

A szubsztrátkötődés és szubsztrátkiralitás szerepe a humán 3-foszfoglicerát kináz dinamikájában

Doktori értekezés

Pálmai Zoltán

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Balog Erika egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Dr. Dosztányi Zsuzsanna tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Dr. Béni Szabolcs egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Mátyus Péter egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Czirók András egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Ambrus Attila egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	5
2.1. Számítógépes szimulációk alkalmazása a fehérjekutatásban	6
2.1.1. A számítógépes szimuláció és kapcsolata a kísérleti, elméleti módszerekkel	6
2.1.2. A számítógépes szimulációk rövid története	8
2.1.3. A MD szimuláció elve	9
2.1.4. A MD szimuláció lehetőségei és korlátai a fehérjekutatásban	12
2.2. A fehérjefunkció és dinamika kapcsolata	16
2.3. A doménmozgások, mint funkcionálisan fontos kollektív mozgások	17
2.4. A lokális mozgások és jelentőségük	20
2.5. A humán 3-foszfoglicerát kináz (hPGK)	21
2.5.1. A PGK röntgen-krisztallográfiás szerkezete	23
2.5.1.1. A humán enzim szubsztrátkötőhelyeinek szerkezete	27
2.5.1.2. A csuklópontok meghatározására tett kísérletek	32
2.5.2. Az oldott PGK tulajdonságai	34
2.5.3. A PGK vizsgálata számítógépes szimulációval	37
3. CÉLKITŰZÉSEK	39
4. MÓDSZEREK	40
4.1. A szimuláció kiindulási szerkezeteinek meghatározása	40
4.2. MD szimuláció	43
4.3. A szimuláció kiértékeléséhez használt mennyiségek	46
4.4. Csuklópontok azonosítása DynDom (Dynamical Domains) programmal	48
4.5. A Principal Component Analysis (PCA) módszer	50
4.6. A fehérjekonformációk gyakorisági eloszlásának karakterizálása	51
4.7. Nemkötő kölcsönhatási energiák számítása	52
5. EREDMÉNYEK	53
5.1. Az apo hPGK és a D-ADP komplex dinamikai jellemzése	53
5.2. A D-/L-ADP és D-/L-CDP komplexek dinamikai elemzése	72

6. MEGBESZÉLÉS	89
6.1. A szubsztrátkötődés hatása a dinamikára.....	89
6.2. A szubsztrátkiralitás hatása a dinamikára	94
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	100
7.1. A szubsztrátkötődés hatásai	100
7.2. A szubsztrátkiralitás hatásai.....	101
8. ÖSSZEFOGLALÁS	104
9. SUMMARY	105
10. IRODALOMJEGYZÉK	106
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	119
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	120

1.**Rövidítések jegyzéke**

1,3-BPG	1,3-biszfoszfoglicerát
3-PG	3-foszfoglicerát
ADP	adenozin-difoszfát
AMP-PNP	β,γ -imido-adenozin-5'-trifoszfát
ATP	adenozin-trifoszfát
CDP	citidin-difoszfát
CG MD	coarse graining molekuláris dinamikai szimuláció
CHARMM	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics
CPK	Corey-Pauling-Koltun molekuláris modell
GA	genetikus algoritmus
HIV	Human Immunodeficiency Virus, (emberi immunhiányt-előidéző vírus)
hPGK	humán 3-foszfoglicerát kináz
MC	Monte Carlo szimuláció
MD	molekuláris dinamika
NAMD	Not (just) Another Molecular Dynamics program
NMA	Normal Mode Analysis (normál módus analízis)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (magnáneses rezonancia)
PCA	Principal Component Analysis (főkomponens analízis)
PGK [EC 2.7.2.3]	3-foszfoglicerát kináz
PME	Particle Mesh Ewald
RMSD	Root Mean Square Distance
RMSF	Root Mean Square Fluctuation
SAXS	Small Angle X-ray Scattering (kisszögű röntgenszórás)

2.

Bevezetés

A fehérjék az élő szervezetben lezajló, legkülönbözőbb élettani folyamatok végrehajtásáért és ellenőrzésért felelősek. Egyik alcsoportjuk, az enzimfehérjék - miniatűr molekuláris gépekként működve - különféle biokémiai reakciókat katalizálnak. Szerkezeti adottságaik révén rendkívül specifikusak: csak egy adott vegyület (vagy vegyületcsoport) adott reakcióját katalizálják. A biokémiai tudományok korai szakaszában igen népszerű kulcs-zár modell ezt a tulajdonságot sikerrel magyarázta (1). A modell szerint enzim és szubsztrátja merev geometriai formaként képzelhetők el, melyek pontosan illeszkednek egymásba, mint a kulcs a zárba. A modell alapvető hiányossága, hogy figyelmen kívül hagyja a fehérjeszerkezet flexibilitását. Ma már tudjuk, hogy a fehérjék fiziológiás körülmények között igen gazdag belső dinamikával rendelkeznek. Szerepük betöltéséhez mozgásra van szükség (2-6). A fehérjeszerkezetben ható erők a random jellegű atomi hőmozgásokat biológiai jelentőséggel bíró funkcionális mozgásokká képesek alakítani. Lokális fluktuációk mellett nagyobb léptékű szerkezeti átrendeződések jöhetnek létre, melyek fontos szerepet játszanak az enzimfehérje működésében.

Doktori munkám során azt vizsgáltam, hogy a lokális és kollektív mozgások összessége - mint dinamikai repertoár - hogyan valósul meg egy tipikus két doménből felépülő enzim, a humán 3-foszfoglicerát kináz (hPGK) esetén. Arra a kérdésre kerestem a választ, vajon hogyan befolyásolja a szubsztrátkötődés az enzim dinamikáját. Annak ellenére, hogy már munkám kezdetén jelentős mennyiségű információ állt rendelkezésre a PGK működéséről az irodalomban, a fehérje funkcionális mozgásairól csak indirekt bizonyítékok voltak ismertek. Munkám fő célja volt, hogy számítógépes szimulációs módszerekkel atomi szinten jellemezzem a PGK dinamikáját és a hatékony enzimaktivitás dinamikai körülményeit.

2.1. Számítógépes szimulációk alkalmazása a fehérjekutatásban

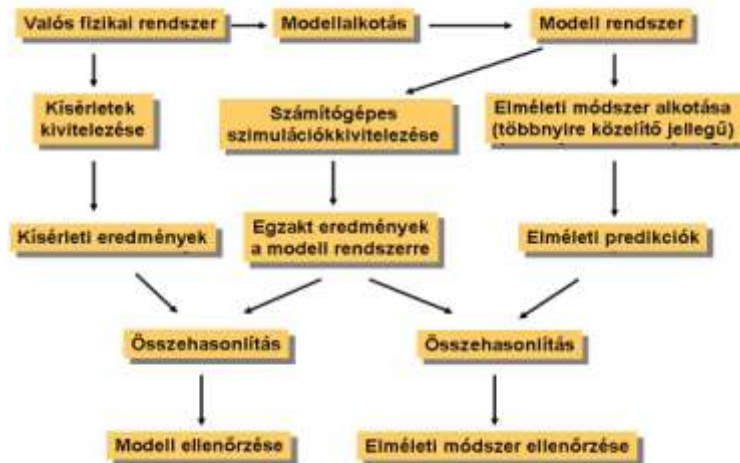
2.1.1. A számítógépes szimuláció és kapcsolata a kísérleti, elméleti módszerekkel

A tudósok a természet és a benne lejátszódó folyamatok megértése, leírása érdekében évszázadok óta különféle, a valóságot minél jobban megközelítő modellek megalkotására törekedtek. A fizikában egy modell nem más, mint a modellt jellemző változók és azok kapcsolatát leíró matematikai egyenletek rendszere. Az egyenleteket megoldva, a modell viselkedése leírható néhány paraméter és a kiindulási feltételek ismeretében. Ha elég jó a modell, akkor a leírás a valós rendszer esetében is alkalmazható.

A statisztikus fizikában nagyon kevés azon problémák száma, melyek analitikusan megoldhatók (7). Ezen ritka esetekben a modell viselkedése leírható egy (vagy több) zárt, analitikus matematikai kifejezés segítségével (pl. kétdimenziós Ising-modell). Komplex és bonyolult problémák esetében azonban (pl. molekuláris folyadékok leírása) többnyire lehetetlen zárt, analitikus formában megadni a megoldást. Bizonyos közelítések alkalmazásával ugyan konstruálhatók olyan elméleti módszerek, melyek több-kevesebb sikerrel hozzávetőleges jóslatokat tehetnek a modell rendszerek viselkedésére vonatkozóan. Hatékony alternatívát nyújthatnak ilyen esetekben a különféle számítógépes szimulációs módszerek, melyek komplex és bonyolult problémák esetén is egzakt megoldásokat képesek szolgáltatni (figyelembe véve a számolások véges pontosságát és a modell rendszer használt közelítéseket).

Valahol a kísérleti és elméleti módszerek között elhelyezkedve, a szimulációk egyfajta kettős szereppel rendelkeznek (1. ábra, (8)). Az elméleti módszerekhez hasonlóan egy előre felállított modellen dolgoznak, viszont kivitelezésük és analízisük a kísérleti módszerekhez teszik őket nagyon hasonlatossá. Ezért nagyon találó az a kijelentés miszerint a szimuláció nem más, mint számítógépes kísérlet. A szimulációs és elméleti eredmények összehasonlítása lehetővé teszi az elméleti módszer ellenőrzését. Ugyanakkor a kísérleti és a szimulációs eredmények összehasonlításával az alkalmazott modell validálására nyílik lehetőség. Ha a modell jónak bizonyul, szimuláció segítségével a probléma részleteiben és folyamatában, azaz új szemszögből válik vizsgálhatóvá (pl. fehérje feltekeredés atomi szinten történő vizsgálata). Ezzel a kísérleti

eredmények értelmezésére, valamint új kísérletek tervezésére is lehetőség nyílik. Így a szimulációk egyfajta hidat képeznek a modellek és az elméleti predikciók, másrészt a modellek és a kísérleti eredmények között.



1. ábra Kapcsolat a kísérlet, az elmélet és a számítógépes szimuláció között (8). A kísérleti és elméleti módszerek között elhelyezkedve, a szimulációk egyfajta kettős szereppel rendelkeznek.

A szimulációk sajátja, hogy mintegy közvetlen kapcsolatot képesek teremteni statisztikus rendszerek mikroszkopikus (pl. részecskék tömege, töltése, sebessége stb.) és makroszkopikus (pl. energia, nyomás, transzport együtthatók stb.) mennyiségei között. A statisztikus fizika alapvető feltevése, hogy a mért mennyiség egyenlő a mennyiség sokaságra vett átlagával. Ahhoz, hogy szimuláció segítségével egy adott rendszer (pl. fehérje vizes oldata) valamely makroszkopikus fizikai mennyiségét számolhassuk, sokaságot kell generálnunk, azaz fel kell térképeznünk a rendszer összes lehetséges állapotát a fázistérben (a részecskék pozíciói és impulzusai által kifeszített tér).

Két alapvető szimulációs módszer létezik egyensúlyi sokaság létrehozására: a Monte Carlo szimuláció (MC) és a molekuláris dinamikai szimuláció (MD). A különbség a fázistér feltérképezésének módjában rejlik. MC során egy, a rendszert alkotó részecske random módon történő kiválasztásával és pozíciójának szintén random módon való megváltoztatásával, a potenciális energiában okozott perturbáció alapján történik az elmozdulás a fázistérben. A rendszer új pozícióját a szimuláció

$\min(1, \exp(-\beta\delta V_{mn}))$ valószínűséggel fogadja el, ahol β a Boltzmann-állandó és az abszolút hőmérséklet szorzatának a reciproka, δV_{mn} pedig az m kiindulási állapot és az n végállapot közötti potenciális energia különbség. Ezzel szemben MD szimuláció esetében a klasszikus newtoni mozgásegyenletek numerikus integrálásával valósul meg a fázistérbeli elmozdulás (lásd később). Tehát ebben az esetben valós dinamikai eseményeket szimuláló módszerről van szó.

Fehérjék szimulációs vizsgálatainak során a MD szimulációk használata az általánosabb. Ennek oka, hogy a MD szimulációk – szemben a MC-vel - számot adnak a rendszer dinamikai tulajdonságairól is, valamint nem-egyensúlyi sokaság generálására is alkalmasak. Ugyan a MC módszer jóval egyszerűbb, mint a MD (nem kell gépidő igényes erőket számolni), bizonyíthatóan nem produkál jobb statisztikát adott gépidő alatt (9).

A számítógépes szimulációk alapvető gyakorlati haszna, hogy - szemben a kísérleti módszerekkel - rendkívül költséghatékonyak és sokoldalúak. Segítségükkel extrém körülmények szimulálhatók (pl. magas hőmérsékletű plazma). Alkalmazásukkal atomi szinten váltak tanulmányozhatóvá a másodperc milliomod része alatt lejátszódó folyamatok (pl. fehérje konformációs dinamika). Fizikai jelenségek - legyenek azok molekuláris szinten vagy galaktikus (8) léptékben lejátszódó folyamatok - szimulációval egyformán megközelíthetők, leírhatók.

2.1.2. A számítógépes szimulációk rövid története

A számítógépes szimulációk fejlesztése gyakorlatilag már az első számítógépek megjelenésével megkezdődött az 1940-es években. Az első jelentős alkalmazásra a Manhattan-terv keretében a második világháború idején került sor. Ennek során Neumann, Ulam és Metropolis az atomrobbanás folyamatát szimulálta, megalkotva ezzel a MC szimuláció alapjait (10). Az első folyadék rendszeren végzett MC szimulációt szintén a Los Alamos National Laboratories-ban végezték 1953-ban (11). A korai szimulációs alkalmazások igen egyszerű modell-rendszerekkel dolgoztak, pl. kölcsönhatásmentes kemény gömbök, korongok. Azonban nem kellett sokat várni az első Lennard-Jones potenciált alkalmazó MC szimuláció megjelenésére sem (12). Ezen

a ponton már lehetőség nyílt szimulációs és kísérleti eredmények (pl. folyékony argon) összehasonlítására. 1957-ben Alder és Wainwright szimulációs algoritmust írt kemény gömbökből álló rendszerre, hogy folyadékok dinamikai tulajdonságait modellezhesse. Ezzel egyben lefektették a MD szimuláció alapjait is (13,14). Néhány évvel később megszületett az első folytonos potenciált (Lennard-Jones) alkalmazó MD szimuláció is (15).

A számítógépek egyre szélesebb körű elterjedésével felgyorsult a számítógépes szimulációk fejlesztése az 1960-as, 1970-es években. A kezdeti, atomos rendszereken végzett szimulációkat hamarosan követték az egyre komplexebb, molekuláris rendszereken végzett munkák. 1968-ban történt először kísérlet egy kétatomos molekuláris folyadék viselkedésének szimulálására (16), majd megszülettek az első folyadék fázisú vizet modellező szimulációs munkák, előbb MC-vel 1969-ben (17), majd MD-vel 1971-ben (18). A hetvenes években már kisebb, merev (19), később flexibilis molekulákon (szénhidrogéneken) (20) is hajtottak végre szimulációkat. Majd 1977-ben McCammon és mtsai közölték az első fehérjén (BPTI, Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) végzett szimuláció eredményeit (21). Mára a számítógép kapacitás és a szimulációs algoritmusok fejlődésével, komplex biológiai rendszerek (fehérje-, nukleinsav-, lipid-rendszerek) vizsgálatára is lehetőség van.

2.1.3. A MD szimuláció elve

Nagy makromolekuláris rendszerek fizikai, kémiai tulajdonságainak elméleti vagy szimulációs leírása gyakran nagyon komplex és számításigényes feladat, főként abban az esetben, ha megfelelően szeretnénk kezelni a kvantummechanikai effektusokat is. A probléma áthidalására a hagyományos MD szimulációk a Born-Oppenheimer-közelítést használják. Az elv röviden a következő. Tekintsünk egy tetszőleges N atomos molekulát. Mivel az elektronok mozgása sokkal gyorsabb az atommagokénál, ezért a rendszer Schrödinger-egyenlete két külön egyenletre bontható. Az első az elektronokra vonatkozó Schrödinger-egyenlet, amely paraméteresen függ az atommagok $\mathbf{r} \equiv (\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$ pozícióitól. Ennek megoldása adja a $\phi(\mathbf{r})$ potenciális energiafüggvényt, amely csak az atommagok pozícióitól függ. A második egyenlet az

atommagok mozgását írja le ezen a $\phi(\mathbf{r})$ potenciálfelületen. Az MD két alapfeltevése:

1. A $\phi(\mathbf{r})$ potenciálfüggvényt empirikus energiafüggvénnyel helyettesíthetjük (a Schrödinger-egyenlet megoldása helyett). Ezt nevezik erőtérek vagy force-fieldnek (lásd később).

2. Az atommagok jóval nehezebbek az elektronoknál, így a magokra vonatkozó Schrödinger-egyenlet helyett a Newton-féle mozgásegyenletet használhatjuk (klasszikus közelítés):

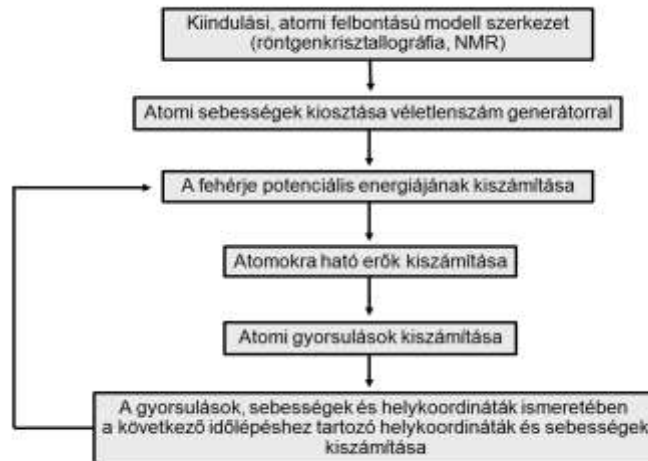
$$-\nabla_{\mathbf{r}_i} \phi(\mathbf{r}) = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} \quad 1 \leq i \leq N, \quad (1)$$

ahol m_i az i -edik atommag tömege. Tehát N atom esetén $3N$ darab klasszikus Newton-egyenlet numerikus megoldásával (bizonyos itt nem részletezett integrációs algoritmusok segítségével) szimulálhatjuk az atomi mozgásokat. Az atomi koordináták idő szerinti függvénye adja a trajektóriákat.

A statisztikus fizika alapvető feltevése: a mért mennyiség egyenlő a mennyiség sokaságátlagával. A lefuttatott szimulációból, az (1) mozgásegyenletek által generált trajektóriából trajektória-átlagot, vagyis időátlagot számolhatunk. Az ergodicitási hipotézis alapján a fizikai mennyiség időátlaga egyenlő a sokaságátlagával. Azaz az MD szimuláció szolgáltatja eredmények segítségével a rendszer makroszkopikus termodinamikai mennyiségeinek meghatározására is lehetőség nyílik.

