimek peptidkötés hasítását végzik egy ún. katalitikus triád segítségével, melyet egy szerin egy hisztidin és egy aszparaginsav H-híddal csatolt hármasa alkot. Az AAP fehérjék katalitikus doménjének vizsgálata során felfedezték, hogy a harmadlagos szerkezetét tekintve a család más fehérjékkel – például egyes lipázokkal – együtt az α/β hidrolázokhoz tartozik [1, 2, 3]. Az AAP biológiai jelentősége, hogy az N-terminálison acetilezett fehérjék lebontását segíti, emiatt hiánya bélgyulladásához [4], valamint vese-, vagy tüdőrák [5] kialakulásához vezethet.

1. Irodalmi áttekintés

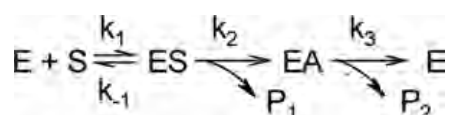
Az enzimeket többféleképpen is csoportosíthatjuk, az általuk katalizált kémiai reakciók alapján például 6 csoportba sorolhatjuk őket. Az első a transzferázok csoportja, ezek fontos kémiai csoportokat szállítanak egyik vegyületről a másikra, az oxidoreduktázok egy molekulát oxidálnak, miközben egy másikat redukálnak, az izomerázok elősegítik a molekulák szerkezeti átalakítását, a ligázok a nagy energiájú szintéziseket segítik, a liázok kettős kötést alakítanak ki szubsztrátjaikon, a hidrolázok a kötést hidrolízis révén bontják el [2]. A hidrolázok csoportjába tartozik az általunk vizsgált enzimesalád is. A hidrolizált kémiai kötés típusa szerint újabb csoportokra bonthatjuk az enzimesaládokat, eszerint az AAP a peptidázok (proteázok) közé sorolható.

A proteázokat újabb 4 családra oszthatjuk fel aszerint, hogy mely aminosavak alkotják a reaktív csoportjukat. Eszerint megkülönböztetünk szerin-proteázokat, cisztein-proteázokat, metallo- és aszparaginsav-proteázokat [6, 7].

1.1 A szerin-proteázok katalízise

A szerin-proteázok egy igen átfogóan tanulmányozott enzimesalád. Jól ismert szubsztrát felismerésük mechanizmusa, a katalízis- és aktivitásuk szabályozása [6].

A szerin-proteázok hidrolízise egy észterkötést tartalmazó acil-enzim intermediéren keresztül történik, amit a következő egyenlettel szemléltethetünk:

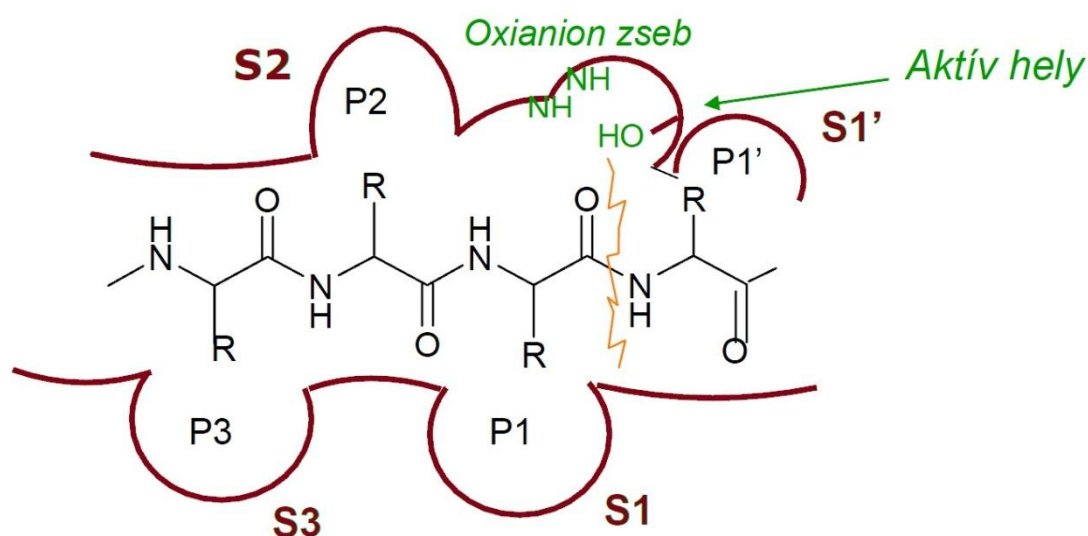


1. ábra A peptid-hidrolízis kinetikus mechanizmusa a szerin-proteázoknál: E az enzim, S a szubsztrát, ES az enzim- szubsztrát komplex, EA az acil-enzim P1 és P2 pedig az S hidrolízisének két terméke [8, 10].

Az enzim aktív formájában közel kerülnek egymáshoz a katalitikus triád tagjai, a szerin a hisztidin és az aszparaginsav. A szubsztrát megkötésekor Michaelis-komplex alakul ki. A szerin átadja protonját az OH-csoportjáról, amelyet a hisztidin vesz fel általános bázisként. Az így kialakult imidazónium-iont az aszparaginsavval kialakuló H-kötés stabilizálja. A szerin oxigénje megtámadja a peptidkötés szénatomját, ezzel létrehozva egy tetraéderes „oxianion” köztterméket. Ezt az oxianion-kötőzsebbel kialakított köztterméket H-kötések stabilizálják. Az imidazol leadja a protont a távozó P1' csoport képződő aminocsoportjának, kialakítva az

EA-t. Ezt követően az első termék diffúzióval távozik, helyére egy vízmolekula kapcsolódik, ami a következő nukleofil támadást végzi egy újabb tetraédes intermedier képződésén keresztül, az EA elhidrolizál, közben visszaalakítva az aktív enzimet, amely ezt követően készen áll a következő szubsztrát megkötésére [8, 10].

A katalitikus mechanizmus során az S szubsztrát P1 aminosavjának karbonil szénét támadja az E enzim szerinje (2. ábra). A P1 jelzésű aminosav N-terminálisán elhelyezkedő aminosavat P2-nek, a C-terminálisán elhelyezkedőt pedig P1'-nek nevezik. A speciális üregek, melyekbe az aminosavak bekötnek S1, S1'... kötőzseb elnevezést kapják.



2. ábra Az aktív hely és a szubsztrát kötőhely a szerin-proteázokban. Forrás [9]

1.2 A prolil-oligopeptidáz család

A Polgár László kutatócsoportja által 1991-ben felfedezett prolil-oligopeptidáz család tagjai a már jól ismert tripszin- és szubtilizin-családtól több igen jelentős tulajdonságban is eltérnek. A csoport tagjai, melyet S9 családnak neveztek, el a szerin-proteázok SC nevű klánjába tartoznak. A család minden tagja Ser-His-Asp katalitikus triádot tartalmaz, tehát szerin-proteázok, de α/β hidroláz feltekeredésűek [1].

A család tagjai a szerin-proteáz csoport más tagjaitól több tulajdonságban különböznek [12]. Csupán rövid, maximum 30 aminosavból álló peptid-szubsztrátokat képesek hasítani. Ezen tulajdonság oka a szerkezetben keresendő. A POP katalitikus alegysége mellett egy 7 lapátból álló β -propeller domén figyelhető meg [13], az aktív hely a két domén közötti központi üregben található. Mivel a nagyméretű, szerkezettel rendelkező fehérjék a

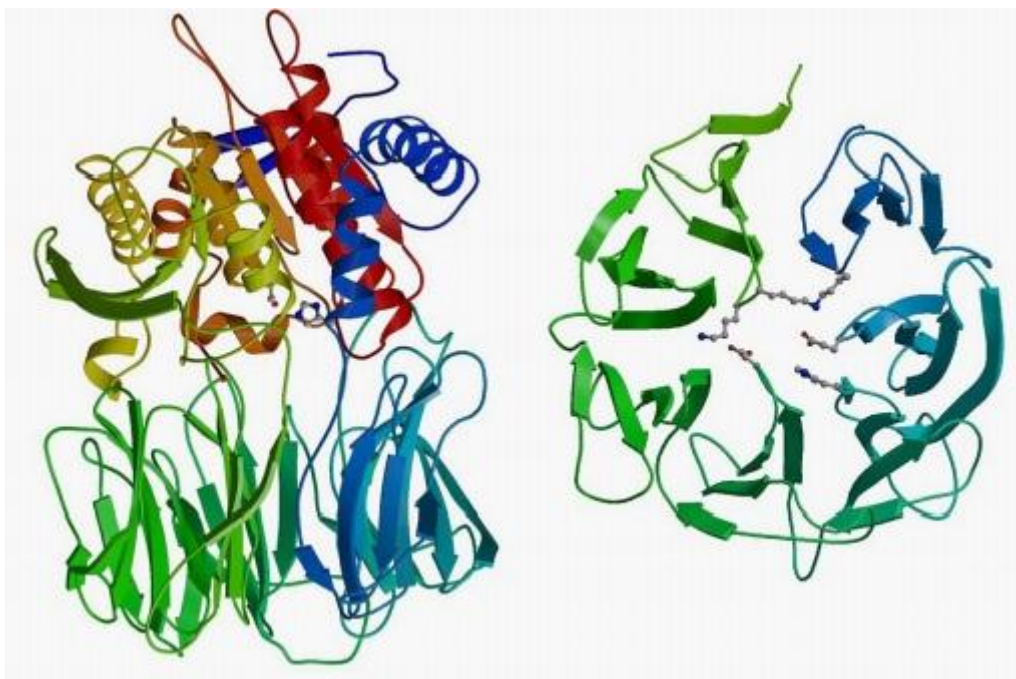
viszonylag szűk nyílás miatt nem férnek oda az aktív helyhez, a család tagjai a rövid, szerkezettel nem rendelkező aminosav láncokra specifikusak [14]. A család minden tagja rendelkezik ilyen β -propeller doménnel, ez eredményezi a méretszelektivitást.

A család attól függően, hogy hol történik a hasítás az oligopeptiden belül tartalmaz amino-, di- és tripeptidázokat [6]. A családot négy alcsaládra osztják: a prolil-oligopeptidáz, a dipeptil-peptidáz IV (DIP IV), az acilaminoacil-peptidáz (AAP) és az oligopeptidáz B (OPB) alcsaládra [6].

A család több tagja is a gyógyszertervezés célpontja: a POP az agyi rendellenességekben is szerepet játszik. Depressziós betegeknél a POP aktivitás kisebb, skizofréniás, mániás betegeknél pedig nagyobb az átlagosnál [15, 16]. Ezen kívül a POP aktivitás csökkenése összefügg a bulimiás és anorexiás megbetegedésekkel is [17]. A DIP IV a kettes típusú cukorbetegség kezelésének egyik célfehérjéje, míg az OPB maláriaellenes gyógyszerkutatások célpontja [18, 19]. Az AAP biológiai jelentőségét az adja, hogy eukarióta élőlények esetén a fehérjék N-terminális acetilálása igen gyakori módosítás, ami több tanulmány szerint a fehérjék lebontását gátolja [19], ebből következően hasításukra specializálódott enzimek szükségesek. Lebontás során először oligopeptidekre bomlanak, ezt követően pedig az AAP lehasítja az acetil-aminosavat, az így létrejövő peptid más enzimek számára is lebontható, az acetil-aminosavat pedig az aminoaciláz 1 bontja le [20]. Az AAP-nak az emberi emésztőfolyamatokban is fontos szerepe van, nemcsak a fehérjék lebontásában, de a baktériumokkal szembeni immunválasz kialakításában is.

1.3 A POP család tagjainak szerkezeti vonatkozásai

A POP egy 710 aminosavat tartalmazó fehérje. Tartalmaz egy peptidáz és egy β -propeller domént (3. ábra).



3. ábra A sertés POP szerkezete. A szín N-terminálستól kékből pirosba megy át a C terminális felé. A bal oldali képen felül látható a hidroláz alul a propeller domén. Jobbra a propeller domén felülnézeti képe, melyen jól látható az oldalláncok csatornaszűkítő hatása. Forrás [12].

A propeller domén hét, darabonként négy antiparallel β -szálból felépülő, csavart lemezből áll, amelyek egy központi csatorna körül helyezkednek el, elrendezésüket a lemez felszínek közötti másodlagos kölcsönhatások stabilizálják. A szerkezet stabilitásáért főként a hidrofób kölcsönhatások felelősek [12].

