

—— Tudományos Diákköri Dolgozat ——

Dürvanger Zsolt

**TIOÉTER TÍPUSÚ BELSŐ LINKEREK HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA EGY PROTEÁZ ENZIM CIKLIKUS
PEPTID-INHIBITORAINAK KÖRÉBEN ELMÉLETI
MÓDSZEREKKEL**

Témavezető: Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dóra

ELTE Kémiai Intézet

Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium



—— Eötvös Loránd Tudományegyetem ——

—— Természettudományi kar ——

—— Budapest, 2014, december 3. ——

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítséget nyújtottak a dolgozat elkészítésében. Mindenek előtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dórának, aki lehetővé tette, hogy bekapcsolódjak a kutatásba. Köszönöm a sok türelmet és segítséget, amit munkám és a dolgozat megírása során nyújtott. Köszönöm Dr. Harmat Veronikának a dolgozat elkészítése során nyújtott hasznos tanácsait.

Köszönöm Dr. Pál Gábornak, Dr. Gál Péternek és Dr. Mező Gábornak, hogy a kísérleti adatokat rendelkezésünkre bocsátották, és a megbeszélések során sok segítséget nyújtottak azok értelmezéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Jákli Imrének a számításaimhoz elengedhetetlen informatikai háttér megteremtéséért és karban tartásáért.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Irodalmi áttekintés	5
1.1 A szerin proteázok	5
1.2 A komplement rendszer proteázai	6
1.3 Proteáz inhibitorok	7
1.3.1 Bowman-Birk inhibitorok	8
1.3.2 MASP inhibitorok	9
1.4 Célkitűzések	11
2. Alkalmazott eszközök	13
2.1 A Born-Oppenheimer közelítés	13
2.2 Kvantumkémiai módszerek	14
2.2.1 Sűrűségfunkcionál-elmélet (DFT)	15
2.2.2 Szolvatációs módszerek	15
2.3 Erőterez módszerek	16
2.3.1 Energiatagok	16
2.3.2 Energiaminimalizáció	18
2.3.3 Molekuladinamika	18
3. Elvégzett számítások és eredmények	21
3.1 A két PG2-Dap izomer azonosítása	21
3.2 Az inhibitorok molekuladinamikai vizsgálata	23
3.2.1 Az erőter parametrizálása	23
3.2.2 A szimulációk menete	23
3.2.3 Eredmények	24
3.3 Inhibitor - MASP2 komplexek vizsgálata	29
3.3.1 A láncvégi védőcsoport hatása	32
3.3.2 Az inhibitorok szorosan kötött komplexeinek vizsgálata	34
4. Összefoglalás és a további tervek	44
Irodalomjegyzék	46

Rövidítésjegyzék

Arg Arginin.

Asp Aszparaginsav.

BBi Bowman-Birk inhibitor.

DFT Density functional theory, sűrűségfukcionál-elmélet.

His Hisztidin.

Ile Isoleucin.

Lys Lizin.

MASP Mannan binding lectin associated serine protease.

MBL Mannan binding lectin, mannóz kötő lektin.

NMR Nuclear magnetic resonance, Mágneses magrezonancia.

PES Potenciálisenergia-felület.

RMS Root mean square, négyzetes közép.

Ser Szerin.

SFTI Sunflower trypsin inhibitor, napraforgómagból izolált tripszin inhibitor.

Trp Triptofán.

Tyr Tirozin.

Val Valin.

Bevezetés

Az immunrendszer az élő szervezetek kórokozókkal szembeni védelmét ellátó fehérjék, sejtek, szövetek és szervek összessége. Jelentőségét mi sem mutatja jobban, mint hogy az egyszerű egysejtűektől kezdve a gerincesekig a legtöbb élőlény rendelkezik immunrendszerrel, mely az evolúció során nagyon hamar kialakult. Az egyszerűbb élőlények veleszületett immunrendszerrel rendelkeznek, mely a patogéneket nem specifikusan, általános jellemzőik alapján ismeri fel. A gerincesekben kialakult a veleszületett immunrendszer mellett az adaptív, vagy specifikus immunrendszer is, mely adott kórokozót specifikusan képes felismerni.

Megfelelő működése esetén az immunrendszer megvéd bennünket a vírusoktól, baktériumoktól, gombáktól, és egyéb kórokozóktól. Esetenként azonban előfordul, hogy az immunrendszer nem működik megfelelően. Túlerzékenysége esetén allergiás megbetegedések és igen súlyos autoimmun betegségek, ellenkező esetben immunhiányos megbetegedések alakulnak ki. A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy nagyon fontos az immunrendszer működésének részletes megismerése, illetve olyan módszerek, hatóanyagok kifejlesztése, melyek lehetővé teszik az immunrendszer finom szabályozását.

A MASP enzimek (mannóz kötő lektinhez kapcsolódó szerin proteázok) a veleszületett immunrendszer, azon belül a komplementrendszer tagjai. Három proteáz tartozik közéjük: MASP1, MASP2 és MASP3. Az immunrendszer működése során betöltött funkciójuk máig nem teljesen tisztázott. Szerepük pontosabb megértésében komoly segítséget nyújtanak a különféle MASP enzimekre specifikus inhibitorok, melyek kidolgozására és továbbfejlesztésére több éve folynak kísérletek az ELTE Biokémia tanszékén és az MTA TTK Enzimológiai Intézetében [1]. A kifejlesztett inhibitorok az immunrendszer működésének megértésén kívül szerepet kaphatnak a gyógyszerkutatásban is.

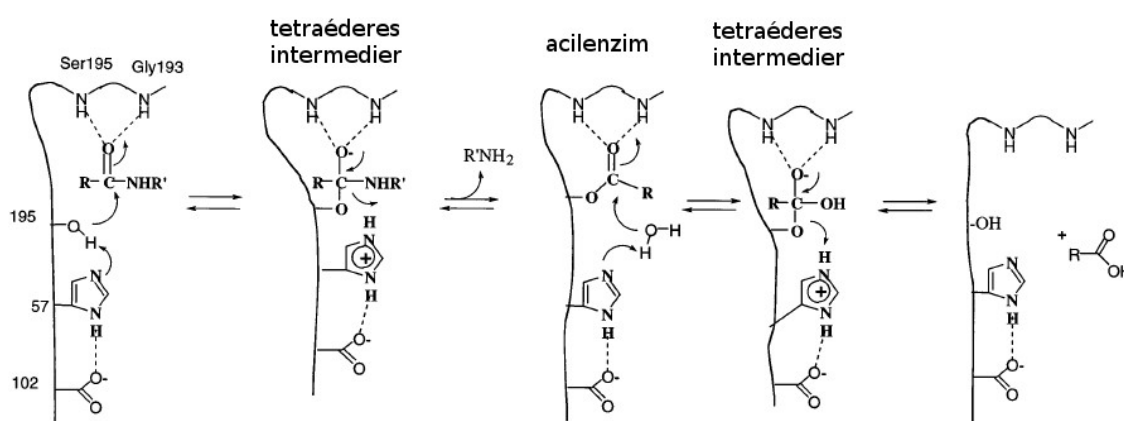
Tudományos diákköri munkám során különböző, a MASP2 fehérjére specifikus inhibitor peptideket vizsgáltam molekuladinamikai szimulációk és kvantumkémiái számítások segítségével. Az egyes, egymástól csak kis mértékben eltérő szerkezetű molekulák a MASP2 működését jelentősen eltérő mértékben gátolták. Céлом ezért az eltérő inhibíciós tulajdonságok magyarázata volt, mely a későbbiekben segíthet hatékonyabb inhibitorok tervezésében. Ennek megkönnyítésére olyan, általánosan alkalmazható módszer kidolgozása volt a célom, mellyel egyszerűen vizsgálhatók az új molekulák és a MASP2 kölcsönhatásai.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A szerin proteázok

Az enzimek a biológiai rendszerek nagyrészt fehérje alapú katalizátorai, melyek lehetővé teszik, hogy az élő szervezetekben végbemenő reakciók fiziológiás körülmények között, megfelelő sebességgel játszódjanak le. A különféle enzimek az általuk katalizált reakció típusa szerint családokba sorolhatók. A proteázok a hidrolázok családjába tartozó enzimek, melyek a peptidkötés hasítását (hidrolízisét) katalizálják. A proteázok nagyon sok biológiai folyamat szabályozásában kulcsszerepet töltenek be, ebből adódóan nagyon elterjedtek a természetben [2].

A proteázok tovább csoportosíthatók szerkezeti jellemzőik és a katalízis mechanizmusa szerint. Az ismert proteázok és azok inhibitorainak szerkezet alapján csoportosított adatbázisa a MEROPS adatbázis [3]. Az ismert proteázok körülbelül harmada a szerin proteázok közé tartozik [4]. Ezen enzimek jellemzője a hisztidin-szerin-aszparaginsav katalitikus triád jelenléte. A katalitikus triád tagjai térben közel kerülnek egymáshoz az enzim aktív centrumában. Az 1.1 ábrán a szerin proteázok által katalizált reakció általánosan elfogadott mechanizmusa látható.

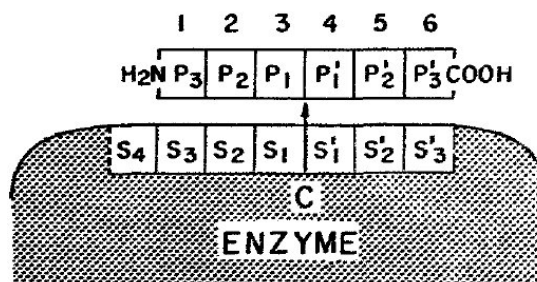


1.1. ábra. A peptidkötés hasításának mechanizmusa [4]

A reakció első lépésében az enzimes család névadója, a katalitikus szerin végez nukleofil támadást a hasítandó peptidkötés karbonil szénatomján. A katalitikus triád hisztidinje hidrogénkötést alakít ki a szerin hidroxilcsoportjával, ezzel növelve annak nukleofil jellegét. Ezt segíti elő a hisztidin és az aszpartát közt kialakuló hidrogénkötés is. Ezt követően kialakul az első tetraédes intermediér, amelynek negatív töltésű csoportját az oxianion hely két hidrogénkötéssel

stabilizálja. Az intermedier megszűnésével a peptidkötés elhasad, és az egyik termék távozik. Az aktív centrum regenerációja egy vízmolekula nukleofil támadásával, és az előző lépéshez hasonló tetraéderes intermedieren keresztül valósul meg.

A proteázok szubsztrátkötőhelyét szokás olyan kölcsönható helyekre felosztani, melyeket a szubsztrát egy aminosav oldallánca foglal el. A Schechter és Berger által 1967-ben bevezetett konvenció [5] szerint az elhasított peptidkötés előtti aminosav kapja az P1 jelzést, mely az enzim S1 „zsebében” foglal helyet. A további jelöléseket az 1.2 ábra mutatja.



1.2. ábra. A szubsztrát és a kötőhely részeinek jelölése [5]

1.2. A komplement rendszer proteázai

Az élő szervezetek kórokozókkal szembeni védelmét az immunrendszer hivatott ellátni. Gerincesekben az immunrendszer két alrendszerből áll: a veleszületett és az adaptív immunrendszerből. Az adaptív immunrendszer jellemzője a viszonylag lassú, igen specifikus immunválasz, míg a veleszületett immunrendszer a patogéneket általános jellemzőik alapján ismeri fel, így képes azok megjelenésére nagyon gyorsan reagálni [6].

A komplement rendszer a veleszületett immunrendszer fontos része, melyet 20-30 fajta, a vérben jellemzően inaktív formában megtalálható enzim alkot. A komplement rendszer aktiválódása után több módon is felveszi a harcot a kórokozókkal szemben. A patogén felületén ún. *Membrane Attack Complex* jön létre, mely pórust képez a sejtmembránon, ezzel elpusztítva a kórokozót. Ezen kívül a felülethez kötött komplement fehérjék jelként szolgálnak a fagociták számára, melyek így könnyebben felismerik és bekebelezik a kórokozót. A komplement rendszer egyes tagjai nem kötődnek a patogén felületére, ezek a vérben maradnak és immunsejteket vonzanak a kórokozó közelébe.

A komplement rendszer három útvonalon keresztül aktiválódhat. Az aktiváció során proteázok hasítanak további proteázokat, ezzel a jelet felerősítő kaszkádot (komplement kaszkád) hozva létre. Az elsőként felfedezett aktivációs útvonal a klasszikus útvonal, mely kapcsolatot teremt a veleszületett és az adaptív immunrendszer között. A fertőzés hatására az adaptív immunrendszer a kórokozókat specifikusan felismerő antitesteket szintetizál. Az antitestek kötődnek a kórokozóhoz, majd a C1 fehérjekomplexhez, mely így aktiválódik, és elindítja a komplement kaszkádot. A másodikként felfedezett alternatív útvonal első lépéseként a C3 fehérje spontán

két részre hasad. Az így létrejövő, igen reaktív C3b fragmens amino- és hidroxilcsoportokhoz kötődik a kórokozó felszínén. A kötődés után a komplement rendszer további tagjai kapcsolódnak hozzá, elindítva a kaszkádot. A szervezet saját sejtjeit más fehérjék védik, így ezek nem aktiválják a komplement rendszert.

Az utolsóként felfedezett aktivációs útvonal a lektin útvonal. A patogén felületén található mannóz részletekhez kötődik az MBL (mannóz kötő lektin), mely ez után aktiválja az MBL-hez kapcsolódó szerin proteázokat (MASP-ok). Három különböző MASP ismert: MASP1, MASP2 és MASP3. A három proteáz komplement aktiválásban betöltött szerepe ma sem teljesen tisztázott. Sokáig úgy gondolták, hogy a MASP2 egyedül aktiválja a komplement rendszert. Ezt az elméletet támasztotta alá az a megfigyelés, hogy MASP2 gén-kiütött egerekben nem volt aktív a lektin útvonal. Később szelektív MASP inhibitorok segítségével bizonyították, hogy bár a MASP2 képes autoaktivációra [7], így képes lenne a komplement rendszert egyedül aktiválni, fiziológiai körülmények között a MASP1 aktiválja [1, 8] a MASP2-t, ami elindítja a komplement kaszkádot. A MASP3 szerepe máig nem tisztázott.

Szerkezetüket tekintve a MASP enzimek a MEROPS adatbázis S1 családjába tartoznak. Ebbe a családba a szerin endopeptidázok tartoznak, melyek jellegzetessége a fent bemutatott Ser-His-Asp katalitikus triád. A család tagjait szubsztrátspecifitásuk szerint három csoportba sorolhatjuk. A tripszin-típusú proteázok Arg vagy Lys aminosavak után, a kimotripszin típusú proteázok hidrofób aminosavak után, míg az elasztáz típusú proteázok Ala után hasítják a peptidláncot. A MASP enzimek a tripszin típusú szerin proteázok közé tartoznak, és Arg oldalláncot követően hasítják a peptidkötést.

1.3. Proteáz inhibitorok

A proteázok számos biokémiai folyamat szabályozásában vesznek részt. Ehhez szükség van arra, hogy az enzimek képesek legyenek a megfelelő jel hatására aktiválódni, majd a funkciójuk ellátása után inaktiválódni. Ennek a szabályozásnak egyik fontos lehetősége az inhibitorok alkalmazása. Növények kórokozói gyakran szekretálnak proteázokat, melyekkel szemben a növények proteáz inhibitorokkal képesek védekezni [9]. Nem meglepő ezek alapján, hogy a természetben nagyon sokféle proteáz inhibitor található, melyek mechanizmusuk és szerkezetük alapján csoportosíthatók [10, 11].

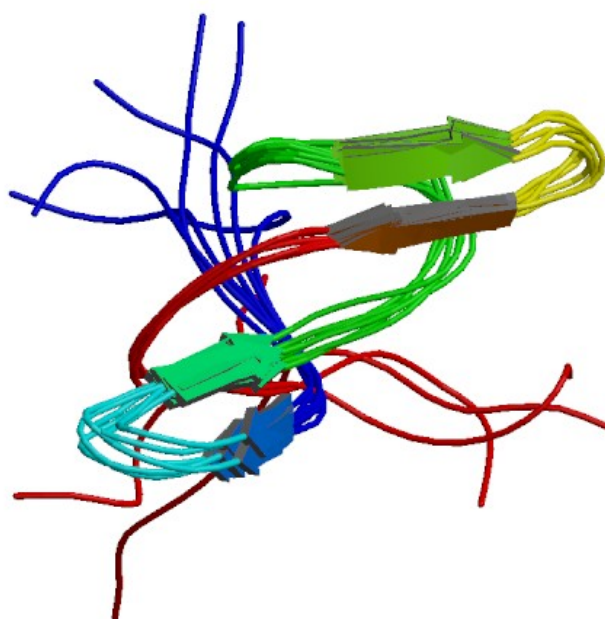
A szerin proteáz inhibitorok nagy része a célenzimhez a szubsztráthoz hasonló módon kötődik [11], az ilyen inhibitorokat szokás kanonikus inhibitoroknak nevezni. Szerkezetükben közös, hogy jól meghatározott konformációjú kötőrészsel rendelkeznek, mely az enzim kötőárákába illeszkedik. A szerin proteázok szubsztrátspecifitásáért legnagyobb mértékben az S1 kötőzsebbe illeszkedő P1 aminosav felelős. A P1 aminosav két oldalán elhelyezkedő néhány aminosav további kölcsönhatásokat alakít ki a célenzimmel. A kanonikus inhibitorok kötőrégiója a kötődésre alkalmas konformációban van, a kötődés során csak igen kis mértékben változik, és az enzim-inhibitor komplex kialakulásakor általában az enzim konformációja sem

változik jelentős mértékben.

1.3.1. Bowman-Birk inhibitorok

A Bowman-Birk inhibitorok (BBI) a proteáz inhibitorok egy családja, melynek első tagját Bowman izolálta szójababból 1946-ban [12], és Birk vizsgálta 1961-es cikkében [13]. Azóta más növényekből több, hasonló szerkezetű proteáz inhibitorot sikerült izolálni, többek között földimogyoróból [14], tehénborsóból [15] és lencséből [16].