A fehérjékre alkalmazott hagyományos MD szimulációk sematikus kivitelezési protokollja a 2. ábrán látható. A rendszert alkotó atomok kiindulási koordinátáit röntgen-krisztallográfiai, NMR spektroszkópiái adatok vagy homológia modell szolgáltatja. Adott hőmérsékleten a kezdeti sebességeket véletlenszám generátor osztja ki az atomok között (22). A kölcsönható erők pedig a potenciális energia (erőtér) segítségével számolhatók, melyre egy példa a 3. ábrán látható (23,24). Az erők származhatnak kovalensen kötődő atomok kölcsönhatásaiból illetve nem kötődő atomok másodlagos kölcsönhatásaiból. A kötések és kötőszögek menti vibráció virtuális

rugókkal, a torziós szögek központi kötése körüli rotáció szinuszoid függvénnyel kerül modellezésre. A kovalensen nem kötődő atomok között ható erők van der Waals és elektrosztatikus kölcsönhatásból erednek. A van der Waals kölcsönhatást Lennard-Jones 6-12 potenciálfüggvény (25), az elektrosztatikus kölcsönhatást a Coulomb-törvény modellezi.



2. ábra Klasszikus MD szimulációk kivitelezési protokollja.

A potenciálfüggvényben szereplő paramétereket kísérleti (pl. infravörös spektroszkópiai) adatok és kvantummechanikai *ab initio* számolások szolgáltatják. Ma már számos különböző erőter áll a kutatók rendelkezésére (pl. AMBER (23), CHARMM (26), GROMOS (27)). Alapvetően a különbség köztük a paraméterezésben és az energiatagokban rejlik (24).

Sok kölcsönható részecskét tartalmazó, nagy rendszerek esetén, a rengeteg számítási feladat miatt a MD szimulációk meglehetősen gépidő igényesek. A szükséges gépidő csökkentése érdekében több tíz/száz processzort tartalmazó számítógép-klasztereken, parallelizálva végzik a számításokat.

$$E = \sum_{\text{potenciális kötések}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{szögek}} K_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{torziós kötések}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

3. ábra Az erőterekben jellemzően használt energiatagok szemléltetése (24).

2.1.4. A MD szimuláció lehetőségei és korlátai a fehérjekutatásban

A MD szimulációk szerepe a fehérjekutatásban a hetvenes évek végétől mind hangsúlyosabbá vált. A röntgen-kristallográfiás szerkezet meghatározások során egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a fehérjemozgások nagy jelentőséggel bírnak a fehérjeműködésben (28,29). Kísérleti módszerek mellett a számítógépek és a szimulációs módszerek fejlődésével a makromolekuláris rendszerek, így a fehérjék szimulációs vizsgálata mind elérhetőbbé vált.

Számos példa van arra, mikor a szimuláció segített egy-egy jelenség megértésében vagy a kísérleti adatok magyarázatában (30-34). Például Somani és mtsai MD szimulációval mutatták ki, hogy a humán interleukin-1béta fehérjében található hidrofób üregbe vízmolekulák diffundálhatnak ki és be, ami megmagyarázta a korábban detektált NOE (Nuclear Overhauser Effect) jeleket (35). Az üreg hidratációjával bizonyos távoli, funkcionálisan fontos szerkezeti elemek mozgása korreláltabbá válik és a hidrogénhid kötések hálózata megerősödik. MD szimulációs eredményeket új gyógyszerhatóanyag kifejlesztéséhez is sikerrel alkalmazták. Például Schames és mtsai MD szimulációval vizsgáltak egy korábban, kísérletileg alkalmatlan gyógyszer-célpontnak tulajdonított enzimet, a HIV integrázt (36). A szimulációk egy új lehetséges kötőhelyre hívták fel a figyelmet, mely a röntgen-kristallográfiás szerkezetekben nem volt látható. A későbbi kísérletes eredmények megerősítették, hogy ismert inhibitorok valóban kötődnek a molekula ezen részén, a jóslatnak megfelelően. Az eredmények fényében a Merck & Co. gyógyszer-cég új vizsgálatokat kezdett a HIV integrázzal (37), melyeknek eredményeképpen egy új, hatékony antiretrovirális HIV gyógyszert, a raltegravirt

fejlesztették ki.

Az erőterek közelítő jellege miatt azokban az esetekben, ahol a kvantummechanikai effektusok fontos szerepet játszanak (kémiai kötések felszakadása, létrejötte, kvantummechanikai alagút effektus, elektromos polarizáció stb.) a klasszikus MD szimuláció helyett QM/MM (quantum-mechanical/molecular mechanical) technikákat használnak. Közös jellemzőjük, hogy a fehérjék aktív helyeinek mozgásait, reakcióit a kvantummechanikai törvények figyelembevétel számolják, míg a rendszer összes többi szegmensét hagyományos MD módszerrel modellezzik. Például Hong és mtsai QM/MM módszerrel vizsgálta a *Desulfovibrio desulfuricans* és *Clostridium pasteurianum* [Fe-Fe] hidrogenázokat. Kötésfelszakadással és képződéssel járó, katalitikusan fontos proton-transzfer jelenséget sikerült leírni az aktív helyen (38).

A kémiai kötésfelszakadás és képződés mellett egy másik fontos kvantummechanikai jelenség, az elektromos polarizáció sem szimulálható klasszikus MD módszerrel. Mivel az erőterek előre definiált, fix paraméterként tartalmazzák az egyes atomok részleges töltését, az atommagok körüli elektronfelhők alakjának folytonos, dinamikus változása nem szimulálható. A jelenség korrekt kezelése érdekében számos ún. polarizálható erőter került kifejlesztésre (pl. Drude-részecske módszer (39), fluktuáló töltés módszerek (40) stb.), ezek azonban jelentősen megnövelik a szimulációk számítási igényét. Így alkalmazásuk széles körben nem terjedt el. Napjainkban is szakmai vita tárgyát képezi, hogy milyen módon kell helyesen figyelembe venni a polarizáció jelenségét úgy, hogy ezzel ne növeljük jelentős mértékben a számítási igényt (41).

Az erőterek közelítő jellege mellett komoly korlátozó tényező a számítások tekintélyes gépidő igénye. Szemléletes példa: egy 64 processzor magos számítógép klaszteren, mely 160,77 GFlops (giga floating-point operations per second) teljesítményre képes, 1 mikroszekundum időintervallumot szimuláló MD futás 71409 atomos rendszerre (416 aminosavból álló fehérje 12 Å vastagságú rombos dodekaéder vízdobozban) körülbelül 54 napig tartana. A hatalmas gépidő igény meggátolja a mikroszekundumnál hosszabb időskálájú MD szimulációk rutinszerű futtatását. Fehérjék esetében ez sokszor a konformációs állapotok statisztikailag elégtelen mintavételezését vonhatja maga után. Termodinamikai mennyiségek pontos meghatározásához és a dinamikai viselkedés egyértelmű tisztázásához viszont a fehérje összes lehetséges konformációs állapotát fel kell deríteni. Az enzimműködésért felelős nagy, kollektív mozgások időskálája

többnyire milliszekundum – szekundum nagyságrendű (42), tehát a MD szimulációk tipikus időskáláján ezek a mozgásformák még nem követhetők nyomon a maguk teljességében. Ezzel szemben a lokális mozgásokhoz köthető konformáció változások (pl. kötőhelyek konformáció változásai) sok esetben sikerrel vizsgálhatók, hiszen ezek az események nagyságrendileg többnyire nanoszekundumosak – mikroszekundumosak. A konformációs energiatérkép hatékonyabb felderítése érdekében a hagyományos MD módszer különféle módosításait javasolták. Egyik legismertebb megoldás a Replica-Exchange MD módszer (REMD) (43,44). A módszer lényege, hogy ugyanazon rendszer több másolatát (replikák) szimuláljuk párhuzamosan, különböző hőmérsékleteken. Periodikus időközönként adott valószínűséggel véletlenszerűen kicseréljük két rendszer hőmérsékletét (újraszkálazzuk az atomsebességeket) és az új hőmérsékleteken folytatjuk a hagyományos MD szimulációt. E módszer segítségével a viszonylag magas energiagátakkal elválasztott konformációs állapotok is hatékonyan feltérképezhetők. A replikák párhuzamos propagálásához igen sok processzorra van szükség, ezért a módszer erőforrás-igényes. Egy továbbfejlesztett változat - az ún. single-copy tempering - egyetlen rendszer-replikát alkalmaz. A hőmérséklet folyamatos változtatásával eszközöli a nagyobb energiagátakon való átjutást (45). Egy másik alternatívát kínál a Hamelberg és mtsai által kifejlesztett ún. accelerated MD (aMD) szimulációs technika, mely a magas energiagátak mesterséges csökkentésével segíti a konformációs tér hatékonyabb feltérképezését (46).

Egy másik gyakran alkalmazott módszer csoport - az ún. coarse graining MD (CG-MD) - szintén a számításokhoz szükséges gépidő csökkentését és/vagy a szimulált időskála növelését teszik lehetővé (47,48). Közös jellemzőjük, hogy a hagyományos MD szimulációk részletes atomi reprezentációja (ún. all-atom) helyett ún. pszeudo-atomok alkalmazásával vesznek figyelembe bizonyos atomcsoportokat. Ezzel jelentősen csökkenthető a számítások mennyisége, természetesen a pontosság rovására. Egyszerű példák pszeudo-atomokra: $-CH_3/-CH_2$ csoportok vagy egész aminosavak egy részecskeként történő kezelése. A pszeudo-atomok paraméterezése kísérleti ill. hagyományos atomos MD szimulációk eredményei alapján történik. A paraméterezés során a legnagyobb problémát az elektromos töltéseloszlás meghatározása okozza, emiatt elektromos tulajdonságok jellemzésére a módszer megbízhatatlan (49). Viszont sikerrel alkalmazzák fehérje feltekeredés vizsgálatára (50).

A szimulációs algoritmusok fejlesztésével párhuzamosan, a rendelkezésre álló számítógép kapacitás is fejlődött az évek során. Az egyre fejlettebb processzor architektúrák és a parallel számítási lehetőségek megjelenésével mind nagyobb rendszerek mind hosszabb időskálán váltak vizsgálhatóvá. Shaw és mtsai kifejezetten MD szimulációk futtatására konstruált számítógépet alkalmaznak (neve Anton, Anton van Leeuwenhoek után), melynek segítségével milliszekundumos időskálán tudták vizsgálni egyes kis molekulású fehérjék folding folyamatait (51). Ligandumok fehérjéhez történő kötődésének teljes folyamatát sikerült leírni szintén az Anton szuperszámítógépen végzett szimulációkkal (52). A szimulációs vízdobozban, random pozícióban lett elhelyezve mind a ligandum, mind a célfehérje. Elegendően hosszan futtatott szimuláció alatt a ligandum minden esetben „megtalálta” kötőhelyét és kötődött, a kísérletileg meghatározott módon.

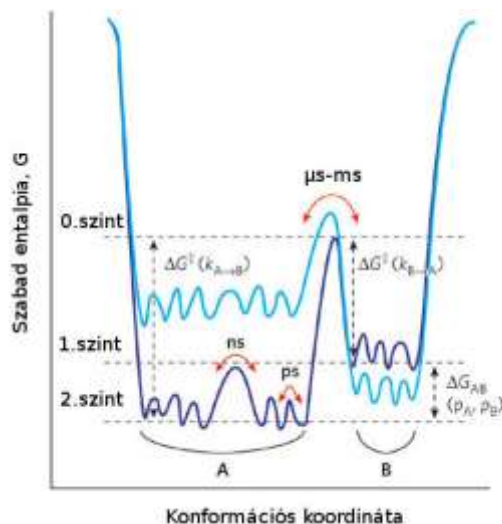
Egy másik irányt képviselnek a számítások felgyorsítására tett törekvésekben a GPU-ra (graphics processing unit) adaptált MD szimulációk (53-55). A videójátékok, számítógép grafikák minél gyorsabb, tökéletesebb megjelenítésére kifejlesztett GPU-k ugyanazon algoritmusok műveleteit hajtják végre a grafikus alkalmazások futtatása során, mint amilyeneket a MD használ. Ez adta az ötletet, hogy processzorok helyett, GPU-kat alkalmazzanak MD számításokhoz, melyek alkalmazása körülbelül egy nagyságrenddel növeli a számítások sebességét (53).

A jelenlegi korlátok ellenére a MD szimulációk kínálta lehetőségek páratlanok. A tudomány pillanatnyi állása szerint nincs a kezünkben olyan kísérleti módszer, mellyel a másodperc milliomodrésze alatt lejátszódó mikroszkopikus folyamat atomi részletességgel, közvetlenül vizsgálható lenne. MD szimulációval mindez elérhető. Alkalmazásukkal fehérjék dinamikai viselkedése jellemezhető, elősegítve ezzel a szerkezet és funkció közötti kapcsolat mélyebb megértését. A számítógép kapacitás és az algoritmusok fejlődésével pedig várhatóan a MD szimuláció mind nagyobb szerepet fog betölteni a gyógyszertervezésben is.

2.2. A fehérjefunkció és dinamika kapcsolata

Az enzimfehérjék az aktivációs energia csökkentésével képesek katalizálni különböző biokémiai reakciókat (56). Működésük során, funkciójuk betöltéséhez több-kevesebb szerkezeti flexibilitásra van szükségük (57). Ezen mozgások során a fehérjék nagy számú, különböző konformációjú állapotba kerülnek.

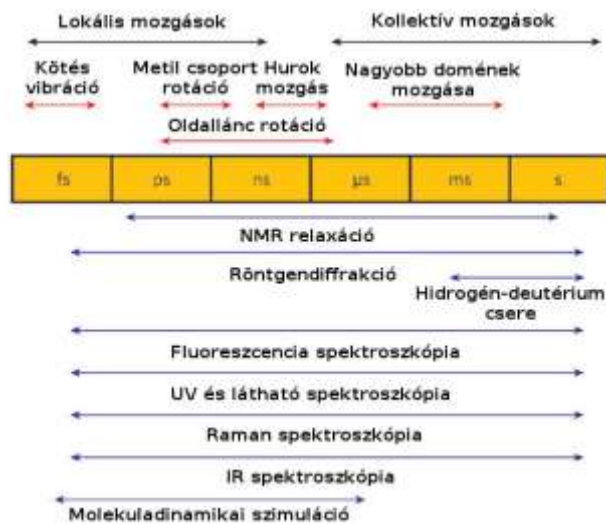
A konformáció és dinamika kapcsolata a fehérje konformációs energiatérképével jellemezhető (4. ábra (42)), melyen a lokális minimumok egy-egy konformációs állapotnak, a minimumok közötti átmenetek a konformációs dinamikának felelnek meg. A fehérje energiatérkép egyik legmeghatározóbb tulajdonsága, hogy struktúrája hierarchikusan szervezett (58). A konformációs állapotok az őket elválasztó energiagátak (átlagos) nagysága alapján hierarchikus szintekbe rendeződnek. A hierarchia legfelső szintjén (0. szint, 4. ábra) elhelyezkedő konformációs állapotok közötti átmenetek írják le a kollektív mozgásokat, melyek időskálája fiziológiás körülmények között mikroszekundum – milliszekundum nagyságrendű. Ezen mozgások a fehérjeatomok kooperatív, irányított elmozdulásait jelentik, melyek nagyobb molekularészletek szerkezeti átrendeződésével járnak (pl. relatív doménmozgások). Segítségükkel a megfelelő funkciós csoportok kellő közelségbe kerülhetnek a biokémiai reakció teljesülése érdekében.



4. ábra A fehérjék hierarchikusan szerveződő konformációs energiatérképe 2 dimenzióban (42). A kollektív mozgások időskálája μs - ms , míg a lokális fluktuációké ps - ns nagyságrendű.

A hierarchia alsóbb szintjeihez (1., 2. szint, 4. ábra) tartozó konformációs állapotok közötti átmenetek a gyorsabb, kisebb aktiválási energiát igénylő lokális fluktuációkat jellemzik. Ezen mozgások közé sorolhatók a femtoszekundumos időskálán lejátszódó kötés menti atomi vibrációk vagy a piko- és nanoszekundumos időskálájú aminosav-oldallánc mozgások és a másodlagos szerkezeti elemek deformációja (pl. hurkok flexibilitása). Számos eddigi eredmény és jelen munkám is azt bizonyítja, hogy ezen lokális fluktuációk is alapvető biológiai jelentőséggel bírnak (28,59,60). Kitétetett régiók – például szubsztrátkötőhelyek és csuklóregiók (lásd 2.4. fejezet) – lokális flexibilitása döntő fontosságú az enzimműködésre, egyben a katalitikus hatékonyságra nézve (29).

Az 5. ábra foglalja össze a különböző időskálán megvalósuló mozgástípusokat a vizsgálatukra alkalmas kísérleti, elméleti módszerekkel együtt (42). Figyelemre méltó, hogy a fehérjék teljes dinamikai repertoárja az időskála 16 nagyságrendjét íveli át.



5. ábra A különféle időskálákon megvalósuló molekuláris események (42).

2.3. A doménmozgások, mint funkcionálisan fontos kollektív mozgások

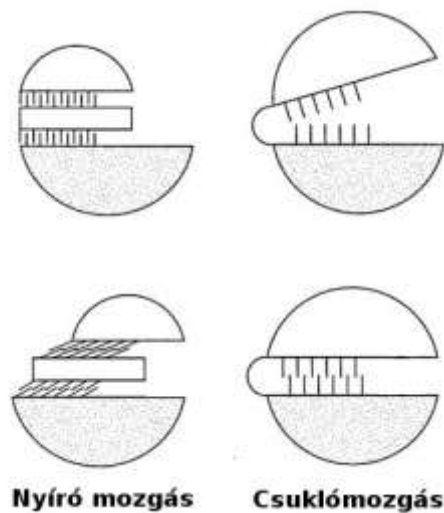
A fehérjedomén fogalma. A fehérjeszerkezet kompakt, globuláris térbelileg jól elkülönülő egységeit - melyek rendszerint önálló funkcióval is rendelkeznek - doméneknek nevezzük (61). Gyakran a fehérjeszerkezeten kívül, önállóan is stabil, feltekeredett állapotban képesek létezni, így a fehérjefolding egységeinek is tekintik

őket. Többnyire merev testként, dinamikai egységként viselkednek a fehérjemozgások során. Egy doméntípus több különböző fehérjében is megtalálható. Az evolúció a különféle doméntípusokat kombinálva, különböző szerkezetű és funkciójú fehérjéket alkotott, emiatt evolúciós egységként is említik őket. Méretük limitált, többnyire 25-500 aminosavból állnak. Például az E-szelektin doménje mindössze 36 aminosavból épül fel, de a lipoxigenáz-1 óriási C-doménje egyenesen 692 aminosavat számlál (62). Míg a kisebb domének stabilitását általában valamilyen fémion vagy diszulfid kötés biztosítja, addig a nagyobb domének esetében a hidrofób mag felelős a kohézióért (63). A fehérjék állhatnak egy vagy több doménből. Például a jelen munkában vizsgált hPGK egy jellegzetes, két, kb. azonos méretű doménből álló fehérje (64). Az izom passzív rugalmasságáért felelős óriási titinmolekula viszont 244 doménből épül fel (65). A doméneket összekötő régiókat interdomén régióknak nevezzük. Flexibilis szerkezeti elemeik révén az interdomén régiók elősegíthetik, szabályozhatják a domének relatív mozgását, így rendkívül fontos szerepet töltenek be a több doménből álló fehérjék működésben (66).