A két domén határán helyezkedik el a katalitikus triád egy nagy üregben. A katalitikus szerin egy éles kanyar csúcsán található, ami jellemző az α/β -hidroláz feltekeredésű enzimekre, ez az úgynevezett nukleofil könyök elnevezést kapta. Ebből következően a szerin OH-csoportja könnyen hozzáférhető a szubsztrát és a katalitikus hisztidin számára is. A hisztidin (a katalitikus triád második tagja) egy kanyar közepén található. A triád harmadik eleme, az aszparaginsav karboxil csoportjának oxigénjei egyrészt két főlánc-NH-csoporthoz, másrészt pedig a 680-as hisztidin nitrogénjéhez kötődnek, emellett egy stabilizáló vízmolekulával is hidrogénkötést alakítanak ki [12].

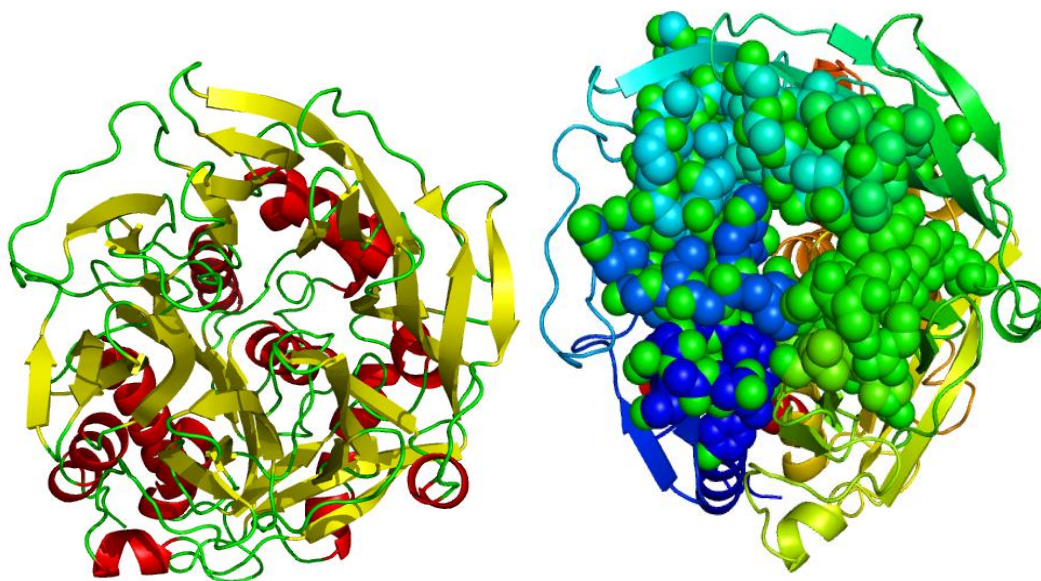
A proteázok, amennyiben működésük nem szabályozott, igen komoly károkat okozhatnak a szervezetben. Ennek elkerülése érdekében számos mechanizmus alakult ki olyan peptidek vagy fehérjék lebontásának elkerülésére, amikre a sejtnak még szüksége van. A POP esetén a központi csatorna nyílása (a szubsztrátbejárat feltételezett helye) csupán 4 Å széles (3. ábra), ami nem elég nagy egy átlagos méretű peptid bejutásához. Feltételezték, hogy a nyílás megnagyobbodhat a propeller kinyílásával, azaz az első és a hetedik propellerlapát

részleges eltávolodásával. Így már kisebb oligopeptidek bejuthatnak az aktív helyre, de a nagy, szerkezettel rendelkező fehérjék még így sem férnek hozzá az aktív helyhez, ezzel elkerülve a hidrolízist [11, 13]. Ezt a feltételezést igazolta az a megfigyelés, hogy ha az első és a hetedik propeller között diszulfidhidat hozunk létre, ezzel a felnyílást akadályozva, az enzim elveszíti aktivitását [13]. Újabb kutatások alapján a szubsztrát bejutása elsődlegesen a két domén szétnyílása során képződő oldalbejáraton át történik [23, 24].

1.3.1. Az acilaminoacil-peptidáz szerkezete

Az emlős szervezetekben megtalálható AAP enzimek szerkezet-meghatározása eddig az enzim kristályosításának nehézségei miatt nem járt sikerrel. Meghatározták azonban két ősbaktérium eredetű homológjának szerkezetét. Az általam végzett munka is egy ilyen archea eredetű rendszeren történt. Az *Aeropyrum pernix* K1 AAP (ApAAP) szimmetrikus homodimer, mindkét monomere 582 aminosavból áll. Az ősbaktérium eredetű AAP-ok funkciójáról kevesebbet tudunk, mint az emlős AAP-okról. Az ősbaktérium eredetű és az emlős eredetű AAP-ok között csak 27%-os homológia figyelhető meg. A POP és az emlős eredetű AAP-ok esetében az alegységek nagyobbak, mint az ApAAP alegységei. Annak ellenére, hogy szekvenciáik jelentős eltérést mutatnak, szerkezetük topológiája igen hasonló.

A propeller 7 lapátból áll, melyeket egy kivétellel egyenként négy antiparallel β -szál alkot, csakúgy, mint a sertés eredetű POP esetében. A propeller domén közepén az ApAAP esetén is található egy központi alagút (4. ábra). A propeller domént a katalitikus doménnel itt is két polipeptid lánc, valamint hidrogénkötések és hidrofób kölcsönhatások kapcsolják össze.



4. ábra Az ApAAP propeller doménje. A bal oldali ábrán sárgával láthatóak a β -szálak, pirossal az α -hélixek, zölddel a hurkok. A jobb oldali ábrán a propellerlapátok (kék, illetve zöld színnel) között található központi járat látható.

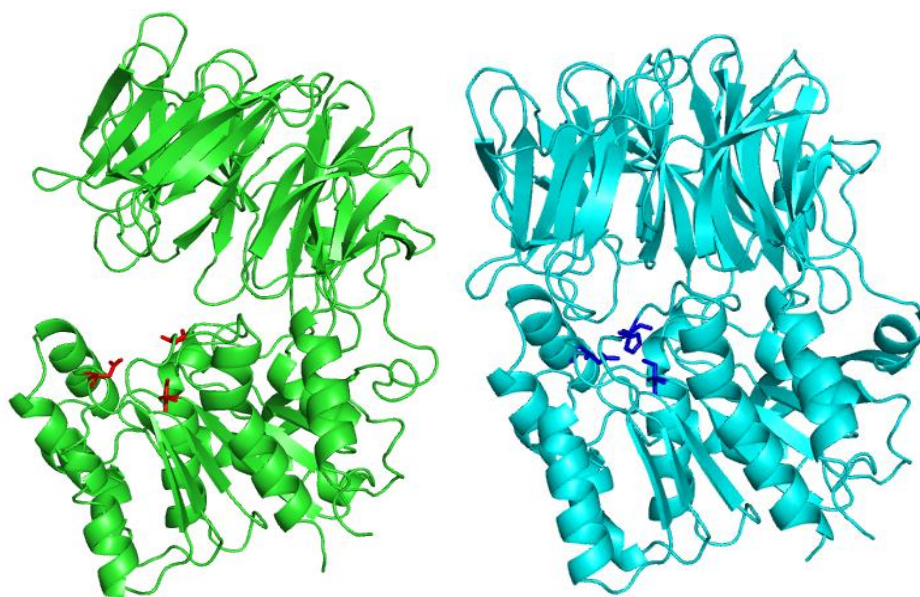
A katalitikus domén α/β szerkezetű, a központi hét szál egy kivételével mind parallel elhelyezkedésű.

A katalitikus triád tagjai a 445-ös szerin, az 524-es aszparaginsav, valamint az 556-os hisztidin, melyeknek térbeli elhelyezkedése hasonló, mint a fent említett POP esetén. Az ApAAP esetén is két nyílásról beszélhetünk, csakúgy, mint a POP esetében, így a nagyméretű fehérjéket értelemszerűen az ApAAP sem képes hasítani. Az első, fent említett nyíláson kívül még egy második nyílás is van, amely a hidroláz és a propeller domén találkozásánál található a molekula csukott állapotában.

1.4 Az aktivitás és méretszelekció együttes mechanizmusa

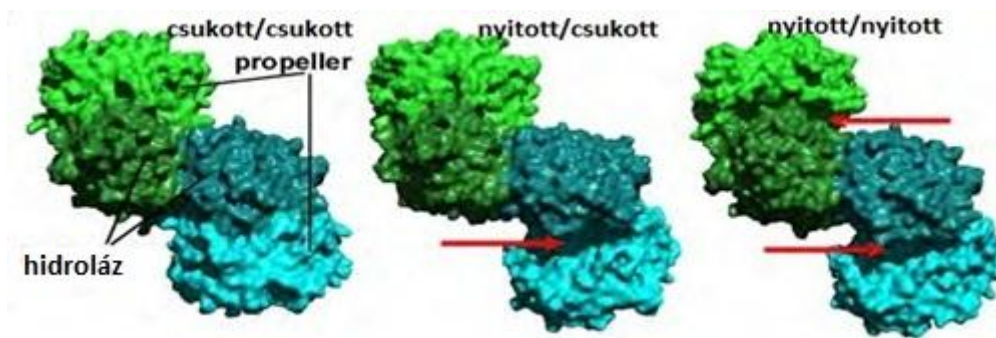
A POP család tagjai esetében az aktív hely az enzim két doménje között, egy üregben található. A DIP IV esetén egyes oligopeptidek hozzáférnek az aktív helyhez a viszonylag nagyméretű oldalsó nyíláson keresztül. A hasítandó szubsztrát bejutása a hidroláz és a propeller domén közötti tágas, belső zsebbe és így az aktív hely megközelítésének mikéntje nem minden esetben dönthető el egyértelműen. Egyes nézetek szerint POP, AAP, és az OPB esetén csak a nyitott forma enged hozzáférést a katalitikus helyhez, azonban régebbi eredmények azt mutatják, hogy a lapátok közötti kis póruson is megfelelő bejárat lehet kisebb méretű szubsztrátok számára. Nyitott formának hívjuk az enzim azon konformációját, amikor az eredetileg szorosan egymásra illeszkedő propeller és hidroláz domén egymástól

eltávolodik, méghozzá úgy, hogy a molekula egyik oldalon, mint egy kagylóhéj, felnyílik (lásd 5. ábra). Ilyen nyitott formát eddig a POP és az AAP esetében figyeltek meg. Mind az AAP, mind a POP esetében az enzim felnyílása a katalitikus triád felbomlását eredményezi [8, 23, 25]. Ez garantálja, hogy a nyitott forma könnyen hozzáférhetővé vált aktív helye ne hasítson el az enzim szubsztrát-körébe nem tartozó, nagyobb méretű peptideket is. A szubsztrát-bejutás mikéntjére a mai napig még nem sikerült egyértelmű választ kapni.



5. ábra Az ApAAP monomer egysége, bal oldalon zölddel a nyitott, jobb oldalon világoskékkel a csukott monomer látható, a katalitikus triád tagjai bal oldalon piros, jobb oldalon sötétkék színnel.

A közelmúltban meghatározták az *Aeromonas punctata* POP szerkezetét [25], melyből azt a következtetést vonták le, hogy a nyitott forma a komplexátlan, nyugalmi állapotú enzim stabil állapota, és az inhibitor vagy a szubsztrát bekötése kezdeményezi a becsukódást. Kiderült azonban, hogy ez a mechanizmus nem általános a POP családra, az ApAAP esetén a komplexátlan és a komplex (inhibitort tartalmazó) nyitott és csukott formák létezése másfajta mechanizmust sejtet [8]. Az ApAAP esetében laboratóriumunkban olyan szerkezetet is sikerült meghatározni, ahol a kristály rácspontokban található dimer szerkezetben az egyes monomerek csukott-csukott, nyitott-csukott, nyitott-nyitott szerkezetűek voltak (6. ábra). Tehát ellentétben a POP-al az ApAAP esetén a komplexátlan enzim esetén a nyitott és csukott forma oldatfázisban egyaránt előfordul, valószínűleg a két forma egyensúlyban van egymással [8].