A Bowman-Birk inhibitorok jellemzően diszulfidhidakkal és sok főlánc hidrogénhíddal stabilizált, béta redős szerkezetű peptidek, melyek általában az S1 családba tartozó proteázok működését gátolják. Kétszikűekben általában körülbelül 8 kDa molekulatömegű, két reaktív hellyel rendelkező inhibitorok, míg egyszikűekben 8 kDa tömegű, egy reaktív hellyel rendelkező, és 16 kDa tömegű, két reaktív hellyel rendelkező inhibitorok találhatók [17]. A reaktív helyek mindegyike képes a célenzimhez kötődni, így a „két fejű” inhibitorok egyszerre két enzim molekulát gátlására is képesek lehetnek. Nem ritka, hogy a „két fejű” inhibitorok két különböző proteázt képesek gátolni. A szójababból izolált inhibitor egyik reaktív részével tripszinhez, másikkal kimotripszinhez képes kötődni [18].



1.3. ábra. A szójababból izolált BBI térszerkezete (PDB: 2BBI)

A reaktív részek jellemzően béta redős szerkezetet mutatnak, és több diszulfidhíd rögzíti stabilan az aktív konformációt. Ezt a tipikus, két reaktív részt tartalmazó szerkezetet mutatja a 1.3 ábra, ahol a szójababból izolált Bowman-Birk inhibitor NMR spektroszkópia (mágneses magrezonancia spektroszkópia) segítségével meghatározott három dimenziós szerkezete látható. Inhi-

bíciós hatásuk feltételezhetően annak köszönhető, hogy a peptidkötés hasítása után a termékek a kötőhelyen maradnak, ami lehetőséget ad a peptidkötés újbóli kialakulására.

A Bowman-Birk inhibitorok az 1.3 alfejezetben bemutatott kanonikus inhibitorok közé tartoznak, az enzimhez tehát a szubsztráthoz hasonló módon, jól meghatározott, stabil konformációval rendelkező kötőrésszel segítségével kapcsolódnak, mely az enzim szubsztrátkötő árkába illeszkedik. Az enzimhez való kötődésért felelős régió jellemzően béta-redős szerkezetet mutat, mely a kötődés során is megmarad [19]. Az enzimmel a béta-redő aktív szakaszt tartalmazó szála alakít ki hidrogénhidakat, a másik béta-szál a kötőrégió megfelelő konformációban való rögzítéséért felelős. Az enzimmel jellemzően a P3-P2' aminosavak létesítenek kapcsolatot.

S. Luckett és munkatársai 1999-ben számoltak be egy napraforgómagban található Bowman-Birk típusú inhibitor (SFTI - Sunflower Trypsin Inhibitor) izolálásáról, melynek különlegessége, hogy a 14 aminosavból álló ciklopeptid molekulatömege mindössze 1516 Da [20], ami sokkal kisebb, mint az eddig ismert Bowman-Birk inhibitoroké. Az SFTI 100 pM-os K_i értékével a hasonló méretű peptideknél nagyságrendekkel hatékonyabb inhibitor, ami valószínűleg a ciklopeptid jellegének, illetve a belső hidrogénhidakkal és az egyetlen diszulfidhíddal stabilizált, viszonylag merev szerkezetének köszönhető. Kis méretének köszönhetően az SFTI jól használható további proteáz inhibitorok tervezésére, illetve gyógyszermolekulák fejlesztésekor is alapul szolgálhat.

1.3.2. MASP inhibitorok

Az előző alfejezetben láttuk, hogy a komplement rendszer működésének részletesebb vizsgálatához és potenciális gyógyszermolekulák tervezéséhez is szükség van specifikus MASP inhibitorok előállítására. Az ELTE Biokémiai Tanszéke és az MTA TTK kutatói a közelmúltban specifikus MASP1 és MASP2 inhibitorokat állítottak elő fág-bemutató (*phage-display*) technika alkalmazásával. Kiindulásként az SFTI inhibitorot használva születtek meg az SFMI (Sunflower MASP inhibitor) gátlószerek [21], míg a majdnem kétszer olyan hosszú SGPI (*Schistocerca gregaria* proteáz inhibitor [22]) alapot alkalmazva kapták az SGMI inhibitorokat [1].

A MASP2 SGMI-2 inhibitorral alkotott komplexének kristályszerkezete ismert (PDB: 3TVJ, [1], 1.4 ábra), melynek segítségével betekintést nyerhetünk a MASP2 inhibitor- és szubsztrátkötésének részleteibe. Az SGMI-2 inhibitor a pacifastin típusú inhibitorok közé tartozik, kötődését tekintve az enzimhez a kanonikus módon kötődik. Az SGMI-2 inhibitor kötődése feltehetően indukált illeszkedés (*induced fit*) mechanizmus szerint játszódik le, ugyanis viszonylag nagy mértékű konformációs változások figyelhetők meg az enzim és az inhibitor részéről is. A P1 aminosav helyét ebben az esetben Lys foglalja el, ahogy az az 1.4 ábrán is látható, azonban a lizin helyén arginint tartalmazó inhibitor sem sokkal kevésbé hatékony. A P1 lizin karbonil oxigénje a katalitikus szerin (Ser633) és a Gly631 amid hidrogénjei által alkotott oxianion zsebben található, ez a szerin proteázok szubsztrátkötésének fontos tulajdonsága.

A fő kötőrégióban (S4-S4') csak kisebb konformációs változások figyelhetők meg, melyek



1.4. ábra. A MASP2-SGMI-2 komplex térszerkezete (PDB: 3TVJ)

az inhibitor oldalláncainak elhelyezkedését biztosítják. Kivételt képez ez alól az enzim S2' zsebét blokkoló Arg630, mely jelentő mértékben elmozdul, hogy a P2' Trp oldallánc a kötőzsebbe férjen. Ez az elmozdulás várhatóan más szubsztrátok kötődése során is megjelenik, hiszen szükséges ahhoz, hogy az S2' zseb elérhetővé váljon. A távolabbi kötőrégiók esetén azonban a komplex kialakulásához nagyobb mértékű konformációs változások voltak szükségesek. A két másodlagos kötőrégió kötődéséhez az enzim 602-611. és 526-529. aminosavak által alkotott hurokrégióinak (Perona és Craik által bevezetett terminológia [23] szerint 3-as és C hurokrégiók) jelentős mértékű elmozdulására volt szükség. Más inhibitorok esetén azok méretétől függően nem biztos, hogy szükség van a hurokrégiók nagy mértékű elmozdulására.

Az SFMI-2 inhibitor a MASP2 enzim specifikus inhibitora, melynek szekvenciája a 1.1 táblázatban található. A 3., és a 11. pozícióban található ciszteinek egymással diszulfidhidat kialakítva stabilizálják a szerkezetet. Ahhoz, hogy az inhibitorok in vivo kísérletekben alkalmazhatók legyenek, meg kell akadályozni a gyors enzimatis degradációjukat, mely általános probléma peptid típusú gyógyszerjelölt molekulák esetén. A peptidek biológiai stabilitását jelentős mértékben növelheti a lineáris peptid ciklizálása. A diszulfidhíddal stabilizált szerkezet stabilabb a lineáris peptidnél, azonban a diszulfidhíd kiváltása tioéter kötéssel az enzimatis lebontásnak még jobban ellenálló peptidet eredményez [24]. A tioéter kötés kialakításának szokásos módszere az egyik cisztein lizinre cserélése, majd klóracetilzés után a két oldallánc kapcsolása.

Mező Gábor és munkatársai a közelmúltban az SFMI-2 alapján új MASP2 inhibitorokat szintetizáltak, melyekben a 3. pozícióban található, diszulfidhíd kialakításában résztvevő cisztein helyére lizint építettek be, és az oldalláncát kötötték a Cys11 kénatomjához. Az így kapott, PG2 nevű inhibitor K_i értéke 3 nagyságrenddel nagyobbak adódott, mint a láncvégeken vé-

dett SFMI inhibitoré, amiből származtatták. Ennek okaként a diszulfidhíd helyén megjelenő átkötőben - linkerben - résztvevő atomok számának növekedését látták, ezért a lizinnél rövidebb oldalláncú aminosavakkal helyettesítették a lizint. Az így kapott inhibitorok kísérletileg meghatározott K_i értékeit az 1.1 táblázat tartalmazza.

Név	Szekvencia	Nehézatomok száma a linkerben	$K_i / \mu M$
SFMI2	GYCSRSYPPVCIPD	4	0,18
Ac-SFMI2-NH ₂	Ac-GYCSRSYPPVCIPD-NH ₂	4	0,1
Ac-PG2-NH ₂	Ac-GYKRSYPPVCIPD-NH ₂	9	100
Ac-PG2-Orn-NH ₂	Ac-GY-Orn-SRSYPPVCIPD-NH ₂	8	71
Ac-PG2-Dab-NH ₂	Ac-GY-Dab-SRSYPPVCIPD-NH ₂	7	43
Ac-PG2-Dap-NH ₂	Ac-GY-Dap-SRSYPPVCIPD-NH ₂	6	0,5 / 4
Ac-PG-Agl-NH ₂	Ac-GY-Agl-SRSYPPVCIPD-NH ₂	5	~ 70-100

1.1. táblázat. MASP2 inhibitorok K_i értékei (a nem természetes aminosavak hárombetűs kódjának feloldását lásd a 3. oldalon)

Jól látszik, hogy a linker hosszának csökkenésével egy ideig a várakozásoknak megfelelően javul a peptidok MASP2 gátló hatása, a diaminopropionsavat tartalmazó peptid már csak 5x gyengébb inhibitor az eredeti SFMI-2-nél. A lizin helyett diaminopropionsavat tartalmazó inhibitor tisztítása során két izomert találtak, melyek hatékonysága is eltérőnek bizonyult. A linkerben az SFMI-2-nél csak egy nehézatommal többet tartalmazó Ac-PG2-Agl-NH₂ inhibitor esetén azonban a várakozásoknak megfelelő tendencia megfordul, ez az inhibitor a diaminopropionsavat tartalmazó peptidnél jelentősen kisebb hatékonysággal gátolja az enzim működését.

Kiemelendő, hogy az előállított peptidok mindegyike láncvégi védőcsoportokkal (*capping group*) van ellátva. Az SFMI-2 esetén ez kis mértékben növelte az inhibitor hatékonyságát, azonban ennek szerkezeti hátterére eddig nem született magyarázat.

1.4. Célkitűzések

A MASP2 SFMI-2 inhibitorral alkotott komplexének szerkezete az inhibitor jelentősen kisebb méretének köszönhetően számottevő különbségeket mutathat a nagyobb méretű SGMI-2 inhibitorral alkotott komplexhez képest. Hatékonyabb inhibitorok tervezéséhez emiatt mindenképpen szükséges a kötődés módjának vizsgálata. A MASP2 kisebb méretű inhibitorokkal alkotott

komplexének szerkezetére nézve nem áll rendelkezésünkre kísérleti adat, így ezek a komplexek molekulamodellező módszerekkel tanulmányozhatók.

TDK munkám célja tehát az előző alfejezetben bemutatott kísérleti tapasztalatok magyarázata volt:

- Az egymástól csak az átkötés hosszában különböző SFMI-2 és PG2 inhibitorok hatékonysága közt 3 nagyságrend különbség van
- A PG2 inhibitor átkötésének rövidítésével a hatékonyság először több nagyságrenddel javul, majd a tendencia a legrövidebb linkert tartalmazó peptid esetén megfordul
- A PG2-Dap peptid tisztítása során két izomer különíthető el, melyek azonos szekvenciájuk ellenére eltérő hatékonyságot mutatnak
- A láncvégi védőcsoportot tartalmazó inhibitorok hatékonyabbak a védőcsoportot nem tartalmazó peptideknél

Molekulamodellező módszerekkel a kölcsönhatások atomi felbontással vizsgálhatók. Az így kapott molekuláris kép nagy segítséget nyújthat további inhibitorok tervezése során. Munkám fő célja olyan modellezési és számítási protokollrendszer kidolgozása volt, mely segítségével a további inhibitorok egyszerűen és megbízhatóan vizsgálhatók, így a módszer segítségével további, az előzőeknél hatékonyabb MASP-2 inhibitorok tervezhetők.

2. Alkalmazott eszközök

2.1. A Born-Oppenheimer közelítés

Az atomi mérettartományban a részecskék viselkedését, azok mozgását a kvantummechanika törvényei írják le. Ebből adódóan, amennyiben egy ilyen részecskékből álló rendszer (például egy molekula) viselkedését szeretnénk leírni, a Schrödinger-egyenletet kell megoldanunk:

$$\hat{H}\psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E\psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}), \quad (2.1)$$

ahol $\mathbf{r}$ az elektronok, $\mathbf{R}$ pedig az atommagok koordinátáit jelöli. Az egyenletben szereplő $\hat{H}$ Hamilton operátor alakja egy általános molekulára:

$$\hat{H} = \hat{T}_e(\mathbf{r}) + \hat{T}_n(\mathbf{R}) + \hat{V}(\mathbf{r}, \mathbf{R}), \quad (2.2)$$

ahol $\hat{T}_e$ az elektronok, $\hat{T}_n$ a magok kinetikus energiájához tartozó operátorok, míg $\hat{V}$ a potenciális energia operátora, mely függ a magok és az elektronok helyzetétől is. Könnyebben kezelhető lenne az egyenlet, ha külön lehetne választani a magok és az elektronok mozgását. A Born-Oppenheimer közelítés értelmében ezt a legtöbb esetben meg is tehetjük, ugyanis az elektronok a magoknál sokkal könnyebbek, azok mozgását pillanatszerűen követik, így az elektronok szempontjából a magok mozdulatlannak tekinthetők.

A fentiek szerint a magok és az elektronok mozgása különválasztható:

$$\hat{H}_e(\mathbf{r}; \mathbf{R})\phi(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = E(\mathbf{R})\phi(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \quad (2.3)$$

$$(\hat{T}_n(\mathbf{R}) + E(\mathbf{R}))\chi(\mathbf{R}) = E_{TOT}\chi(\mathbf{R}), \quad (2.4)$$

ahol a 2.3 egyenlet az elektronok mozgását, míg a 2.4 egyenlet a magok mozgását írja le. Az elektronokra vonatkozó egyenlet a magok helyzetét csak paraméterként tartalmazza, a közelítés értelmében tehát minden geometriára külön megoldható. Az így kapott energiák alkotják a potenciálisenergia-felületet (PES), melynek léte tehát a Born-Oppenheimer közelítés következménye. A PES ismeretében már megoldható a magmozgásra vonatkozó egyenlet is, ezzel megkapható a rendszer teljes energiája (E_{TOT}).

Munkám során molekulák és molekula-komplexek egyensúlyi konformációját, illetve bizonyos konformációk közti energiakülönbségeket határoztam meg. Függően a minket érdeklő

rendszer méretétől és a potenciálisenergia-felület tulajdonságaitól, a feladatok megoldására alkalmazhatóak kvantumkémiai módszerek és erőterez módszerek is. A következőkben a munkám során használt eszközöket ismertetem röviden.

2.2. Kvantumkémiai módszerek

Kvantumkémiai módszerekkel történő geometria-optimalizálás során általában egy megfelelően megválasztott kiindulási szerkezetből kiindulva keressük az ahhoz legközelebbi lokális minimumot. Ehhez a 2.3 elektronikus Schrödinger-egyenletet kell megoldani. A probléma bonyolultságából adódóan a Born-Oppenheimer közelítésen túlmenően további egyszerűsítéseket kell bevezetnünk.

A Schrödinger-egyenlet megoldásakor a rendszer ún. hullámfüggvényét kapjuk meg, melyet felírhatunk az egyes elektronokhoz tartozó molekulapályák determinánsaként. A 2.3 egyenletet azonban a H_2^+ molekulaion kivételével még a Born-Oppenheimer közelítés keretein belül sem oldható meg analitikusan, így közelítő módszerekre van szükség.

Az LCAO-MO elmélet szerint az elektrópályákat megadó függvényeket kereshetjük atompályák lineáris kombinációjaként, tehát:

$$\phi_i = \sum_a c_{ia} \chi_a, \quad (2.5)$$

ahol χ_a az a . atompályát jelöli. A 2.5 képlet matematikailag mindössze egy sorfejtést jelent, jelentősége abban áll, hogy az atompályák különösen jó bázist adnak, így elég viszonylag kevés tagig elmenni a sorfejtésben ahhoz, hogy jó eredményt kapjunk.

Az atomi pályák exponenciális lecsengésűek, azonban a gyakorlati kvantumkémiaiában a jóval kisebb számításigény miatt Gauss-függvényeket, illetve azok lineárkombinációját szokás bázisként használni. A kvantumkémiai számítások során általam is használt Pople-féle „split valence” bázisok általánosan az $x - y(z...)G$ alakú nevet kapják. Az így megadott bázis esetén egyszerű esetben a törzselektronok atompályáit x , vegyértékelektronjait y számú Gauss-függvény lineárkombinációjaként keressük. Minimális bázis esetén minden betöltött atompályához egy atomi bázisfüggvényt veszünk fel. Pontosabb számításokhoz nagyobb bázist kell alkalmazni, így például megtehetjük, hogy a vegyértékelektronok esetén betöltött atompályánként két atomi bázisfüggvényt használunk (ún. double zeta bázis), melyeket különböző számú Gauss függvénnel közelítünk. A fentiek túlmenően alkalmazhatunk polarizációs függvényeket, ilyenkor betöltetlen atompályákhoz is veszünk fel atomi bázisfüggvényt (matematikai értelemben a számítást nagyobb bázison végezzük). Távoli, illetve intermolekuláris kölcsönhatások pontos leírásához szükség lehet diffúz függvények bevezetésére is, melyek lassan lecsengő függvényeket adnak a bázishoz.

A fentiek alapján a számítások során általam is alkalmazott 6-31G** bázisban a törzselektronok leírásához használt atomi függvényeket 6 Gauss-függvénnel közelítjük. A vegyérték-

elektronok esetén betöltött atompályánként két atomi függvényt használunk, az egyiket 3, a másikat 1 Gauss függvényekkel közelítve. Ezen kívül polarizációs függvényeket is használunk, már a H atomok esetén is (ezt a ** jelzés mutatja).

2.2.1. Sűrűségfunkcionál-elmélet (DFT)

Egy n elektront tartalmazó rendszer hullámfüggvénye általánosan egy $4n$ változós függvény:

$$\Psi = \Psi(x_1, y_1, z_1, \tau_1 \dots), \quad (2.6)$$

ahol τ_1 az első elektronhoz tartozó spinfüggvény. Az elektronsűrűséget adott pontban megadó függvény ezzel szemben csak 3 változós, így sokkal könnyebben kezelhető.