A doménmozgások típusai. A doménmozgások során a fehérjelánc csak egy igen kis szegmense, az interdomén régió és néhány oldallánc szenved nagy konformáció változást (67). A domének - néhány kisebb lokális fluktuációtól eltekintve – merev testként viselkednek. Az interdomén régió néhány torziós szögének nagyobb megváltozása is elegendő a nagy léptékű doménmozgásokhoz. Például a piruvát foszfát dikináz enzim foszfoinozítid doménje a működés során kb. 100 fokot fordul egyetlen aminosav körül (68).

Gerstein és mtsai a relatív doménmozgásokat két fő típusba sorolják: csukló- és nyíró mozgások (69) (6. ábra). Az osztályozás alapja a mozgássík és a két domén érintkező felületének síkja által bezárt szög.

Ha ez a szög 90° , csuklómozgásról (hinge bending) beszélünk, ilyenkor a domének egymáshoz képest jellegzetes összehajló-szétnyíló mozgást végeznek. A mozgás során a katalízis szempontjából fontos funkciós csoportok, szubsztrátok kerülhetnek kedvező orientációba. Csukló jellegű doménmozgást végez például az adenilát kináz ill. lizin/arginin/ornitin kötő fehérje (LAO) (69).



6. ábra A doménmozgások két fő típusa: a nyíró- és csuklómozgás (69). A doméneket félkörök és téglalapok, az interdomén régiókat vonalak jelölik.

Ha a mozgássík és az érintkező felület síkja párhuzamos egymással, azaz a domének mintegy „csúsznak” egymáson, nyíró mozgásról beszélünk. Nyíró doménmozgás azokban az esetekben jön létre, amikor a doménfelületek között igen erős kölcsönhatások uralkodnak, így a mozgás nagy kényszereknek van kitéve. Többnyire kompakt és réteges felépítésű fehérjék esetében jellemző, pl. alkohol dehidrogenáz, Trp represszor (69).

Az interdomén régióban található azon aminosavakat, melyek körül a doménrotációk megvalósulnak, ún. csuklópontoknak (hinge point) nevezzük. Az elnevezés megtévesztő, ugyanis csuklópontja nem csak csukló jellegű, hanem bármilyen más típusú, doménrotációt megvalósító kollektív mozgásformának lehet (pl. nyíró jellegű doménmozgás (70)).

A valóságban a doménmozgások a két fő típus kombinációjaként állnak elő, amint azt jelen munkámban a hPGK doménmozgásaira is bizonyítani fogom. Egyik vagy másik típus dominanciája alapján lehet a mozgásokat osztályozni. Előfordulnak olyan mozgásformák is, melyek nem sorolhatók be egyértelműen ezen két típus egyikébe sem, mint például a hPGK csavarodó jellegű doménmozgása (lásd 5.1. fejezet) vagy az immunoglobulinok dinamikája (69).

A doménmozgások jelentősége. A több doméból álló fehérjék szubsztrátkötő helyei sokszor különböző doméneken helyezkednek el (59). Ahhoz, hogy a szubsztrátok reaktív csoportjai megfelelően orientálódjanak és megtörténhessen a katalitikus reakció, a doméneknek közeledni, záródni kell. A doménzáródással bizonyos katalitikusan fontos, de a nyitott konformációban távoli aminosav oldalláncok kerülhetnek sztérikus közelségbe. Ezzel a katalízis szempontjából kedvező mikro környezet alakul ki a szubsztrátok körül. A doménzáródás egy másik fontos következménye, hogy kizárja a vizet az aktív centrumból, megakadályozva ezzel a szubsztrátok esetleges hidrolízisét (69). A domének távolodásával, nyílásával a reakció termékei végül szabadon távozhatnak. A doménmozgás jelentősége tehát abban áll, hogy a katalitikusan fontos oldalláncok valamint a szubsztrátok megfelelő pozicionálásával, koordinálja a katalízist és végső soron megteremti annak feltételeit.

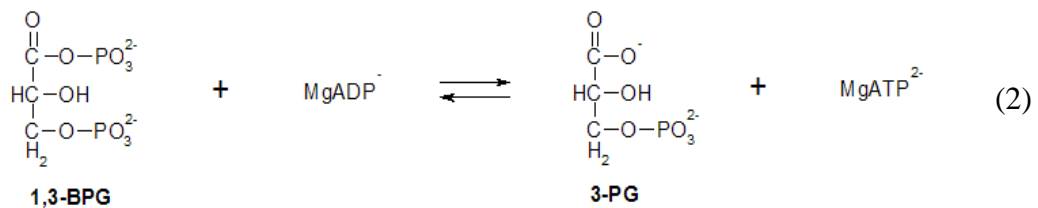
2.4. A lokális mozgások és jelentőségük

Az egyre növekvő mennyiségű kísérleti és szimulációs eredmény fényében mind nyilvánvalóbbá válik, hogy a kollektív mozgások mellett a lokális mozgások is alapvető biológiai jelentőséggel bírnak a fehérjeműködésben.

Már a mioglobint több mint negyven évvel ezelőtt meghatározott röntgenkristallográfias szerkezete is azt sugallta, hogy a lokális mozgásoknak fontos szerepe van a funkcióban (28). A mioglobint kristályszerkezetén nem volt látható olyan csatorna, amelyen az oxigénmolekula be- és kijuthatna a fehérjéből. Tehát lokális mozgásokra van szükség ahhoz, hogy az oxigén be tudjon jutni a kötőzsebbe. Később röntgenkristallográfias és elasztikus inkoherens neutronszerzés kísérletek bizonyították, hogy a fehérje merev, aktív centruma körül lokalizált, flexibilis régiók vannak, melyek csatornaként funkcionálhatnak az oxigénkötődés során (71-73). Több doménből álló fehérjék esetében pedig bebizonyosodott, hogy a csuklórégiók a többi szerkezeti elemhez képest igen nagy atomi fluktuációkat mutatnak már a piko- és nanoszekundumos időskálán is (60). Valószínűsíthető, hogy a fehérje gyorsan fluktuáló, nagy lokális flexibilitást mutató szerkezeti elemei tehető felelőssé a nagy amplitúdójú, kollektív szerkezeti átrendeződéssel járó konformációváltozásokért (pl. doménzáródás). Azaz a gyors, lokális és a nagyarányú, koordinált mozgások között összefüggés van.

2.5. A humán 3-foszfoglicerát kináz (hPGK)

A PGK szerepe nélkülözhetetlen a legtöbb élő szervezetben. Aerob élőlényekben a glikolízis egyik lépéseként a foszfát csoport reverzibilis átadását katalizálja az 1,3-biszfoszfoglicerát (1,3-BPG) és magnézium-adenozin-difoszfát (MgADP) között (56). A reakció során 3-foszfoglicerát (3-PG) és magnézium-adenozin-trifoszfát (MgATP) keletkezik:



Aerob szervezetekben a reakció egyensúlya az ATP-keletkezés irányába tolódik el. Anaerob szervezetek esetében a fermentációban, míg növényeknél a fotoszintézis sötét szakaszában van nélkülözhetetlen szerepe a PGK-nak.

Az utóbbi egy évtizedben fény derült a hPGK egy igen fontos tulajdonságára, miszerint D- és L- nukleozid-analógok széles spektrumát képes foszforilálni (74,75). Az L-nukleozid-analógok a természetben előforduló D-nukleozid-analógok tükörképi párjai, tehát enantiomerek. A hPGK ezen tulajdonsága azért figyelemre méltó, mert mind a D- mind az L-nukleozid-analógok rák- és vírusellenes gyógyszerek egy fontos csoportját alkotják (76,77). Az analógokat nukleozid formában kell bevinni az élő szervezetbe, hogy a sejtmembránon át tudjanak jutni. Ahhoz, hogy farmakológiailag aktív gyógyszer hatóanyag váljon belőlük, nukleozid-trifoszfáttá kell őket foszforilálni. A foszforilációt a szervezet kináz enzimei végzik, több lépésben. A foszforiláció utolsó lépését a hPGK katalizálja, ennek során a nukleozid-difoszfátból nukleozid-trifoszfát keletkezik. A hPGK tehát rendkívül fontos szereppel bír ezen gyógyszer-molekulák aktiválásában. Fontos megjegyezni, hogy a foszforilációs kaszkád utolsó lépése a folyamat sebesség limitáló része, ugyanis sok esetben kimutatták a farmakológiailag hatástalan mono-, vagy difoszfátok sejten belüli felhalmozódását (78). Sok esetben nagy dóziszokat (több száz mg) kell beadni a betegnek egy-egy nukleozid analógból (pl.: Cidofovir (79), Valorticitabine (80), Pentacept (81) stb.), hogy terápiásan elegendő dóziszú aktív

gyógyszer válják belőle a szervezetben. Ennek oka, hogy a hPGK bizonyos nukleozid analógokat kevésbé hatékonyan foszforilál. Ahhoz, hogy növeljük a foszforilációs hatékonyságot, és minél könnyebben aktiválható gyógyszerjelölteket tervezhessünk, fontos, hogy atomi szinten tisztában legyünk a hPGK működésével. Doktori munkám során a hPGK természetes szubsztrátja (D-ADP) mellett én is vizsgáltam bizonyos analóg vegyületek (L-ADP valamint D-/L-CDP (citidin-difoszfát)) fehérjedinamikára gyakorolt hatását. Összehasonlítva a természetes és analóg szubsztrátok hatásait, a hatékony foszforiláció érdekes és fontos dinamikai körülményeit sikerült megállapítani. Az utóbbi években az L-nukleozid-analógok szerepe mind hangsúlyosabbá kezdett válni a terápiás alkalmazások terén. Ugyanis összehasonlítva a két enantiomert, az L-nukleozid-analógok kevésbé toxikusak természetes tükörképi párjukhoz képest. Ennek oka, hogy a gazdasejt polimeráz enzimejei nem ismerik fel szubsztrátként az L-analógokat, így ezek nem befolyásolják a polimeráz működését. Viszont az L-analógok jó szubsztrátnak bizonyultak a vírus reverz transzkriptáza számára, így az beépíti az analógot a DNS-be, ami eltérő szerkezeténél fogva meggátolja a lánc továbbépülését (76).

Néhány eredményes terápiás alkalmazásra is találhatunk már példát. HIV és Hepatitis B elleni terápiában alkalmazott L-nukleozid-analóg gyógyszer például a lamivudin (82) és az emtricitabin (83). Egy leukémia elleni analóg, a troxacitabin hatékonyságának vizsgálata pedig jelenleg a klinikai kipróbálás második fázisában van (84).

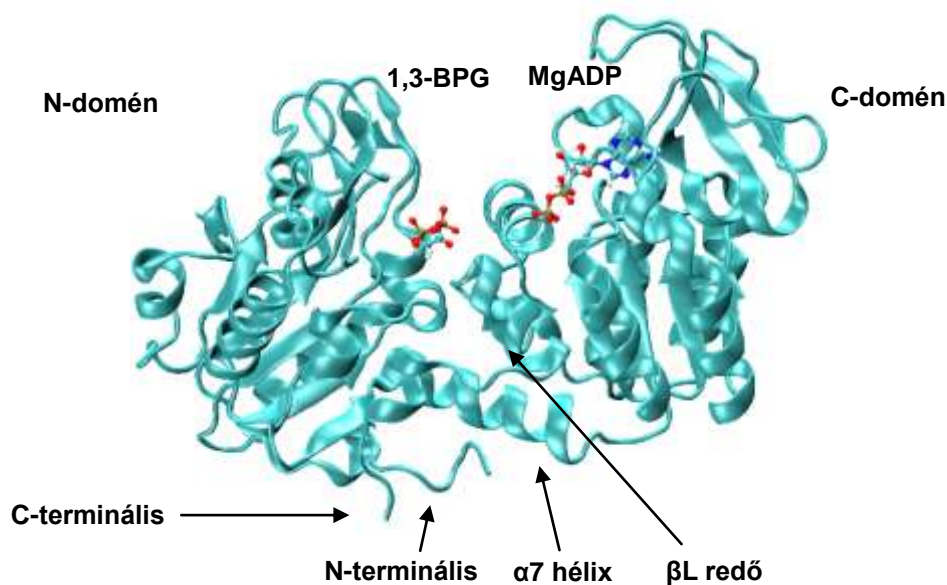
A rák- és vírusellenes terápiákat tekintve, ma már bizonyítottnak látszik a hPGK szerepe a nukleozid-analógok foszforilálásában. A hPGK viszont más eredmények kapcsán is az érdeklődés homlokterébe került. Hogg és mtsai arra a következtetésre jutottak, hogy a hPGK tumorok angiogenezisének gátlásában is szerepet játszhat (85). A hPGK a plazmint redukálva angiosztatint hoz létre, mely a tumorok angiogenezisét, azaz érképződését gátolja. Feltételezték, hogy a hPGK aktív centrumában található két reaktív ciszteinil oldallánc felelős a redukációs aktivitásért. Lay és mtsai azonban azt tapasztalták, hogy a plazmin redukciója független a Cys oldalláncok jelenlététől. Ezt a Cys oldalláncok Ala-ra történő mutálásával bizonyították (86). Tudományosan elfogadott magyarázat azonban mindmáig nincs a folyamatra.

Mindemellett a hPGK hatással van a DNS szintézisre, javítási mechanizmusokra (87,88) és szerepet játszik bizonyos kationok (Na^+ és Ca^{2+}) transzportjában (89,90).

Valószínűsíthető, hogy más glikolitikus enzimekkel együtt kapcsolatban áll a szarkoplazmatikus retikulummal, és ATP-t szolgáltat a Ca^{2+} -pumpa működéséhez. Kulcsfontosságú szerepet tölt be a hemolitikus anémia kialakulásában is (91). A betegség a vörösvérsejtek károsodásával, súlyos esetben azok kipukkadásával jár. A betegség az X kromoszómán bekövetkező mutációhoz köthető, melynek következtében a hPGK funkcionális károsodást szenved. Így az nem szintetizál elegendő ATP-t a K^+/Na^+ -pumpa működéséhez. Ez végső soron a sejtmembrán két oldala közötti Na^+ - és K^+ - gradiens megszűnéséhez vezethet.

2.5.1. A PGK röntgen-kristallográfiás szerkezete

1979-ben Banks és mtsai - lóizomból nyert szubsztrátmentes PGK-t vizsgálva – elsőként határozták meg az enzim aminosavszekvenciáját és röntgen-kristallográfiás térszerkezetét (7. ábra, (64)). Azóta több különböző forrásból származó PGK térszerkezete is ismertté vált. Az 1. táblázat foglalja össze a PDB adatbázisban jelenleg elérhető összes PGK szerkezetet.



7. ábra A hPGK molekula szerkezete. Az α hélixeket spirálok, a β redőket nyilak, míg a természetes szubsztrátokat (MgADP és 1,3-BPG) CPK gömbök jelölik.

1. táblázat A PGK ismert röntgen-krisztallográfiás szerkezetei.

Komplex típusa	Szubsztrát	Szerkezet	Felbontás (Å)	PDB kód	Hivatkozás	Forrás
Apo	-	nyitott	2,5	2PGK	(64)	Lóizom
	-	nyitott	2,5	3PGK	(92)	Élesztő
	-	nyitott	1,8	2IE8	(93)	<i>Thermus caldophilus</i>
Biner	Mg*D-ADP	nyitott	1,65	1PHP	(94)	<i>Bacillus stearotherm.</i>
	Mg*D-ATP	nyitott	2,1	1VJC	(95)	Sertésizom
	D-ATP	nyitott	1,9	1VJD	(95)	Sertésizom
	3-PG	nyitott	2,0	-*	(96)	Sertésizom
	D-ADP	nyitott	2,0	2ZGV	(97)	Humán
	3-PG	nyitott	1,85	3C39	(97)	Humán
	3-PG	nyitott	1,74	2XE6	(98)	Humán
Terner	3-PG*Mg*D-AMP-PNP	zárt	2,0	1VPE	(99)	<i>Thermotoga maritima</i>
	3-PG*Mg*D-ADP	zárt	2,5	13PK	(100)	<i>Trypanosoma brucei</i>
	3-PG*Mg*D-AMP	nyitott	1,8	1HDI	(101)	Sertésizom
	D-CDP*PO ₄	nyitott	1,8	3C3B	(97)	Humán
	3-PG*D-ADP	nyitott	2,2	2XE7	(98)	Humán
	3PG*Mg*L-ADP	nyitott	2,3	3C3A	(97)	Humán
	3PG*Mg*L-CDP	nyitott	2,4	3C3C	(97)	Humán
	3PG*Mg*D-ADP	zárt	1,74	2X13	(102)	Humán
	3PG*Mg*D-ADP*Cl*F ₃ MG	zárt	1,47	2WZB	(103)	Humán
	3PG*Mg*D-ADP*Cl*AlF ₄	zárt	1,5	2WZC	(103)	Humán
	3PG*Mg*D-ADP*ATP*1,3-BPG	zárt	2,1	2X15	(102)	Humán
	3PG*Mg*L-ADP*Cl*AlF ₄	zárt	2,9	2Y3I	(104)	Humán

* Harlos és mtsai által meghatározott, de a PDB adatbázisba fel nem töltött kristályszerkezet (96).