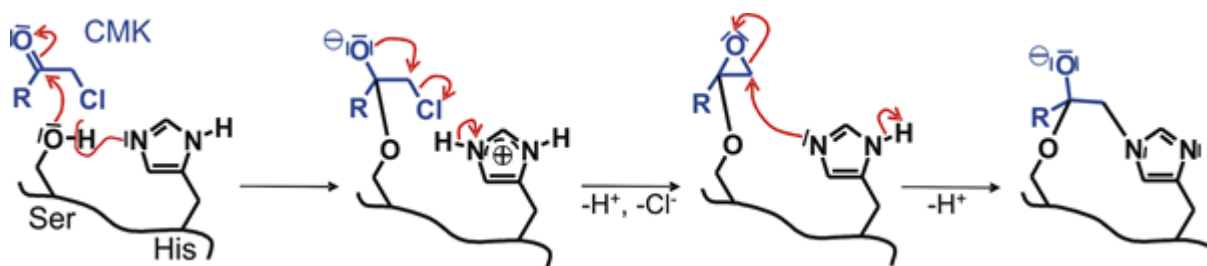
6. ábra A képen az ApAAP molekulafelszíni ábrázolása látható. A monomerek kék illetve zöld színnel vannak megjelölve. A sötétebb szín a hidroláz domén, a világosabb pedig a katalitikus domén. A nyitott monomerek esetén a felnyílás helye vörös nyíllal megjelölve. Forrás [8].

A szubsztrát vagy az inhibitor bekötése feltételezhetően stabilizálja a csukott állapotot, mivel ezek a molekulák mindkét doménnel kialakítanak kölcsönhatásokat [8]. Az ApAAP esetén a P1 helyen a szubsztrát a hidroláz doménhez kötődik, a P2 és P3 helyen pedig a propeller doménhez. A két régió, melyekben a kinyílás/bezáródás során a legjelentősebb átrendeződés történik a 43-46 (propeller doménhez tartozó) valamint a csukott formában vele szemben elhelyezkedő és vele kölcsönható hidroláz-béli 551-560 hurok, amely tartalmazza a funkcionális jelentőségű 556-os hisztidint. Emiatt az átrendeződés során a katalitikus triád szétszerelődik, mivel a His-t hordozó 551-560 hurok eltávolodik az aktív hely többi részétől (lásd 5. ábra). Tehát a felnyílás megnöveli a két hurok konformációs szabadságát anélkül, hogy a katalitikus szerin flexibilitását megnövelné [8].

A fentiek alapján megállapítható tehát, hogy az enzim aktivitása annak szerkezetétől függ, így nyitott állapotban a POP és az AAP nem aktívak, csak csukott formában. Az aktív hely az enzim mélyén van elrejtve, így az aktív helyhez való korlátozott hozzáférés szabályozza azt, hogy mekkora peptidláncokat képes hasítani.

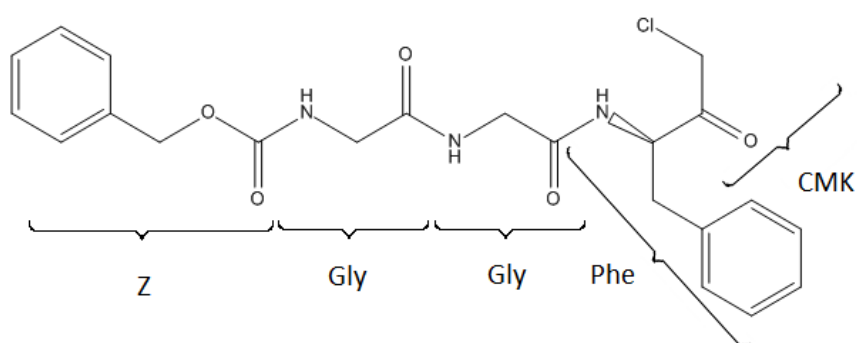
1.5 Klórmetil-ke-ton inhibitor

A klórmetil-ke-ton származékokat elterjedten használják, főként szerin-proteázok inhibitoraként [11]. Munkám során alkalmazása igen hasznosnak bizonyult ahhoz, hogy jobban megérthessük az enzim szubsztrátkötő mechanizmusát. Természetesen ez az inhibitor úgy használható, ha megfelelő szekvenciájú szubsztráthoz kapcsoljuk, ami a speciális kötőzsebekkel (pl. S1) kedvező kölcsönhatást alakít ki, ekkor ugyanis a 7. ábra szerinti folyamatban a klórmetil-ke-ton inhibitor molekula a vizsgált enzim aktív helyén kovalens kötést alakít ki a katalitikus szerinnel és hisztidinnel. Az aktív hely nem képes regenerálódni, másképpen a katalitikus hely inaktív lesz CMK jelenlétében.



7. ábra A klórmetil-ke-ton inhibitor kötődésének feltételezett mechanizmusa [26].

A vizsgálathoz használt fehérjeminták egy részét az alábbi szekvenciájú inhibitorral képzett komplex formájában kaptuk együttműködő partnerünktől (8. ábra), ezen kívül különálló formában is rendelkezésünkre állt az áztatásos vizsgálatok elvégzéséhez.



8. ábra A kovalens inhibitor szerkezeti képlete Z-Gly-Gly-Phe-CMK, (Z: Benziloxikarbonil, Gly: glicin, Phe: fenilalanin, CMK: klórmetil-ke-ton).

2. Célkitűzések

A POP család egyes tagjai eltérő módon válogatják ki a hasítandó molekulákat. A laboratóriumunkban szintén vizsgált *Pyrococcus horikoshii* AAP (PhAAP) egy kettős beléptető rendszert képző komplex csatorna-rendszerrel és egy merev hexamer szerkezettel rendelkezik. A névadó POP és az általam vizsgált ApAAP esetében a propeller és a hidroláz domén közötti felnyílás, valamint egyes kutatások szerint a propellerlapátok közötti nyílás gondoskodik a méretszelekcióról. Ezen molekulák esetében a felnyílás egyúttal azt is jelenti, hogy az aktív hely eltorzul, mivel a katalitikus triád hisztidinjét tartalmazó hurok távolabb kerül a triád másik két tagjától. A felnyílással kapcsolatban célunk annak a vizsgálata, hogy a His-hurok visszarendeződését a szubsztrát kötődés kezdeményezi-e, vagy a két domén összezáródása. Célunk olyan szerkezet vizsgálata volt, amelyben a szubsztrát-kötött állapotot befagyasztjuk, és szerkezetét megvizsgáljuk a nyitott enzimben. Ezt a vizsgálatot röntgenkristallográfiai úton kívántuk elvégezni, irreverzibilisen kötődő inhibitor segítségével.

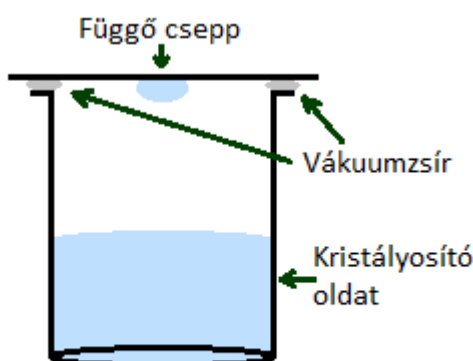
A szubsztrát elhelyezkedéséről, valamint a szubsztrát enzim-kötődésről is szeretnénk volna több információt megtudni (Michaelis-komplex). Ilyen jellegű kutatásokat már végeztek a POP [27] és a DIP IV [28] esetében, azonban az AAP esetén még nem. A hasítás utáni állapotról több ismerettel rendelkezünk (termékekről és termék-analógokkal képzett komplex szerkezetéből), ugyanis ezt például röntgenkristallográfiai úton is vizsgálni tudjuk. A hasítás előtti pillanatot viszont csak számítógépes szimulációk segítségével tudjuk részletesebben megismerni.

3. Módszerek

3.1. Röntgenkristallográfiai módszerek

A kristallográfiai mérések elvégzéséhez szükséges a fehérjék kristályosítása, mint minta-előkészítő lépés. A megfelelő mérési eredményekhez az előállított kristályoknak viszonylag nagyméretűeknek kell lenniük (általában körülbelül.: 0,1 mm). A megfelelő méretű egykristályok előállításához rengeteg különböző kristályosítási körülményt kell tesztelnünk: ki kell választanunk a megfelelő lecsapószertert, valamint be kell állítanunk a megfelelő pH-t, hőmérsékletet, koncentrációt, stb. Ehhez először tájékoztató jellegű körülményeket tesztelünk, majd a legmegfelelőbbeket optimalizáljuk. Ezt követően, ha szükséges a kristályok minőségét egyedi technikák, mint például a csíráztatás alkalmazásával tudjuk javítani. Esetemben az ApAAP nyitott/csukott konformációjú dimerjét tartalmazó kristályforma körülményeit [8] kellett optimalizálni a CMK-származékkal képzett komplex kristályainak előállításához.

A kristályok előállítása során a gőzdiffúzió elvén alapuló függő csepp módszert alkalmaztam (9. ábra). Ennek lényege, hogy az üvegfedélre helyezett csepp a kristályosító oldatra nézve hígabb, mint az alatta lévő tálkában található kristályosító oldat, valamint felülete görbült, ezért gőznyomáskülönbség alakul ki a csepp két oldala között, amely a cseppből történő vízgőz távozással egyenlítődik ki. Ez a csepp töményedését okozza, így megindul a kristályosodás folyamata.



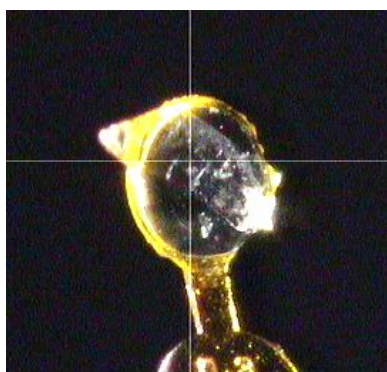
9. ábra A függőcsepp módszer

Az *Aeropyrum pernix* K1 ősbaktérium eredetű fehérje kifejezése *E. coli* baktériumból történt. Polgár László kutatócsoportjától kétféle fehérjeoldatot kaptunk. Az első komplexátlatlan fehérjeoldat $c_{enzim} = 158 \mu\text{M}$, a második, klórmetil-ketonnal gátolt enzim oldata $c_{enzim} = 443 \mu\text{M}$, az inhibitor koncentrációja 1,121 mM volt (mindkettő TRIS pufferben (pH = 7,5)). A kristályosítás során célunk az volt, hogy a nyitott/csukott szerkezetű

kristályformát állítsuk elő, amelynek körülményei már korábbról ismertek voltak [8]. Ismert volt korábbi tapasztalatokból, hogy a nyitott/csukott konformációban kristályosodó enzimkristály morfológiája és az elemi cella paraméterei is egészen mások (pillangó formájú kristályok), mint a csukott állapotúaké (hasáb alakú kristályok) (10/a ábra). Ezek alapján még a szerkezet-meghatározás előtt azonosítottuk, hogy tartalmaz-e a kristály nyitott formát. Kezdetben a korábban nyitott/csukott konformációt eredményező [8] körülményeket optimalizáltam: 91 µl 2,2 µM EDTA-t, 50 µl 10 w/w%-os DMSO-t (dimetil szulfoxid) 69 µl 11 w/w%-os PEG 4000-t (polietilén-glikol), 217 µl acetát puffert (pH: 4,5-5,5)) töltöttem a kristályosító tálcákba, melyek fölé 2 µl + 2 µl-es (2 µl komplexátlatlan fehérjeoldat + 2 µl kristályosító oldat) cseppeket cseppentettem. Különböző hőmérsékleten (20 °C, szobahőmérséklet) vizsgáltuk a kristályok méretét, és alakját a pH függvényében. 3-féle pH-t alkalmaztunk: 4,5; 5,0; 5,5. A szobahőmérsékleten tartott tálcán szép, viszonylag nagyméretű kristályokat kaptunk, míg 20 °C-n apróak maradtak, vagy kicsapódtak. Ez mellett Cyberlab kristályosító robottal megkezdtem a többi körülmény optimalizálását is: 91-100 µl 2,2 µM EDTA, 100 µl 33,5 µM DTT (ditiotreitol) vagy 50 µl 10 w/w%-os DMSO, 91-114 µl 11 w/w%-os PEG 4000, 100-217 µl acetát puffer (pH: 4,5-5,5), 500 µl kristályosító oldathoz. A csepp mérete 2 µl + 2 µl volt. Ezek közül a 100 µl 2,2 µM EDTA, 100 µl 33,5 µM DTT, 109 µl 11 w/w%-os PEG 4000, 100 µl Acetát puffer (pH= 4,5) körülményből keletkezett „pillangó” alakú kristályt mértük meg, amely nyitott konformációjú volt (1. (komplexátlatlan) kristály). Ugyanebből a körülményből kiindulva próbáltunk az inhibitoros fehérjeoldatból is ilyen konformációt elérni, azonban ez többszöri próbálkozás (számos különböző körülmény) után sem sikerült: mindig csukott kristályformát kaptunk. Ennek ellenére ebből is végeztünk mérést: 91 µl víz, 100 µl pH= 4,5 acetát puffer, 109 µl 11 w/w%-os PEG 4000, 100 µl 33,5 µM DTT, 100 µl 2,2 µM EDTA, cseppméret: 3 µl + 3 µl (2. (gátolt) kristály). Végül más stratégiát választottunk: a komplexátlatlan fehérjeoldatból állítottuk elő a nyitott/csukott állapotú kristályt, amelyet később CMK-származék oldatába áztattunk, így kaptunk gátolt enzimkristályokat. (Az optimalizált körülmény: 223 µl víz, 100 µl pH = 5 acetát puffer, 127 µl 11 w/w%-os PEG 4000, 100 µl 33,5 µM DTT és 100 µl 2,2 µM EDTA volt, az alkalmazott cseppméret: 3+ 3 µl) (3. (áztatott) kristály). A három kristálytípus krisztallográfiai adatai az 1. táblázatban találhatóak, a kristályokról készült képek az alábbi ábrákon láthatóak (10/a és 10/b ábra).