Hohenberg és Kohn 1964-ben bebizonyították, hogy nincs két, azonos elektronsűrűséggel, de eltérő hullámfüggvénnyel rendelkező rendszer [25]. Ezek alapján a rendszer energiája felírható az elektronsűrűség funkcionáljaként. A funkcionál egzakt alakja azóta sem ismert, így a gyakorlatban különféle közelítő funkcionálokat alkalmaznak. Munkám során a B3LYP hibrid funkcionált [26] alkalmaztam a kvantumkémiai számításokhoz. A kvantumkémiai számításokat a Schrödinger Jaguar programcsomag segítségével végeztem [27].

2.2.2. Szolvatációs módszerek

Az elméleti módszerekkel kapott eredményeinket a legtöbb esetben valamilyen kísérleti adattal szeretnénk összehasonlítani. A kísérletek során a vizsgált molekulák gyakran oldószerben találhatók. Az eddig bemutatott kvantumkémiai módszerek nem veszik figyelembe az oldószer hatását, a molekulákat vákuumban található egyedi molekulaként kezelik. Az oldószernek azonban igen komoly hatása lehet a molekula szerkezetére és energiájára, ezért számolásaink során érdemes valamilyen módon figyelembe venni jelenlétét. Különösen fontos ez biokémiai alkalmazások esetén, hiszen a biokémiai reakciók oldószerben játszódnak le, a biomolekulák pedig működésképtelenek lennének oldószer nélkül.

Az oldószer jelenlétének figyelembe vétele alapvetően két módon lehetséges. A probléma egyik, magától értetődő kezelése explicit oldószermolekulák elhelyezése a rendszerben. Ilyen módon nagyon pontos képet kaphatunk az oldószer molekulái és a vizsgált molekula kölcsönhatásairól. Könnyen belátható azonban, hogy ez a módszer a hatalmas számításigénye miatt kvantumkémiai számítások során nem alkalmazható. Molekulamechanikai módszerek alkalmazásakor van létjogosultsága az oldószermolekulák ily módon való kezelésének.

Implicit oldószermodellek esetén feltételezzük, hogy az oldószer hatása átlagolható, ezért az oldószerre az explicit modellekkel ellentétben folytonos közegként tekintünk. A leggyakrabban alkalmazott módszer esetén a vizsgált molekulát egy oldószerüregben helyezük el, majd ponttöltéseket helyezünk el rajta. Ezt követően megoldható a Poisson-Boltzmann egyenlet, mely leírja az oldott molekula elektrosztatikus környezetét az oldószerben, mely ionokat is tartal-

mazhat.

A megoldás iteratív úton történik, hiszen a molekula elektrosztatikus környezete és a molekula töltéeloszlása kölcsönösen hatással vannak egymásra. Ez az SCRF (Self-consistent reaction field) technika. A B3LYP funkcionállal végzett számításaim során a Schrödinger Jaguar programcsomagban található PBF Poisson-Boltzmann Solver eljárást alkalmaztam, míg az M06-2X funkcionállal végzett számítások esetén a Schrödinger Jaguar programcsomagban található SM8 szolvatációs eljárást [28] használtam.

A Poisson-Boltzmann egyenlet számításigényes megoldása helyett gyakran az általánosított Born modellt (Generalized Born, GB) alkalmazzák, mely a Poisson-Boltzmann egyenlet pontos közelítése. A Schrödinger Macromodel programcsomaggal végzett molekulamechanikai számításaim során a GBSA implicit oldószermodellt [29] alkalmaztam, mely a GB modellt az oldószer által hozzáférhető felület kiszámításával korrigálja.

2.3. Erőterek módszerek

Nagyobb rendszerek, például fehérjék esetén a kvantumkémiail módszerek nem alkalmazhatók a teljesíthetetlenül nagy erőforrásigényük miatt. Ilyen rendszerek vizsgálatára a kevésbé pontos, azonban sokkal kisebb erőforrásigényű erőterek módszerek (molekulamechanikai módszerek) használhatók (megjegyzendő, hogy makromolekulák vizsgálatokor jellemzően nem is pontos energiákra, hanem a molekula vagy komplex konformációjára vagyunk kíváncsiak, erre a molekulamechanikai módszerek alkalmasak). Ilyenkor az atommagot és az elektronokat a kvantummechanikával ellentétben együtt, tömeggel és töltéssel rendelkező gömbökként kezeljük, az atomok közt pedig a rugók mozgását leíró Hooke-törvényhez hasonló erőket definiálunk. Az így bevezetett erőket leíró egyenletek és az azokban lévő paraméterek alkotják az erőteret. A számítások céljától és a vizsgált rendszertől függően többféle erőter közül választhatunk. Az erőterek különféle atomtípusokat definiálnak, ugyanis az energiakifejezésekben szereplő paraméterek függenek a kölcsönhatásban lévő atomok típusától. Az erőtéren értelmezett potenciális energiát az egyes erőtagokból származó energiák összege adja meg.

2.3.1. Energiatagok

A következőkben röviden áttekintem a molekulamechanikai módszerek során alkalmazott leggyakoribb energiatagokat. Az egymással kötésben lévő atomok közti távolságra a Hooke-törvénnyel teljesen analóg potenciálisenergia kifejezés használatos:

$$V_{bond}(x) = \frac{k_b}{2}(x - x_0)^2, \quad (2.7)$$

ahol k_b a kötéserősségre jellemző állandó, x_0 az optimális kötэшossz, x pedig a kötés aktuális hossza.

Hasonló a kötősszögre vonatkozó energiakifejezés is az i, j, k atomok által bezárt θ szög esetén:

$$V_{angle}(\theta) = \frac{k_a}{2}(\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2, \quad (2.8)$$

ahol θ_{ijk}^0 az optimális kötősszög, k_a pedig az erőállandó.

Torziós szögek esetén többféle megoldás is ismert a különféle erőterekben. Az általam is használt CHARMM27 erőter esetén a torziós szögekre vonatkozó energiát a következő kifejezés adja meg:

$$V_{dihedral}(\phi_{ijkl}) = k_d(1 + \cos(n\phi - \phi_0)). \quad (2.9)$$

Látszik, hogy az energiát definiáló függvény több minimummal is rendelkezhet. Egyes esetekben ez a kifejezés önmagában nem alkalmas a valóságnak megfelelő potenciálisenergiafüggvény megadására, ilyenkor lehetőség van az energiát megadó függvényt több, a fentihez hasonló kifejezés összegeként előállítani.

A fentiekén kívül szükség esetén egyéb energiatagok is figyelembe vehetők egymással kötésben lévő atomok esetén. Planáris csoportok vagy kiralitáscentrumok esetén például bevezethető egy harmonikus potenciálfüggvény, mely bünteti a síkból való kitérést, vagy tiltja a kiralitás változását:

$$V_{impr_dihedral}(\omega_{ijkl}) = \frac{k_\omega}{2}(\omega_{ijkl} - \omega_0)^2. \quad (2.10)$$

Az egymással kötésben nem lévő atomok közt az elektrosztatikus kölcsönhatásokat, és a Van der Waals kölcsönhatást szokás figyelembe venni. A Van der Waals kölcsönhatás párkölcsönhatások összegeként adható meg a Lenard-Jones potenciálfüggvényt használva:

$$V_{VDW}(r_{ij}) = \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (2.11)$$

ahol R_{ij}^* a két atom Van der Waals sugarának összege, r_{ij} az aktuális távolságuk, ϵ_{ij} pedig erőállandó.

Az elektrosztatikus hozzájárulás kiszámításának alapja a Coulomb-törvény. Ez az energiatag is párkölcsönhatások összegeként áll elő:

$$V_{Coulomb}(q_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}, \quad (2.12)$$

ahol q_i az i atom töltése.

A kötésben nem lévő atomok közti kölcsönhatások elméletileg az összes, kötésben nem lévő atom közt hatnak, a gyakorlatban viszont egy bizonyos távolság felett elhanyagolható a hatásuk, ezért a számítások során a számításigény csökkentésének érdekében bizonyos távolság felett figyelmen kívül hagyhatók.

Az erőterek természetesen csak abban az esetben adják a rendszer elfogadhatóan pontos leírását, amennyiben az energiatagok paraméterei megfelelően pontosak. A paramétereket ezért

minden atomtípus esetén külön meg kell adni, és figyelni kell arra, hogy minden, eltérő viselkedésű atomhoz külön atomtípust rendeljünk. A paraméterek kísérleti adatok (például röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezetek, infravörös spektrumok...), vagy kis rendszerekre elvégzett, pontos kvantumkémiai számítások alapján határozhatók meg.

Molekulamechanikai számításaim során a Schrödinger Macromodel programcsomag használatakor az OLPS [30], a Gromacs molekuladinamikai programcsomag használatakor pedig a CHARMM27 [31] erőtereket alkalmaztam. Mindkét erőtér szerves molekulákhoz, azon belül is leginkább biomolekulákhoz lett kifejlesztve és optimalizálva.

A molekuladinamikai szimulációk során alkalmazott CHARMM27 erőtér kizárólag a természetben előforduló fehérjeépítő aminosavak paramétereit tartalmazza. Ezzel az erőtérről tehát az 1.1 táblázatban szereplő inhibitorok nem vizsgálhatók. A problémára megoldást jelent az erőtér parametrizálása, tehát az inhibitorokban előforduló nem természetes aminosavak és kötések paramétereinek az erőtérbe illesztése.

2.3.2. Energiaminimalizáció

A fent bemutatott energiagtagok összegeként értelmezett potenciális energia minden geometria esetén meghatározza az erőtéren értelmezett potenciálisenergia-felület egy pontját. A kvantumkémiai módszerekhez hasonlóan erőteres módszerek esetén is lehetőség van a kiindulási szerkezethez legközelebb eső lokális minimum keresésére. A módszer kisebb rendszerek esetén is alkalmazható előminimalizációként a pontosabb kvantumkémiai számítás előtt, nagyobb rendszerek esetén pedig a nagy számításigényű kvantumkémiai módszerek helyett használható.

Az energiaminimalizációhoz használható algoritmusok közül a legegyszerűbb eljárás a leghatékosabb ereszkedés (*steepest descent*) módszer, melynek során a potenciálisenergia-felület gradiensével ellentétes irányban történik az ellépés a vonal menti keresés során talált minimum-pontba. A módszer hátránya, hogy a minimum közelében lassan konvergál, ezért a minimum közelében érdemes olyan eljárást alkalmazni, mellyel gyorsabban elérhető a konvergencia.

Ilyen módszerek az ún. konjugált gradiens eljárások, melyek a következő lépés kereséséhez felhasználják az előző deriváltak értékét is, ezzel javítva az eljárás hatékonyságát. Ezek közé tartozik a TNCG (Truncated Newton Conjugated Gradient) [32] módszer is, amit az OLPS erőtérről végzett számításaim során alkalmaztam.

2.3.3. Molekuladinamika

Bonyolult potenciálisenergia-felület esetén az optimális szerkezet megtalálásához nem elég megkeresni a kiindulási szerkezethez legközelebb eső lokális minimumot, ugyanis a rendszer sok lokális minimummal rendelkezhet, minket pedig általában a rendszer globális minimumához tartozó geometria érdekel. Ilyenkor olyan módszereket kell alkalmaznunk, mely lehetőséget nyújt a PES nagyobb részének bejárására. Az egyik ilyen módszer a molekuladinamikai

szimuláció, mely az erőter által definiált erők felhasználásával a rendszer időfüggő, klasszikus mechanikai szimulációja.

A szimuláció során a 2.3.1 alfejezetben bemutatott energiakifejezésekből meghatározzuk az atomok között ható erőket:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V(r_1, r_2 \dots r_N)}{\partial r_i}, \quad (2.13)$$

ahol r_i a potenciálisenergia függvény i . változója. Az erők alapján az atomok mozgása Newton-egyenletek megoldásával kapható meg:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = \mathbf{F}_i. \quad (2.14)$$

A két egyenlet numerikus módszerekkel oldható meg, megfelelően megválasztott lépésközökkel. Az egyes időlépések között az erőket állandónak tekintjük, ezért fontos a lépésközök megfelelő megválasztása. A molekuladinamikai szimulációk eredményeképpen a rendszer trajektóriáját kapjuk, mely tartalmazza a vizsgált rendszer részecskéinek koordinátáit minden időlépésben.

A szimuláció során a részecskék diffundálnak, így véges méretű rendszer szimulációja esetén egyes atomok „kiúszhatnak” a rendszerből. Ezt a problémát az ún. periodikus peremfeltételek bevezetésével kerülhetjük el. A térben ható elektrosztatikus kölcsönhatások pontos összegzéséhez is szükség van a periodikus peremfeltételek bevezetésére. A vizsgált molekulát vagy komplexet egy dobozba helyezük, melyet saját másolataival veszünk körül. A doboz feltölthető oldószermolekulákkal (a molekulamechanikai módszerek a kvantumkémiai módszereknél jelentősen kisebb számításigénnyel rendelkeznek, ezért alkalmazhatunk explicit oldószermodelleket) és ionokkal, ezzel jól közelítve az oldatbeli körülményeket.

A molekuladinamikai szimulációk előtt általában szükség van a kiindulási szerkezet több lépéses minimalizációjára, mert az optimálistól távoli kiindulási szerkezetben túl nagy erők lépnének fel, az azokból eredő hirtelen, nagy mértékű elmozdulások pedig lehetetlenné tennék a rendszer egyensúlyi szimulációját.

A molekuladinamikai szimulációk többféle termodinamikai sokaságon végezhetők, függően attól, hogy milyen termodinamikai függvényeket tartunk állandó értéken. A legfontosabb sokaságokat a 2.1 táblázat tartalmazza.

<i>Név</i>	<i>Állandó függvények</i>
Mikrokanonikus sokaság	N, V, U
Kanonikus sokaság	N, V, T
Izoterm-izobár sokaság	N, P, T

2.1. táblázat. Termodinamikai sokaságok

A fentiek szerint tehát, amennyiben nem mikrokanonikus sokaságon szeretnénk végezni a szimulációt, gondoskodnunk kell a hőmérséklet, és esetenként a nyomás állandó értéken tar-

tásáról. A hőmérséklet rögzített értéken tartásának egyik legegyszerűbb módja a Berendsen-termostát [33] alkalmazása, mely a rendszert egy hőtartályhoz csatolja, és a részecskék sebességeit úgy skálázza, hogy a hőmérséklet exponenciálisan relaxáljon a beállított értékhez:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}. \quad (2.15)$$

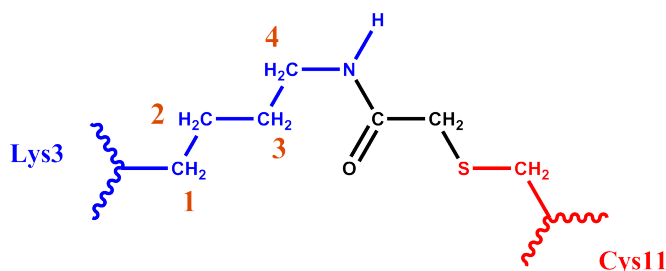
A Berendsen-termostát alkalmazásával nem kapunk szabályos kanonikus sokaságot. Giovanni Bussi és munkatársai 2007-ben számoltak be az általuk kifejlesztett, Berendsen-termostáthoz hasonló algoritmusról, mellyel szabályos kanonikus sokaságot kaphatunk [34]. Az általam végzett szimulációk során is ezt a termostátot alkalmaztam.

A nyomás állandó értéken tartásához a doboz méreteit és az atomok pozícióját kell a szimuláció során a kívánt nyomáshoz igazítani. Erre megfelelő megoldást nyújt Berendsen algoritmus [33].

3. Elvégzett számítások és eredmények

3.1. A két PG2-Dap izomer azonosítása

Az 1.1 táblázatban bemutatott PG2 inhibitorok közös tulajdonsága, hogy a 3-as pozícióban található aminosav az oldalláncán keresztül, amidkötés és tioéter kötés segítségével van összekapcsolva a 11-es pozícióban található ciszteinnel. A 3.1 ábrán látható a beépített átkötés sematikus szerkezete lizin oldallánc esetén. A számozott CH₂ csoportok hiányoznak a lizinnél 1, 2, 3, illetve 4 CH₂ csoporttal rövidebb oldalláncú aminosavakból.

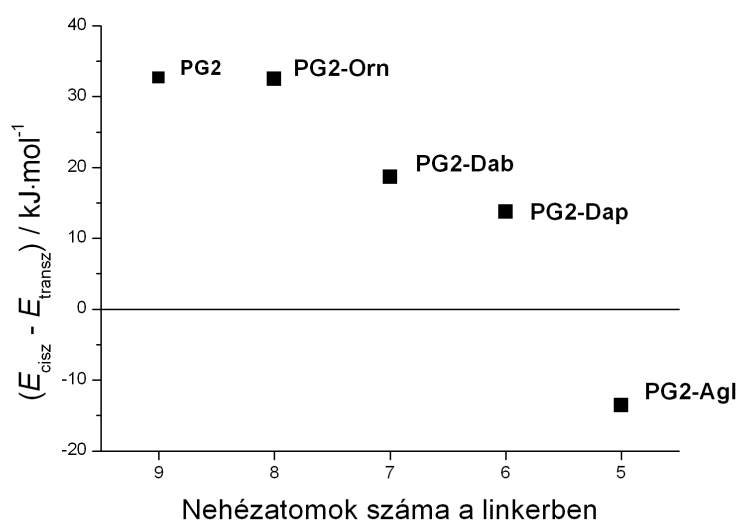


3.1. ábra. A PG2 inhibitorokban található linker sematikus szerkezete

A peptidek szintézise és tisztaságvizsgálata során kiderült, hogy a diaminopropionsavat tartalmazó peptid esetén két izomert sikerült előállítani, melyek inhibíciós hatása kis mértékben különbözik. Első célom a két PG2-Dap izomer azonosítása volt, ugyanis ezek szerkezetének ismerete szükséges a további vizsgálatokhoz. Az egyre rövidülő átkötések miatt reálisnak tűnik a feltételezés, hogy a két izomer az átkötés amidkötésének térállásban különbözik egymástól.