A kristályszerkezetek alapján elmondható, hogy a PGK két hasonló nagyságú doménből felépülő, 44,5 kDa molekulatömegű monomer enzim. A nukleotidok (ADP/ATP) a C-terminális doménon (C-domén) (aminosavszám: 188 – 395, lásd 2. táblázat), a 3-PG és az 1,3-BPG pedig az N-terminális doménon (N-domén) (aminosavszám: 1 – 187, 396 – 416, lásd 2. táblázat) kötődnek (94,96). (Az N-domén szekvenciálisan két aminosavszámú tartományból áll, ugyanis a C-terminális visszahajlik az N-doménhez.) A korai szerkezetmeghatározások során az enzim minden esetben egyértelműen nyitott konformációban kristályosodott, azaz a domének között széles árok mutatkozott. A kötőhelyek azonosítása után nyilvánvalóvá vált, hogy ezen szerkezetekben a kötött szubsztrátok túlságosan távol (12-15 Å) vannak egymástól ahhoz, hogy a katalitikus reakció végbe mehessen. Ennek alapján Banks és mtsai (64) arra következtettek, hogy a katalízis során a két domén egymáshoz képest relatív, összehajló-szétnyíló, merev test szerű mozgást, ún. csuklómozgást végez. Az összehajló mozgás során, feltételezték, a két domén olyan közel kerül egymáshoz (zárt konformáció), hogy direkt foszfortranszfer jöhet létre a szubsztrátok között. Tehát az enzimnek zárt konformációt kell felvenni a katalízishez. Ez az ún. „hinge-bending” hipotézis. A zárt konformációjú kristályszerkezetet először csak 1997-ben határozták meg, egy egysejtű élőlényből, a *Trypanosoma brucei*-ből (100). Vizsgálataim kezdetéig azonban ugyanazon forrásból származó nyitott és zárt konformációjú enzim nem állt rendelkezésre, tehát továbbra sem volt direkt kísérleti bizonyítéka a hinge-bending hipotézisnek. Ezért volt különösen izgalmas kérdés szimulációs-elméleti módszerekkel megközelíteni a problémát. Végül, 2011-ben Bowler és mtsai (98,103) meghatározták a humán enzim nyitott és zárt konformációjú kristályszerkezetét, és ezzel igazolták a hinge-bending hipotézis létjogosultságát. A teljesen zárt konformációban a szubsztrátok donor és akceptor atomjai 3.9–4.3 Å távolságra, azaz elegendően közel kerülnek egymáshoz, hogy a foszfortranszfer bekövetkezhessen. Ez a záródás a domének mintegy 33 fokos rotációját jelenti a nyitott szerkezethez képest. Fontos megjegyezni, hogy a két konformációs végállapot ismerete nem elegendő a funkcionális doménmozgások atomi szinten történő jellemzésére, megértésére. További vizsgálatok szükségesek mind kísérleti, mind szimulációs téren, hogy még teljesebb képet alkothassunk a PGK dinamikájáról és hatékonyan foszforilálható gyógyszereket tervezhessünk.

A hPGK másodlagos szerkezeti elemeinek jelölése a 2. táblázatban látható.

2. táblázat A hPGK másodlagos szerkezeti elemei. Az α hélixeket szám, a β redőket betű jelzi.

Aminosavsorszám	Szerkezeti elem jelölése	
17-22	A	
36-40	1a	
41-52	1b	
56-61	B	
77-89	2	
91-96	C	
101-109	3	N-domén
114-119	D	
124-128	α extra	
129-134	M	
136-141	N	
144-155	4	
158-163	E	
165-169	5	
173-178	6	
182-187	F	
189-202	7	
207-212	G	
218-228	8	
231-236	H	
239-249	9	
261-264	10a	
266-275	10b	
277-282	L	
283-289	O	C-domén
296-301	P	
310-315	Q	
317-330	11	
332-336	J	
348-365	12	
367-371	K	
373-380	13	
388-392	L	
396-404	14	N-domén
408-414	15	

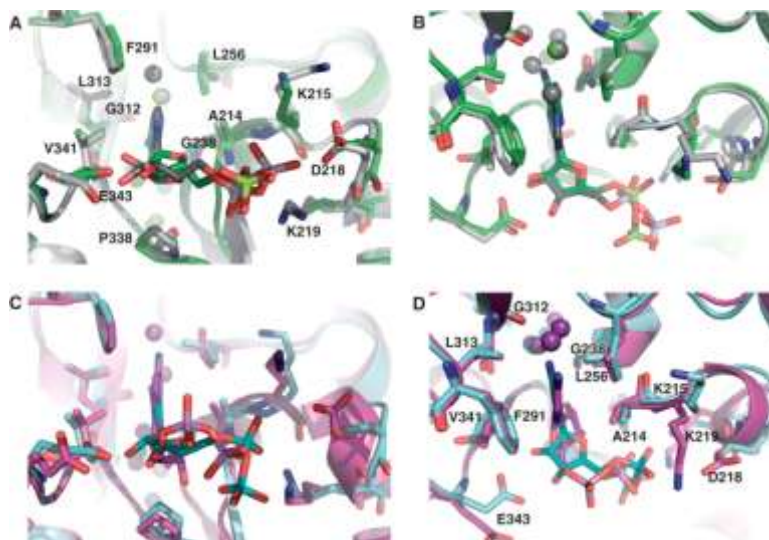
2.5.1.1. A humán enzim szubsztrátkötőhelyeinek szerkezete

Az enzim röntgen-krisztallográfiás szerkezetei alapján részletes képet kaphatunk a szubsztrát-fehérje kölcsönhatásokról és a kötőhelyek szerkezetéről. A különböző forrásokból származó kristályszerkezetek alapján megállapítható, hogy a kötőhelyeket nagy mértékben konzervatív aminosavak alkotják. A kötőhelyek szerkezete és a szubsztrátok kötődési módja nagyon hasonló a különböző fajok esetében. A szubsztrátkötő aminosavak listáját a 3. táblázatban közlöm. Doktori munkám során a humán apo enzim mellett a D-ADP*1,3-BPG*Mg*hPGK (továbbiakban D-ADP komplex), az L-ADP*1,3-BPG*Mg*hPGK (továbbiakban L-ADP komplex), a D-CDP*1,3-BPG*Mg*hPGK (továbbiakban D-CDP komplex) és az L-CDP*1,3-BPG*Mg*hPGK (továbbiakban L-CDP komplex) komplexek dinamikáját vizsgáltam.

3. táblázat A szubsztrátkötőhelyek aminosavai.

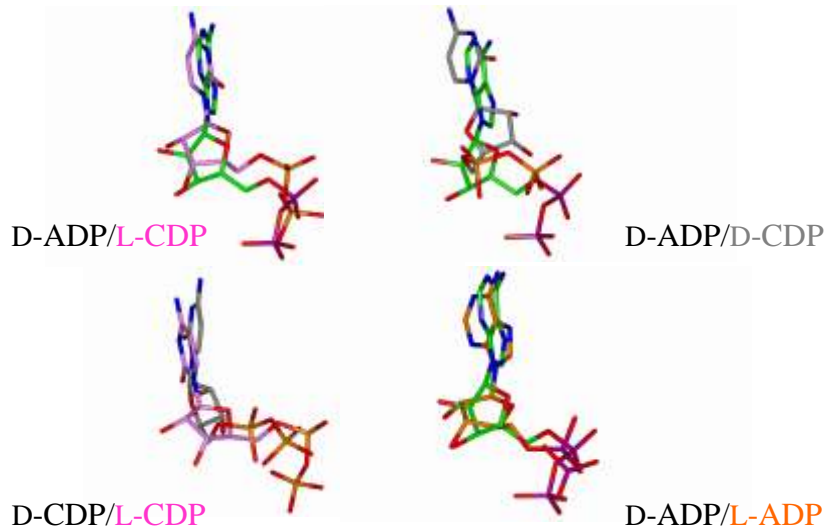
1,3-BPG	Nukleotid
Asp23	Ala214
Asn25	Lys215
Arg38	Lys219
His62	Gly238
Arg65	Leu256
Arg122	Phe291
Arg170	Gly312
	Leu313
	Asn336
	Pro338
	Val341
	Glu343
	Asp374
	Thr375

A D- és L-ADP kötőhely szerkezete. A humán enzimben - csakúgy mint más fajoknál - a kötött D-ADP adenin gyűrűje egy konzervatív aminosavakból álló hidrofób zsebbe beágyazva található a C-doménon (8. ábra) (97). A hidrofób kötőzsebet a következő aminosavak alkotják: Ala214, Gly238, Leu256, Phe291, Gly312 és Leu313. Az adenin gyűrű NH₂ csoportja H-híd kötést létesít a Gly312 peptid O-jével. A ribóz gyűrű helyzetét egyrészt a Pro338 aminosavval képezett hidrofób kölcsönhatások, másrészt a Glu343 aminosavval alkotott két H-híd kötés stabilizálja. A foszfátcsoportok a C-domén felszínén helyezkednek el, a foszfátlánc vége az N-doménon található 1,3-BPG kötőhely irányába mutat. Míg az α -foszfát a Lys219 és a Lys215 oldallánccal, addig a β -foszfát az Asn336 oldallánccal áll vonzó jellegű elektrosztatikus kölcsönhatásban. Ezen felül a β -foszfát H-híd kötést is létesít a Thr375 oldallánccal, miközben az Asp218 taszító elektrosztatikus kölcsönhatást fejt ki rá. Utóbbi kölcsönhatásnak köszönhető, hogy a foszfátlánc vége kifelé mutat a C-doménből, az 1,3-BPG kötőhely irányába. A Mg-ion az ADP α - és β -foszfátjának egy-egy O-atomjával valamint az Asp374 oldallánc karboxil csoportjával alakít ki ionos kötést. A különböző forrásokból származó nyitott és zárt konformációjú kristályszerkezetek összehasonlítása során feltűnt a Lys215 oldallánc nagy mértékű fluktuációja. Ez alapján Flachner és mtsai az oldallánc foszfo-transzferben betöltött fontos szerepére következtetett (105). Mutációs és enzimkinetikai mérésekkel igazolták hipotézisüket. A Lys215 Ala-ra történő mutálásával drasztikusan csökkent az enzimaktivitás, ami az oldallánc katalízisben betöltött kiemelkedő szerepét bizonyítja. Továbbá bizonyították, hogy a Lys215 a foszfo-transzfer során átadódó foszfát csoporttal közvetlen kölcsönhatásban áll. Feltételezik, hogy a Lys215 oldallánc együtt mozog az átadó foszfát csoporttal, azaz részt vesz a foszfát csoport kémiai átvitelében és a katalízis szempontjából azt kedvezően orientálja.



8. ábra A nukleotid kötőhely szerkezete (97). **(A, B)** Az ADP kötőhely két egymáshoz képest 90°-kal elforgatott nézete. A D-ADP és kötőhelye szénatomjai zöld színnel, míg az L-ADP és kötőhelye szénatomjai szürke színnel vannak ábrázolva. A többi atom a CPK színezési séma szerint van jelölve. **(C, D)** A CDP kötőhely két egymáshoz képest 90°-kal elforgatott nézete. A D-CDP és kötőhelye szénatomjai rózsaszínnel, míg az L-CDP és kötőhelye szénatomjai kék színnel vannak ábrázolva. A többi atom a CPK színezési séma szerint van jelölve. A vízmolekulákat gömbök illusztrálják mind a négy ábrán.

Az L-ADP – mely a természetben előforduló D-ADP tükörképi párja – kötődési módja nagyon hasonló a D-ADP-hez. L-ADP esetén ugyanazon hidrofób kölcsönhatások alakulnak ki a bázis és a ribóz gyűrű körül, mint az D-ADP esetében megfigyelhető (97). Továbbá a ribóz gyűrű két H-híd kötése a Glu343 oldallánccal szintén létrejön. Ez úgy lehetséges, hogy míg a D-ADP-ben az adenin *anti* konformációt vesz fel a ribóz gyűrűhöz képest, addig az L-ADP-ben a bázis *szin* konformációjú (9. ábra). A foszfátlánc flexibilitása következtében pedig az L-ADP α -foszfát azonos pozíciót képes felvenni, mint D-ADP-ben. Az L-ADP β -foszfátja a Mg-ionon keresztül az Asp218 oldallánccal alakít ki kapcsolatot, ami kissé eltérő orientációt jelent a D-ADP esetéhez képest. Összességében elmondható, hogy a kötőhely és az ADP flexibilitása miatt az enantiomerek kötődési módja nagyarányú azonosságot mutat.

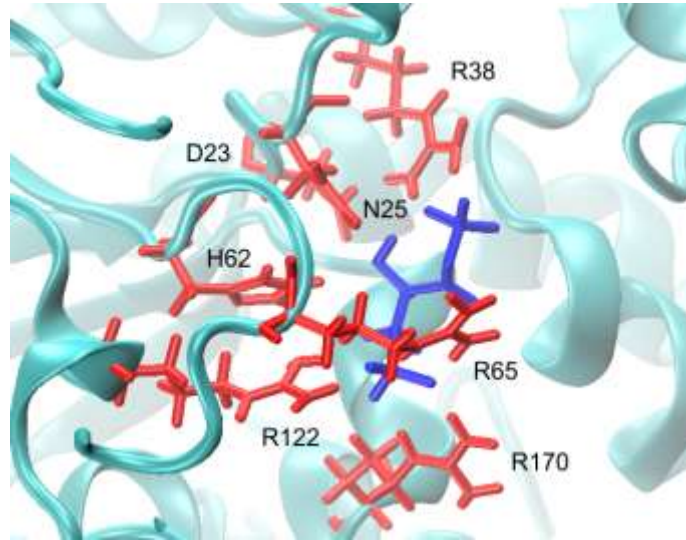


9. ábra A hPGK-hoz kötődő nukleotidok páronkénti összehasonlítása (97).

A **D- és L-CDP kötőhely szerkezete.** Jelen munkában a purin bázisú nukleotidok mellett egy pirimidin nukleotid, a citidin-difoszfát (CDP) két enantiomerjének fehérjedynamikára gyakorolt hatását is vizsgáltam. Mint azt fentebb említettem, a hPGK széleskörű specificitással rendelkezik a nukleotid szubsztrátok tekintetében. Az enzim képes foszforilálni D- és L-pirimidin bázisú nukleotidokat, így a D- és L-CDP-t is, bár katalitikus hatékonysága ezen vegyületekre nézve jóval kisebb (lásd 2.5.2. fejezet) (106). Az enzimen kötött D-CDP bázis része szintén a C-domén hidrofób zsebébe beágyazva helyezkedik el, a D-/L-ADP bázisához igen hasonló helyzetben (8. ábra) (97). A citozin azonban körülbelül 2.5 Å-mel távolabb helyezkedik el a C-domén központi β -redőitől, mint az adenin. Ennek következtében a ribóz gyűrű 2 Å-mel beljebb található a hidrofób zsebben. Ez azt vonja maga után, hogy D-CDP esetében nem létesül H-híd kötés a Glu343 aminosav és a ribóz két hidroxil csoportja között. Gondeau és mtsai ezen H-híd kötések megszűnését teszik felelőssé a D-CDP esetén tapasztalt alacsony katalitikus hatékonyságért (97). A H-hidak eltűnésével ugyanis megszűnik egy jelentős koordináló erő, mely a foszfátláncot a katalitikus reakció szempontjából kedvezően orientálja. A hidrofób zsebbe történő mélyebb beékelődés további következménye, hogy a D-CDP β -foszfátja hasonló pozícióban helyezkedik el, mint a D-/L-ADP α -foszfátja. Ez azt jelenti, hogy a D-CDP β -foszfátja mintegy 3 Å-mel távolabb van az 1,3-BPG katalízisben átadódó 1-es foszfátjától, mint a D-/L-ADP β -foszfátja.

Az L-CDP elhelyezkedése a kötőzsebben szintén nagyon hasonló a fentebb említett nukleotidokéhoz. Mivel nem ékelődik be annyira mélyen a hidrofób zsebbe, mint D-enantiomer párja, az L-CDP ribóz gyűrű és a Glu343 oldallánc között is létrejön a D-/L-ADP esetén leírt két H-híd kötés, bár a kötéstávolságok hosszabbak. Gondeau és mtsai ezzel magyarázzák, hogy az L-CDP hatékonyabb szubsztrátnak bizonyult az enzimkinetikai mérések során, mint a D-CDP.

Az 1,3-BPG kötőhely szerkezete. Az 1,3-BPG kötődési módját hagyományos röntgen-krisztallográfias módszerekkel nem lehet vizsgálni, ugyanis az 1,3-BPG erősen bomlékony vegyület (az 1-es foszfátja vizes oldatban gyorsan hidrolizál, felezési ideje 10 °C-on, pH=7,5-n kb. 6 óra). A kötődés módját modellezéssel, ún. molekuláris dokkolás módszerével határozták meg, melyhez a 3-PG-vel alkotott komplex kristályszerkezetét vették alapul (105). Szimulációink kivitelezéséhez mi is ezt a módszert alkalmaztuk a 1,3-BPG kötőhelyének meghatározására (lásd 4.1. fejezet). Az 1,3-BPG az enzim N-doménjén kötődik. A szubsztrát negatívan töltött foszfátcsoportjait pozitívan töltött oldalláncok (Arg38, Arg65, Arg122, Arg170) elektrosztatikus kölcsönhatásai koordinálják (10. ábra). Míg a 3-foszfát csoport észterkötés O-ja a His62-vel létesít kontaktust, addig a 2-hidroxil csoport az Asp23 és Asn25 oldalláncokkal formál H-híd kötetést. Mutációs és enzimkinetikai mérések szerint az Arg38 oldalláncnak nem csak a 1,3-BPG kötésében, hanem a foszfotranszferben is alapvető szerepe van. Az Arg38 Ala-ra történő mutációja ugyanis az enzimaktivitás elvesztését okozta. Ezt a szerepet röntgen-krisztallográfias adatok is megerősítették. Szabó és mtsai később azt is megmutatták, hogy az Arg38 oldallánc a doménzáródás indukálásában is meghatározó szerepet játszik (107).



10. ábra Az 1,3-BPG kötőhely szerkezete. Az 1,3-BPG-t kék, a kötő aminosavakat piros pálcika reprezentáció szemlélteti.

2.5.1.2. A csuklópontok meghatározására tett kísérletek

Mikor a PGK funkciós csuklómozgásának első – bár még indirekt – bizonyítékai napvilágot láttak, megkezdődtek a vizsgálatok a mozgás karakterizálására. A karakterizálás első és legfontosabb lépése, hogy meghatározzuk a doménmozgás csuklópontjait, vagyis azon pontokat, melyek körül a doménrotációk megvalósulnak. Ezek többnyire egy-egy aminosavat jelentenek.