10/a. ábra Bal oldalon egy pillangó alakú jobb oldalon egy hasáb alakú kristály képe látható.



10/b. ábra Egy hasáb alakú kristály a mérés előtt a kristályhurkon

A keletkezett kristályok igen sérülékenyek, részben nagy víztartalmuk miatt, ami a molekulák közötti térrészt tölti ki. Habár a mérés 25 °C körül is elvégezhető lenne, a röntgensugarak kristályt károsító hatása alacsonyabb hőmérsékleten kisebb. Sugárzás hatására ugyanis a vízből oxidatív hatású szabad gyökök keletkeznek, amelyek a kristály molekuláival ütközve újabb gyököket eredményeznek, így lavinaszerű folyamatot indítanak be, csökkentve ezzel a kristály rendezettségét. Alacsony hőmérsékleten a szabad gyökök vándorlása lényegesen lelassul, így a roncsolódás mértéke is csökken, emiatt a mérést kb. 100 K hőmérsékletű nitrogénáramban végezzük. Ennek további előnye, hogy a molekulák felszíni régióinak mozgása is csökken, javítva ezzel a felbontást. Ügyelni kell arra, hogy kristályos jégfázis ne keletkezzon. A jégkristályképzés elkerülésére, ha szükséges, a fehérjét úgynevezett krio-oldatba áztathatjuk, amely összetétele révén (glicerin, polietilén-glikol, stb.) hirtelen lehűtés hatására amorf formájú jég keletkezik. Az 1. és 2. kristályosítási körülmény során a kristályokat MDP-t (valamint a kristályosító körülményt) is tartalmazó krio-oldatba áztattuk, a 3. esetben pedig olajba (MiTeGen krio-olaj).

A **tesztelés és az adatgyűjtés** során az együttkristályosítással kapott kristályok esetén az ELTE Fehérjekrisztallográfiai laborjában található diffraktométert (réz K_{α} sugárzás, Rigaku RU-H2R forgó anódos generátor, Rigaku R-AXIS IV++ image plate detektor) használtuk (ebben én is részt vettem), a kristály-áztatással kapott komplex esetén az European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Franciaország) BM14U sugárforrását használtuk fel (ezeket az adatokat témavezetőim gyűjtötték). Az így kapott adatokat XSCALE és XDS programokkal [29] dolgoztuk fel.

A mérést követően meg kell oldanunk az úgynevezett fázisproblémát, amely abból következik, hogy a mérés során nem tudjuk mérni a szórt röntgensugarak fázisát, csupán az intenzitását. Ennek megoldásához matematikai módszerek segítségével juthatunk el. A fázisprobléma megoldásának egyik legelterjedtebb módszere a molekuláris helyettesítés, amelyet az ApAAP esetében is használtunk. Ekkor egy hasonló molekula helyét és orientációját keressük az elemi cellában. Ehhez a CCP4 programcsomag MOLREP programját használtam fel [30]. Esetemben már ismert ApAAP szerkezettel izostrukturálisak voltak a kristályok (azonos kristályszimmetria, a molekulák nagyon hasonló helyzetben és konformációban vannak az elemi cellában), ezért a modell két doménje helyzetének finomítására volt csak szükség. Az így kapott fázisok felhasználásával már kiszámítható a saját molekulánk elektronsűrűségi térképe.

A fázisprobléma megoldását követően láthatóvá vált a kristályok szerkezete, valamint az is, hogy milyen molekula van az enzim belsejében. Az inhibitorral kristályosított fehérjék esetén mindkét monomer egység belsejében megtalálható volt a CMK-származékolt inhibitor molekula. A komplexálatlan oldatok esetén szerettünk volna olyan csukott szerkezetet kristályosítani, amiben az enzim belseje üres, azonban ez nem sikerült; a csukott formában az aktív hely közelében minden esetben egy DTT molekula kötődött, a nyitott monomerekben a triád közelében csupán vízmolekulák voltak. Az áztatott komplexálatlan kristályoknál a csukott egységben CMK-inhibitor, a nyitott egységben szintén csak víz volt.

1. táblázat A röntgendiffrakciós adatgyűjtés eredményei

Név	Kristályrendszer	Cellaparaméterek					
		élhossz: (a,b,c) /Å			szög: (α,β,γ) /°		
ApAAP komplexálatlan	ortorombos	64,395	104,944	171,247	90,0	90,0	90,0
ApAAP gátolt	ortorombos	63,813	104,434	170,081	90,0	90,0	90,0
ApAAP áztatott	triklin	71,580	97,300	99,160	105,15	103,96	100,22

Név	Térceport	R _{meas} ¹	I/σ(I)	Felbontási tartomány	Reflexiók száma összes/független	Teljesség
ApAAP komplexálatlan	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	6,8	16,41	19,82-1,70	489448/127139	99,2%
ApAAP gátolt	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	7,1	13,38	19,92-1,85	382062/97754	99,7%
ApAAP áztatott	P 1	7,1	13,38	19,94-2,55	149085/78753	86,7%

¹R_{meas}-t a következő egyenlettel számoljuk:

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

Mivel a modellmolekula elektronsűrűsége eltér a saját molekulánk elektronsűrűségétől, ezért az a feladat, hogy ezt a modellmolekulát manuálisan a térképhez igazítsuk. Ezt a COOT [31] nevű program segítségével végeztem. Az így kapott modellből újabb fázisokat kapunk, amelyekből újabb térképet számolunk. Így modellépítési és finomítási ciklusok sorozatával a térképünk zajszintje is csökkenni fog.

A **szerkezetfinomítási** lépésnél a modellszerkezet és a mért adatok közötti eltéréseket egy célfüggvény szélsőértékének keresésével csökkentjük. Mivel a mérések során sokszor nem kapunk megfelelő adat-változó arányt, így szükséges felhasználnunk a fehérjeszerkezetre vonatkozó bizonyos ismereteket is, úgy, mint jellemző kötőhosszak és kötőszögek, torziós szögek, és bizonyos sztereokémiai megkötések, amelyeket az illesztés során szintén figyelembe veszünk. Segítségünkre lehet még az úgynevezett TLS finomítás, amelyet a REFMAC [32] program végez. Ennek lényege, hogy a molekula bizonyos nagyobb egységeit

(mint esetünkben a propeller és a katalitikus domén) különböző anizotróp hőmozgási tényezőkkel modellezünk. Az áztatott kristályból kapott szerkezet finomítása során még nem-krisztallográfiai szimmetriákat (NCS) is figyelembe vettem, szintén a REFMAC program segítségével. Ez abban az esetben hasznos ha a felbontás nem túl jó, mert ilyenkor az adat/atómi koordináta arány nem megfelelő. Az én esetemben a NCS csoportok az azonos konformációjú monomerpárok voltak, (A-C, B-D), melyekben minden aminosavat figyelembe vettem, amely a molekulapáron is megtalálható volt.

A szerkezetek validálását (jóság vizsgálat) a CCP4 programcsomag segítségével végeztem melynek eredményeit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat A szerkezetfinomítások eredménye

Szerkezetfinomítási eredmények	
Név	ApAAP áztatott
Tér csoport	P 1
R-faktor	0,2244
R _{free}	0,2679
Fehérjeatomok száma	18267
Inhibitoratomok száma	24
Víz molekulák száma	1024
Átlagos négyzetes eltérés az ideális geometriától	
Kötéshosszak (Å)	0,077
Kötésszögek (°)	1,1764
Trigonális síkok (Å)	0,22
Átlagos B-faktor (Å ²)	29,126
Átlagos koordinátahiba (Å)	0,298

Megjegyzés: a 1. illetve a 2. kristályosításból számolt eredményeket nem tüntettem fel a táblázatban, mivel ezekben az esetekben a szerkezetfinomítási lépést nem végeztem el teljes mértékben, lévén ezek meghatározása nem tartozott munkám céljaihoz.

3.2. Molekulamodelllezési számítások

A molekuladinamikai számítások célja, hogy megjósoljuk egy összetett kémiai rendszer makroszkopikus tulajdonságait atomi szintű ismeretek alapján. A röntgenkristallográfiai vizsgálatok mellett a számítás számos kiegészítő információval is szolgálhat, hiszen az előbbi módszer esetén csupán a mért egységről alkothatunk képet, így például a kristályt csak korlátozottan szolvatált rendszerben vizsgálhatjuk, azonban *in silico* vizsgálatokkal a szolvatáció mértéke, a kölcsönható paraméterek mibenléte, még akár a hőmérséklet is szabadon változtatható, ezzel a rendszer potenciális energiefelszínének teljesebb feltérképezését téve lehetővé. Ehhez azonban körültekintően megalkotott modellrendszer, és megbízható kísérleti eredmények szükségesek (jó minőségű kiindulási modellek és a számítások validálásának lehetősége végett).

Mozgásegyenletek és az erőter

Ismert, hogy az elektronok mozgása jóval gyorsabb, mint az atommagoké, ennek megfelelően a Born-Oppenheimer közelítés értelmében a két mozgás egymástól elválasztható. Az atommagok mozgása egzakt módon, az időfüggő Schrödinger-egyenlet segítségével írható le, azonban a fehérjemolekulák esetében az atommagok nagy száma miatt ez nem megvalósítható. Molekulamodellezés során a molekulákat alkotó atomokat töltéssel rendelkező tömegpontoknak tekintjük és a köztük lévő kötő és nem-kötő kölcsönhatásokat párkölcsönhatások összegeként állítjuk elő. Az adott magelrendezéshez (konformáció) relatív potenciális energia értéket rendelő komplex, empirikus függvényt (alakját és a benne szereplő állandókat együttesen) erőtérrnek nevezzük. Az öt leggyakrabban használt erőtér fehérjék leírására: AMBER, CHARMM27, CVFF, ECEPP, GROMOS [33], melyek közül mi a CHARMM27-et alkalmazzuk.

Az erőterek általános alakja:

$$\begin{aligned} V &= E_b + E_\theta + E_\phi + E_\omega + E_{U-B} + E_{VDW} + E_{el} = \\ &= \sum_{\text{kötések}} k_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{szögek}} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torziók}} k_\phi[1 + \cos(n\phi - \delta)] + \\ &\quad + \sum_{\text{kényszerek}} k_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_u(u - u_0)^2 + \end{aligned}$$

$$+ \sum_{\text{nemkötő}} \varepsilon \left[\left(\frac{R_{\min ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\min ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \quad (1)$$

ahol k_i erőállandók; $b_0, \theta_0, \varphi_0, \omega_0, u_0, R_{\min}$ paraméterek, ε a dielektromos állandó, $b, \theta, \varphi, \omega, u, r_{ij}$ pedig a konformációt leíró belső koordináták.