A feltételezés igazolására a Schrödinger Macromodel szoftvert használva ún. *drive*-számolásokat végeztem. Ennek során a kiválasztott torziós szöget a kiindulási (transz) szerkezethez képest 30°-os lépésként elforgattam, majd minimalizáltam a kapott szerkezeteket. Ehhez az OLPS erőteret alkalmaztam, a minimalizálást a TNCG-módszerrel végeztem el. A 3.2 ábrán láthatók a kapott eredmények.

Jól látható, hogy a PG2-Agl peptid kivételével minden esetben a transz (a diéderes szög 180°-os) izomer a stabilabb, a linker hosszának csökkenésével azonban csökken a transz és a cisz izomerek energiakülönbsége, sőt, a legrövidebb változat esetén meg is fordul az energiasorrend. Természetesen ezek a számítások erősen közelítő jellegűek, a cisz-transz izomériára vonatkozó feltevést azonban igazolni látszanak, hiszen a PG2-Dap inhibitor esetén a legkisebb az energiakülönbség a két izomer közt, így ebben az esetben várható, hogy mindkét izomer



3.2. ábra. A drive számítások eredményei

jelen lehet. Mindenképpen figyelmet érdemel az az eredmény is, hogy a PG2-Agl peptid esetén a cisz forma a stabilabb, ugyanakkor éppen ez az a peptid, mely meglepő módon - a várt tendenciát megfordítva - sokkal kevésbé hatékony inhibitor, mint az egy nehézzal hosszabb linkert tartalmazó peptid.

A fenti következtetések igazolása és az energiakülönbségek pontosabb meghatározása céljából kvantummechanikai számításokat is végeztem a PG2-Dap és a PG2-Agl cisz és transz izomereire. A számításokat DFT szinten végeztem, B3LYP hibrid funkcionál használatával, 6-31G** bázison. A 210, illetve 213 atomot tartalmazó rendszerek nagy méretére való tekintettel nem volt lehetőségem ennél magasabb elméleti szintű módszert és nagyobb bázist alkalmazni. A számítások során a vizes közeget a Poisson-Boltzmann egyenlet megoldásán alapuló módszerrel vettem figyelembe. Az így, oldószer figyelembe vételével végzett iteratív geometria optimalizálás nem konvergált, ezért az oldószerbeli energiákat a vákuumban optimalizált szerkezet solvatációjával határoztam meg. A kapott energiákat a 3.1 táblázat tartalmazza.

Név	E / E_h
PG2-Dap transz	-5768,168670
PG2-Dap cisz	-5768,155168
PG2-Agl transz	-5728,841546
PG2-Agl cisz	-5728,857939

3.1. táblázat. DFT számítások eredményei

Látható, hogy a várakozásoknak megfelelő eredményt kaptuk. A PG2-Agl izomerek közti energiakülönbség 43,04 kJ/mol a cisz izomer javára, míg a PG2-Dap izomerek közti energiakülönbség kisebb, 35,45 kJ/mol a transz izomer javára. A fenti eredmények alapján valószínűleg

helyes az eredeti feltevés, az izolált két izomer a linker amidkötésének transz és cisz izomere lehet.

3.2. Az inhibitorok molekuladinamikai vizsgálata

Célunk az inhibitorok eltérő hatékonyságának szerkezet alapú magyarázata volt. Ehhez minde- nek előtt ismerni kell a vizsgálni kívánt inhibitorok oldatbeli szerkezetét, melyet legegyszerűb- ben molekuladinamikai szimulációk segítségével kaphatunk meg. Ehhez az előző alfejezetben bemutatott drive számítások során kapott legalacsonyabb energiájú szerkezetekből indultam ki.

3.2.1. Az erőter parametrizálása

A molekuladinamikai szimulációk során a Gromacs programcsomagot használtam a CHARMM27 erőtérrrel. A programcsomag és a benne található erőterek biológiai makromolekulák (nuklein- savak és fehérjék) vizsgálatára lettek kifejlesztve. Az általam vizsgálni kívánt inhibitorok azon- ban a természetes peptidekben és fehérjékben nem előforduló aminosavakat (Dap, Dab, Agl, Orn) tartalmaznak, melyek a Cys11 aminosavval a természetes peptidekben nem megtalálható kötésen keresztül vannak összekapcsolva. A CHARMM27 erőtér tartalmazza a természetes aminosavak paramétereit (a 2.3.1 alfejezetben bemutatott kifejezésekben szereplő, atomtípustól függő paraméterek értékét), a nem természetes aminosavak paramétereit azonban meg kell adni a szimuláció előtt, ahogy ezt a 2.3.1 alfejezetben is láttuk. Fontos a paraméterek minél pon- tosabb megadása, hiszen az erőteres módszerek csak megbízható és pontos paraméterkészlet alkalmazása esetén adhatnak megbízható eredményeket.

A parametrizálás során a lizin aminosav CHARMM27 erőtérben található paramétereiből indultam ki, hiszen ezek az aminosavak a lizinből vezethetők le az oldallánc hosszának csök- kentésével. A kapcsolás során létrejövő amidkötés paramétereire különösen nagy hangsúlyt kellett fektetni. Szükség volt az atomi töltések, a geometriai paraméterek, egyes esetekben pe- dig a toriós szögek meghatározására is. Ehhez a PG2 molekulán DFT számításokat végeztem 6-31G** bázison a Schrödinger Jaguar program segítségével. Az így kapott paramétereket, és a lizin esetén az erőtérben már megtalálható paramétereket felhasználva az erőtérbe beil- lesztettem az új aminosavakra vonatkozó információkat. Az ily módon továbbfejlesztett erőtér segítségével a vizsgálni kívánt peptidek már probléma nélkül modellezhetők.

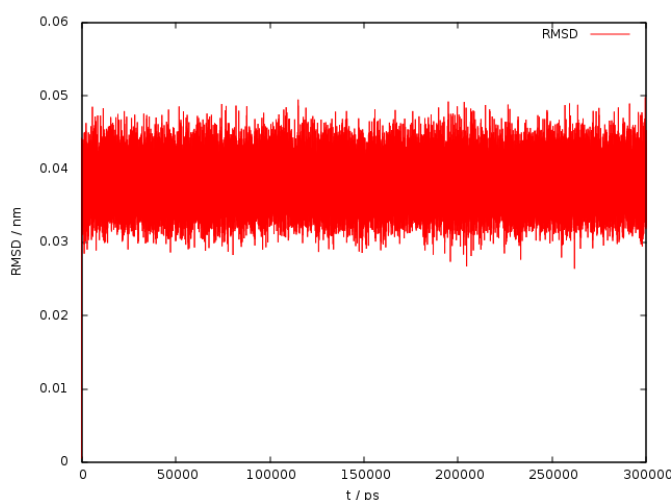
3.2.2. A szimulációk menete

Az erőtér parametrizálása után elkezdhettem az inhibitorok vizsgálatát. A szimulációkat min- den esetben a drive számításokból kapott optimális szerkezetből kiindulva végeztem Kivételt képez ez alól az aminoglicint tartalmazó inhibitor, ahol a transz állású izomerből indítottam a szimulációt. Ennek oka az volt, hogy a rendszer viselkedéséről fontos információkat hordoz az is, hogy a szimuláció során a linker amidkötése képes-e a kedvezőbb, cisz állásba átfordulni.

További ok, hogy a későbbi vizsgálatok során szükség lehet a transz izomer szerkezetének ismeretére is. A 2.3.3 alfejezetben láttuk, hogy a molekuladinamikai szimulációk előtt a rendszert egyensúlyba kell juttatnunk, különben a túl nagy erőkből eredő túl nagy gyorsulások miatt nem tudjuk a rendszert egyensúlyban szimulálni. A szimulációt ezért egy négy lépéses minimalizáció előzte meg, melynek során először a vízmolekulák helyzetét optimalizáltam merev inhibitor mellett, majd három lépésben feloldottam a peptidre vonatkozó megkötéseket, és a vízzel együtt minimalizáltam a szerkezetet. Ez után három, 200 ps hosszúságú előszimuláció következett, melyek során az előzőekben látott csökkenő erősségű kényszerek segítségével tovább optimalizáltam a vízmolekulák és a peptid atomjainak helyzetét. Az utolsó előtti lépés egy kanonikus sokaságon végzett, 200 ps hosszú előszimuláció volt, melynek célja a nyomás stabilizálása. Az így egyensúlyba hozott rendszeren, állandó nyomás és hőmérséklet mellett végeztem a molekuladinamikai szimulációkat. Az időlépések hossza minden esetben 0,002 ps, a hőmérséklet 300 K volt. A töltéseket Na^+ és Cl^- ionok semlegesítették, az ionerősséget 0,15 M NaCl-al állítottam be. A szabad inhibitorok szimulációja során a dobozban a peptiden kívül körülbelül 1600 vízmolekula volt.

3.2.3. Eredmények

A fent bemutatott módon végrehajtott első szimulációk hossza 300 ns volt. A szimulációk során célunk a rendszer egyensúlyba juttatása, majd az egyensúlyi viselkedése alapján következtetések levonása. Ehhez a szimulációt a rendszer egyensúlyba jutásáig kell futtatni, majd az egyensúlyi trajektória vizsgálata alapján lehet következtetéseket levonni. Az egyensúlyba jutás ellenőrizhető a kiindulási szerkezettől való RMS eltérések változásának vizsgálatával. A 3.3 ábra az RMSD értékek tipikus változását mutatja a vizsgált inhibitorok esetén, a PG2-Dab példáján bemutatva.



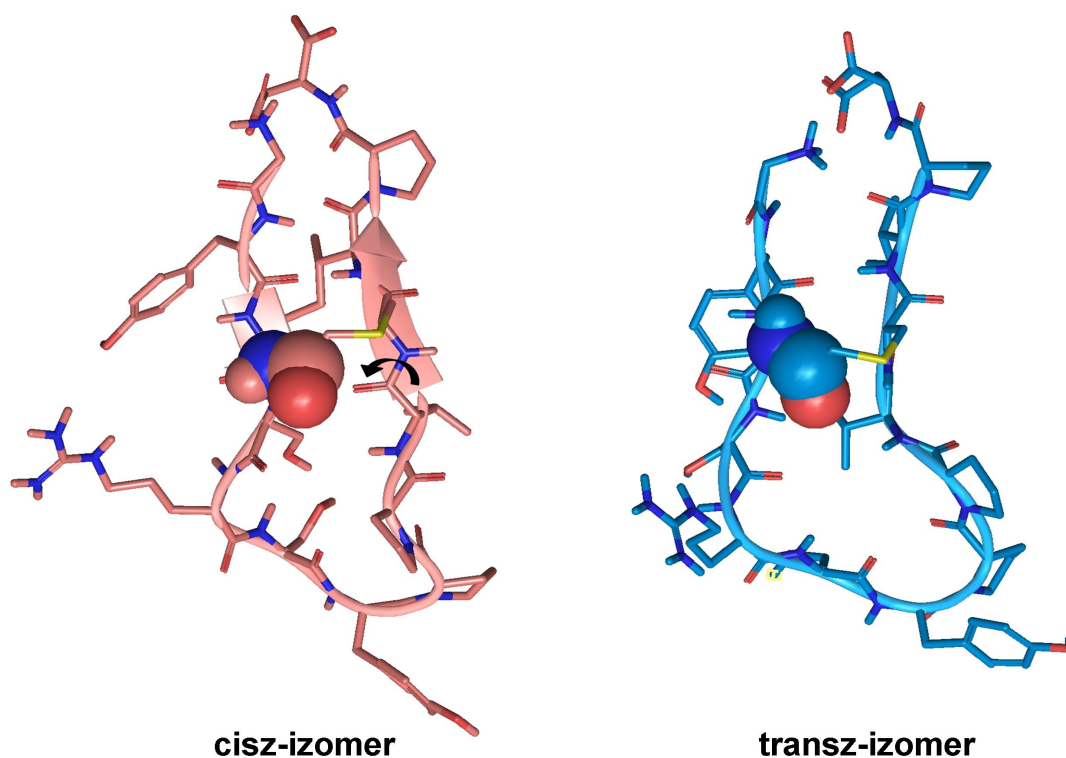
3.3. ábra. Az RMSD értékek változása a PG2-Dab inhibitor esetén

Jól látszik, hogy az RMSD értékek alig változnak a szimuláció során, így az inhibitorok

vizsgálatához rövidebb szimulációk is elegendők. A futtatott szimulációk hossza változó volt az egyes inhibitorok esetén, a fentiek alapján azonban látszik, és az RMS eltérések változásának vizsgálatával minden esetben meg is bizonyosodtam róla, hogy ez a levonható következtetéseket nem befolyásolja.

Molekuladinamikai szimulációkat végeztem az összes, PG2 alapú inhibitorra. A Dap és Agl aminosavakat tartalmazó peptidek esetén vizsgáltam a transz és a cisz izomereket is. A PG2-Agl peptid esetén ehhez az erőter paraméterei közt csökkentettem a cisz és a transz formák közti energiagát magasságát, melynek hatására az eredetileg transz formából indított szimuláció során a stabilabb, cisz formában jutott egyensúlyba a rendszer. Erre azért volt szükség, hogy a cisz és a transz forma külön-külön vizsgálható legyen, ami szükséges ahhoz, hogy a cisz forma stabilitására magyarázatot adhassunk.

A 3.1 alfejezetben láttuk, hogy a PG2-Agl inhibitor a többi peptidtől eltérően viselkedik, a linker amidkötésének cisz formáját preferálja. Erre a viselkedésre a cisz és a transz izomerek konformációjának ismeretében szerkezeti magyarázat adható. Az egyensúlyi trajektória alapján számolt átlagszerkezetek a 3.4 ábra mutatja.



3.4. ábra. A PG2-Agl izomerek oldatbeli átlagszerkezete (a cisz és transz amid részleteket kiemelttem)

A cisz izomer esetén megfigyelhető, hogy a szerkezetet hidrogénhidak stabilizálják, béta redős szerkezet alakul ki, ami megszokott a Bowman-Birk inhibitorok esetén. Kiemelendő, hogy a cisz izomer esetén hidrogénhíd alakult ki a Val10 aminosav karbonil oxigénje, mint akceptor és a Ser4 amid nitrogénje, mint donor közt (a továbbiakban a hidrogénhídkötésekre a donor és akceptoratomok megjelölésével hivatkozom), mely a transz izomer esetén nem tudott kialakulni. A transz izomer esetén a Val10 karbonil oxigénje a síkból kifordul (ezt a 3.4 ábrán látható nyíl mutatja), mert a Val10 amidkötésének N-H dipólusa kedvezőbb elektrosztatikus környezetet teremt a linker főlánc síkjába kényszerülő karbonil oxigénje számára. A fentiek miatt tehát nem képes kialakulni a kedvező, béta redős szerkezet, ami a transz izomer magasabb energiáját magyarázza. A többi inhibitor esetén a hosszabb linkerből adódó nagyobb mértékű flexibilitás miatt nem merül fel ez a probléma.

A PG2-Dap esetén is szükség volt mindkét izomer modelljének előállítására, azonban a PG2-Agl esetén látott megoldással nem lehetett előállítani a cisz izomer modelljét, hiszen ebben az esetben a transz forma a stabilabb, a cisz állásból indított szimulációk során ezért az amidkötés transz állásba fordult át. A cisz izomer modelljének előállításához emiatt az erőter paramétereit úgy módosítottam, hogy a linker amidkötésének torziós szögét megadó energiafüggvénynek kizárólag 0° -ban legyen minimuma. A cél ebben az esetben is csak a cisz izomer modelljének előállítása volt, melyre szükség lesz a további vizsgálatok során, ezért nem okoz problémát a realistól eltérő potenciálfüggvény alkalmazása. A többi inhibitor esetén elég volt a jelentősen stabilabb transz izomer szimulációja, amihez nem volt szükség az erőter további módosítására.

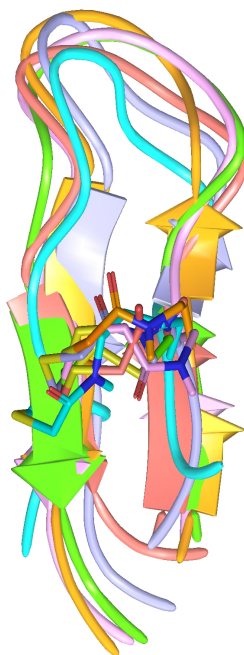
Molekuladinamikai szimulációkat végeztem az összes inhibitor védett változatának szabad, enzimhez nem kötött formájára, a kapott szerkezetek főláncának konformációját a 3.5 és a 3.6 ábrák mutatják. Az ábrákon kék szín jelöli a PG2, narancs szín a PG2-Orn, élénk lila a PG2-Dap cisz, kékes lila a PG2-Dap transz, és piros szín a PG2-Agl peptideket.

Megállapítható, hogy a szerkezetek egymástól eltérnek, azonban a szerkezetek alapján nem azonosítható olyan, szisztematikus eltérés, ami magyarázatot adhatna az eltérő hatékonyságra.

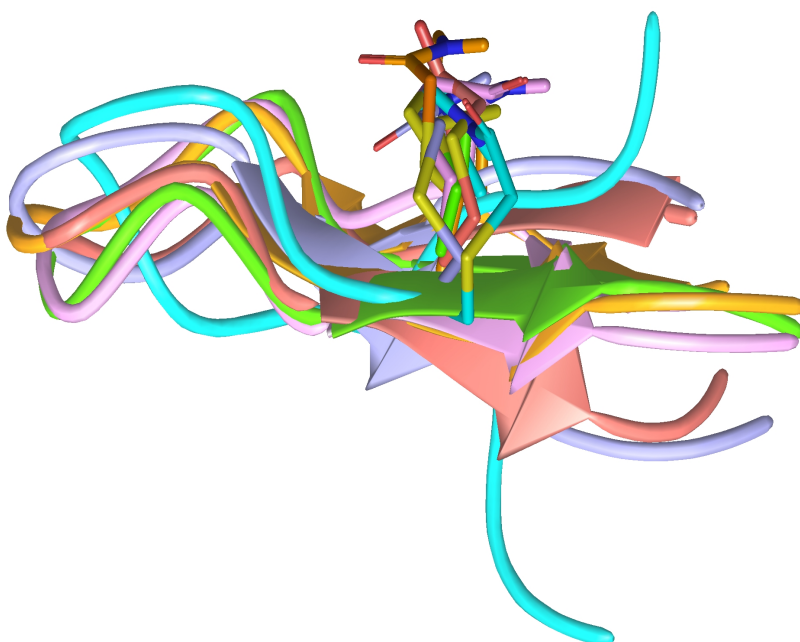
Az előzőekben láttuk, hogy a leghatékonyabb inhibitornak az Ac-SFMI2-NH₂ bizonyult. Feltételezhető, hogy az új inhibitorok annál hatékonyabbak, minél jobban hasonlítanak a védett SFMI2-re. Ennek vizsgálatához kiszámoltam a PG2 inhibitorok főláncának SFMI2-höz viszonyított RMS eltérését. A számolást két módon is elvégeztem: egyik esetben a teljes inhibitort (1-14. aminosavak) hasonlítottam az SFMI2-höz, a másik esetben pedig csak az inhibitorok aktív régióját tartalmazó béta szálat (1-8. aminosavak) hasonlítottam össze, hiszen a kötődést ez befolyásolja leginkább. Az eredményeket a 3.2 táblázat tartalmazza.