A csuklópontok meghatározásának egy lehetséges, bár elég hozzávetőleges módja a zárt és nyitott konformációjú kristályszerkezetek összehasonlításán alapszik. Szilagyi és mtsai két nyitott (PGK*3-PG*MgADP és PGK*3-PG*MgAMP-PNP, forrás: sertés) és két zárt (PGK*3-PG*MgAMP-PNP és PGK*3-PG*MgADP, forrás: *Thermotoga maritima* és *Trypanosoma brucei*) terner komplex szerkezetét hasonlították össze (101). Felváltva egyik ill. másik domén belső β -redőinek peptidgerince alapján szuperponálták a szerkezeteket. Ezzel vizualizálni tudták a relatív domén elmozdulásokat. A doméneket összekötő $\alpha 7$ hélix N- és C-terminálisa igen nagy konformációs különbséget mutatott a nyitott és zárt szerkezetekben. Így arra következtettek, hogy ezen régiók csuklóként funkcionálnak a doménmozgás során. Jelentős konformációváltozást szenved a szintén interdomén régióban elhelyezkedő βL redő is. Szilagyi és mtsai azt feltételezték, hogy ezen másodlagos szerkezeti elem meghatározó szerepet játszik a két domén

koordinációjában a doménzáródás során. Mivel a β L redő több konzervatív aminosavat tartalmaz, mint az α 7 hélix terminálisai, arra következtettek, hogy a β L szerkezeti elem a fő csukló régió. Bernstein és mtsai hasonló módon, különböző forrásokból származó nyitott és zárt szerkezetek összehasonlításával szintén az α 7 hélix N- és C-terminálisát javasolta csuklókként (108). Ezen munkák kapcsán fontos megjegyezni, hogy mivel az összehasonlítás alapjául szolgáló kristályszerkezetek különböző forrásokból származtak, a szekvenciális különbségek zavarják a csuklók pontos meghatározását. Ezen zavaró tényező kiiktatása csak úgy lehetséges, hogy azonos forrásból származó szerkezeteket hasonlítunk össze. Erre viszont csak 2011-ben kerülhetett elsőként sor, amikor a humán enzim nyitott és zárt kristályszerkezete is rendelkezésre állt. A 2XE6 és 2WZB PDB kóddal rendelkező humán szerkezetek (lásd 1. táblázat) feltöltésre kerültek a DynDom adatbázisába (109) (csuklópont meghatározásra alkalmas web szerver), és a program alkalmazásával összehasonlították a két konformációt. A program a következő aminosavszerű régiókat ítélte csuklóknak: Tyr195-Leu200 (α 7 hélix C-terminális), Leu211-Asp228 (α 8 hélix), Ser392-Gly394 (β L-redő). Ezen eredmények jó egyezést mutatnak a korábbi munkákkal, alátámasztják az α 7 hélix C-terminális és a β L redő csukló-szerepét (7. ábra). Figyelemre méltó az α 8 hélix pozíció változása is a doménzáródás során, ami szintén összhangban van korábbi munkákkal. Szilágyi és mtsai szerint ugyanis az α 8 hélix, mely ugyan strukturálisan része a C-doménnek, attól függetlenül mozog a nukleotiddal való közvetlen kölcsönhatása révén (101). A doménzáródás során az α 8 hélix az α 14 hélix irányában mozdul el és ezzel a két domén közötti csatorna zárul.

Az egyes kristályszerkezetek molekuláris grafikai összehasonlítása azonban nem teljesen megbízható módszer csuklópont meghatározásra. A csuklópontok - ha léteznek - működésük közben, az interdomén régió dinamikai tulajdonságainak folyamatos monitorozásával határozhatók meg. Az ilyen jellegű vizsgálatokhoz a fehérje bizonyos konformációkba „fagyott” kristályszerkezeteinek ismerete nem elegendő. Mindehhez hozzájárul az a tény, hogy a kristályban működő rácserők sok esetben a fehérje nem természetes konformációit stabilizálják. A kristályos enzim vizsgálatából nyert információk így félrevezetőek lehetnek. A belső molekuláris mozgások atomi szinten történő feltérképezése - ami elengedhetetlen a csuklópontok azonosításához - viszont az enzim oldatában elvégezhető mérésekkel nem lehetséges. Hatékony megoldását

jelentheti a problémának MD szimuláció alkalmazása, amely atomi szinten enged betekintést a csukló régió mozgásaiba.

2.5.2. Az oldott PGK tulajdonságai

Ahhoz, hogy biológiailag releváns információkat nyerhessünk egy enzim működéséről, fontos, hogy fiziológiai körülményeit közelítve, oldott állapotában vizsgáljuk. Oldott PGK-val már az első kristályszerkezet meghatározások idején végeztek kisszögű röntgenszórás (SAXS) méréseket (110). Azt tapasztalták, ha az apo enzimhez két természetes szubsztrátját (3-PG, ATP) hozzáadják, akkor a molekula kompaktabb szerkezetet vesz fel, girációs sugara körülbelül 1 Å-mel lecsökken. Ezen eredmények is hozzájárultak a hinge-bending hipotézis felállításához, ugyanis a girációs sugár csökkenés jól magyarázható a doménzáródás jelenségével. SAXS mérésekkel azt is bizonyították, hogy a doménzáródás csak akkor következik be, ha mindkét szubsztrát kötődik az enzimhez. Ugyanis azokban az esetekben, ahol csak egyik vagy másik szubsztrátot adták az enzimhez, nem tapasztaltak nagy girációs sugár csökkenést a szubsztrátmentes enzimhez képest. A feltételezett doménzáródás és az enzimfunkció közötti szoros kapcsolatra szintén SAXS kísérletek szolgáltattak igen meggyőző bizonyítékot. Sinev és mtsai (111) aktív és kémiai módosított inaktív sertésizom PGK szubsztrátkötődés hatására történő girációs sugárváltozását vizsgálta oldatban. Míg az aktív enzim esetén 1 Å girációs sugárcsökkenést tapasztaltak, addig az inaktív, módosított enzim esetében nem okozott girációs sugárcsökkenést a szubsztrátkötődés. Ezzel bebizonyosodott, hogy az enzimaktivitás nagy mértékű konformációváltozással, feltételezhetően csuklómozgással jár.

A szubsztrátok kötődési erősségének jellemzése. A 4. táblázat a hPGK két természetes szubsztrátjának (D-ADP és 1,3-BPG) valamint az L-ADP enantiomer-szubsztrát disszociációs állandóit mutatja be (K_d), melyeket fluoreszcencia spektroszkópiával mértek (107,112). Látható, hogy az 1,3-BPG disszociációs állandója több nagyságrenddel kisebb a többi értékhez képest, ami ezen szubsztrát rendkívül szoros kötődését mutatja.

4. táblázat A szubsztrátok disszociációs állandói szabad enzim valamint hPGK*3-PG komplex esetén.

Szubsztrát	K_d (mM)	
	hPGK	hPGK*3-PG
Mg*D-ADP	$0,013 \pm 0,002$ (112)	$0,060 \pm 0,003$ (112)
Mg*L-ADP	$0,021 \pm 0,002$ (112)	$0,034 \pm 0,003$ (112)
1,3-BPG	$(5,6 \pm 2,4) \times 10^{-5}$ (107)	-

Figyelemre méltó jelenség, hogy a D-ADP kötődése gyengül, ha az enzimen a 3-PG már kötve van (4. táblázat 3. oszlop). A jelenséget, melyet *szubsztrát antagonizmusnak* neveznek, először Vas és mtsai írták le PGK-ra (113). Két magyarázat született eddig a jelenségre. Az egyik szerint a 3-PG közvetett módon – domének közötti kommunikáció által - gyengíti a Mg-ion és a D-ADP kölcsönhatását (114). Ugyanis Mg-mentes esetben nem tapasztalták a jelenséget. Tehát a 3-PG csökkenti a Mg-ion D-ADP-fehéreje kötési erősítő hatását. A másik magyarázat a szubsztrátok negatívan töltött foszfátcsoportjai közötti elektrosztatikus taszítást teszi felelőssé a szubsztrát antagonizmusért (107). Érdekes módon a jelenség nem vagy igen kis mértékben jelentkezik PGK*3-PG*Mg*L-ADP esetén, amire szimulációink alapján sikerült egy lehetséges magyarázatot adnunk (lásd 6.2. fejezet). A szubsztrát antagonizmus jelensége egyébként nem csak PGK esetén jelentkezik, tapasztalták már például a foszfofrukto-1-kináznál (115) vagy RNS/DNS polimerázoknál is (116).

A hPGK által katalizált reakció enzimkinetikai jellemzése. Cleland-féle osztályozás szerint a hPGK által katalizált reakció mechanizmusa szerint szekvenciális (117). Ez annyit jelent, hogy mindkét szubsztrátnak kötődnie kell az enzimen mielőtt bármelyik termék felszabadulna. A szubsztrátok gyors egyensúlyt elérő és random módon kötődnek. Tehát a szubsztrátok kötődés gyorsabb, mint az enzimreakció és nem meghatározott sorrendben kötődnek (118). Kinetikai vizsgálatokkal azt is bizonyították, hogy a foszfo-transzfer inverzióval megy végbe, asszociatív jellegű, vagyis nincs kovalens foszfo-enzim intermedier, hanem a foszfo-csoport közvetlenül adódik át egyik

szubsztrátról a másikra (119). A reverz irányú reakció (defoszforiláció) során a termékek közül az ADP távozik először, ugyanis az 1,3-BPG kötődése annyira szoros, hogy disszociációja a reakció sebesség meghatározó lépése (120,121).

A hPGK széleskörű nukleotid specificitása. A hPGK igen széleskörű specificitással rendelkezik a nukleotid szubsztrátok irányában, azaz igen sokféle nukleotidot, nukleotid-analógot képes hatékonyan foszforilálni. A rendelkezésünkre álló mind több adat fényében egyre nyilvánvalóbb, hogy az enzim enantioszelektivitása is alacsony, azaz sztereoizomeriától függetlenül képes mind D-, mind pedig L-szimmetriájú nukleotidokat foszforilálni.

Az 5. táblázat az általam is vizsgált nukleotidok (D-/L-ADP, D-/L-CDP) katalitikus állandóit (k_{cat}), Michaelis-állandóit (K_M), katalitikus hatékonyságát (k_{cat}/K_M) és disszociációs állandóit (K_d) mutatja be. Az adatokat Varga és mtsai az oldott enzim spektrofotometriai méréseivel határozták meg (106).

5. táblázat A hPGK katalitikus és kötődési tulajdonságai az általunk vizsgált négy nukleotidra nézve. A mérési hiba minden adat esetében $\pm 5-10\%$ (106).

Szubsztrát	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (mM)
D-ADP	1085	0,12	$9,0 \times 10^6$	0,024
L-ADP	685	0,27	$2,5 \times 10^6$	0,071
D-CDP	2,8	16,8	167	3,500
L-CDP	58	2,1	$2,8 \times 10^4$	1,740

A mért adatok alapján általánosan elmondható, hogy az enzim mind a négy nukleotidra aktív, azaz képes őket foszforilálni. Már e négy eset is jól szemlélteti a hPGK széleskörű specificitását: purin (ADP) és pirimidin (CDP) bázisú, D és L kiralitású nukleotidokat is képes foszforilálni. Igaz, katalitikus hatékonysága az egyes nukleotidokra nézve változó. Az enzim katalitikus hatékonysága ADP-re jóval nagyobb, mint CDP-re. Természetes szubsztrátját, a D-ADP-t foszforilálja a leghatékonyabban és leggyorsabban (k_{cat}), kötődése is ennek a szubsztrátnak a legszorosabb. Tükörképi párja,

az L-ADP esetén az enzim nagyon hasonló hatékonyságot mutat és a kötődés erőssége is azonos nagyságrendű. Érdekes módon a pirimidin bázisú CDP esetén a nem természetes L-enantiomerre sokkal hatékonyabb a hPGK, mint a természetes D-CDP-re. A legkisebb foszforilációs hatékonyságot D-CDP-re mutatja, ezzel együtt a D-CDP kötődik a leglazábban.

Ahhoz, hogy a hPGK által hatékonyan foszforilálható gyógyszereket tervezhessünk, fontos lenne tudni, hogy milyen szerkezeti-dinamikai okai lehetnek az enzim széleskörű foszforilációs képességének. Milyen szerkezeti-dinamikai tényezők befolyásolják a különböző kötés erősségeket és a katalitikus hatékonyságokat? Doktori munkám során ezen kérdésekre is kerestem a választ (lásd 3. fejezet).

Varga és mtsai az oldott enzimen végzett kinetikai mérésekkel és dokkolásos molekulamodellezéssel szintén molekuláris szinten keresett kapcsolatot a mért katalitikus hatékonyság és a szubsztrátok kötődési módja között (106). A humán enzim zárt katalitikus konformációjú kristályszerkezetébe dokkolással helyezték be a fenti négy nukleotidot. Eredményeik alapján azt feltételezik, hogy a nukleotidok hasonló kötődési módja felelős az enzim széleskörű nukleotid specificitásáért. Valószínűsíthető, hogy a különböző nukleotidok esetén mért eltérő katalitikus hatékonyságért pedig a nukleotidgyűrűk hidrofób kölcsönhatásai közötti különbségek a felelősek. Ezek a kölcsönhatások feltételezhetően nagyban hozzájárulnak a foszfátlánc katalitikusan kedvező orientálásához. Például D-CDP esetén ezen hidrofób kölcsönhatások számának és erősségének jelentős csökkenését tapasztalták. Mutációs kísérletekkel azt is bizonyították, hogy a hidrofób kölcsönhatások mellett a Lys219, Asn336, Glu343 oldalláncoknak szintén fontos szerepe lehet a foszfátlánc megfelelő pozícionálásában, így a katalitikus hatékonyság befolyásolásában is.

2.5.3. A PGK vizsgálata számítógépes szimulációval

Doktori munkám kezdetéig már születtek számítógépes szimulációs munkák a PGK témakörében. Szimulációval főként az enzim konformációs dinamikáját vizsgálták. Guilbert és mtsainak ún. PEDC (Path Exploration with Distance Constraints) MD szimulációs technikával - mindössze 30 óranyi gépidő alatt – sikerült a nyitott szerkezetű élesztő PGK-ból a zárt konformációjú állapotot meghatározni (122). A

szimuláció a doménzáródás egy lehetséges konformációs útvonalát tárta fel. A módszer hátránya, hogy referencia szerkezethez (pl. kiindulási kristályszerkezet) viszonyított mesterséges távolságkényszerek bevezetésével dolgozik. Szintén Guilbert és mtsai Normal Mode Analysis (NMA) módszert alkalmazva az élesztő PGK kollektív mozgásait elemezte (123). Megállapították, hogy a legalacsonyabb frekvenciájú módusok a domének csukló, nyíró és bizonyos, propellerszerű csavarodását írják le. CG MD szimulációval (lásd 2.1.4. fejezet) is vizsgálták már a PGK dinamikáját, ennek során a fehérje két doménjét merev klaszterként vették figyelembe (124). Csak a doméneket összekötő interdomén régióknak engedtek meg bizonyos mértékű flexibilitást. A két szubsztrát kötődésével a zárt szerkezet stabilabbnak mutatkozott a nyitott szerkezethez képest. Rövid szimulációs idő alatt - nyitott konformációból kiindulva – doménzáródás vette kezdetét a szubsztrátok jelenlétében. Kutatócsoportunk is vizsgálta már korábban MD szimulációval az apo élesztő PGK konformációs dinamikáját (125). Ennek során sikerült kimutatni, hogy a domének már nanoszekundumos időskálán is mutatnak csukló jellegű merev test szerű mozgást és a domének közötti kölcsönhatás jelentős befolyással van az intradomén (doménen belüli) mozgásokra.

3.

Célkitűzések

A kérdések, melyekre doktori munkám során kerestem a választ a következő két fő téma köré csoportosíthatók:

1. **Az apo és a D-ADP komplex dinamikájának jellemzése, azaz a szubsztrátkötődés hatása a dinamikára:** Milyen módon befolyásolja a hPGK dinamikáját a természetes szubsztrátok kötődése? Nanoszekundumos időskálán mutat-e szignifikánsan eltérő dinamikai viselkedést a komplex az apo enzimhez képest? Ha igen, kapcsolatba hozható-e ez az eltérő dinamikai viselkedés az enzim ismert funkciójával?
2. **A D-ADP-, L-ADP-, D-CDP- és az L-CDP komplexek dinamikájának összehasonlító elemzése, azaz a szubsztrátkiralitás hatása a dinamikára:** Hogyan magyarázható a hPGK alacsony enantioszelektivitása és széleskörű nukleotid specifitása? Milyen szerkezeti-dinamikai okokra vezethető vissza az eltérő kiralitású és bázisú nukleotidok kötődésének affinitásbeli különbsége?

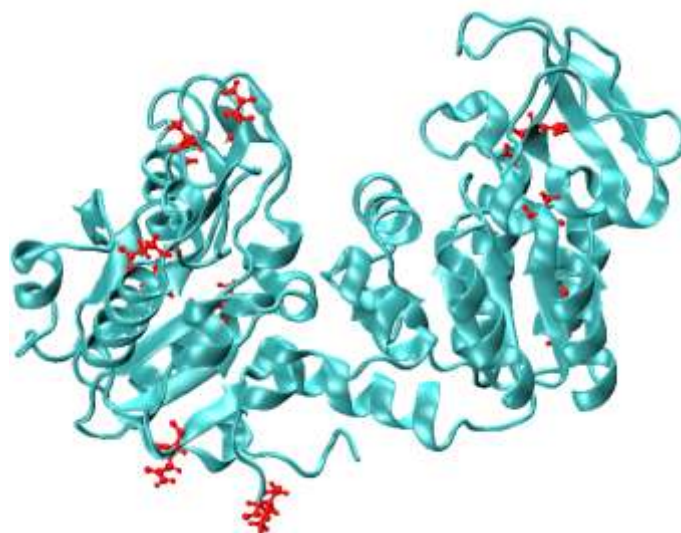
4.

Módszerek

4.1. A szimuláció kiindulási szerkezeteinek meghatározása

Az enzim első humán eredetű, nyitott konformációjú röntgen-kristallográfiás szerkezeteit (D-ADP*hPGK (PDB kód: 2ZGV), L-ADP*Mg*3-PG*hPGK (PDB kód: 3C3A), D-CDP*hPGK (PDB kód: 3C3B) és L-CDP*Mg*3-PG*hPGK (PDB kód: 3C3C) komplexek) éppen vizsgálataim kezdetén, 2008-ban határozták meg Gondeau és mtsai (97). A szerkezetekből hiányzik az α 13 hélix, ami a nukleotid kötőhely közelében van, így vizsgálataink szempontjából lényeges lenne helyzetének, kontaktusainak pontos ismerete. Ezen oknál fogva nem a fenti szerkezeteket használtuk kiindulási szerkezetként az apo enzim valamint a D-/L-ADP-t és D-/L-CDP-t tartalmazó komplexek MD szimulációihoz. A hiányos humán szerkezetek helyett olyan más forrásból származó, szerkezetileg teljes PGK kristályszerkezetet kerestünk, mely nagy szekvenciális egyezést mutat a hPGK-val. Így esett választásunk a sertésizom PGK Mg-iont és D-ATP-t tartalmazó, nyitott konformációjú biner komplexére (PDB-kód: 1VJC (95)), melynek aminosav szekvenciája 97%-os egyezést mutat a hPGK-val és kötőhelyeit teljes mértékben konzervatív aminosavak alkotják (6. táblázat, 11. ábra). Ebből a szerkezetből együttműködő partnerünk, Laurent Chaloin (CPBS, Université Montpellier) egyszerű homológia modellezéssel – a Modeler 8v2 programcsomagot (126) alkalmazva – megkonstruálta a hPGK szerkezeti modelljét. A modelltől hiányzó H-atomokat a CHARMM programcsomag (26) HBUILD rutinjával (127) hoztam létre. A His oldalláncok megfelelő protonáltságát a környező kölcsönhatások alapján határoztam meg. Validálásként, modellszerkezetünket a fenti, hiányos humán kristályszerkezettel (2ZGV) hasonlítottuk össze (a hiányzó aminosavakat nem vettük figyelembe az összehasonlítás során). A modell és a létező fehérjeszerkezet fehérjeatomjai között 1,23 Å RMSD különbséget kaptunk (az RMSD definícióját illetően lásd a 4.3. fejezetet). Ez azt jelenti, hogy a modellszerkezet nagyon hasonló a létező kristályszerkezethez. A később (2011-ben) meghatározott teljes nyitott humán kristályszerkezettel (2XE7) is összehasonlítottuk modellszerkezetünket, a

peptidgerincek között 0,91 Å, míg a nem-hidrogén fehérjeatomok között pedig 1,21 Å RMSD különbséget tapasztaltunk. Ez szintén alátámasztja modellszerkezetünk érvényességét.