Az első tag a vizsgált konformáción belül a kötőhosszaknak, a második a kötésszögeknek, a harmadik a torziós szögeknek az „ideális” (vagy várható) értékektől való eltéréséből eredő „büntető” potenciális energiája. A negyedik tag a kiralitási kényszerek megsértéséből és az atomok síktól való eltéréséből ered, az ötödik tag a szomszédos kötéseken át ható úgynevezett Urey-Bradley többlet energiákat tartalmazza, a hatodik tag a Van der Waals kölcsönhatásból ered, a hetedik tag pedig a Coulomb kölcsönhatások figyelembe vételére van [34]. Kedvező elrendeződések – az ideális értékektől csak kicsit vagy egyáltalán nem eltérő belső koordinátákkal rendelkező konformációk – relatív potenciális energiája alacsony lesz, ezek a molekulát leíró potenciális energiefelszín minimumhelyei.

Az energiaminimalizáció során egy feszült kiindulási konformációból a potenciális energiefelszín legközelebbi lokális minimumhelyének megfelelő, kedvezőbb elrendeződést állítunk elő. Erre többféle módszer ismeretes, mi kezdetben a legmeredekebb esés módszerét alkalmaztuk, melynek segítségével a potenciális energiefelületen való elmozdulás gradiens (energiefelület deriváltja) irányba történik. Mivel azonban ez a módszer a minimum-helyek közelében nem megfelelően pontos, ezért kiegészítésként a konjugált gradiens, azon belül is Polak-Ribiere módszerét alkalmaztuk, ahol nem csak az adott lépés gradiensét, hanem az előző lépésből származót is figyelembe vesszük, így a minimum hely pontosabban meghatározható [35].

3.3. Monte Carlo Multiple Minimum módszer (MCMM)

Az energiaminimalizáció lokális minimumhelyek felderítésére alkalmas, a globális minimumhoz tartozó konformáció (a rendszer legkedvezőbb elrendeződése az adott erőter mellett) felderítéséhez konformációs analízis módszereket kell alkalmaznunk. Monte Carlo Multiple Minimum módszer (MCMM) [36] alkalmazásakor a vizsgált molekula belső koordinátáinak (tipikusan torziós szögeinek) egy véletlenszerűen kiválasztott halmazát

véletlenszerű mértékben megváltoztatjuk, majd energiaminimalizációt hajtunk végre. Ezt a lépést sokszor megismételve egy olyan konformer-sokasághoz juthatunk, amely teljesebb képet ad a potenciális energiefelszín alakjáról. Esetünkben az ApAAP-ben elhelyezkedő szubsztrát molekula torziós szögeinek értékeit változtattuk meg 0-180° közt egy véletlenszerűen választott értékkel, valamint a szubsztrát és a fehérje egymáshoz képest is elmozdulhatott (0 – 3 Å közt) és elforoghatott (0-180° közt) szintén véletlenszerű mértékben. Az energiaminimalizáció során a szubsztrát és fehérje azon aminosavai mozoghattak, amelyek legalább egy olyan atomot tartalmaztak, amely szubsztrát atomoktól nem esett messzebbre, mint 7 Å. Az oldószer (víz) hatását GB/SA solvatációs modell alkalmazásával vettük figyelembe [37]. A számításokat a Schrödinger Suite programcsomag [38] felhasználásával hajtottuk végre.

3.4. Molekuladinamikai szimuláció (MD)

Molekuladinamikai szimuláció során a Newton-féle mozgásegyenleteket integráljuk. N darab kölcsönható atom esetén:

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

melyet felírhatunk:

$$F_i = - \frac{\partial V}{\partial r_i} \quad V(r_1, r_2, r_3, \dots r_N) \quad (3)$$

mely egyenletekben F az erő, m a redukált tömeg, t az idő, r az atomok közötti távolság, V pedig a potenciálfüggvény. Tehát az alkalmazott erőteréből származó potenciálfüggvény felhasználásával az egyes atomokhoz a rájuk ható eredő erő mértéke szerint sebességet rendelhetünk, amely a molekulában uralkodó belső feszültségek leképezése lesz. Egy megszabott, rövid intervallumon belül (időlépés) a számított átlagsebességeket állandónak tekintjük és az atomokat az adott vektorok mentén elléptetjük. Az így előállt új elrendeződés esetében az átlagsebességeket újraszámítjuk, és újabb elmozdulást hozunk létre. Ehhez olyan időlépést kell választani, mely kisebb, mint a vizsgált leggyorsabb mozgás frekvenciájának reciproka. A szimuláció során a rendszerünket (jelen esetben az enzimet) egy cellába

helyezzük, amelyet azonos méretű cellákkal veszünk körbe, amelyekben a részecskék ugyanúgy mozognak, mint az eredeti rendszerben. Így amennyiben a cella egyik felén egy részecske „kiúszik”, úgy a másik oldalon azonos részecske lép be az állandó anyagmennyiség, valamint a teljes mozgásszabadság megvalósításának érdekében (periodikus határfeltételek alkalmazása), valamint ez az eljárás a lassan lecsengő elektrosztatikus kölcsönhatás egzaktabb kezelésére is lehetőséget ad. A szimuláció során feltételezzük, hogy a rendszer adott hőmérsékletű hőtartállyal érintkezik (esetünkben a fehérjemolekulát és az inhibitort külön hőfürdőbe helyeztük). A számításokat a GROMACS programcsomag felhasználásával végeztük [39].

A számítás előkészítéseként a MCMM módszerrel meghatározott, legkedvezőbb energiájú konformációt szolvatáltuk (egy (TIP3P típusú) vízmolekulákat tartalmazó dobozba helyeztük, melynek méretét úgy választottuk meg, hogy a dodekahedron alakú doboz falai és a fehérje atomok között minimum 8 Å legyen a távolság, a rendszer semlegességét és a fiziológias sókoncentrációt Na^+ és Cl^- ionok hozzáadásával valósítottuk meg), majd az így előállított rendszer energiáját minimalizáltuk. Az energiaminimalizációt úgy végeztük, hogy a vizsgálat elején a fehérje és a szubsztrát atomjait „megfogtuk” (mozgásukat megakadályoztuk) annak érdekében, hogy a rendszer köré a számítógép által rendezett vízmolekulák számukra ideális helyzetbe kerüljenek. A rögzítés azért fontos, mert amennyiben az összes atomot egyszerre elengedjük, a rendszer a hirtelen változások hatására szétesik. A rögzítés mértékét elsőként a szubsztrát atomokon csökkentettük fokozatosan, hogy a fehérjemolekula belsejében ideális konformációba álljon, végül az enzim molekuláit is fokozatosan elengedtük. Az energiaminimalizációt követően hasonló kényszerfeltételeket alkalmazva 3 db 200 ps hosszúságú MD lépésben optimáltuk a rendszert, majd egy végső előkészítő NVT lépés során (szintén 200 ps) a nyomást stabilizáltuk. A szerkezet-gyűjtésre alkalmas molekuladinamikai szimulációt 1 bar nyomás mellett (Berendsen barosztát [40]) 300 K-en végezzük (Nose-Hoover termosztát [41, 42]) (NPT sokaság), 2 fs-os időlépést használva. A futás során keletkező konformációkat csoportokba, úgynevezett clusterekbe rendeztük, oly módon, hogy az egyes clustereken belül a konformációk közti (főlánc atomokra számított) rms érték ne legyen nagyobb, mint 1 Å.

4. Eredmények és következtetések

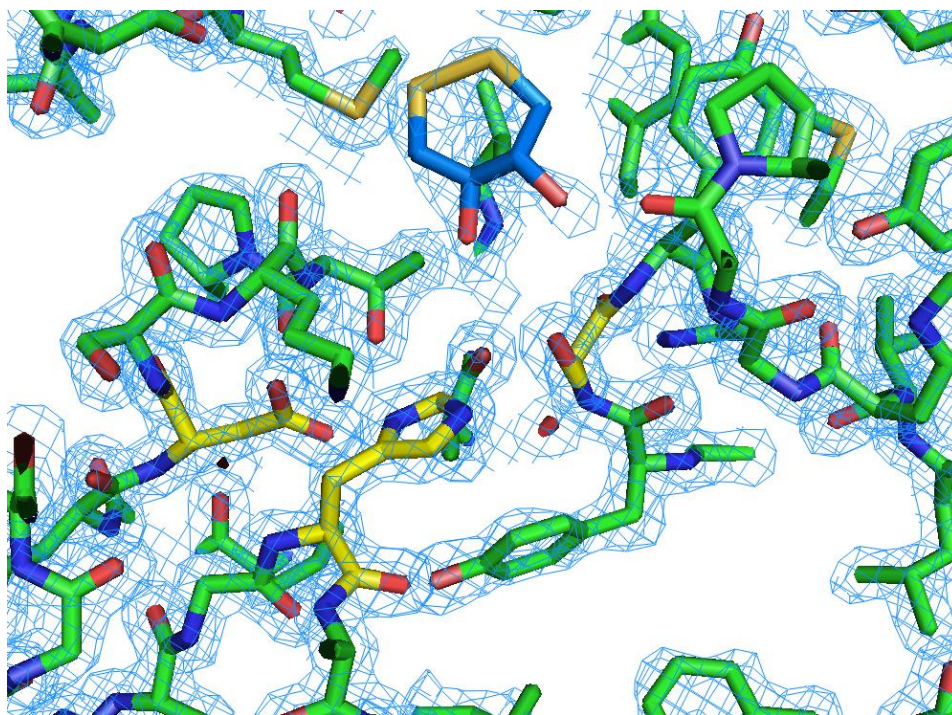
A célkitűzésnek megfelelően olyan szerkezetet kívántunk előállítani, melyben a szubsztrát-kötött állapotot befagyaszthatjuk a nyitott enzimben. Ezen kísérlet célja annak

meghatározása volt, hogy az enzim felnyílásakor a triád másik két tagjától eltávolodó His-hurok vajon milyen folyamatok eredményeként kerül vissza: a szubsztrát megkötődésének hatására vagy a domének záródásának hatására.

A molekuladinamikai szimulációval pedig a szubsztrát kötődését, kölcsönhatásait és dinamikáját kívántuk részletesebben megismerni az ApAAP két domén közti üregében. A Michaelis-komplexet modellezzük, ugyanis a hasítás utáni állapotról már sok ismerettel rendelkezünk, míg a hasítás előtről viszonylag keveset tudunk.

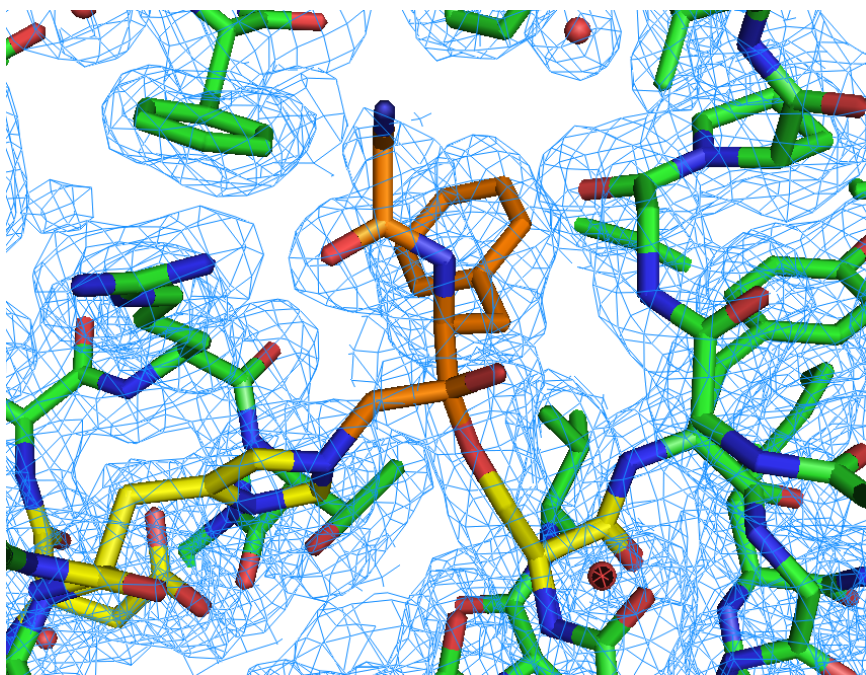
4.1. Krisztallográfiai vizsgálatok: a kovalens inhibitor kötődésének vizsgálata az enzim nyitott és csukott formájában

A kristályosítás során három módszer segítségével állítottam elő a kristályokat, amiket röntgenkrisztallográfiai úton mértünk. Az 1. fehérjeoldat kristályosítása során elsődleges célunk egy üres szerkezet kristályosítása volt, ami nem sikerült, lévén a DTT oxidálódott formája az enzim belsejébe diffundált a zárt szerkezet elsődleges vagy másodlagos pórusán keresztül (ld. 1.3.1 fejezet), és az S1 zsebben megkötődött (11. ábra). Ugyan ebben az esetben egy nyitott/csukott konformációról beszélünk, azonban ez számunkra nem mutatott új eredményeket, így ezzel a továbbiakban nem is foglalkoztam.