A kapott eredményekből kiderül, hogy nincs egyértelmű összefüggés az SFMI2-höz való hasonlóság mértéke és az inhibitor hatékonysága közt, ezért a tapasztalatok magyarázatához más módszert kell keresni.

Az 1.3.1 alfejezetben láttuk, hogy az irodalomban a Bowman-Birk inhibitorok merev, hidrogénhidakkal stabilizált szerkezetének tulajdonítják a nagy hatékonyságukat [20]. Reális felté-



3.5. ábra. Az inhibitorok átlagszerkezete a linkerrel (felülnézet)



3.6. ábra. Az inhibitorok átlagszerkezete a linkerrel (oldalnézet)

telezés ezért, hogy az új inhibitorok mozgékonyságának vizsgálatával következtethetünk azok hatékonyságára. A szimulált peptidek mozgékonyága az ún. B-faktorok kiszámításával vizsgálható. Ehhez szükség van az egyes atomok RMSF (root mean square fluctuation) értékeire, melyekből a mozgékonyásra jellemző B-faktorok a következő összefüggés segítségével szá-

<i>Név</i>	<i>RMS / Å (1-14)</i>	<i>RMS / Å (1-8)</i>
Ac-PG2-NH ₂	3,99	2,42
Ac-PG2-Orn-NH ₂	1,41	1,58
Ac-PG2-Dab-NH ₂	3,12	1,93
Ac-PG2-Dap-NH ₂ transz	2,39	1,64
Ac-PG2-Dap-NH ₂ cisz	0,93	0,91
Ac-PG2-Agl-NH ₂ cisz	2,59	1,93

3.2. táblázat. PG2 inhibitorok Ac-SFMI2-NH₂-től való eltérése

míthatók ki:

$$B_i = \frac{8\pi^2}{3} \cdot RMSF_i^2. \quad (3.1)$$

A peptid mozgékonyságának vizsgálatához kiszámoltam a peptid főlánc atomjainak átlagos B-faktorát. Azt is láttuk az irodalmi összefoglalóban, hogy a MASP2 enzim szubsztrátjainak P1 pozíciójában arginin vagy lizin található, mely az enzim szubsztrátspecifitási zsebében található Asp627 oldalláncával alakít ki hidrogénhidat. Ezek alapján a kötődés elengedhetetlen feltétele, hogy az inhibitor Arg5 aminosavának oldallánca be tudjon kerülni a szubsztrátkötő zsebbe, amihez szükség lehet arra, hogy az Arg5 aminosav oldallánca kellőképpen mozgékony legyen. Ehhez kiszámoltam az oldallánc atomjaira jellemző átlagos B-faktorokat. A kapott B-faktorokat a 3.3 táblázat tartalmazza.

<i>Név</i>	<i>Átlagos főlánc B-faktor [nm²]</i>	<i>Arg5 oldallánc B-faktor [nm²]</i>
Ac-PG2-NH ₂	1,31	3,69
Ac-PG2-Orn-NH ₂	1,21	3,86
Ac-PG2-Dab-NH ₂	1,33	3,65
Ac-PG2-Dap-NH ₂ transz	1,40	3,48
Ac-PG2-Dap-NH ₂ cisz	1,28	4,61
Ac-PG2-Agl-NH ₂ cisz	1,32	4,98
Ac-SFMI2-NH ₂	1,32	5,16

3.3. táblázat. B-faktorok

Az adatokból kiderül, hogy sem a főlánc, sem az Arg5 oldallánc mozgékonyságának változása nem magyarázza az inhibitorok eltérő hatékonyságát. A fentiek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az inhibitorokat önmagukban vizsgálva nem tudjuk megmagyarázni a hatékonyságukban tapasztalt különbségeket, ezért az enzimet és a peptideket együtt kezelve meg kell vizsgálnunk az inhibitorok és a MASP2 enzim kölcsönhatásait.

3.3. Inhibitor - MASP2 komplexek vizsgálata

Az előző alfejezetből kiderült, hogy az inhibitorok önmagukban történő vizsgálatával nem tudunk magyarázatot adni azok eltérő hatékonyságára, ezért az enzimet és az inhibitorokat együtt kell vizsgálnunk. Mivel nagy rendszerről van szó, erre a legjobb módszert a molekuladinamikai szimulációk nyújtják. Ehhez ebben az esetben is a Gromacs programcsomagot alkalmaztam az előzőleg parametrizált CHARMM27 erőterrel. A szimuláció menete a szabad inhibitorokon végzett szimulációkhoz hasonló volt, a szimuláció paraméterei azzal megegyeztek. A dobozban a komplexen kívül körülbelül 7000 vízmolekula volt. A szimulációkhoz szükség volt a MASP2 szerin proteáz domain aktív konformációjának röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezetére [35], melyet a PDB adatbázisból töltöttem le, PDB kódja 1Q3X.

Célunk elsőként az egyes inhibitorok hatékonyságát befolyásoló tényezők azonosítása volt. Ehhez mindenképpen vizsgálnunk kellett a leghatékonyabbnak bizonyult Ac-SFMI2-NH₂ inhibitor, ugyanis a többi inhibitor kötődését ehhez célszerű hasonlítani. Ezen kívül szükség van a legkevesbé hatékony, Ac-PG2-NH₂, illetve a tioéter kötést tartalmazó inhibitorok közül a leghatékonyabb, Ac-PG2-Dap-NH₂ peptid mindkét izomerének vizsgálatára. Mindenképpen szükséges külön vizsgálni az Ac-PG2-Agl-NH₂ inhibitor és az enzim kölcsönhatásait, hiszen fontos kérdés, hogy miért fordult meg a tendencia az átkötés hosszának csökkenésekor. Az inhibitorok kötődése közt megfigyelhető különbségek megerősíthetők a második leggyengébb, Ac-PG2-Orn-NH₂ inhibitor vizsgálatával. A szimulációk során az enzim kristályszerkezetéből indultam ki, míg a szimulációkat vizes közegben végeztem. Fontos, hogy képesek legyünk megkülönböztetni a solvatáció hatását az inhibitor kötődésének hatásától, ezért mindenképpen szükséges a szabad, inhibitor nem tartalmazó enzim szimulációja is a komplexekkel megegyező körülmények közt.

Első lépésként össze kellett állítani az inhibitor-enzim komplexeket a szimulációhoz. A molekuladinamikai szimulációk önmagukban nem alkalmasak a kötőhely megtalálására, így a komplexek összeállításakor fel kell használnunk a kötődéssel kapcsolatos előzetes információinkat, és azoknak megfelelően kell az inhibitor az enzimben elhelyezni. Az 1.2 alfejezetben láttuk, hogy a MASP2 szubsztrátspecifitását tekintve egy tripszin típusú szerin proteáz, mely a peptidkötést arginin aminosav után hasítja. A szubsztrát kiválasztását és megkötését az enzim kötőzsebében a P1 argininnel szemben elhelyezkedő Asp627 aminosav segíti, mely a P1 argininnel két hidrogénhíd kötést képes kialakítani. A szimulációk előtt ezért az inhibitorok Arg5 oldalláncát el kell helyeznünk a kötőzsebben. Ezt az OLPS erőter segítségével végzett minimalizáció és megfelelő kényszerfeltételek alkalmazásával végeztem el.

Az első szimulációkat az így előkészített komplexeket használva indítottam el, melyek során a Ac-PG2-(cisz)Agl-NH₂ és az Ac-PG2-(transz)Dap-NH₂ peptideket vizsgáltam. A szimulációkat megelőző minimalizáló és egyensúlyt beállító lépéseket olyan minimalizáló és elődinamikai lépésekkel egészítettük ki, melyek során az inhibitor szabadabban mozog az enzimmél. Ezek célja, hogy a peptidek felvehessék a kötődéshez szükséges konformációjukat anélkül, hogy az

enzim szerkezetét nagy mértékben megváltoztatnák, ugyanis ellenkező esetben az enzim valószínűleg nem előforduló konformációjával végeznék a vizsgálatokat, melyekből nem lehetne következtetéseket levonni.

Szimulációinkat 150 ns-ig futtattuk a NIIF szegedi szuperszámítógépén, mely idő alatt az RMS eltérések alapján beállt az egyensúly, így az egyensúlyi trajektória vizsgálható volt. A két kapott szerkezet között jelentős eltérések mutatkoztak. Az eredmények bemutatása során az inhibitorokban található aminosavak számozása 1-től 14-ig, míg az enzim esetén a számozás 433-tól 686-ig tart. A kötődés szempontjából egyik leglényegesebb szempont az inhibitor Arg5 (P1) oldallánc nitrogénjeinek és az enzim Asp627 oxigénjeinek a távolsága, hiszen a szubsztrát kötődésének feltétele, hogy kialakuljon a két oldallánc közti hidrogénhíd, ezáltal a szubsztrát a kötőárokban rögzüljön. Szembetűnő a különbség: az Ac-PG2-(cis)Agl-NH₂ inhibitor esetén a trajektória utolsó 50 ns-ában az Arg5 oldallánc nitrogénjei a szerkezetek 13%-ában az enzim Ser653 karbonil oxigénjével, 21%-ában pedig a Ser657 karbonil oxigénjével létesítettek hidrogénhídkötést. Viszonylag erős hidrogénkötés figyelhető meg egy oldallánc nitrogén és a Ser657 karbonil oxigénje között, mely a szerkezetek 98%-ára volt jellemző. Kiemelendő, hogy a szubsztrátspecifitásért felelős Asp627 oldalláncához egyáltalán nem kötődött az Arg5 oldallánc. Ennek oka, hogy az Arg5 oldallánc a szubsztrátspecifitási zseb „falával” alakított ki hidrogénhíd kötések, nem nyúlt be a zseb alján lévő Asp627 oldalláncához. Külön kiemelendő, hogy az Ace-PG2-(cis)Agl-NH₂ inhibitor a trajektória egyes pontjaiban különösen eltávolodott az enzimtől, kizárólag az Arg5 oldallánc kötődött hozzá.

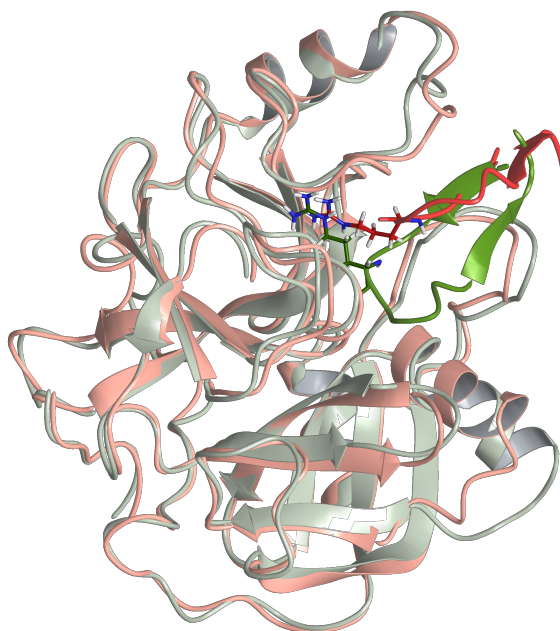
Az Ace-PG2-(trans)Dap-NH₂ inhibitor esetén az Arg5 oldallánc mindkét nitrogénje képes hidrogénhídkötést kialakítani a Ser657 karbonil szénatomjával, mely a szerkezetek több, mint 99%-ában megjelenik. Ellentétben a kisebb linkert tartalmazó inhibitorral, az Arg5 oldallánc nitrogének és az Asp627 oldallánc oxigénjei közti hidrogénhíd kötés ebben az esetben a szerkezetek több, mint 99%-ában megjelent. Ezen kívül az átlagszerkezetben megfigyelhető volt néhány hidrogénhíd kötés az inhibitor főlánc és az enzim közt, ezek azonban elég gyenge kötések voltak. A Dap3 karbonil oxigénje és a Trp655 gyűrű nitrogénje közti hidrogénhíd a szerkezetek 78%-át, az aminoterminális védőcsoport karbonil oxigénje és az Arg609 amid nitrogénje közti hidrogénkötés a szerkezetek 38%-át, míg a Gly1 karbonil oxigénje és a Gly528 amid nitrogénje közti hidrogénhíd a szerkezetek 41%-át jellemezte. Figyelemre méltó, hogy eközben az inhibitor stabil, béta-redős szerkezete megmaradt, melyet az erős intramolekuláris hidrogénhídkötések jeleznek: a Tyr2 karbonil oxigénje és az Ile12 amid nitrogénje közt a szerkezetek 98%-ában, a Tyr2 karbonil oxigénje és a linker amid nitrogénje közt a szerkezetek 93%-ában, a Val10 karbonil oxigénje és a Ser4 amid nitrogénje közt a szerkezetek 87%-ában, az Ile12 karbonil oxigénje és a Gly1 amid nitrogénje közt pedig a szerkezetek 99%-ában volt megfelelő távolság belső hidrogénhíd kialakulásához.

A fenti eredmények kiértékelése során megállapítottuk, hogy az inhibitorok nem az 1.3.2 alfejezetben bemutatott irodalmi adatoknak és az eddigi, más inhibitorok esetén elvégzett szimulációknak megfelelő módon kötődtek az enzimhez. Az Arg5 oldalláncán kívül nem alakí-

tottak ki erős hidrogénhidakat az enzimmel. Külön figyelmet érdemel, hogy a P1 aminosav karbonil szénatomja nem került közel az enzim Ser633 aktív szerinjéhez. A trajektória egyensúlyi szakaszán az Ace-PG2-(cisz)Ag1-NH₂ esetén a Ser633 oxigénjének és az Arg5 karbonil szénatomjának távolsága átlagosan 7,2 Å volt, míg a másik vizsgált inhibitor esetén ez a távolság 8,12 Å. Az enzim szubsztrátkötésének fontos része, hogy ez a két atom egymáshoz közel helyezkedjen el, hiszen a proteáz csak így képes a peptidkötést hasítani. Korábban láttuk, hogy az irodalmi adatok szerint a Bowman-Birk inhibitorok is szubsztrátként kötődnek az enzimhez, így meg kellett vizsgálni ennek a furcsa eredménynek az okát.

Jogosan feltételezhető, hogy az új peptidek is az irodalmi adatok alapján várt módon kötődnek, ezért új kiindulási szerkezeteket készítettünk. Kutatócsoportunkban korábban készült szimuláció a láncvégi védőcsoporttal nem rendelkező SFMI2 inhibitor MASP2-vel alkotott komplexéről, melyben az SFMI-2 az irodalmi adatok alapján várt módon kötődött az enzimhez. Az akkor kapott szerkezetet felhasználva készítettük el az új komplexeket, melyekkel a fent bemutatott módon végeztük a szimulációkat a NIIF szegedi szuperszámítógépén és a kutatócsoportunk számítógépein.

Az inhibitor ebben az esetben az előző szimulációk eredményétől nagy mértékben eltérő helyzetben kötődött a proteázhoz, ahogy azt a 3.7 ábra mutatja a linkerben Dap aminosavat tartalmazó enzim példáján szemlélítve. Ez a szerkezet az irodalmi adatok alapján várt kötődésnek felel meg.



3.7. ábra. Az Ace-PG2-(transz)Dap-NH₂ két kötődési módja

Az ábrán piros színnel jelöltem az első, gyengén kötött komplexet, zöld színnel pedig a második, szorosan, a kötőárokban kötött komplexet tartalmazó szimuláció eredményeit. A zöld színnel jelölt inhibitor a kötőárokka párhuzamosan helyezkedik el, így az inhibitor szoros kö-

tődésének felel meg. A fenti eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a bemutatott két kötődési mód a szubsztrát megkötésének két fázisát mutatja be. Az első szimulációk során láttuk, hogy a peptid P1 argininje bekötött a szubsztrátspecifitási zsebbe, a peptid többi része viszont még nem alakított ki szoros kapcsolatot az enzimmal. Ennek ellenére a trajektória vizsgálatokor kötött, stabil szerkezetet láttunk, ami egy stabil köztes állapotra utal. A további szimulációk során már kialakultak az enzim és a szubsztrát közti kötést stabilizáló hidrogénhidak, eközben a szubsztrát P1 argininjének karbonil szénatomja a katalitikus triád közelébe került. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy az enzim szubsztrátjai fiziológiai körülmények között több lépéses mechanizmus szerint kötődnek a proteázhoz. Az arginin jelenléte és megkötődése a szubsztrátspecifitási zsebben nem elegendő ahhoz, hogy az adott peptid vagy fehérje a proteáz szubsztrátja legyen, ehhez további feltételek teljesülése szükséges: a P1 aminosav kötődése után a környezetében található aminosavaknak is specifikus kölcsönhatásba kell lépniük az enzim szubsztrátkötő árkáival ahhoz, hogy az enzim hasítani legyen képes a peptidkötést. A P1 arginin karbonil szénatomja csak a peptid és a fehérje közti főlánc hidrogénhidak kialakulása után került a katalitikus triád közelébe.