11. ábra A sertés és humán PGK eltérő aminosavai. Az eltérő aminosavak atomjait piros CPK gömbök jelölik.

6. táblázat Az eltérő aminosavak listája a sertés és humán PGK-ban.

Aminosavsorszám	Sertés	Ember
43	Izoleucin	Valin
69	Izoleucin	Valin
88	Prolin	Leucin
109	Aszparaginsav	Aszparagin
137	Szerin	Aszparagin
142	Aszparaginsav	Glutaminsav
182	Lizin	Glutamin
262	Szerin	Alanin
324	Szerin	Alanin
328	Alanin	Treonin
349	Glutamin	Arginin
416	Valin	Izoleucin

A D-ATP-t eltávolítva, a különböző nukleotidokat pedig dokkolással modellezve a szerkezetbe, származtattuk a D-ADP*Mg*hPGK, L-ADP*Mg*hPGK, D-CDP*Mg*hPGK és L-CDP*Mg*hPGK biner komplexeket. A dokkolást szintén Laurent Chaloin, montpellier-i együttműködő partnerünk végezte a GOLD 3.2 (128) (Genetic Optimization for Ligand Docking, CCDC software limited) program segítségével, mely ún. genetikus algoritmust (GA) használ a lehetséges ligandum és oldallánc orientációk, azaz a dokkolási pózok feltérképezéséhez. A procedúra során a szubsztrátok teljes mértékű, míg a fehérje esetében csak az oldalláncok flexibilitása volt megengedett. 50 független GA futást végeztünk minden nukleotid esetében. Minden GA futás során 100.000 genetikus műveletet hajtottunk végre, alapértelmezett operátor súlyokkal. A populáció mérete 100 kromoszóma volt. A dokkolás célatomjaként a Pro338 N-atomját választottuk, ennek 15 Å sugarú környezetével definiáltuk a kötőhelyet. A dokkolási pózok osztályozásához a GOLD Chemscore kiértékelő függvényét (scoring function) alkalmaztuk. Mindegyik nukleotid esetén a legjobb konformációjú dokkolási pózt tartottuk meg, majd rövid energia-minimalizációs protokollnak vetettük alá őket, hogy tovább optimalizáljuk a szubsztrát-kötőhely orientációt. A dokkolási eredmények validálásához, modellszerkezeteinket létező sertés és humán PGK kristályszerkezetekkel hasonlítottuk össze (1HDI, 1VJD és a fenti humán szerkezetek). Mivel a kötőhelyeknél 100 %-os a sertés és humán PGK szekvenciális egyezése, a sertésizom PGK kristályszerkezetek is használhatók a validálásához. Csak a nukleotid kötőhelyeket figyelembe véve, a modell és a létező szerkezetek között számolt RMSD értékek minden esetben 1 Å-nél kisebbnek adódtak.

A D-/L-ADP*Mg*hPGK és D-/L-CDP*Mg*hPGK biner komplexekbe dokkolással modelleztük az 1,3-BPG szubsztrátot, ezzel megkaptuk a teljes D-/L-ADP*Mg*1,3-BPG*hPGK (röviden D-/L-ADP komplex) és D-/L-CDP*Mg*1,3-BPG*hPGK (röviden D-/L-CDP komplex) terner komplex modellszerkezeteket. A dokkolási protokoll azonos volt a nukleotidok esetében ismertetettel, azzal a különbséggel, hogy az 1,3-BPG kötőhelyet az Asp23 oldallánc C_γ-atomjának 15 Å sugarú környezetével definiáltuk. Az optimális orientáció érdekében további távolság kényszerrel róttunk ki az 1,3-BPG hidroxil O-atomja és az Asn25 C_γ-atomja között. A legjobb dokkolási pózt megtartottuk és energia-minimalizáltuk. A dokkolás eredményének validálásához az 1HDI PDB kódú sertésizom PGK kristályszerkezet 3-PG kötőhelyét használtuk referenciaként. A

dokkolással kapott kötőhelyet a referenciával összehasonlítva, az RMSD távolság a két szerkezet között mindössze 0,1 Å-nek adódott. További ellenőrzésként a modellezésből kapott 1,3-BPG kötőhelyünket összehasonlítottuk a fentebb említett hiányos humán kristályszerkezet (3C39 3-PG*hPGK biner komplex) 3-PG kötőhelyével is. Az RMSD 0,27 Å volt a két szerkezet között, ami szintén jó szerkezeti egyezést mutat.

Az apo hPGK szerkezetét egyszerűen a fent tárgyalt D-ADP*Mg*hPGK biner modellszerkezet Mg-ionjának és D-ADP-jének törlésével származtattuk. Ez azért tehető meg, mert valószínűsíthető, hogy az ADP jelenléte vagy hiánya nem okoz drasztikus perturbációt a fehérje szerkezetében: például az ATP-t tartalmazó 1VJC és 1VJD sertésizom biner komplexek és az apo sertésizom PGK (nem közölt) kristályszerkezete között mindössze 0,55 Å RMSD különbség van (95).

4.2. MD szimuláció

A generált modellszerkezeteken, azaz az apo hPGK-n és négy terner komplexén (D-ADP-, L-ADP-, D-CDP- és L-CDP komplex) MD szimulációt hajtottunk végre. A szimulációk futtatásához az NAMD programcsomagot (129), és annak all-atom típusú CHARMM 22-es erőterét (130) használtuk. A szimulációkat egy SGI Altix 350 típusú szerver nyolc darab processzorán futtattuk. A szimulációk előkészítését és a trajektóriák analizését a CHARMM programcsomaggal (26) végeztük. A MD futásokhoz az NAMD programot használtuk, mivel parallel környezetben az NAMD hatékonyabb, mint a CHARMM.

MD szimuláció előtt az egyes modellszerkezetek potenciális energiáját minimalizáltuk, hogy eltávolítsuk az esetlegesen jelen lévő, energetikailag kedvezőtlen kölcsönhatásokat, amik például a fiziológiailag nem természetes rácserőkből adódhatnak. A következő minimalizálási protokollt követtük mind az öt rendszer esetében. 1500 lépés steepest descent módszerrel (131) kezdtük az energia-minimalizációt. Ennek során a H-atomok kivételével minden atomra harmonikus kényszereket róttunk ki. Ezzel megakadályoztuk, hogy a nehéz atomok túl nagy amplitúdójú mozgásokat végezzenek. Így az energia-minimalizáció stabilabb, kisebb a valószínűsége a nagy fluktuációknak az energiában. Az alkalmazott harmonikus kényszer potenciális energiája:

$$E_c = \sum_{\substack{\text{nehéz} \\ \text{atomok}}} K (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i0})^2, \quad (3)$$

ahol a H-atomok kivételével az összes atomra történik az összegzés, K az erőállandó, \mathbf{r}_i az i -edik atom helyvektora, \mathbf{r}_{i0} az i -edik atom referencia helyvektora. A referencia helyvektorokat mindig a kényszerek kirovása pillanatában érvényes konfiguráció adta. A minimalizálás során fokozatosan csökkentettük a kényszererők nagyságát. A steepest descent első 500 lépésében $10 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$, a következő 500 lépésben $1 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$, míg az utolsó 500 lépésben $0,1 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$ volt a K értéke. $0,1 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$ értéken tartva az erőállandót, 200 lépés conjugate gradient módszerrel (131) folytattuk a minimalizálást. Majd a kényszereket megszüntettük, és 100 lépés steepest descent módszerrel tovább minimalizáltuk a rendszerek potenciális energiáját. Ezt 200 lépés conjugate gradient követte. Majd 1000 lépés adopted-basis Newton-Raphson módszerrel (131) fejeztük be a minimalizációs protokollt.

Ezt követően minden rendszert $99 \text{ \AA} \times 74 \text{ \AA} \times 63 \text{ \AA}$ térfogatú vízdobozba helyeztünk. Ezzel definiáltuk a szimuláció elemi celláját. A vízdoboz felépítéséhez explicit vízmolekulákat, azaz a CHARMM TIP3 vízmodelljét (26) használtuk. Az így kapott elemi cellára periodikus határfeltételeket róttunk ki, azaz a vízdoboz szemközti oldalait azonosítottuk egymással. Tehát ha a szimuláció során egy vízmolekula kilépett a vízdoboz egyik oldalán, akkor ezzel egy időben ugyanez a vízmolekula megjelent a szemben lévő oldalon. A periodikus határfeltételek segítségével megakadályozhatjuk, hogy a fehérje környezetéből eldiffundáljon a víz. Egyszerű eltolási transzformációk bevezetésével az elemi cellából ortorombos kristályrácsot konstruáltunk. Ezzel nagy mennyiségű víz környezet válik modellezhetővé a fehérje körül. Úgy választottuk meg a vízdoboz méreteit, hogy az a fehérje felületétől számítva x , y és z irányban 12 \AA vastagságú legyen. Ekkora vízdoboz vastagsággal elkerülhetők a szomszédos elemi cellák közti fehérje-fehérje nemkötő kölcsönhatások (pl. van der Waals), ugyanis ezen kölcsönhatások hatótávolságát (cut-off távolság) 12 \AA -nek választottuk. Véletlenszerű pozíciókba Na-ionokat vagy Cl-ionokat (rendszeről függően) helyeztünk a vízdobozba, hogy annak elektromos össztöltése zérus legyen. Az ilyen módon szolvatált rendszereket ismét energia-minimalizációnak vetettük alá, hogy az esetleges nagy

energiájú fehérje-víz kölcsönhatásokat eltávolítsuk. Az energia-minimalizációt a fentebb tárgyalt vákuumbeli minimalizációval azonos módon végeztük.

A Particle Mesh Ewald (PME) (132,133) módszert használtuk az elektrosztatikus energiák számolására. A PME rácsállandót 1 Å-nek, az interpoláció rendjét 6-nak választottuk. A valós térbeli szummáció cut-off értékét 12 Å-nek, ennek megfelelően a PME Gauss függvény szélességét 0,34 Å⁻¹-nek állítottuk be. A dielektromos állandó értékét 1-nek vettük. A van der Waals kölcsönhatásokat ún. switching függvénnyel moduláltuk. Lényegében ez annyit jelent, hogy definiáltunk két cut-off értéket, egy belső és külső cut-offot. Ezen két érték között egy szigmoid függvény által, a távolság növekedésével fokozatosan zérusra redukáltuk a van der Waals energiát. Ezzel mintegy kikapcsoljuk a kölcsönhatást, innen a függvény elnevezése. Esetünkben a belső cut-off 10 Å, míg a külső cut-off értéke 12 Å volt.

A szolvatált rendszerek energia-minimalizálása után kezdetét vette maga a MD szimuláció. A MD szimuláció során a klasszikus mozgásegyenletek integrálása 1 femtoszekundumos időlépésekben történt. Az energia-minimalizált szerkezeteket (apo és a négy turner komplex) először 300 K hőmérsékletre, a szimulációs hőmérsékletre fűtöttük fel. Az eljárást a kezdeti sebességek kiosztásával kezdtük. A *Maxwell-Boltzmann eloszlás* alapján a rendszerek minden egyes atomjához véletlenszerűen sebességértékeket rendeltünk:

$$p(v_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T} \right), \quad (4)$$

ahol $p(v_{ix})$ annak a valószínűsége, hogy az m_i tömegű i -edik atomnak az x irányú sebessége v_{ix} , T hőmérsékleten. A sebességek kiosztása után hagytuk a rendszerek atomjait a mozgásegyenletek szerint mozogni. A kezdő hőmérséklet 10 K volt. 1000 lépésenként újraosztottuk a sebességeket az atomok között úgy, hogy minden újraosztásnál a hőmérséklet 10 K-nel nőjön, így 30000 lépés (30 pikoszekundum) után elértük a kívánt 300 K-t.

Miután felfűtöttük a rendszereket 300 K hőmérsékletre, ekvilibrációval folytattuk a szimulációt. Az ekvilibráció során az a cél, hogy a rendszert termodinamikai

egyensúlyba hozzuk. Több termodinamikai mennyiség (pl.: energia, hőmérséklet, nyomás és térfogat) és az aktuális konformáció együttes vizsgálatával ellenőriztük, hogy mikor kerül egyensúlyba a rendszer. Elsőként kanonikus sokaságként kezelve a rendszereket, azaz a térfogatot és a hőmérsékletet állandó értéken tartva (N =áll., V =áll., T =áll.), hagytuk a rendszereinket a mozgás egyenletek szerint mozogni. A kanonikus ekvilibráció 50 pikoszekundumon (50000 időlépés) keresztül zajlott. Majd 500 pikoszekundum (500000 időlépés) NpT ekvilibrációval folytattuk (N =áll., p =áll., T =áll.) a szimulációt, azaz a Nosé-Hoover algoritmust (134,135) használva izobár-izoterm körülmények között vizsgáltuk a rendszert 300 K hőmérsékleten és 1 atm nyomáson.

Az ekvilibráció után kezdetét vette a konformációs adatgyűjtés-mintavételezés, az ún. production run. 20 nanoszekundum izobár-izoterm ($p=1$ atm, $T=300$ K) MD szimulációt hajtottunk végre mind az öt rendszeren (apo és négy turner komplex). Az atomi koordinátákat 1 pikoszekundumonként mentettük, így mind az öt rendszerre megkaptuk az atomi mozgások trajektóriáit (hely-idő függvény).

4.3. A szimuláció kiértékeléséhez használt mennyiségek

RMSD (Root Mean Square Distance). Két azonos atomszámú (N) szerkezet (a és b szerkezet) egymáshoz viszonyított átlagos különbségét méri az RMSD, melyet az alábbi egyenlettel definiálunk:

$$\text{RMSD} = \left\langle \left(\mathbf{r}_i^a - \mathbf{r}_i^b \right)^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i \left(\mathbf{r}_i^a - \mathbf{r}_i^b \right)^2}, \quad (5)$$

ahol $\mathbf{r}_i^a, \mathbf{r}_i^b$ az a ill. b szerkezethez tartozó i -edik atom helyvektora. Gyakran van szükség két szerkezet összehasonlításánál arra, hogy megállapítsuk a köztük lévő minimális RMSD-t. (Például ugyanazon fehérje különböző konformációi.) Ilyenkor az egyik szerkezetet (pl.: a -t) úgy transzformáljuk (transzláció, rotáció) térben, hogy a másikkal leginkább „átfedjen”, azaz a köztük lévő RMSD minimális legyen, ezt hívjuk *szuperpozíciónak*.

RMSF (Root Mean Square Fluctuation). Az i -edik atom RMSF értéke T ideig tartó szimulációra:

$$\text{RMSF}_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (\mathbf{r}_i(t_j) - \bar{\mathbf{r}}_i)^2}, \quad (6)$$

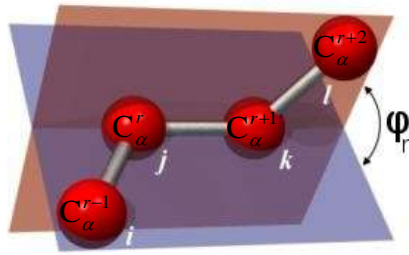
ahol $\mathbf{r}_i(t_j)$ az i -edik atom t_j időpontban vett helyvektora, $\bar{\mathbf{r}}_i$ az i -edik atom T időre átlagolt helyvektora. Mint az a definiáló egyenlethől látszik, egy adott atom RMSF értéke az illető atom mozgékonyaságáról ad számot. A trajektóriák kiértékelése során az aminosavak mozgékonyaságát C_α -atomjuk RMSF értékével becsültük.

Atomi mozgások korrelációja. Atomi elmozdulások (i és j atom) kereszt-korrelációs mátrixa egy adott T időtartamra:

$$C_{ij} = \frac{\langle (\mathbf{r}_i - \bar{\mathbf{r}}_i)(\mathbf{r}_j - \bar{\mathbf{r}}_j) \rangle}{\sqrt{\langle (\mathbf{r}_i - \bar{\mathbf{r}}_i)^2 \rangle \langle (\mathbf{r}_j - \bar{\mathbf{r}}_j)^2 \rangle}}, \quad (7)$$

ahol $\bar{\mathbf{r}}_i$ és $\bar{\mathbf{r}}_j$ az i -edik és j -edik atom T időre átlagolt helyvektora. $\langle \rangle$ szintén az időátlagot jelöli. C_{ij} -1 és +1 közötti értékeket vehet fel. A +1-es érték az i és j atomok azonos irányú elmozdulásának felel meg, a -1-es érték viszont a két atom ellenkező irányú elmozdulásaként értelmezhető. Amennyiben C_{ij} zérus, i és j atomok mozgása korrelálatlan és/vagy elmozdulásuk merőleges egymásra. Tehát, ha C_{ij} abszolút értéke kisebb, mint 1, akkor az i és j atomok elmozdulása kevésbé korrelált és/vagy a két atom mozgásiránya nem esik egy tengelybe, azaz szöget zárnak be (136).

Torziós kötőszögváltozások. A 12. ábra szerint torziós szögeket definiáltunk a peptidgerinc egymást követő C_α -atomjai között. A fehérje interdomén régiójában a torziós szögek MD szimuláció során bekövetkező változásait vizsgáltuk. Ezt a módszert csuklópont meghatározásra használtuk.



12. ábra Az r -edik aminosav C_α^r -atomjához tartozó φ_r torziós szög.

A trajektória minden egyes szerkezetére számoltunk torziós szögeket, melyeket a szimuláció első szerkezetének torziós szögeihez, mint referenciához viszonyítottunk és képeztük különbségüket:

$$\Delta\varphi_r(t_n) = \varphi_r(t_n) - \varphi_r(t_0), \quad r = 2, 3, \dots, 414 \quad (8)$$

ahol r az aminosav sorszám, $\Delta\varphi_r(t_n)$ az r -edik C_α -atomhoz (C_α^r) tartozó torziós szögváltozás a t_n -edik szimulációs időpillanatban, $\varphi_r(t_n)$ a C_α^r -atomhoz tartozó torziós szög a t_n -edik szimulációs időpillanatban, $\varphi_r(t_0)$ a C_α^r -atomhoz tartozó torziós szög a szimuláció első szerkezetében. Az r aminosav sorszám csak 2 és 414 közötti értékeket vehet fel, hiszen a peptidgerinc első és két utolsó C_α -atomjához nem rendelhető torziós szög. (A hPGK 416 aminosavból áll.) A torziós szögváltozásokat szintábrán ábrázoltuk idő és aminosavsorszám függvényében. A doménrotációk megvalósulásához nagy amplitúdójú torziós szögváltozások szükségesek a csuklópontok körül. A torziós szögváltozások meghatározásával tehát lehetőség nyílik csuklópontok azonosítására.