11. ábra A csukott konformációjú komplexátlatlan ApAAP katalitikus helye (a katalitikus triád tagjai sárga színnel), benne az oxidált DTT molekulával (kék). Az elektronsűrűségi térképet $1,5 \sigma$ elektronsűrűségi szinten világoskékkel ábrázoltam.

A második esetben CMK-inhibitoros oldatból készítettem kristályokat annak reményében, hogy a szubsztrát-kötött állapotot a kristálybeli intermolekuláris kölcsönhatások segítségével belekényszeríthetjük az ennek a kristályformának megfelelő nyitott konformációba is, annak érdekében, hogy megállapíthassuk, hogy a szubsztrát kötődés önmagában (becsukódás nélkül) képes e rendezni a katalitikus triád szerkezetét. A kristályok azonban minden esetben hasáb alakúak voltak, ami a fent említettek értelmében azt jelezte, hogy csukott/csukott formában van jelen az enzim. Ennek ellenére végeztünk mérést, melynek eredménye azonos volt a várakozással, miszerint mind a két monomer egységben megkötődött az inhibitor, és mindkét monomer be is zárult. Az inhibitor S1 és S2 helyen kötődő Gly-Phe-CMK részlete azonosítható az elektronsűrűségi térképen, az N-terminális benziloxikarbonil-Gly részlet nem, arra utalva, hogy az már rendezetlen, nem alakít ki specifikus másodlagos kötéseket az enzimmal. (12. ábra)

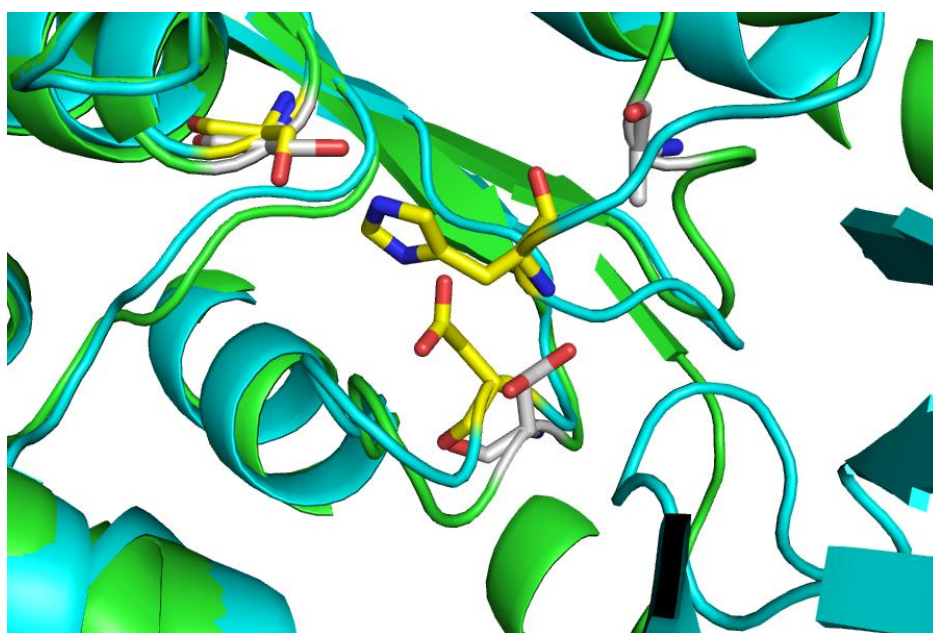


12. ábra A 2. kristály aktív helye a kovalensen kötődött inhibitorral. Az enzim csukott konformációban van. A katalitikus hely, citromsárga színnel a triád tagjai, narancssárgával pedig a CMK-inhibitor.

Az a tény, hogy az ApAAP dimer mindkét monomerje csukott, arra enged következtetni, hogy az oldatban túlnyomó többségben a csukott forma van jelen, ezért csak csukott molekulák épültek be a kristályba. Ez azért fontos számunkra, mert korábbi kutatások eredményeként feltételezik, hogy amennyiben az enzim hasítandó molekulát nem tartalmazó oldatban van ilyen körülmények között, a nyitott-csukott konformáció egymással dinamikus egyensúlyban van [8]. Az, hogy az oldatban csukott szerkezet lényegesen nagyobb mennyiségben fordul elő azt mutatja, hogy az inhibitor jelenléte ezt az egyensúlyt eltolja a

záródás irányába. Kísérleteink arra utaltak, hogy az irreverzibilis inhibitorral gátolt enzim oldatából az általunk vizsgálni kívánt kristályforma feltehetően nem állítható elő.

A fenti eredmények ellenére szerettünk volna olyan szerkezetet előállítani, melyben a nyitott konformációjú fehérje mellett jelen van a CMK-inhibitor is, ezért a komplexátlatlan fehérjeoldatból a fellebb említett körülményekkel előállítottunk a fehérjekristályokat, amelyek a nyitott/csukott konformációban tartalmazták az AAP dimert, majd kipróbáltuk mi történik abban az esetben, ha a kifejlődött kristályokat inhibitor tartalmazó oldatban áztatjuk. Egy óra áztatást követően a kristályok nem oldódtak fel és nem roncsolódtak el, így a folyékony nitrogénben lefagyasztott mintákat témavezetőim elvitték Franciaországba mérésre. A szerkezet valóban nyitott/csukott konformációt mutatott, a CMK-inhibitor azonban itt sem kötődött hozzá a nyitott szerkezetű monomer egységhez. Tehát az inhibitor nem, vagy csak gyengén kötődött a nyitott forma szubsztrátkötő helyén, azaz a csak a hidroláz domén által alkotott, tehát a nyitott formában is jelen levő, S1-S2 helyen (a szerkezetmegoldás során a kristálybeli molekulák átlagos elektronsűrűségi térképét látjuk, a nyitott molekulák legalább 30-50%-ában jelen kellett volna lennie az inhibitoroknak, hogy a térképen felismertető legyen). Ez egyrészt azt jelzi, hogy nemcsak a reakcióhoz, hanem a szubsztrátkötéshez is szükség van a His-hurok megfelelő helyzetére. A másik következtetésünk, hogy a His-hurok helyreállításához nem elegendő szubsztrát-kötődés, hanem ez a záródás következménye, azaz szükséges a propeller domén közelsége is.



13. ábra A katalitikus triád összehasonlítása a nyitott és csukott monomerben (inhibitorba áztatott nyitott/csukott kristályforma). Ciánkék színnel a csukott monomer egység, rajta a triád tagjai sárga színnel, zölddel a nyitott konformációjú monomer, a triád tagjai szürke színnel.

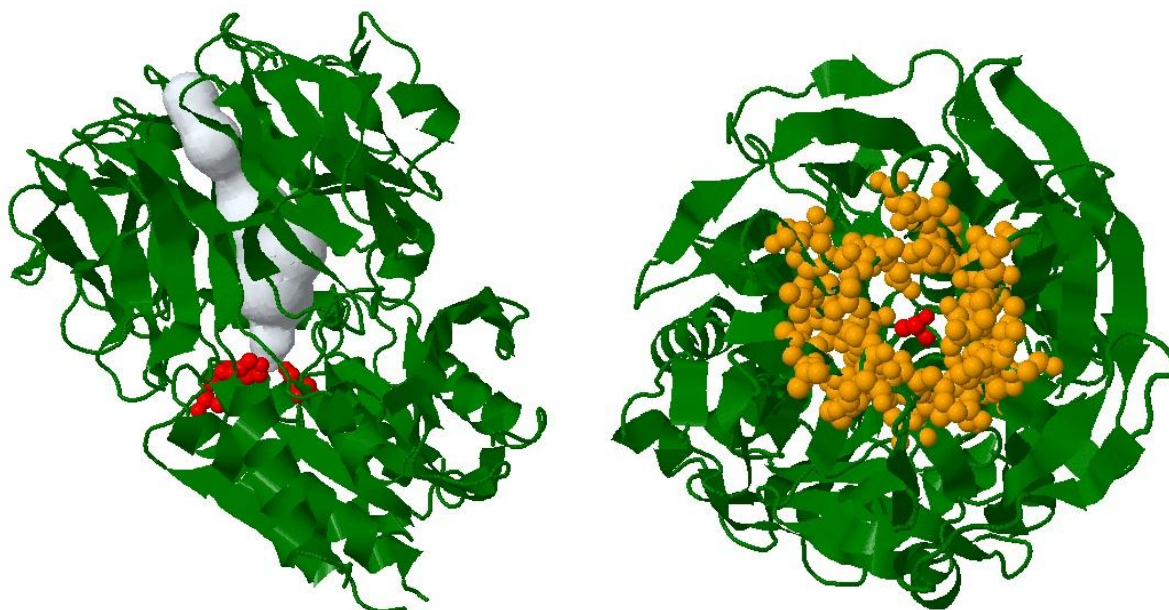
A 13. ábrán látható a katalitikus hely nyitott, illetve csukott konformációjú esetben egymásra illesztve. Itt látható, hogy míg a 445 Ser helyzete szinte egyáltalán nem változik, addig az 524 Asp helyzete már eltér, azonban ennél is szembetűnőbb az 556-os His-t tartalmazó viszonylag nagy méretű hurok eltávolodása a többi tagtól. (A nyitott forma esetében a His oldalláncát a finomítás során levágtam, mivel az egész His-hurkon kevésbé jó az elektronsűrűség, ami jelzi a mozgékonyágát).

Az áztatott kristályból nyert további eredmény, hogy a CMK-inhibitor a csukott monomer egységbe bediffundált, amely a katalitikus triád új hozzáférési lehetőségére mutat rá, hiszen kristályos formában a molekulának nincs akkora mozgásszabadsága, hogy el tudjon távolodni egymástól a propeller és a hidroláz domén.

4.2 Az aktív helyhez vezető csatornák feltérképezése

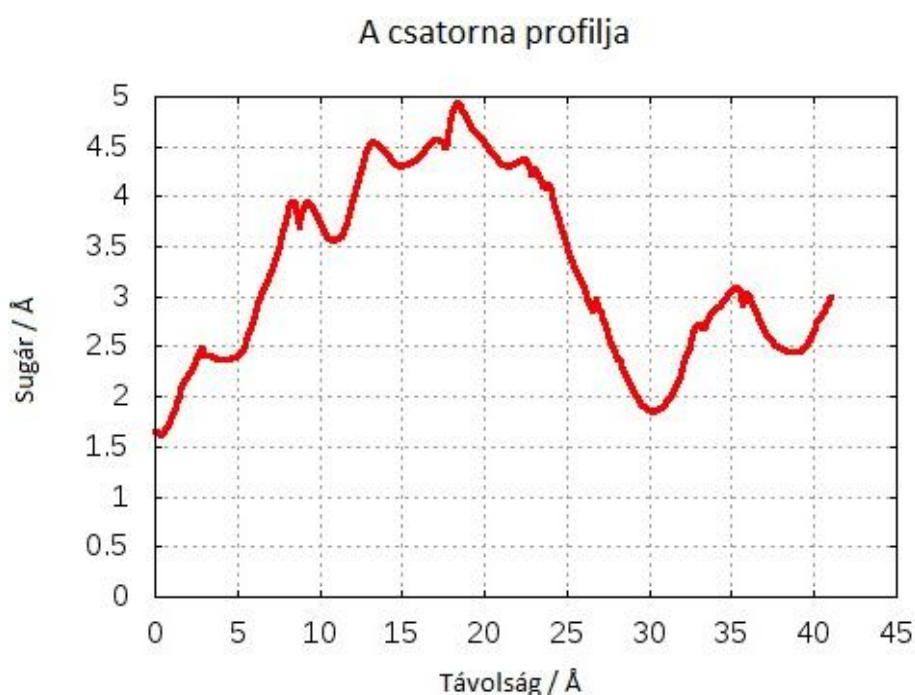
A hozzáférés lehetséges útvonalát a MOLE Online 2.0 program [43] segítségével kerestem meg. Ennek a programnak a segítségével nem csak megjeleníteni lehet a lehetséges csatornákat és üregeket, hanem az útvonalat, valamint a csatorna átmérőjét és szűkületeit, illetve ezek méretviszonyait is meg lehet határozni.