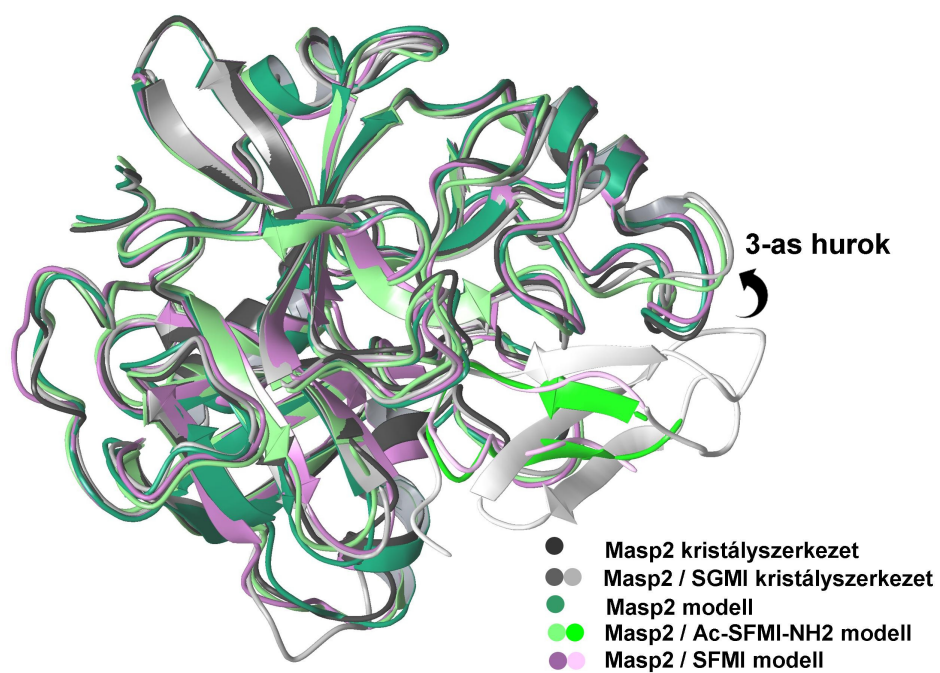
Külön figyelmet érdemel az inhibitorok Tyr2 oldallánca, melynek elhelyezkedése különösen fontosnak bizonyult a kötődés során. A két szimuláció közti különbségek vizsgálatokor megfigyelhető volt, hogy az irodalmi adatoknak megfelelő kötődéshez a Tyr2 gyűrűjének be kell ékelődnie az enzim Trp655 és Tyr607 gyűrűi közé, mely az első szimulációk során nem történt meg. A szorosan kötött komplexeket eredményező szimulációk során a Tyr2 oldallánc a vártan megfelelően helyezkedett el.

3.3.1. A láncvégi védőcsoport hatása

Az 1.3.2 alfejezében láttuk, hogy az SFMI2 esetén a láncvégi védőcsoport jelenléte növelte a peptidek MASP2 gátló hatását. Erre a jelenségre még nem született magyarázat, ezért a MASP2 védőcsoport nélküli és a védett SFMI2 inhibitorokkal alkotott komplexeket külön megvizsgáltam. A nem védett SFMI2-vel alkotott komplex szimulációja kutatócsoportunkban korábban megtörtént, így az összehasonlítás során ezeket az eredményeket is felhasználtam.

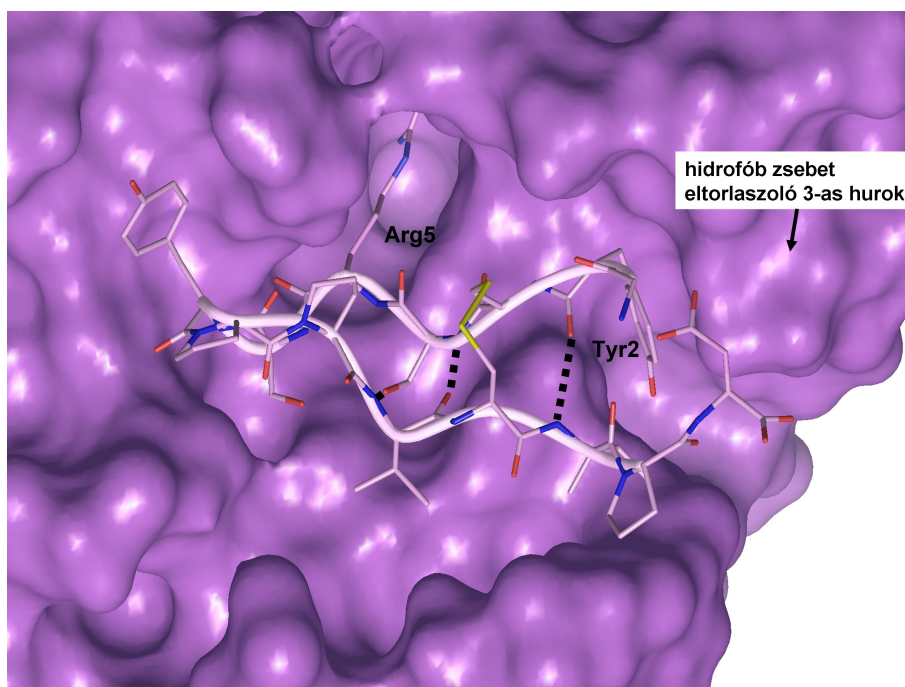
Összevettem az általam kapott, védett SFMI2-t tartalmazó komplex szerkezetét a az SFMI2 láncvégi védőcsoporttal nem rendelkező változatával végzett szimulációk, és az SGMII2-vel alkotott komplex, illetve a szabad enzim szerkezetével. Az egymásra illesztett szerkezeteket a 3.8 ábra mutatja.

Jól látható, hogy a láncvégi védőcsoporttal ellátott peptid esetén a 3-as hurokrégió ugyanolyan átalakuláson esett át, mint ami az SGMII2-vel alkotott komplex kristályszerkezetében látható. Külön figyelmet érdemel, hogy a láncvégi védőcsoportot nem tartalmazó peptid esetén ez az elmozdulás nem következett be. Ezek alapján megállapítható, hogy az elmozdulás a láncvégi védőcsoport és a hurokrégió kölcsönhatásának következménye. Ez a hatás magyarázhatja a védőcsoporttal ellátott peptidek nagyobb hatékonyságát is, ugyanis az elmozdulás hatására

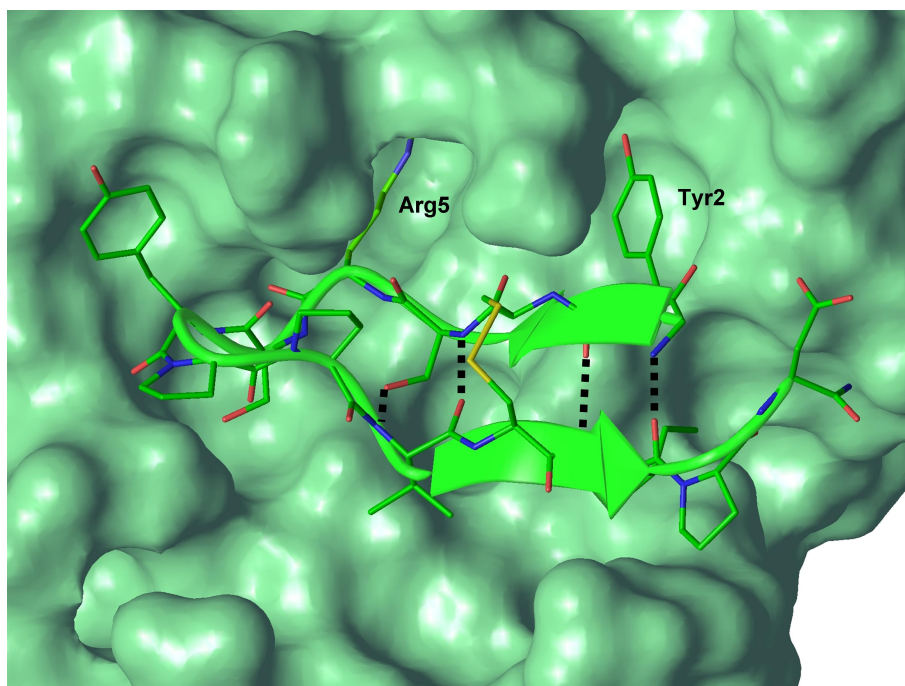


3.8. ábra. Az eredmények összevetése korábban meghatározott szerkezetekkel (a 3-as hurokrégió elmozdulását nyíl jelzi)

egy hidrofób zseb nyílik ki, ahogy azt a 3.10 és a 3.9 ábrák mutatják.



3.9. ábra. Védőcsoport nélküli SFMI2 kötődése (a hidrofób zseb nem alakult ki)



3.10. ábra. Védett SFMI2 kötődése. Hidrofób zseb kialakulása a 3-as hurokrégió elmozdulásával.

Az ábrán látható, hogy az inhibitor Tyr2 oldallánca a kinyíló hidrofób zsebben helyezkedik el, így kiterjed a kölcsönhatási felszín, ami erősebb kötődést eredményezhet. Az eredmények alapján tehát feltehetően ez a hatás felelős a védett SFMI2 megnövekedett hatékonyságáért.

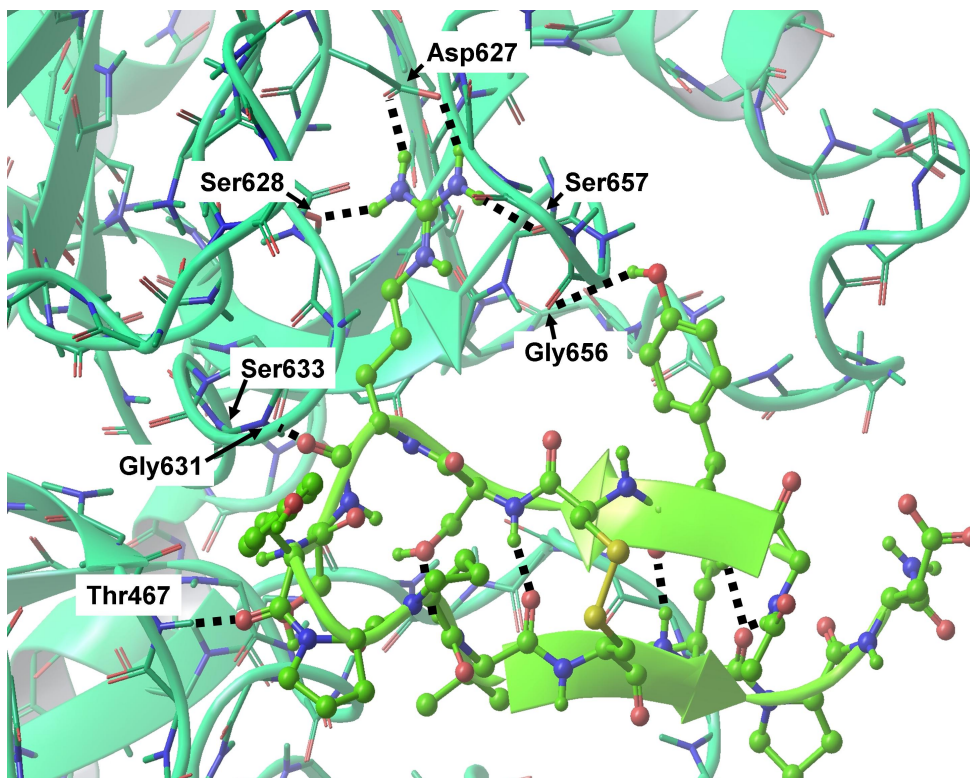
3.3.2. Az inhibitorok szorosan kötött komplexeinek vizsgálata

A továbbiakban az 1.1 táblázatban látható PG2 inhibitorok eltérő hatékonyságát magyarázó kölcsönhatásokat kívántam vizsgálni. Ehhez a Ac-PG2-NH₂, az Ac-PG2-Orn-NH₂, az Ac-PG2-Dap-NH₂ (cisz és transz izomer) és az Ac-PG2-Agl-NH₂ (cisz izomer) peptidek MASP2-vel alkotott, szorosan kötött komplexeit vizsgáltam molekuladinamikai szimulációval a korábban ismertetett módon. Külön szimuláltam a szabad, inhibitorot nem tartalmazó MASP2 szerin proteáz fragmenst, hogy a megfigyelhető változások közül el tudjam különíteni a solvatáció hatását.

Elsőként a szubsztrátkötéshez elengedhetetlen tulajdonságok jelenlétét vizsgáltam meg, hogy megbizonyosodjak arról, hogy az inhibitorok megfelelően kötődtek az enzimhez. A vizsgált kölcsönhatásokat a 3.11 ábra mutatja be a leghatékonyabb, Ac-SFMI2-NH₂ peptid esetén.

Korábban láttuk, hogy szubsztrátok kötődésekor a P1 aminosav (jelen esetben Arg5) oldallánca az S1 szubsztrátspecifitási zsebbe kerül, miközben karbonil szénatomja a Ser633 katalitikus szerin közelébe kerül. A peptidkötés hasításakor keletkező negatív töltésű oxigén az oxianion zsebbe kerül, így stabilizálódik a tetraédes intermediér.

A P1 arginin oldallánca minden vizsgált komplex esetén erősen megkötődött az S1 zsebben, az arginin oldallancának nitrogénjei minden esetben legalább 4 erős hidrogénkötésben



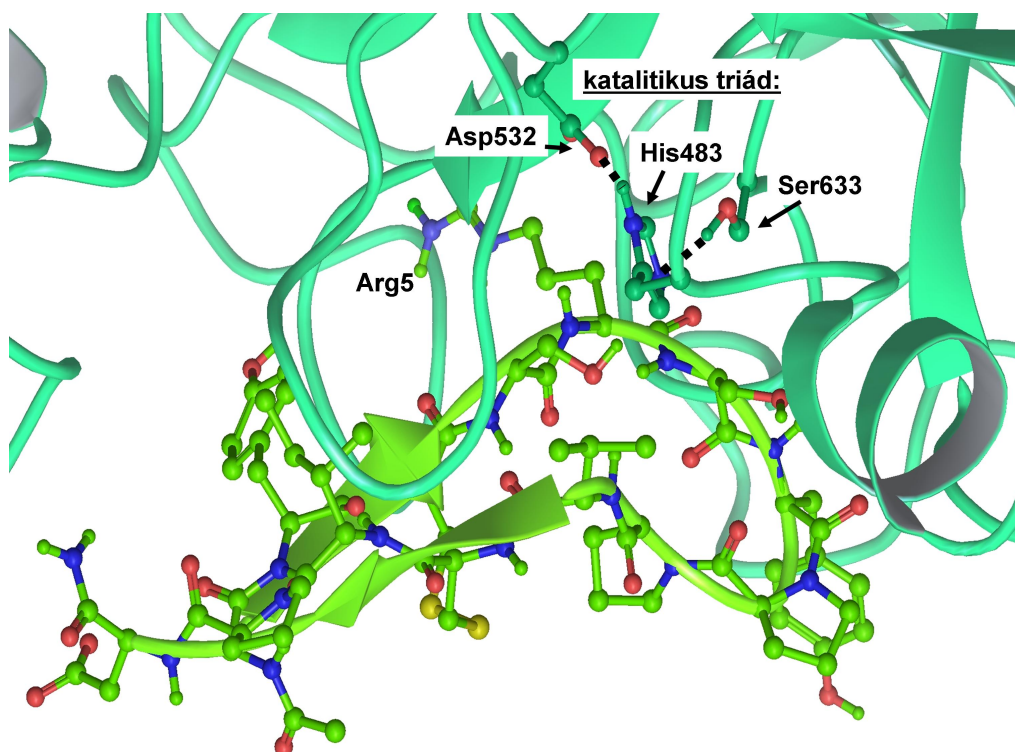
3.11. ábra. A szubsztrátkötéshez elengedhetetlen kölcsönhatások

vettek részt, melyek a trajektóriákban található szerkezetek több, mint 90%-ában megjelentek. A zseb alján található Asp627 oldalláncán kívül a hidrogénhídkötések akceptora volt a Ser657 oldallánc és karbonil oxigénje és a Ser628 oldallánc oxigénje.

A P1 arginin karbonil oxigénje minden esetben az oxianion zsebbe került. Ezt mutatja, hogy a karbonil oxigén az enzim Ser633 és Gly631 amid nitrogénjeivel (melyek az oxianion zsebet alkotják) hidrogénhíd kötést alkot. A Gly631 amid nitrogénjével alkotott hidrogénkötés minden esetben erős, a szerkezetek több, mint 95%-ában jelenik meg. A Ser633 amid nitrogénjével alkotott hidrogénhíd a legtöbb esetben körülbelül a szerkezetek 30%-át jellemzi. A P1 arginin karbonil szénatomja minden vizsgált inhibitor esetén körülbelül 4 Å távolságra helyezkedett el a katalitikus szerin oldallánc oxigénjétől. A fentiek alapján megállapítható, hogy az inhibitorok P1 aminosava a szubsztrátoktól várt módon helyezkedik el az enzimben. A katalitikus triád szerkezetét a 3.12 ábra mutatja.

Az 1.3.2 alfejezetből kiderült, hogy az SGM12 kötődése során az inhibitor Arg630 oldallánc elmozdult, hogy az inhibitor P2' Trp oldallánc az S2' zsebbe kerülhessen. Ez az elmozdulás az általam végzett szimulációk során is megjelent, az inhibitor Tyr8 oldallánc így az S2' zsebben helyezkedett el.

A továbbiakban a vizsgálni kívánt PG2 inhibitorokkal alkotott komplexek kötődés szempontjából fontos, a komplexek általános jellemzése során nem vizsgált paramétereit vizsgáltam. A komplexek jellemzéséhez a trajektóriák egyensúlyi szakaszán megjelenő szerkezeteket főlánc konformáció szerint klaszterekbe osztottam a Gromacs programcsomag segítségével [36].



3.12. ábra. A katalitikus triád szerkezete

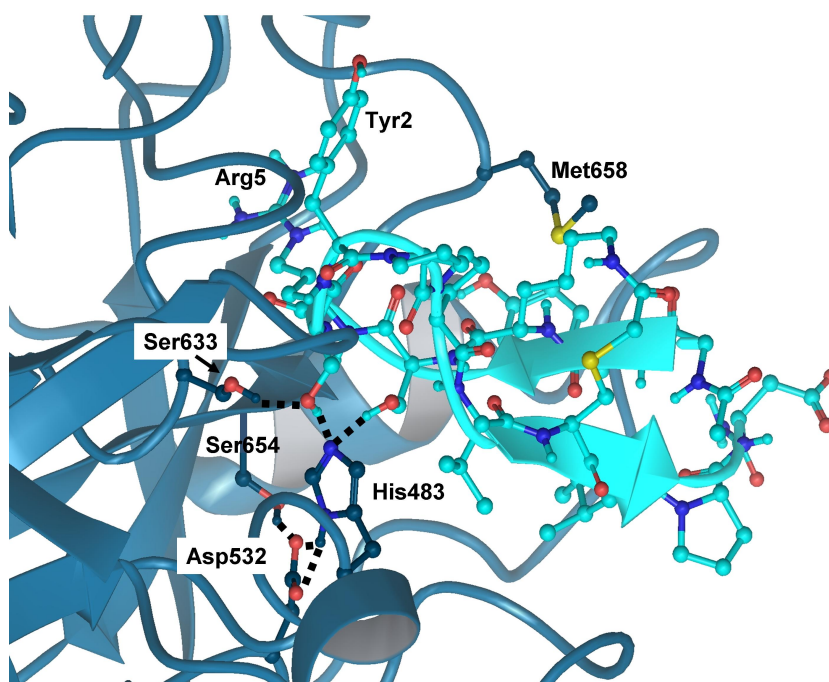
A klaszterek középszerkezetei jellemzik a szimuláció során megjelenő különböző szerkezeteket. Ezek után a komplexek geometriai paraméterei a klaszterek betöltöttsége alapján súlyozva számolhatók.