4.4. Csuklópontok azonosítása DynDom (Dynamical Domains) programmal

A DynDom (70) programot szintén csuklópontok azonosítására használtuk az apo enzim és a természetes D-ADP komplex esetében. A program által alkalmazott módszert Hayward és mtsai multidomén fehérjék doménmozgásainak karakterizálására fejlesztették ki. Az eljárás során a program beolvassa ugyanazon rendszer két eltérő konformációját. A két konformáció szuperponálásával meghatározza a főláncot felépítő,

rövid - néhány aminosavnyi - szegmensek elmozdulásvektorait, melyek a konformációkat egymásba viszik. Mivel minden elmozdulás leírható egy rotációs tengely körüli rotáció és egy, a rotációs tengely mentén történő transláció összegeként, a főláncszegmensek elmozdulásaihoz tartozó rotációs vektorok kiszámíthatók. A program az egyes rotációs vektorokat pontokkal reprezentálja egy ún. rotációs térben. Ideális esetben egy domén tökéletes merev testként viselkedik. Ilyenkor az azonos doménhez tartozó főláncszegmensek azonos rotációs vektorral rendelkeznek, azaz ugyanazon rotációs ponttal jellemezhetőek a rotációs térben. Ez a pont egyben a teljes domén rotációját is reprezentálja. Ha egy fehérje n darab ideális doménből állna, akkor ez n darab rotációs pontot jelentene a rotációs térben. A valóságban a doméneken belüli (intradomén) mozgások miatt az egyes doméneket nem egy-egy pont, hanem pontok klasztere reprezentálja. A program a K -közép klaszterelemzési algoritmus (137) és bizonyos kritériumok alkalmazásával az egyes klaszterekhez doméneket rendel. Tehát a módszer az egyes doméneket eltérő rotációs tulajdonságaik alapján képes megkülönböztetni és azonosítani.

A módszer csuklóponthoz aminosavak azonosítására is alkalmas. Tekintsünk az egyszerűség kedvéért egy két doménből (A- és B-domén) álló fehérjét és annak két eltérő konformációját (pl. nyitott és zárt). Ha a két szerkezetet szuperponáljuk úgy, hogy csak az egyik domén (pl. A-domén) atomjait vesszük figyelembe az illesztés során, akkor megkapjuk a másik domén (B-domén) relatív elmozdulását az elsőhöz képest. Ekkor a B-domén rotációs tengelyét a korábban tárgyalt módon meg lehet határozni. Adott aminosavszám hosszúságú ablakot definiálva és azt végigcsúsztatva a főláncon, az így kapott főláncszegmensek rotációs vektorai is kiszámíthatók. A módszer ezen vektoroknak a B-domén rotációs tengelyére vett projekcióit határozza meg, majd az ablakok közepén elhelyezkedő aminosavakhoz a megfelelő főláncszegmensek rotációs vektorainak projekcióit rendeli. Ezzel minden egyes aminosav kap egy értéket, mely az interdomén mozgás során betöltött rotációs szerepét jellemzi. Ezen projekciós értékek átlaga az A-doménben nulla körül van, hiszen az A-domén fixálva lett a szuperpozíció által. Ezzel szemben a B-doménben a projekciók átlaga körülbelül a B-domén rotációs szögével egyezik meg. Így az interdomén régióban, ahol a csuklóponthoz aminosavak vannak, átmenetnek kell lennie a projekciós értékekben. A módszer szerint a csuklópontok azon aminosavaknál vannak, ahol a projekciós értékek legalább 1

standard deviáció nagyságával eltérnek egyik vagy másik domén projekciós értékeinek átlagától.

4.5. A Principal Component Analysis (PCA) módszer

PCA módszert (138) használtunk az apo enzim valamint a D-ADP- és az L-ADP komplexek kollektív mozgásainak vizsgálatára. Az eljárás segítségével a szimulációk szolgáltatatta nagy mennyiségű adatból a funkcionálisan lényeges, nagy skálájú kollektív mozgásokról szerezhetünk információt.

Tekintsünk egy N atomos fehérjemolekulát, melynek MD szimulációval számolt $\mathbf{x}(t)$ trajektóriája (hely-idő függvény) rendelkezésünkre áll. \mathbf{x} egy $3N$ dimenziós vektor, melynek elemei az atomi Descartes-koordináták. Mivel a fehérje belső mozgásait szeretnénk jellemezni, a PCA módszer alkalmazása előtt eltávolítjuk a fehérje egészét érintő translációs és rotációs mozgásokat (pl. a trajektória szerkezeteinek a szimuláció első szerkezetére történő szuperpozíciójával). Az atomi mozgások közötti korreláció az atomi elmozdulások kovariancia mátrixával kifejezhető:

$$C = \text{cov}(\mathbf{x}) = \left\langle (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)(\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T \right\rangle, \quad (9)$$

ahol $\langle \rangle$ az időátlagot jelöli. A szimmetrikus C mátrix mindig diagonalizálható egy alkalmasan választott ortogonális T koordináta transzformációval:

$$\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle = T\mathbf{q} \quad \text{vagy} \quad \mathbf{q} = T^T(\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle), \quad (10)$$

mely a C mátrixot egy $\Lambda = \langle \mathbf{q}\mathbf{q}^T \rangle$ diagonális mátrixba transzformálja λ_i sajátértékekkel:

$$C = T\Lambda T^T \quad \text{vagy} \quad \Lambda = T^T C T \quad (11)$$

A T mátrix i -edik oszlopa a λ_i sajátértékhez tartozó sajátvektor. A teljes

fehérjefluktuáció (Mean Square Fluctuation, MSF), $\sum_i \langle (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \rangle$ az egyes sajátvektorok járulékeinak összegeként fogható fel:

$$\begin{aligned} \sum_i \langle (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \rangle &= \langle (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) \rangle = \\ \langle \mathbf{q}^T T^T T \mathbf{q} \rangle &= \langle \mathbf{q}^T \mathbf{q} \rangle = \sum_i \langle q_i^2 \rangle = \sum_i \lambda_i \end{aligned} \quad (12)$$

A sajátvektorok megadják az egyes atomok mozgásirányát, a sajátértékek pedig az atomok átlagos négyzetes fluktuációját (MSF) ezen irányok mentén. A sajátvektorok mentén megvalósuló mozgásokat PCA módusoknak nevezik. A λ_i sajátértékeket nagyság szerint csökkenő sorrendbe szokták rendezni. Tehát az első néhány sajátvektor a nagy atomi fluktuációkat reprezentálja. Így a fehérje teljes fluktuációját főként az első néhány sajátérték járuléka adja. Ez azt jelenti, hogy a legnagyobb sajátértékekhez tartozó módusok a lassú, nagyobb léptékű konformáció változásokkal járó kollektív mozgásokat írják le. A módszer lényege tehát, hogy egyfajta dimenzió redukció által ($3N$ darab szabadsági fok helyett néhány módus) információk nyerhetők a kollektív mozgásokról.

4.6. A fehérjekonformációk gyakorisági eloszlásának karakterizálása

A szimuláció során megvalósuló fehérjekonformációk gyakorisági eloszlásának karakterizálására a következő módszert dolgoztuk ki. Meghatároztuk a fehérje kiindulási szerkezetének tehetetlenségi főtengelyeit, amiket a 33. (A) ábrán szemléltetünk. Ezen tengelyekre vetítettük a domén tömegközéppontokat összekötő vektort a trajektória minden egyes szerkezete esetében. A módszerrel benyomást szerezhettünk arról, hogy a fehérje alakja hogyan változik a három irány mentén a szimuláció időtartama alatt. Tehát a három irány menti projekcióval a fehérje konformációja jellemezhető. A projekciók gyakoriságának monitorozásával pedig az egyes konformációk betöltöttségéről szerezhettünk információt. A tehetetlenségi főtengelyeket és a projekciókat a CHARMM programcsomag segítségével számoltam.

A gyakorisági eloszlásokat minden esetben 1-re normáltam, hogy a különböző rendszerekről nyert információk összehasonlíthatók legyenek.

4.7. Nemkötő kölcsönhatási energiák számítása

Mind a négy terner komplex esetében számoltuk a szimuláció során kialakuló szubsztrát-fehérje nemkötő kölcsönhatási energiákat (elektrosztatikus és van der Waals). A szubsztrátok és a szubsztrátkötő aminosavak (3. táblázat) minden atomját figyelembe vettük a számolások során. Tisztában vagyunk azzal, hogy az így számolt kölcsönhatási energia nem a szubsztrát-fehérje kötési szabadenergiát adja vissza. Célunk nem az volt, hogy kötési szabadenergiákat számoljunk, hanem az egyes szubsztrátok egymáshoz viszonyított, relatív kötődési affinitásainak jellemzése, a nemkötő kölcsönhatási energiák összehasonlításával (139).

5.

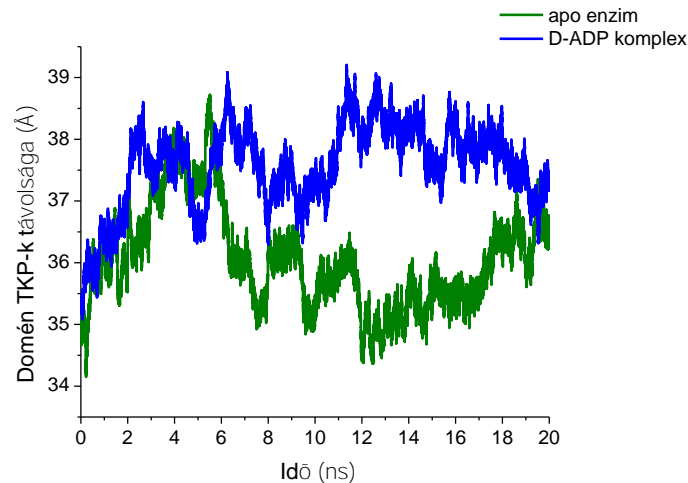
Eredmények

5.1. Az apo hPGK és a D-ADP komplex dinamikai jellemzése

A szubsztrátkötődés fehérjedinamikára gyakorolt hatását az apo hPGK és a természetes D-ADP komplex 20 nanoszekundum hosszúságú MD szimulációinak vizsgálatával jellemeztem.

Elsőként arra szerettem volna választ kapni, hogy a két domén relatív helyzete változik-e a 20 nanoszekundumos szimulációs időtartam során az apo enzimen és a D-ADP komplexben. Ha igen, milyen módon? Látunk-e csuklómozgásra utaló jeleket? A kérdések megválaszolásához nyomon követtük a szimuláció során a két domén tömegközéppontjainak távolságváltozását. Ezt a 13. ábra mutatja be.

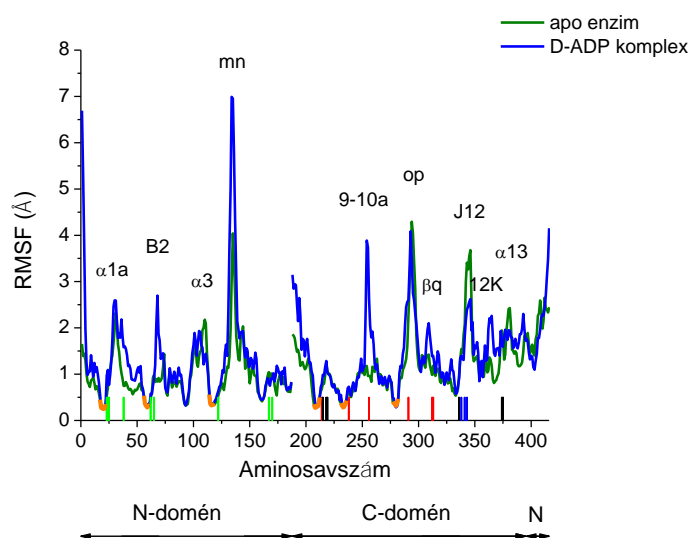
Az apo enzim (zöld görbe) domén tömegközéppontjainak távolságváltozása időben oszcilláló jelleget mutat. Az első 6 nanoszekundum során a domén tömegközéppontok körülbelül 3 Å-nyit távolodnak egymástól, majd közelednek. Körülbelül a 10. nanoszekundumra érik el a kiindulási távolságot. A közeledés a 12. nanoszekundumig folytatódik, amikor ismét távolodni kezdenek egymástól egészen a szimulációs időablak végéig. Az ábra alapján elmondható, hogy az apo enzim a 20 nanoszekundumos szimulációs időtartam alatt a doménnyílás és doménzáródás egy teljes periódusát írja le. A doménfluktuáció amplitúdója mintegy 3 Å. A természetes komplex (kék görbe) esetében a domén tömegközéppontok folyamatos távolodása figyelhető meg a szimuláció során. Csak a 18. nanoszekundumtól veszi kezdetét közeledés. Úgy tűnik tehát, hogy a mozgás periódusideje túlmutat a szimulációs időablakon.



13. ábra A domén tömegközéppontok (TKP) távolságának időfejlődése az apo enzim (zöld görbe) és a D-ADP komplex (kék görbe) esetén a 20 ns szimuláció során. Míg az apo enzim a doménnyílás és doménzáródás egy teljes periódusát írja le, addig a D-ADP komplex doménmozgásának periódusideje túlmutat a szimulációs időablakon.

A lokális mozgások fluktuációs analízise. Ahhoz, hogy a szimuláció során megvalósuló lokális mozgásokat jellemezzük, először kiszámoltuk a C_{α} -atomok 20 nanoszekundumra átlagolt RMSF értékeit mind az apo, mind pedig a komplex rendszer esetében. Amennyiben a domének valóban végeznek merev test szerű mozgást, ezek az egész doménre kiterjedő translációs, rotációs mozgások megjelennek az egyes C_{α} -atomok RMSF értékeiben is. Mivel a lokális mozgások kapcsán csak az egyes doméneken belül megvalósuló mozgásokra (intradomén mozgás) vagyunk kíváncsiak, fontos, hogy eltávolítsuk a domének egészét érintő translációs, rotációs mozgásokat. Így az RMSF értékek számítása előtt, a trajektóriák minden egyes szerkezetét külön N- és C-doménjüknél fogva szuperponáltuk a szimulációk első szerkezeteinek N- és C-doménjére. Azaz mindkét rendszerre (apo és természetes komplex) kaptunk két-két trajektóriát, egy N-doménre és egy C-doménre szuperponáltat. A szuperpozíciókat az egyes domének peptidgerincére végeztük. Az N-domén belső fluktuációit az N-doménre szuperponált trajektóriából, a C-domén belső fluktuációit pedig a C-doménre szuperponáltból számoltuk. A megfelelő doménekre történő szuperpozícióval az RMSF értékekben már csak az intradomén mozgások szolgáltatnak járulékot, míg a domének merev test szerű mozgásai nem. Az ily módon számolt C_{α} RMSF értékek láthatók a 14.

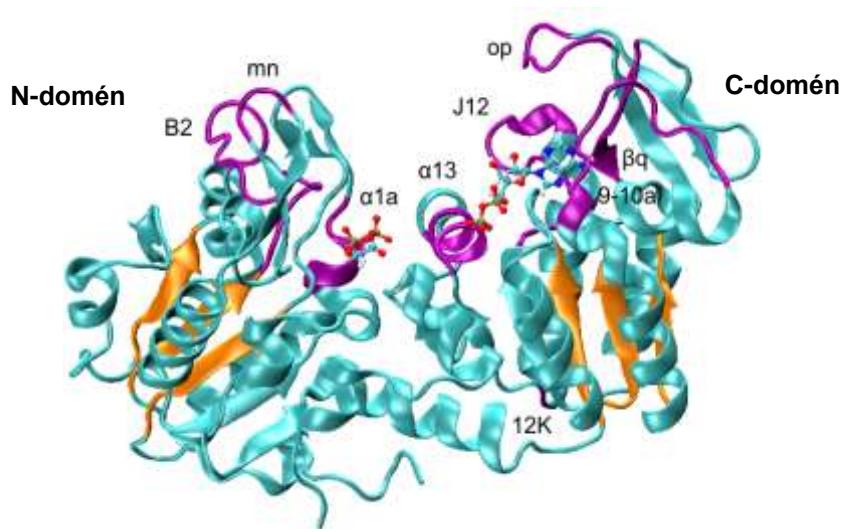
ábrán az enzim apo formájára és a D-ADP komplexre.



14. ábra Az apo enzim (zöld görbe) és a D-ADP komplex (kék görbe) 20 ns-ra átlagolt C_{α} RMSF értékei, a domének merev test mozgásainak eltávolítását követően. A görbék narancssárga, vastagon szedett részei a β magok elemeit, a függőleges vonalak pedig a szubsztrátkötő aminosavakat (zöld – 1,3-BPG kötő, fekete – nukleotid foszfátlánckötő, kék – ribózkötő, piros – báziskötő) jelölik. A fehérje legflexibilisebb elemei a hurok régiók, a legmerevebb elemek pedig a β magok mindkét rendszer esetén.

Általánosságban elmondható, hogy a fehérje hurok régiói mutatnak nagy flexibilitást mindkét rendszer esetében. Az ábráról az is leolvasható, hogy az 1,3-BPG N-doménon történő kötődésével megnő az $\alpha 1a$ hélix és a B2 hurok flexibilitása. A grafikon x tengelyén zöld függőleges vonalak jelzik az 1,3-BPG-t kötő aminosavakat (lásd 3. táblázat). Mind a grafikonon, mind pedig a hPGK szerkezeti ábráján (15. ábra) jól látszik, hogy az $\alpha 1a$ hélix és a B2 hurok az 1,3-BPG kötőhely közelében található. Az N-domén egy másik szerkezeti eleme, az mn hurok is jelentős fluktuációt végez a terner komplexben. A 15. ábráról azonban nyilvánvaló, hogy az mn hurok igen távol esik mindkét kötőhelytől, ezért feltehetően nem a szubsztrátkötődés váltja ki a megnövekedett flexibilitást. A D-ADP kötődésével viszont bizonyos foszfátlánccot és ribózt kötő oldallánccokat tartalmazó szerkezeti elemek veszítenek flexibilitásukból (pl. J12 hurok, $\alpha 13$ hélix). A foszfátlánc és ribóz kötőhelyeket rendre fekete és kék függőleges vonalak jelzik az x tengelyen. Másrészt viszont a nukleobázist kötő,

hidrofób oldalláncokat tartalmazó 9-10a hurok és βq redő a terner komplexben nagyobb fluktuációt mutat, mint az apo enzimben. A bázist kötő aminosavakat az x tengely mentén piros függőleges vonal jelzi. Emellett a 12K hurok is nagyobb flexibilitásra tesz szert a komplex enzimben, bár ezen szerkezeti elem a D-ADP kötőhelytől távol helyezkedik el (15. ábra), így valószínű, hogy nem a szubsztrátkötődés okozza nagy mozgékonyágát. Figyelemre méltó továbbá, hogy az N- és C-domén belső β redői (a 14. ábrán a narancssárga, vastagon szedett részei a görbének; narancssárga színű szerkezeti elemek a 15. ábrán) minimális fluktuációt mutatnak a fehérje többi részéhez képest. Ezen β redőket sok és erős H-híd kötés tartja össze, így dinamikailag igen merev szerkezeti egységet alkotnak a domének magjában. A továbbiakban csak β magként fogok hivatkozni rájuk. Az N-domén β magját a következő β redők alkotják: βA (aminosavsorszám: 17-22), βB (aminosavsorszám: 56-61) és βD (aminosavsorszám: 114-119). A C-domén β magjának alkotó β redői: βG (aminosavsorszám: 207-212), βH (aminosavsorszám: 231-236) és βI (aminosavsorszám: 277-282).