A számítások eredménye igen egyértelmű, ugyanis a program egyetlen olyan hozzáférési útvonalat talált az aktív helyhez, melyen valószínűsíthető az inhibitor molekula átjutása. Ez a csatorna a propeller doménen található és bejárata a propellerlapátok között van (14. ábra). (Ehhez hasonló eredményt a POP esetében is feljegyeztek korábban, azonban a későbbiek során ezt a hozzáférési módot valószínűtlennek tartották.)



14. ábra Az ApAAP csukott monomer egysége, bal oldalon a katalitikus triádhhoz vezető csatorna látható szürkés színnel, a katalitikus triád tagjai piros színnel ábrázolva, zölddel a monomer egység. A jobb oldali képen a monomer felülnézeti képe látható a színmegjelölések azonosak, narancssárga színnel az enzim belépő nyílását szűkítő aminosavai láthatóak.

A 15. ábrán látható a csatorna sugara a katalitikus triádtól való távolság függvényében.



15. ábra A csatorna sugara a katalitikus triádtól való távolság függvényében

Ezen az ábrán látható, hogy a bejárat közelében két helyen is beszűkül a járat. Az első esetben (a katalitikus triádtól 39 Å távolságban, a csatorna bejáratánál) a csatornába a program által rajzolt kör sugara kb. 2,5 Å, vagyis a szemköztí aminosavak távolsága 5 Å. A második

esetben a kör átmérője 3,6 Å körül van (a katalitikus triádtól 30 Å távolságban). Ezeket az eredményeket megfigyelve olyan megállapításra juthatnánk, miszerint a CMK nem képes itt bejutni, ha azonban figyelembe vesszük a program által minden atomhoz rendelt 3 Å-ös Van der Waals sugarat, valamint azt, hogy a program beírt körökkel dolgozik, viszont a bejárat nem feltétlen szabályos, akkor már valószínűbb a bejutás. Megvizsgáltam a szűkületekben elhelyezkedő aminosavakat abból a célból, hogy megállapítsam lehetséges-e a rés tágitása valamilyen módon, például egy mozgékony oldallánc elmozdulásával. A 287-es arginin és 69. aszparaginsav (első szűkület), valamint 160-as arginin, 71-es hisztidin és 72-es tirozin (második szűkület) oldalláncai nagy mértékben benyúlnak a nyílás közepe felé, amennyiben más konformációt vesznek fel (melyet egyébként a szomszédos láncok közelsége nem gátol), akkor ennél nagyobb járatot kapunk. A molekuladinamikai szimuláció eredményeit megnézve az látható, hogy a 71-es hisztidin oldallánca igen nagy mozgékonyaságú, azaz ez is megerősíti a szubsztrát bejutásának lehetőségét a propellerlapátok között.

A program talált még „pórusokat” (szám szerint kettőt), amelyek abban különböznek a fent említett csatornától, hogy két kijáratot talált a program a számolás során. Ezeknél az egyik kijárat a propeller lapátok között volt, a másik kijárat pedig a két domént összekötő hurkok között volt megtalálható. Mivel ezek esetében az alagút kb. 90°-ban elfordul (a hurkokon található főlánc miatt), valamint az alagút sugara helyenként csak 1 Å, így ezeket nem tekinthetjük potenciális bejáratnak.

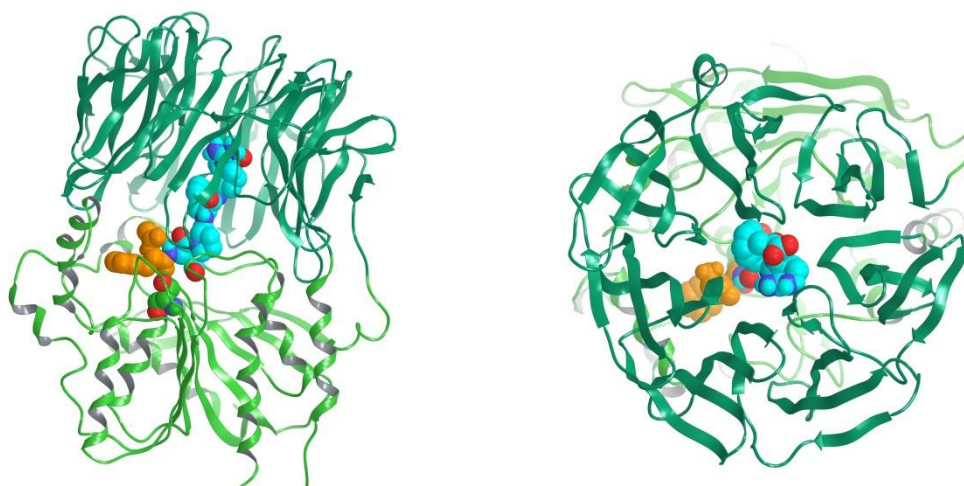
Az eredmények alapján az látható, hogy a kis méretű molekulák a propellerlapátok közötti nyíláson át bejuthatnak az enzim üregében lévő katalitikus triádhhoz, azonban nyilvánvaló, hogy a nagyobb méretű oligopeptidek itt nem férnek be.

4.3 Heptapeptid szubsztrát kötődésének vizsgálata molekuladinamikai szimulációval

A szubsztrát-megkötés mechanizmusának és a szubsztrát elhelyezkedésének a hasítás pillanata előtti vizsgálatához molekuladinamikai számításokat végeztünk. Ennek során olyan szubsztrát molekulákat helyeztünk el az enzim belsejében, amelyet korábbi vizsgálatok alapján [44] képes elhasítani. Elsőként vizsgáltuk a Gly-Phe-Glu-Pro-Phe-Arg-Ala aminosavsorrendű szubsztrátot, mivel ennek szekvenciája részben átfed a kristályosítás során alkalmazott Z-Gly-Gly-Phe-CMK összetételű szubsztrát szekvenciájával. Azért választottuk ezt a molekulát a modellezés alapjául, mert azt kívántuk megvizsgálni, hogy hogyan helyezkedik el a molekula az enzim belsejében a hasítási ponttól C-terminális irányba. Ezt

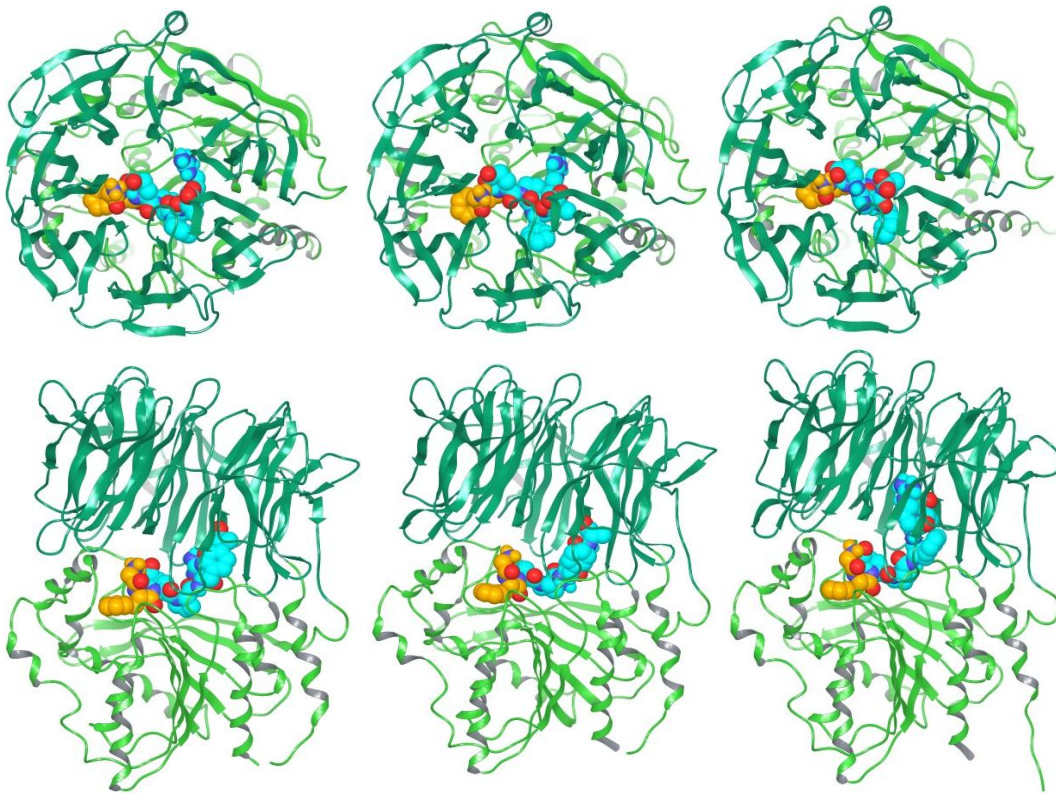
kristályosítással nem tudnánk megvalósítani, mivel csak a hasítás végtermékét látnánk, azaz csak az N-terminális részt.

A vizsgálatok első lépéseként Monte Carlo keresést végeztünk. A szimulációt 10000 lépésen keresztül, a szubsztrát összes belső torziójának lehetséges megváltozását, valamint a szubsztrát és az ApAAP relatív helyzetét vizsgálva végeztük. Ez a vizsgálat egy igen egyértelmű eredményre vezetett, a globális energiaminimumot a számolás során 19-szer találtuk meg; ezen kívül kémiaiilag értelmezhető (létezhet ilyen konformáció) tartományban csak két hasonló szerkezetet találtunk, melyeknek az energiája ennél jóval nagyobb. A szubsztrát elhelyezkedését az enzim belsejében a 16. ábra szemlélteti, melyen jól látható, hogy a molekula N-terminális része a propellerlapátok közötti csatorna felé mutat.



16. ábra Az ApAAP, benne a szubsztrát molekulával. Bal oldalon oldalról, jobb oldalon felülnézetből látható. Világoszölddel a hidroláz sötétzölddel a propeller domén, benne a szubsztrát molekulával melynek C-terminálisa okker színnel, N-terminálisa pedig ciánkék színnel van jelölve.

Az MCMM szimuláció végeredményéből elindítottunk egy molekuladinamikai szimulációt, amelyet 500 ns időtartamra terveztünk. Ez a számolás a dolgozat írásakor még nem ért véget, az első 60 ns alapján azonban elmondható, hogy összhang van a két számolás között. A MD szimuláció alapján 3 lehetséges állapot (cluster) van (17. ábra), ezek hasonlítanak az MCMM számításból származó konformációra, bár a teljesebb solvatáció és a fehérjemolekula szabad relaxációja kissé módosított a kötődési elrendeződésen.



17. ábra A Molekuladinamikai szimuláció eredménye: a 3 lehetséges állapot. Sötétzölddel a propeller világoszölddel a hidroláz domén, benne a szubsztrát: N-terminális ciánkék, C-terminális okkersárga.

A 17. ábrán látható, hogy a szubsztrát N-terminálisa többé-kevésbé a propeller domén felé orientálódik.

A POP termékekkel és termék-analógokkal meghatározott komplexeinek szerkezetével összevetve azt gondoljuk, hogy a propeller-nyíláson keresztül történő be- és kilépésnek méretkorlátja van – körülbelül 10 aminosav hosszúságú lehet a szubsztrát, mielőtt a csatorna túl zsúfoltta válna. Ezért egy további ismert szubsztrát molekula kötődési konformációját is modelleztünk, melynek szekvenciája: Glu-Ala-Leu-Phe-Glu-Gly-Pro-Phe-Ala ennek a vizsgálata a dolgozat megírásakor szintén folyik, de sajnos még nem áll rendelkezésre a kiértékeléshez elég hosszú trajektória. Ezt a molekulát azért választottuk, mert ez még hosszabb C-terminális irányban, és a Polgár László kutatócsoportja által vizsgált molekulák közül ez esetben feltételezhető, hogy az ApAAP csak egy helyen hasítja el a molekulát [44], (amely azért fontos, mert amennyiben több kisebb részre darabolja a szubsztrátot a C-terminális rövidebb lesz).