Az Ac-PG2-NH₂ inhibitor vizsgálata

A korábbiakban bemutatott, minden inhibitor kötődését jellemző kölcsönhatásokon kívül fontos megvizsgálni az egyes inhibitorok további kölcsönhatásait is. Az alábbiakban bemutatott kölcsönhatásokat a 3.13 ábra szemlélteti.

Az Ac-PG2-NH₂ inhibitor P1 arginin amid nitrogénje hidrogénhíd kötést alakított ki az enzim Ser654 karbonil oxigénjével, ami a szerkezetek 91 %-ában jelent meg. Erős, a szerkezetek több, mint 98 %-ában megjelenő hidrogénhíd kötés alakult ki a peptid Tyr2 oldalláncának oxigénje és az enzimben található Gly656 karbonil oxigénje, továbbá a Tyr7 karbonil oxigénje és az enzim Thr467 amid nitrogénje közt. Az inhibitor Tyr2 oldallánca a korábban bemutatott módon el tudta foglalni a hidrofób zsebet.

Fontos megjegyezni, hogy a szerkezetek 80 %-át jellemző klaszter esetén a kötődés során a katalitikus triád szerkezete kis mértékben megváltozott: megszűnt a hidrogénhíd kötés a katalitikus Ser633 és a katalízisben szerepet játszó His483 között. Az inhibitor Ser4, és kis mértékben a Ser6 oldalláncai eközben hidrogénkötés alakítottak ki a His483 nitrogénjével. Ez a kis mértékű átrendeződés a nagy méretű linkerre vezethető vissza: a linker nagy mérete miatt kapcsolatba kerül a Met658 oldalláncával, ami emiatt elmozdul. Ennek következtében a metioninhoz közel



3.13. ábra. Az Ac-PG2-NH₂ inhibitor kötődése az enzimhez

található Ser654 is elmozdul, ami hidrogénkötésben van az Asp532-vel, ami a katalitikus triád tagja. Ennek következtében az Asp532-vel hidrogénhídkötést kialakító katalitikus hisztidin is elmozdul.

A kötődés során az inhibitorban 4 belső hidrogénhíd kötés maradt meg. A Val10 karbonil oxigénje és a Ser4 amid nitrogénje, illetve a Tyr2 karbonil oxigénje és az Ile12 amid nitrogénje közt megjelenő hidrogénhíd erős, a szerkezetek több, mint 93 %-át jellemzi, míg az Ile12 karbonil oxigénje és a Gly1 amid nitrogénje, illetve a Tyr2 amid nitrogénje közt megjelenő hidrogénkötés az előzőnél gyengébb, a szerkezetek 64, illetve 47 %-ában látható.

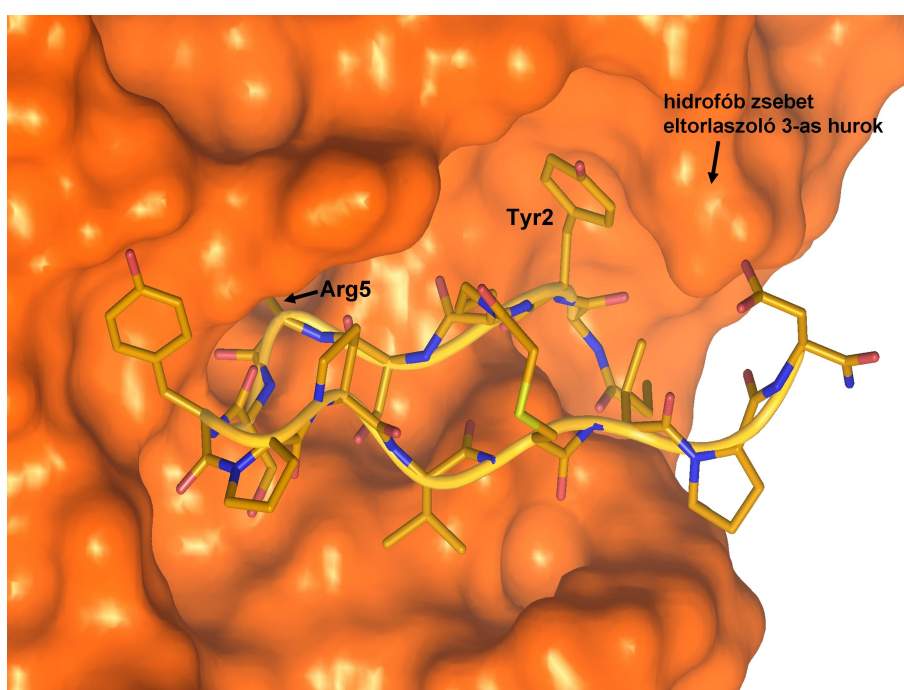
A vizsgálatok során összehasonlítottam az enzim és az inhibitorok vízben található szabad, és komplexben kötött konformációit. Az összehasonlítás során kiderül, hogy a komplexképződés során a résztvevő molekulák szerkezete milyen mértékben változik meg. Nagy mértékű torzulás kedvezőtlenül teheti a kölcsönhatást, és így magyarázhatja a gyengébb gátló képességet is. A szerkezet változását RMS eltérés értékekkel jellemeztem.

Az Ac-PG2-NH₂ inhibitor szabad, és komplexben kötött szerkezete közötti RMS eltérés 3,52 Å, az enzim szaba, és komplexben kötött szerkezete közti RMS eltérés 1,05 Å. Az enzim tehát egészét tekintve nem esett át nagy mértékű konformációs változáson, azonban az inhibitor szerkezete jelentős mértékben torzult. Ez arra utalhat, hogy az inhibitor nehezen kerülhet kötődésre képes állapotba.

A fenti eredmények alapján az inhibitor magas K_i értékét nagyrészt a peptid szabad és kötött szerkezete közti jelentős mértékű eltérés magyarázhatja, azonban fontos a katalitikus triád kedvezőtlen átrendezése is.

Az Ac-PG2-Orn-NH₂ inhibitor vizsgálata

Az Ac-PG2-Orn-NH₂ peptid Arg5 amid nitrogénje és az enzim Ser654 karbonil oxigénje közti erős hidrogénhíd kötés ebben az esetben is megjelent, a szerkezetek több, mint 99 %-át jellemezte. Ezen kívül erős, a szerkezetek több, mint 90 %-ában megjelenő hidrogénhíd alakult ki az inhibitor Gly1 amid nitrogénje és az enzim Ser611 karbonil oxigénje, illetve az inhibitor láncvégi acetil védőcsoportjának karbonil oxigénje és a Phe529 amid nitrogénje közt. A Tyr2 oldalláncot befogadó hidrofób zseb ebben a komplexben zárva volt, ahova így az oldallánc nem került be. Ez jól látható a 3.14 ábrán. A katalitikus triád szerkezetében nem látható az előző esetben látható átrendeződés, a katalitikus Ser633 és a His483 közti hidrogénkötés a szerkezetek több, mint 90 %-ban megjelent.



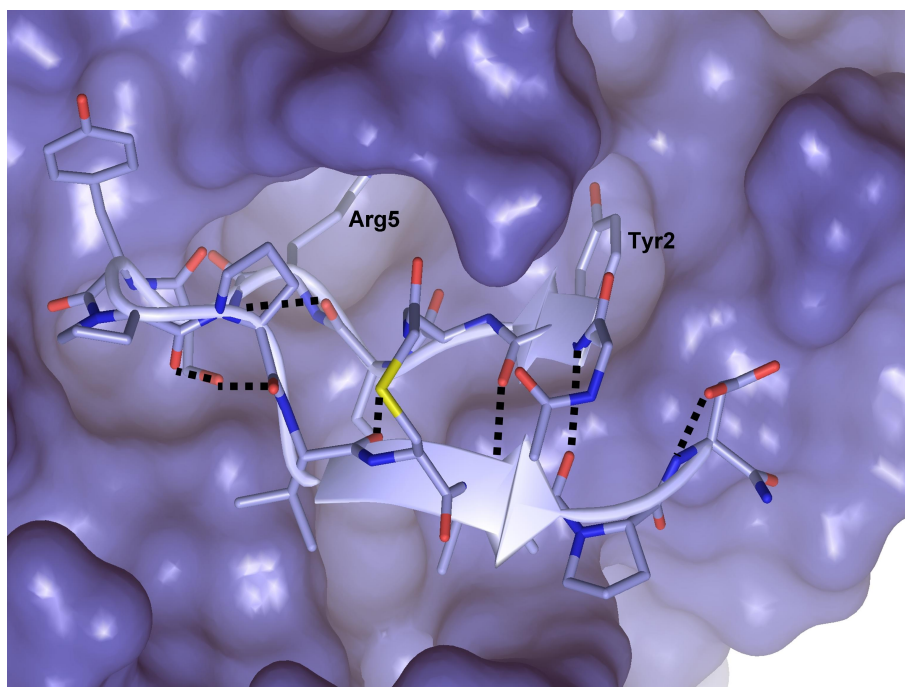
3.14. ábra. Az Ac-PG2-Orn-NH₂ inhibitor kötődése az enzimhez

Az inhibitor belső hidrogénhíd kötéseinek nagy része felbomlott, mindössze 2 gyenge hidrogénhíd maradt meg: a Val10 karbonil oxigénje a Ser4 amid nitrogénjével, illetve a Ser5 oldallánc oxigénje a Val11 amid nitrogénjével alakított ki gyenge, a szerkezetek kicsit több, mint 65 %-ban megjelenő hidrogénhidat.

A kötődés során kapott konformáció és a szabad konformációk eltérése az inhibitor esetén 2,32 Å, az enzim esetén 0,95 Å, tehát a kötődést egyik résztvevő molekula esetén sem kísérte nagy mértékű torzulás. Fontos megjegyezni azonban, hogy az inhibitor béta-redős szerkezete az abban résztvevő hidrogénhidak megszűnése következtében nem maradt meg. Ez a tapasztalat, továbbá a hidrofób zseb zártsága magyarázhatja a gyenge gátló képességet.

Az Ac-PG2-Dap-NH₂ (transz) inhibitor vizsgálata

Az Ac-PG2-Dap-NH₂ (transz) inhibitor esetén is kialakult az Arg5 amid nitrogénje és a Ser654 karbonil oxigénje közti erős, a szerkezetek több, mint 90 %-ára jellemző hidrogénhíd. Ezen kívül erős hidrogénhidak alakultak ki az inhibitor Tyr2 oldallánca és az enzim Gly656 karbonil oxigénje, illetve az inhibitor Tyr7 karbonil oxigénje és az enzim Thr467 amid nitrogénje közt. Ezek a kölcsönhatások a szerkezetek körülbelül 95 %-ában voltak láthatók. Az inhibitor Tyr2 oldallánca a hidrofób zsebbe illeszkedett. A katalitikus triád ebben az esetben is megőrizte szerkezetét. A kialakult kölcsönhatások a 3.15 ábrán láthatók.



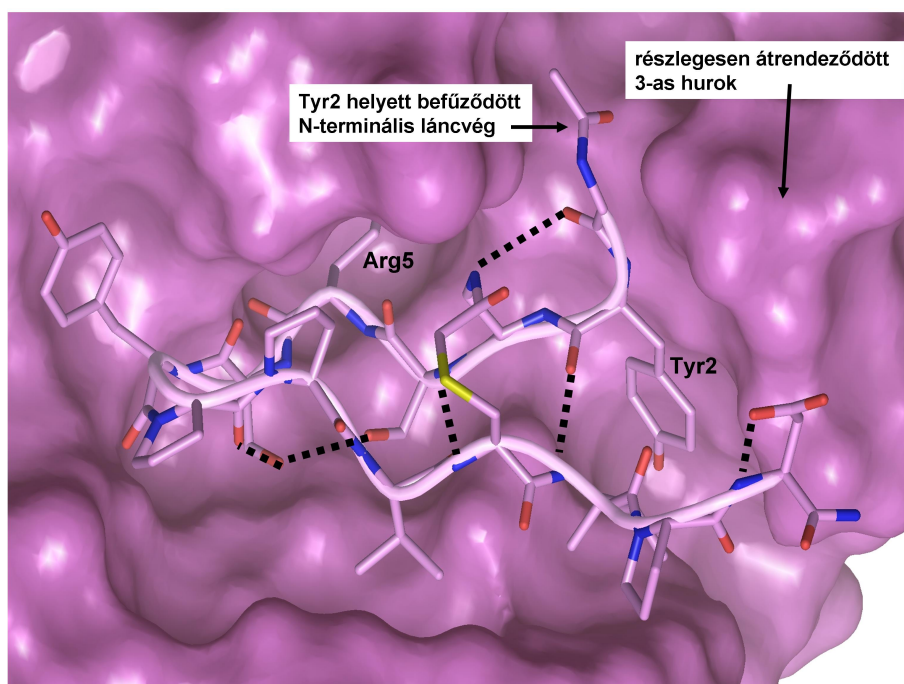
3.15. ábra. Az Ac-PG2-Dap-NH₂ (transz) inhibitor kötődése

A peptid béta-redős szerkezete megmaradt, erős hidrogénkötések alakultak ki a Tyr2 karbonil oxigénje és az Ile12 amid nitrogénje, illetve a Tyr2 amid nitrogénje és az Ile12 karbonil oxigénje közt, melyek a szerkezetek 99, illetve 86 %-ában voltak megfigyelhetők. Ezen kívül hidrogénhíd kötés alakult ki a Val10 karbonil oxigénje és a Ser5 amid nitrogénje közt.

A kötődés után kapott és a szabad konformációk RMS eltérése az enzim esetén 1,05 Å, az inhibitor esetén 1,47 Å volt. Az enzim tehát nem változtatta meg jelentős mértékben a szerkezetét, azonban ebben az esetben az inhibitor kötött szerkezete is nagyon hasonlít a szabad szerkezehez. Az inhibitor tehát szabad formában is kötődésre képes állapotban van, ami nagyon kedvezővé teszi a komplex kialakulását. A hatékony inhibíciós képességhez valószínűleg a hidrofób zseb kinyílása is hozzájárul.

Az Ac-PG2-Dap-NH₂ (cisz) inhibitor vizsgálata

A cisz izomer esetén a szerkezetek 80 %-ában megjelenő hidrogénhíd kötés figyelhető meg az enzim Thr467 amid nitrogénje és a peptid Tyr7 karbonil oxigénje közt, továbbá a trajektória stabil szakaszán található szerkezetek 60 %-ában alakult ki hidrogénkötés a Thr466 oldallánc oxigénje és az inhibitor Tyr7 karbonil oxigénje közt. A kötődés során a Tyr2 oldallánc nem került be a hidrofób zsebbe, ami ebben az esetben zárt állásban maradt. A katalitikus triád tagjainak kapcsolata fennmaradt a komplex kialakulása után is. Megjegyzendő, hogy ebben az esetben a P1 arginin oldalláncát a szokásos 4 helyett 5 hidrogénhíd rögzítette a szubsztrátspecifitási zsebben. A kölcsönhatásokat a 3.16 ábra mutatja be.



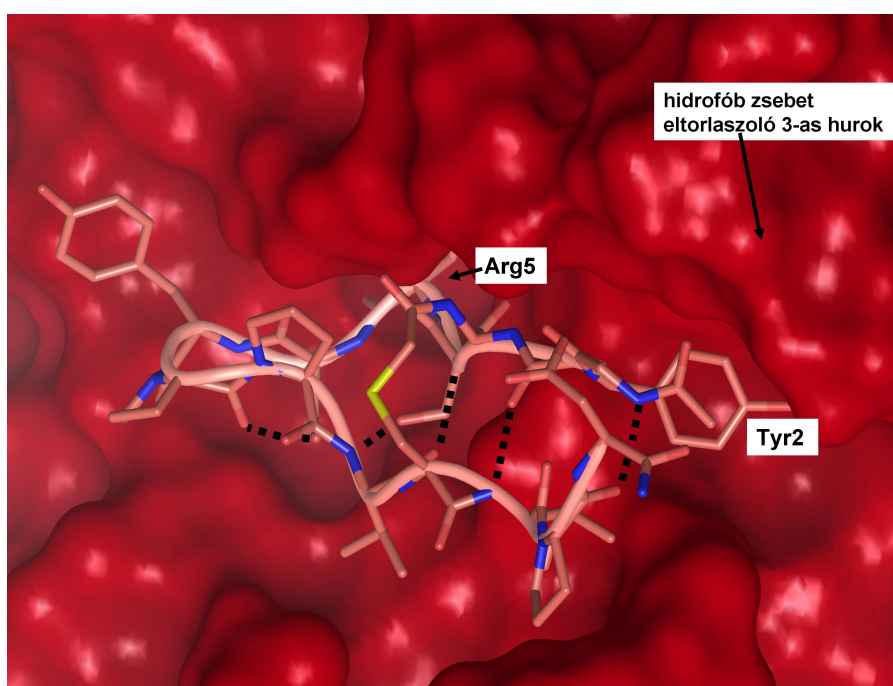
3.16. ábra. Az Ac-PG2-Dap-NH₂ (cisz) inhibitor kötődése

A peptid belső hidrogénhídjainak többsége megmaradt, azonban béta-redős szerkezet nem tudott kialakulni. Erős, a szerkezetek több, mint 95 %-ában látható hidrogénhíd kötés alakult ki a Ser4 oldallánc oxigénje és az Arg5 amid nitrogénje, a Val10 karbonil oxigénje és a Ser4 amid nitrogénje, továbbá a Tyr2 karbonil oxigénje és az Ile12 amid nitrogénje közt. A szerkezetek körülbelül 30 %-ában látható hidrogénkötés a linker amid nitrogénje és a Gly1 karbonil oxigénje, továbbá az Asp14 amid nitrogénje és az Asp14 oldallánc oxigénje közt.

A kötött és a szabad formák RMS eltérése az enzim esetén 1,00 Å, a peptid esetén 3,04 Å volt. Az inhibitor szerkezete tehát viszonylag nagy mértékben változott, míg az enzim szerkezete ebben az esetben sem alakult át jelentős mértékben.

Az Ac-PG2-Agl-NH₂ (cisz) inhibitor vizsgálata

A legkisebb linkert tartalmazó inhibitor esetén a peptid és az enzim közt erős, a szerkezetek több, mint 90 %-ában megfigyelhető hidrogénhíd kötés alakult ki az inhibitor Tyr7 karbonil oxigénje és az enzim Thr467 amid nitrogénje, az inhibitor Arg5 amid nitrogénje és az enzim Ser654 karbonil oxigénje, továbbá a Tyr2 oldallánc oxigénje és a Ser611 oldallánc oxigénje közt. A katalitikus triád átrendeződése ebben az esetben sem volt megfigyelhető, az enzim Ser633 oldalláncának oxigénje a szerkezetek 95 %-ában alakított ki hidrogénhidat a katalitikus triád hisztidinjével. A béta-redős szerkezet tehát felbomlott, továbbá a Tyr2 oldallánca sem a hidrofób zsebben helyezkedett el, ami ebben az esetben is zárt maradt. A komplex szerkezete a 3.17 ábrán látható.



3.17. ábra. Az Ac-PG2-Agl-NH₂ (cisz) inhibitor kötődése

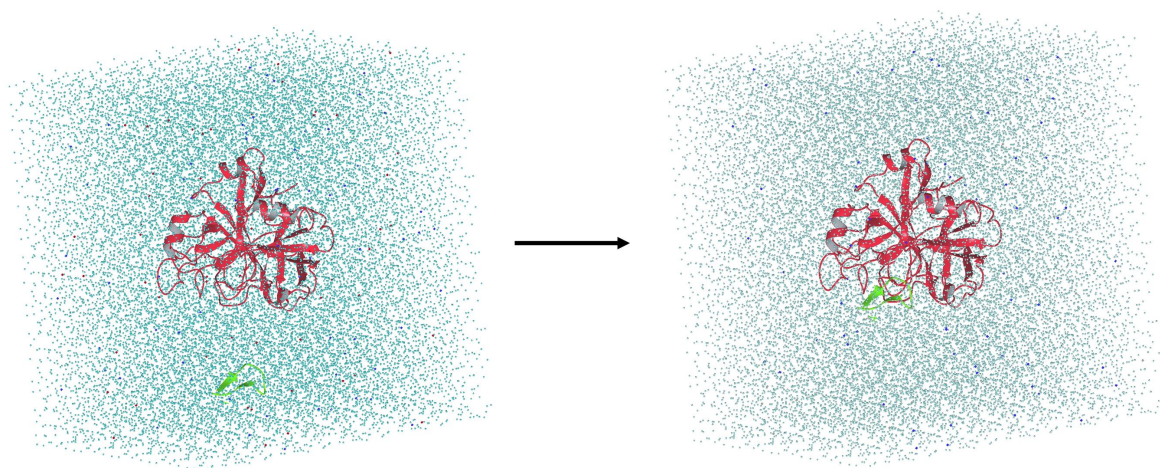
Az inhibitor belső hidrogénhídjai közül 4 jelent meg a kötött szerkezetben: a szerkezetek több, mint 99 %-ában figyelhető meg a Val10 karbonil oxigénje és a Ser4 amid nitrogénje, továbbá a Tyr2 karbonil oxigénje és Ile12 amid nitrogénje közti hidrogénhíd. A trajektória egyensúlyi szakaszának 85 %-ában látható a Ser4 oldallánc oxigénje és a Pro9 karbonil oxigénje közti hidrogénhíd, továbbá a szerkezetek 71 %-ában jelenik meg hidrogénkötés a Pro13 karbonil oxigénje és a Gly1 amid nitrogénje közt.

Az inhibitor szabad és kötött formájának RMS eltérése 2,54 Å, az enzim esetén ugyanez az érték 1,04 Å-nek adódott. A gyenge gátló hatást ebben az esetben tehát a felbomló béta-redős szerkezet és a hidrofób zseb zárt állása magyarázhatja.

Összegzés

Az előzőekben bemutatott vizsgálatok során nem sikerült olyan kölcsönhatást azonosítani, mely a várt tendenciának megfelelően magyarázná az inhibitorok hatékonyságát, azonban sikerült azonosítani több, a kötődés szempontjából fontos jellemzőt, melyeket együtt kell figyelembe venni a hatékonyság vizsgálatakor. Ez a tapasztalat az inhibitorok szabad szerkezetének és a köztük lévő nagyon kis különbség ismeretében nem meglepő, hiszen a vízben egymástól kis mértékben eltérő szerkezetű peptidek várhatóan kis mértékben más módon tudnak az enzim kötőárákában elhelyezkedni. Fontos eredmény, hogy a kötődés során az inhibitorok a szubsztrátkötés során megszokott P3-P2' aminosavakon kívül az inhibitor távolabbi aminosavai is kölcsönhatásba lépnek az enzimmel, amit a komplexek vizsgálatakor mindenképpen figyelembe kell venni.

Bár a kötődést befolyásoló sokféle tényező gondos vizsgálatával helyesen becsülhető a hatékony inhibitorok köre, a kidolgozott eljárás nem tekinthető kvantitatívnek. A továbbiakban ezért szükség lesz a kötési energia becslésére alkalmas módszer alkalmazására, ugyanis várhatóan ez egyrészt alátámasztja a szerkezetek és a megfigyelések helyességét, másrészt a kötődés közben fellépő összes hatást egyszerre veszi figyelembe, így várhatóan visszaadja a peptidek hatékonyságában tapasztalt tendenciákat. A kölcsönhatási energia meghatározásához az inhibitor és az enzimet együtt kell szimulálni, és ki kell számolni a kölcsönható és a nem kölcsönható rendszerek közti energiakülönbséget, ahogy ez a 3.18 ábrán látható.



3.18. ábra. Kölcsönhatási energia számítása

4. Összefoglalás és a további tervek

Munkám során a Mező Gábor (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) által előállított MASP2 inhibitorokat vizsgáltam, melyekbe az inhibitorban eredetileg megtalálható diszulfidhíd helyett tioéter kötést tartalmazó linkert építettek be. Az átkötés hossza a tapasztalatok alapján befolyásolja a peptidek MASP2 enzimre kifejtett gátló hatását. Az eredeti, diszulfidhidat tartalmazó átkötés hosszát közelítve (lizin, ornitin, diaminovajsav, diaminopropionsav beépítésével) Dr. Pál Gábor (ELTE, Biokémiai Tanszék) és munkatársai mérései szerint nőtt az inhibitorok hatékonysága. Meglepő módon azonban a diszulfidhíddal létrehozott ciklus tag-számánál csak egy nehézzal nagyobb tagszámú, az átkötésben aminoglicint tartalmazó inhibitor esetén a megfigyelt tendencia megfordult. Ugyancsak meglepő tapasztalat volt, hogy a diaminopropionsavat tartalmazó inhibitor esetén a szintézis két, közel azonos hatékonyságú izomert eredményezett, melyek az enzim működését eltérő mértékben gátolják. További fontos megfigyelés, hogy a láncvégi védőcsoporttal ellátott inhibitorok hatékonyabbak, mint a védőcsoport nélküli peptidek. Céloom a fenti megfigyelések szerkezet alapú magyarázata volt, melyhez az elméleti kémia eszközeit, kvantumkémiai számításokat és molekuladinamikai szimulációkat alkalmaztam.

- Elsőként a molekuladinamikai szimulációkhoz használt CHARMM27 erőteret parametrizáltam, tehát meghatároztam és beillesztettem a nem természetes fehérjealkotó aminosavak geometriai paramétereit és töltéseit.
- Ezt követően először az inhibitorok szabad, vízben megtalálható konformációját vizsgáltam. Megmutattam, hogy az aminoglicint tartalmazó peptid esetén a linkerben található amidkötés cisz állása stabilabb, míg a többi peptid esetén a transz izomer bizonyult energetikailag kedvezőbbnek. Az eredmények alapján az aminoglicint tartalmazó peptid eltérő viselkedését és a diaminopropionsavat tartalmazó peptid esetén látott két izomer megjelenését az magyarázza, hogy az átkötés rövidülésekor csökken a konformációs szabadság, melynek eredményeképp a linker atomjai a peptid többi atomjának síkja felé fordulnak és azzal szterikus és elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek. A munkám során végzett kvantumkémiai számítások és molekuladinamikai szimulációk alátámasztották az előzetes feltevést, miszerint az előállított két izomer a linker amidkötés cisz és a transz izomereinek felel meg.
- Az inhibitorok szabad konformációinak vizsgálata során megállapítottam, hogy a gerinc-

konformációjuk egymástól kis mértékben eltér. Az inhibitorok kötődés szempontjából fontos tulajdonságainak vizsgálata során nem találtam azonban olyan eltérést, mely magyarázatot adhatna az eltérő hatékonyságukra.

- A vizsgálatokat ezért az inhibitorok és a MASP2 enzim komplexeinek molekuladinamikai szimulációjával folytattam. A komplexek vizsgálata során két, egymástól jelentős mértékben különböző, stabil szerkezetet sikerült előállítani, melyek valószínűleg a komplex kialakulásának különböző lépéseihez tartoznak.
- A lazábban kötött komplexekben a P1 arginin oldallánca az S1 zsebbe kötődik, azonban annak az aljáig nem ér le. Ezekben a komplexekben az inhibitor többi része em orientálódik a kötőárokba. A szorosan kötött komplexek esetén kialakul a kapcsolat a többi kötőzsebbel is.
- Az inhibitorok kötődése a szorosan kötött komplexek további vizsgálatával tanulmányozható. A kapott szerkezetek alapján a láncvégi védőcsoportok beépítésével elért aktivitás növekedés magyarázatára is javaslatot tettem. A védőcsoportok beépítésének hatására 3-as hurokrégió elmozdult, melynek hatására az inhibitor Tyr2 oldallánca egy hidrofób zsebbe kerülhetett. Az így kiterjedő kölcsönhatási felszín magyarázhatja a láncvégi védőcsoport hatékonyságnövelő hatását az SFMI2 inhibitor esetén.
- A szorosan kötött komplexek szerkezetének vizsgálata során azonosítottam a kötődést jellemző fontos paramétereket. Megállapítottam, hogy az egyes inhibitorok eltérő hatékonyságának magyarázatához a fontos tulajdonságokat együtt kell vizsgálni, ugyanis nem található olyan jellemző, mely önmagában magyarázatot adna a hatékonyságok vizsgálatakor talált tendenciára.
- Megállapítottam, hogy a a kötődés során az inhibitorok a szubsztrátkötés során megszkott P3-P2' aminosavakon kívül az inhibitor távolabbi aminosavai is kölcsönhatásba lépnek az enzimmel, amit a komplexek vizsgálatakor mindenképpen figyelembe kell venni.

Az eddigi eredmények alátámasztásához a későbbiekben tervezzük az eddig nem vizsgált, diaminovajsavat tartalmazó peptid komplexének vizsgálatát is. Az eredmények alapján szükséges a kölcsönhatási energia becslésére alkalmas módszer keresése, mellyel a kötődést jellemző tulajdonságok hatása együtt vizsgálható. Ezen kívül terveink közt szerepel a legjobban kötődő inhibitorok röntgenkrisztallográfiás vizsgálata is, mely alátámaszthatná a modellezéssel kapott eredményeket.

Irodalomjegyzék

- [1] D. Héja, V. Harmat, K. Fodor, M. Wilmanns, J. Dobó, K. A. Kékesi, P. Závodszky, P. Gál, and G. Pál, „Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and-2 Are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 24, p. 20290–20300, 2012.
- [2] E. D. Cera, „Serine proteases,” *IUBMB life*, vol. 61, no. 5, p. 510–515, 2009.
- [3] N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, and A. Bateman, „MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors,” *Nucleic Acids Research*, p. gkt953, 2013.
- [4] L. Hedstrom, „Serine protease mechanism and specificity,” *Chemical Reviews*, vol. 102, no. 12, p. 4501–4524, 2002.
- [5] I. Schechter and A. Berger, „On the size of the active site in proteases. I. Papain,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 27, no. 2, p. 157–162, 1967.
- [6] L. M. Sompayrac, , *How the Immune System Works*. Wiley-Blackwell, 2012.
- [7] P. Gál, V. Harmat, A. Kocsis, T. Bián, L. Barna, G. Ambrus, B. Végh, J. Balczer, R. B. Sim, G. Náray-Szabó, *et al.*, „A true autoactivating enzyme Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 39, p. 33435–33444, 2005.
- [8] D. Héja, A. Kocsis, J. Dobó, K. Szilágyi, R. Szász, P. Závodszky, G. Pál, and P. Gál, „Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, p. 10498–503, June 2012.
- [9] H. Habib and K. M. Fazili, „Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants,” *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, vol. 2, no. 3, p. 68–85, 2007.
- [10] N. Rawlings, D. Tolle, and A. Barrett, „Evolutionary families of peptidase inhibitors,” *Biochemical Journal*, vol. 378, p. 705–716, 2004.
- [11] W. Bode and R. Huber, „Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 204, p. 433–451, 1992.

- [12] D. E. Bowman, „Differentiation of soy bean antitryptic factors.,” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 63, p. 547–50, Dec. 1946.
- [13] Y. Birk, „Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and alpha-chymotrypsin from soybeans,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 54, p. 378–381, 1961.
- [14] A. Suzuki, T. Yamane, T. Ashida, S. Norioka, S. Hara, and T. Ikenazka, „Crystallographic Refinement of Bowman-Birk Type Protease Inhibitor A-II from Peanut (*Arachis hypogaea*) at 2·3 Å Resolution,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 234, no. 3, p. 722–734, 1993.
- [15] J. A. R. Barbosa, L. P. Silva, R. C. Teles, G. F. Esteves, R. B. Azevedo, M. M. Ventura, and S. M. de Freitas, „Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with beta-Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases,” *Biophysical Journal*, vol. 92, no. 5, p. 1638–1650, 2007.
- [16] E. M. Ragg, V. Galbusera, A. Scarafoni, A. Negri, G. Tedeschi, A. Consonni, F. Sessa, and M. Duranti, „Inhibitory properties and solution structure of a potent Bowman–Birk protease inhibitor from lentil (*Lens culinaris*, L) seeds,” *FEBS Journal*, vol. 273, no. 17, p. 4024–4039, 2006.
- [17] R.-F. Qi, Z.-W. Song, and C.-W. Chi, „Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Protease Inhibitors and Their Potential Application,” *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 37, no. 5, p. 283–292, 2005.
- [18] R. Voss, U. Ermler, L.-O. Essen, G. Wenzl, Y.-M. Kim, and P. Flecker, „Crystal Structure of the Bifunctional Soybean Bowman-Birk Inhibitor at 0.28-nm Resolution,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 242, no. 1, p. 122–131, 1996.
- [19] J. D. McBride and R. Leatherbrow, „Synthetic peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor protein,” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 8, p. 909–917, 2001.
- [20] S. Luckett, R. S. Garcia, J. Barker, A. V. Konarev, P. Shewry, A. Clarke, and R. Brady, „High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 290, no. 2, p. 525–533, 1999.
- [21] A. Kocsis, K. A. Kékesi, R. Szász, B. M. Végh, J. Balczer, J. Dobó, P. Závodszky, P. Gál, and G. Pál, „Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and-2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation,” *The Journal of Immunology*, vol. 185, no. 7, p. 4169–4178, 2010.

- [22] Z. Gaspari, A. Patthy, L. Gráf, and A. Perczel, „Comparative structure analysis of protease inhibitors from the desert locust, *Schistocerca gregaria*,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 2, p. 527–537, 2002.
- [23] J. J. Perona and C. S. Craik, „Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 48, p. 29987–29990, 1997.
- [24] R. Tugyi, G. Mezö, E. Fellingner, D. Andreu, and F. Hudecz, „The effect of cyclization on the enzymatic degradation of herpes simplex virus glycoprotein D derived epitope peptide,” *Journal of Peptide Science*, vol. 11, no. 10, p. 642–649, 2005.
- [25] P. Hohenberg and W. Kohn, „Inhomogeneous Electron Gas,” *Physical Review*, vol. 136, p. B864–B871, Nov. 1964.
- [26] A. Becke, „Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, p. 5648, 1993.
- [27] A. D. Bochevarov, E. Harder, T. F. Hughes, J. R. Greenwood, D. A. Braden, D. M. Philipp, D. Rinaldo, M. D. Halls, J. Zhang, and R. A. Friesner, „Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences,” *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 113, no. 18, p. 2110–2142, 2013.
- [28] A. V. Marenich, R. M. Olson, C. P. Kelly, C. J. Cramer, and D. G. Truhlar, „Self-consistent reaction field model for aqueous and nonaqueous solutions based on accurate polarized partial charges,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 3, no. 6, p. 2011–2033, 2007.
- [29] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, and T. Hendrickson, „Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, no. 16, p. 6127–6129, 1990.
- [30] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives, „Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, no. 45, p. 11225–11236, 1996.
- [31] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus, „All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 102, no. 18, p. 3586–3616, 1998.

- [32] J. W. Ponder and F. M. Richards, „An efficient newton-like method for molecular mechanics energy minimization of large molecules,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 8, no. 7, p. 1016–1024, 1987.
- [33] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, „Molecular dynamics with coupling to an external bath,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 81, no. 8, p. 3684–3690, 1984.
- [34] G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, „Canonical sampling through velocity rescaling,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 126, no. 1, p. 014101, 2007.
- [35] V. Harmat, P. Gál, J. Kardos, K. Szilágyi, G. Ambrus, B. Végh, G. Náray-Szabó, and P. Závodszky, „The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions.,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 342, p. 1533–46, Oct. 2004.
- [36] X. Daura, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, and A. E. Mark, „Peptide folding: when simulation meets experiment,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, no. 1-2, p. 236–240, 1999.