Összefoglalás, kitekintés

A prolil-oligopeptidáz enzimes család tagjainak fontos tulajdonsága, hogy az elhidrolizálható szubsztrátok méretét korlátozza az aktív helyet tartalmazó üreg mérete, ami az enzimek két doménje között helyezkedik el. A család több tagjának „csukott” kristályszerkezete, amelyben csak a propeller doménen levő szűk pórus létesít összeköttetést az üreg és a külvilág között, tudományos vitát indukált a szubsztrát bejutásának (és a termékek távozásának) módjáról, amelynek során a pórus tágulására vagy a két domén közti kapcsolat lazulására vonatkozó hipotéziseket állítottak fel, és kísérleti és számítási módszerekkel támasztották alá. A később ismertté vált különböző fajokból származó nyitott POP és nyitott ApAAP szerkezetek egy újfajta lehetőséget mutattak: a két domén szétnyílása által nagyobb méretű szubsztrátok számára is hozzáférhető az aktív hely, azonban ezekben a nyitott szerkezetekben az aktív hely szerkezete torzult (a hisztidint hordozó hurok elmozdul), így biztosítva, hogy reakció csak akkor játszódhasson le, miután az enzim „rácsukódott” a szubsztrátra. Ekképpen a nagy, szerkezettel rendelkező molekulák védve vannak a hidrolízistől. Ennek a ma sem egyértelműen tisztázott problémakörnek a további vizsgálatát tűztük ki célul, egyrészt a szubsztrátkötés és hisztidin hurok visszarendeződése közötti összefüggés felderítésével egy kis méretű szubsztrát-analóg inhibitor segítségével, másrészt egy oligopeptid szubsztrátnak az enzim üregében való elhelyezkedésének, dinamikájának és kötődésének a vizsgálatával.

A kísérletek során ApAAP fehérje kristályát kovalensen kötő inhibitort tartalmazó oldatba áztattunk, melynek eredményeként egy olyan dimert sikerült előállítanunk, melynek egyik tagja nyitott és komplexálatlan, másik tagja pedig zárt és inhibitor-kötött konformációban van jelen. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a szubsztrát megkötődése nem elegendő a hisztidint tartalmazó hurok aktív konformációjának helyreállításához, ahhoz a propeller domén közelsége is szükséges. A szerkezet alátámasztotta, hogy kis szubsztrát-analóg inhibitor belépése a csukott monomerbe a propeller doménen lévő póruson keresztül lehetséges. A molekuladinamikai szimulációk során azt találtuk, hogy a szubsztrát N-terminálisa a propeller doménen lévő pórus nyílása felé orientálódik, vagyis a propellerlapátok közötti nyílás feltehetően nem csak be-, hanem kilépő nyílásként is használható kisebb szubsztrátok számára. Ennek a be- és kijutási útvonalnak azonban méretkorlátja van. Számítások segítségével kívánjuk meghatározni a jövőben, hogy pontosan hány aminosav a határa a propellerlapátokon át történő bejutásnak.

A gerinces eredetű AAP-ok kristályosítása a mai napig nem járt sikerrel, ezért az archea eredetű enzimek flexibilitásából szerzett mélyebb ismereteket a gerinces eredetű AAP-ok kristályosítása során is fel kívánjuk használni. A gerinces eredetű AAP-ok működésének megértése pedig az enzim orvosiológiai hatása, ezáltal gyógyszertervezés miatt különösen fontos feladat.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Harmat Veronikának és Dr. Karancsiné Menyhárd Dórának, akiknek jóvoltából szakmai fejlődésem és szemléletem szempontjából is meghatározó ismeretekkel gazdagodtam, és akik segítségével ez a munka nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom a Polgár László által vezetett kutatócsoportnak az MTA Enzimológiai Intézetében a felhasznált fehérjék előállításáért.

Szintén köszönöm a kutatócsoport tagjainak, Végh Ádámnak, amiért megismerttetett a Cyberlab kristályosító robot használatával, valamint Kiss-Szemán Anna Júliának, amiért a párhuzamosan végzett PhAAP eredményeit megosztotta velem, valamint a munkám során hasznos tanácsokat nyújtott.

Végül köszönettel tartozom családomnak, barátaimnak segítségükért és kitartásukért és a nyugodt környezet biztosításáért, amely nélkül e dolgozat nem készülhetett volna el.

Függelék

A dolgozatban előforduló rövidítések és azok magyarázatai:

AAP	Acilaminoacil-peptidáz
ApAAP	<i>Aeropyrum pernix</i> K1 AAP
ApAAP komplexátlan	inhibitor nélküli oldatból kristályosított kristály
ApAAP áztatott	a komplexátlan körülményekből előállított kristályforma, amit később CMK-inhibitorba áztattunk
ApAAP gátolt	ApAAP amit CMK-inhibitorral közösen kristályosítottunk
DIP-IV	Dipeptidil-peptidáz IV enzim
POP	Prolil-oligopeptidáz
PhAAP	<i>Pyrococcus horikoshii</i> AAP
CMK	klórmetil-ke-ton
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
OPB	Oligopeptidáz-B
DMSO	dimetil szulfoxid
DTT	ditiotreitol
PEG 4000	polietilén-glikol 4000
MCMM	Monte Carlo Multiple Minimum módszer
MD	molekuladinamika
Asp	aszparaginsav
Ser	szerin
His	hisztidin
Gly	glicin
Phe	fenilalanin
Z	Benziloxikarbonil csoport

Irodalomjegyzék

1. Polgár, L. *FEBS Lett*, **311**: 281 (1992)
2. Holmquist, M. *Curr Protein Pept Sci*, **1**: 209 (2000)
3. Nardini, M. and Dijkstra, B. W. : α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing.
4. Nguyen, K.T., Pei, D. *Biochemistry*, **44**: 8514. (2005)
5. Erlandsson, R., Boldog, F., Persson, B., Zabarovsky, E.R., Allikmets, R.L., Sumegi, J., Klein, G.,Jornvall, H. *Oncogene*, **6**: 1293 (1991)
6. Kiss, A. L. *Acylaminoacyl peptidáz enzimek katalízisének vizsgálata* Doktori Értekezés (2007) http://www.enzim.hu/media/uploads/598c0c20_kiss_andras_phd.pdf
7. Tichy-Rács, É. *Egy hexamer acilpeptid-hidroláz szerkezete, a méretszelektivitás újszerű módja*. TDK dolgozat (ELTE, 2009)
8. Harmat, V., Domokos, K., Menyhárd D.K., Palló, A., Szeltner, Z., Szamosi, I., Beke-Somfai, T., Náray-Szabó, G., Polgár, L. *J Biol Chem.*, **286**: 1987 (2011)
9. Rádi, K., Hornung, B. *Egy Acilaminoacyl-peptidáz szubsztrátkötő helyének röntgendiffrakciós vizsgálata: szélesebb specifitást igazoló kísérlet*. TDK dolgozat (ELTE, 2007)
10. Kiss, A. L., Palló, A., Náray-Szabó, G., Harmat, V., Polgár, L. *J. Mol. Biol.*, **162**: 313 (2008)
11. Duysen, E. G., Li, B., Xie, W., Schopfer, L. M., Anderson, R. S., Broomfield, C. A., Lockbridge, J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**: 528 (2001)
12. Polgár, L. *Cell Mol Life Sci.*, **59**: 349 (2002)
13. Fülöp, V., Böcskei, Z., Polgár, L. *Cell*, **94**: 161 (1998)
14. Fülöp, V., Szeltner, Z., Polgar, L. *EMBO Rep*, **1**: 277 (2000)
15. Rosenblum, J. S., Kozarich, J. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**: 496 (2003)
16. Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Calabrese, J., Desnyder, R., Meltzer, H.Y. *Psychiatry Res.*, **58**: 217 (1995)
17. Maes, M., Monteleone, P., Bencivenga, R., Goossens, F., Maj, M., van West, D., Bosmans, E., Scharpe, S. *Psychoneuroendocrinology*, **26**: 17 (2001)
18. Jarkko, I. V., Risto, O. J., Pekka, T. M. *J. Biochem.*, **271**: 2705 (2004)

19. Fernandes, C. L., Bastos, M. D., Izabela, Lauria-Pires, L., Rosa, C. O., Teixeira R. L. A., Grellier, G., Schrével, J., Santana, M. J. *Microbes Infect*, **7**: 375 (2005)
20. Hershko, A., Heller, H., Eytan, E., Kaklij, G., Rose, I. A. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**: 7021 (1984)
21. Jones, W. M., Scaloni, A., Bossa, F., Popowicz, A. M., Schneewind, O., Manning, J. M. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 2194 (1991)
22. Juhász, T. *Az oligopeptidázok szerkezete és működése: katalízis az S9A enzimcsaládban* Doktori Értekezés (ELTE, 2010) http://teo.elte.hu/minosites/ertekezes2010/juhasz_t.pdf
23. Shan, L., Mathews, II., Khosla, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 3599 (2005)
24. Fuxreiter, M., Magyar, C., Juhász, T., Szeltner, Z., Polgár, L., Simon, I. *Wiley-Liss, INC.*, **60**: 504 (2005)
25. Li, M., Chen, C., Davies, D. R., Chiu, T. K. *J. Biol. Chem.*, **285**: 21487 (2010)
26. Hedstrom, L. *Chem. Rev.*, **102**: 4501 (2002)
27. Aertgeerts, K., Ye, S., Tennant, M. G., Kraus, M. L., Rogers, J., Sang, B. C., Skene, R. J., Webb, D. R., Prasad, G. S. *Protein Sci.*, **13**: 412 (2004)
28. Fülöp, V., Szeltner, Z., Renner, V., Polgár, L. *J.Biol.Chem.*, **276**: 1262 (2001)
29. Kabsch, W., *J. Appl. Cryst.*, **26**: 795 (1993)
30. Dodson, E. J., Winn, M., Ralph, A. *Methods Enzymol.*, **277**: 620 (1997)
31. Emsley, P., Cowtan, K. *Acta Cryst.*, **60**: 2126 (2004)
32. Murshudov, G. N., Vagin, A., Dodson, E. J. *Acta Crystallogr. D. Biol, Crystallogr.*, **53**: 240 (1997).
33. MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellot, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher-III, W. E., Roux, B., Schlenkrich, B., Smith, J., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Karplus, M. *J. Phys. Chem.*, **102**: 3586 (1998)
34. Rappié, A. K., Casewit C. J., Colwell K. S., Goddard, III W. A., Skiff, W. M. *J. Chem.*, **114**: 10024 (1992)
35. Zimmerman, K. *J. Comp. Chem.*, **12**: 310 (1991)
36. Goodin, D. B., McRee, D. E. *Biochemistry*, **32**: 3313 (1993)

37. Huyett, J. E., Doan, P. E., Gurbiel, R., Housemann, A. L. P., Sivaraja, M., Goodin, D. B., Hoffmann, B. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 9033 (1995)
38. MCMM, Schrödinger, LLC, Inc. New York, NY, (2009)
39. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., Lindahl, E. *J. Chem. Theory Comput.*, **4**: 435 (2008)
40. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., DiNola, A., Haak, J. R. *J. Chem. Phys.*, **81**: 3684 (1984)
41. Nose, S. A. *Mol. Phys.*, **52**: 255 (1984)
42. Hoover, W.G. *Phys. Rev.*, **31**:1695 (1985)
43. Berka, K., Hanák, O., Sehnal, D, Banáš¹, P., Navrátilová¹, V., Jaiswal, D., Ionescu, C.M., Vařeková, R. S., Koča, J., and Otyepka¹, M. *Nucleic Acids Res.*, **40**: 222 (2012)
44. Kiss A.L., Hornung B., Rádi K., Gengeliczki Z., Sztáray B., Juhász T., Szeltner Z., Harmat V., Polgár L. *J. Mol. Biol.*, **368**: 509 (2007)