15. ábra A lila színnel jelölt szerkezeti elemek fluktuációja jelentős mértékben változik szubsztrátkötődés hatására. Az N- és C-domén β magokat narancssárga nyilak szemléltetik.

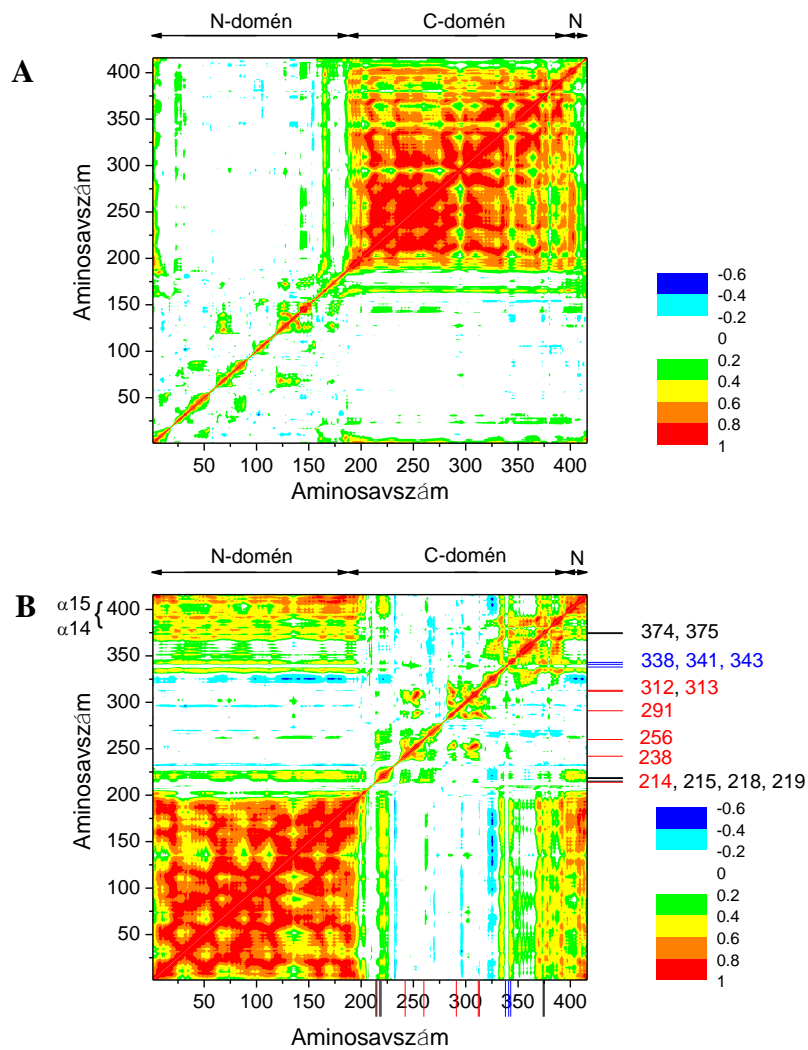
Az intra- és interdomén mozgások korrelációs analízise. Ahhoz, hogy feltérképezzük a mozgások kölcsönös viszonyát, kiszámoltuk a C_{α} elmozdulások 20 nanoszekundumra átlagolt kereszt-korrelációs mátrixát mind az apo, mind a D-ADP komplex rendszerre. A korrelációk számolása előtt, minden esetben eltávolítottuk a dinamikából a teljes fehérje

transzlációs és rotációs mozgásait. Ehhez a trajektória minden egyes szerkezetét szuperponáltuk a szimuláció első szerkezetére. A szuperpozíció kétféle módon történt. Amennyiben az N-doménon belüli lokális mozgások korrelációira illetve a C-domén N-doménhez viszonyított relatív mozgására voltunk kíváncsiak, a szuperpozíciót az N-domén β mag peptidgerincére végeztük. Azaz a trajektória minden egyes szerkezetét N-domén β magjánál fogva szuperponáltuk a szimuláció első szerkezetének N-domén β magjára. Hasonlóképpen, amennyiben a C-doménon belüli lokális mozgásokat illetve az N-domén C-doménhez viszonyított relatív mozgását kívántuk vizsgálni, a C-domén β mag peptidgerincére végeztük a szuperpozíciót. Ezzel a módszerrel lehetőség nyílt a lokális intradomén és a kollektív interdomén mozgások szétválasztására és korrelációs analízissel történő detektálására.

A 16. ábrán az apo enzim C_{α} -atomjaira számolt kereszt-korrelációs mátrix szintábrája látható. Míg az ábra (A) része az N-domén β mag szuperpozícióval számolt mátrixot mutatja, addig a (B) rész a C-domén β mag szuperpozícióval készített mátrixot szemlélteti.

A 16. (A) szintábra jobb felső vörös négyzete nagyon markánsan azt demonstrálja, hogy a teljes C-domén merev testként mozog az N-doménhez képest, ugyanis a C_{α} elmozdulások közötti korrelációk igen nagy pozitív értékeket mutatnak. Az ábra bal alsó négyzetében, mely az N-doménon belüli mozgásokat szemlélteti, nem jelennek meg említésre méltó korrelációk.

A 16. (B) ábra bal alsó vörös négyzete egyértelműen jelzi, hogy az N-domén is merev test szerű mozgást végez a szimuláció során a C-doménhez képest. Tehát a 16. ábra (A) és (B) része kiegészítve egymást, meggyőzően demonstrálják, hogy a két domén dinamikai egységként működik, merev test szerű mozgást folytatnak. Figyelemre méltó továbbá, hogy a fehérje C-terminálisa ($\alpha 14$ és $\alpha 15$ hélixek, lásd 2. táblázat) viszonylag nagy pozitív korrelációt mutat a teljes N-doménnel (16. (B) szintábra bal felső része). A fehérje kristályszerkezetei alapján tudjuk, hogy a C-terminális visszahajlik az N-doménhez és annak szerkezetileg szerves részét képezi.



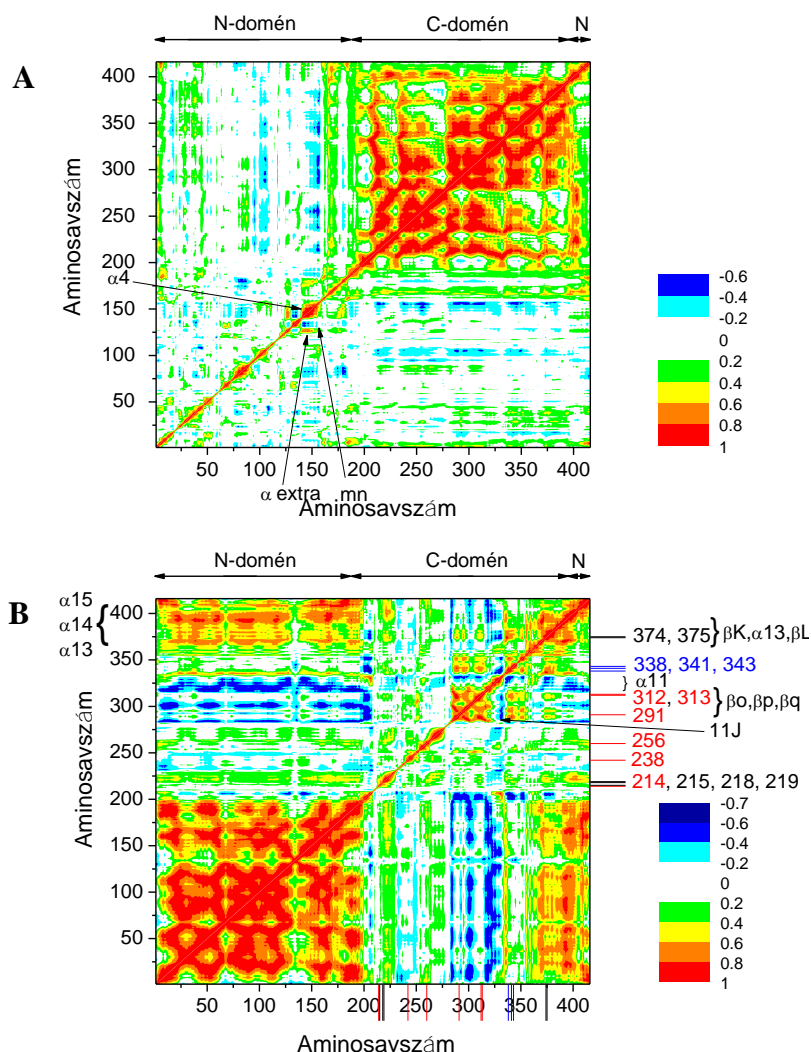
16. ábra A C_{α} -atomok elmozdulásainak 20 ns-ra számolt kereszt-korrelációs mátrixa apo enzimre, (A) N-domén β magra történő szuperpozíciót követően, (B) C-domén β magra történő szuperpozíciót követően. Pirossal az azonos irányú mozgást (korreláció), kézzel az ellentétes irányú mozgást (antikorreláció) szemléltetjük. A (B) ábra x és y tengelyén a fekete vonalak a nukleotid foszfátláncát kötő, a kék vonalak a ribózkötő, a piros vonalak pedig a báziskötő aminosavakat jelölik.

A 16. (B) ábra jobb felső négyzete a C-domén intradomén mozgásainak korrelációját mutatja. Összehasonlítva az N-domén intradomén mozgásaival (16. (A) ábra), a C-doménen belül kifejezettebb korrelációk láthatók. Az ábra x és y tengelyén megjelenített függőleges és vízszintes vonalak az egyes kötő aminosavak szekvenciális pozícióját jelölik. A piros vonalak a nukleotid bázisát kötő, a fekete vonalak a foszfátláncot, míg a

kék vonalak a nukleotid ribóz részét kötő aminosavakat jelölik. A korrelációs mintázat alapján megállapítható, hogy az egyes nukleotid kötőhelyek között alakulnak ki jelentősebb pozitív korrelációk. Például erős korrelációk jelentkeznek bizonyos bázist kötő aminosavak között (Ala214, Gly238, Leu256, Phe291, Gly312, Leu313; 8. ábra). Figyelemre méltó még a korreláció a ribózt (Pro338, Val341, Glu343) és egyes foszfátláncot kötő (Asp374, Thr375) aminosavak között is.

A 17. ábrán a természetes terner komplexre számolt kereszt-korrelációs mátrix szintábrája látható. Alapvetően a korrelációs mintázat nagy hasonlóságot mutat az apo enzim esetében megfigyelttel, szembeötlő különbség viszont, hogy sokkal hangsúlyosabb korrelációk jelentkeznek a D-ADP komplexben. Bár az N-domén intradomén mozgásai (17. (A) ábra) továbbra is igen kevésbé korreláltak, az $\alpha 4$ (aminosavszám: 144-155) és az α extra (aminosavszám: 125-127) hélix között figyelhető meg jelentősebb pozitív korreláció, valamint ezek negatív korrelációja az mn hurokkal (aminosavszám:133-135) (18. ábra).

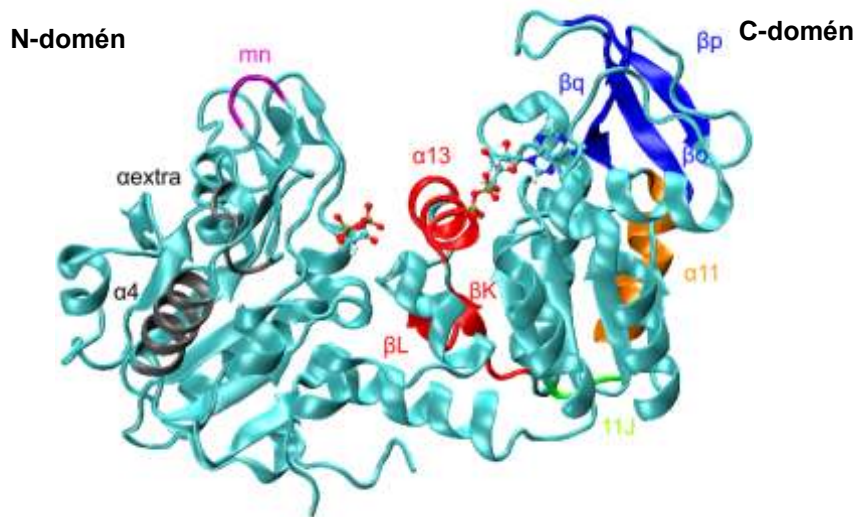
A D-ADP komplexben a C-domén belső mozgásainak korrelációja (17. (B) ábra) igen nagy hasonlóságot mutat az apo enzimnél tapasztalttal. Itt is a nukleotid kötő aminosavak között jelentkeznek nagyobb pozitív korrelációk. Az apo enzimhez képest korreláció növekedés figyelhető meg a Phe291 és a Gly312, Leu313 báziskötő aminosavak között. Továbbá jelentősebb pozitív korreláció jelenik meg az előbbi báziskötő és a ribózkötő Pro338, Val341, Glu343 aminosavak között, ami apo enzimnél nem volt megfigyelhető. Figyelemre méltó különbség még az apo enzimhez képest, hogy $\beta 0$, βp és βq redők (aminosavszám: 285-315) által alkotott pozitív korrelációval együtt mozgó dinamikai egység erős antikorrrelációt mutat a domén ellentétes oldalán található 11J hurokkal (aminosavszám: 327-332) (18. ábra). Hasonló módon, a βK redő, $\alpha 13$ hélix és βL redő (aminosavszám: 367-392) szerkezeti elemekből álló dinamikai egység és a domén átellenes oldalán elhelyezkedő $\alpha 11$ hélix (aminosavszám: 317-329) között jelentős antikorrreláció jelentkezik. A $\beta 0$, βp , βq - 11J és βK , $\alpha 13$, βL - $\alpha 11$ szerkezeti párok azt bizonyítják, hogy akár a doméneken belül is kialakulhatnak erős antikorrrelációs mozgások.



17. ábra A C_{α} -atomok elmozdulásainak 20 ns-ra számolt kereszt-korrelációs mátrixa D-ADP komplexre, (A) N-domén β magra történő szuperpozíciót követően, (B) C-domén β magra történő szuperpozíciót követően. Pirossal az azonos irányú mozgást (korreláció), kékkel az ellentétes irányú mozgást (antikorreláció) szemléltetjük. A (B) ábra x és y tengelyén a fekete vonalak a nukleotid foszfátláncát kötő, a kék vonalak a ribózkötő, a piros vonalak pedig a báziskötő aminosavakat jelölik.

Az apo enzimhez hasonlóan a D-ADP komplex esetében is a C-terminális mozgása jelentős pozitív korrelációt mutat a teljes N-domén mozgásával (17. (B) ábra bal felső négyzet). Viszont itt ez a korreláció erősebb, mint az apo enzim esetében, és az $\alpha 14$, $\alpha 15$ hélixek mellett az $\alpha 13$ hélix is együtt mozog az N-doménnel. Emellett megállapítható, hogy a C-domén jelentős része (főként a nukleotid kötőhely közelében lévő βo , βp és βq

redők, 18. ábra) igen erős antikorrrelációt mutat a teljes N-doménnel. Azért figyelemre méltó ez az eredmény, mert egyértelmű bizonyítéka a domének egymáshoz viszonyított csukló vagy nyíró jellegű mozgásainak.



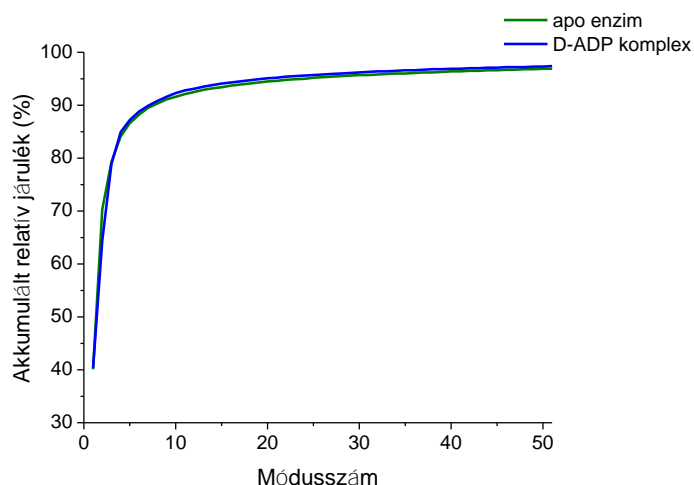
18. ábra A hPGK nagy intradomén korrelációkat mutató szerkezeti elemei.

Felmerül a kérdés, vajon a korrelációs értékek konvergáltak-e a szimuláció során (140,141)? A kérdésre a következőképpen kerestük a választ. A szimulációs trajektóriát két részre osztva, az első és második 10 nanoszekundumra is kiszámoltuk a kereszt-korrelációs mátrix elemeit. Azt találtuk, hogy az intradomén mozgásokat leíró mátrix elemek megegyeztek a teljes trajektóriára számolt mátrix elemekkel, viszont az interdomén mozgásokat jellemző mátrix elemek eltérő értékeket mutattak a trajektória különböző szegmenseire. A lokális intradomén mozgások korrelációs értékei tehát konvergáltak, így ezek a mozgásformák 20 nanoszekundumos szimulációval részletesen vizsgálhatóak. A kollektív interdomén mozgások korrelációs értékei azonban nem konvergáltak a szimuláció során, így ezen mozgások – melyek jóval hosszabb időskálán zajlanak – részletesen nem vizsgálhatóak ebben az időablakban, csak jelenlétükről szerezhetünk tudomást.

Kollektív mozgások vizsgálata PCA módszerrel. Az atomi mozgások korrelációs analízise már szolgáltatott némi információt a kollektív mozgásokra vonatkozóan. PCA módszerrel viszont nem csak a mozgások egymáshoz viszonyított relatív irányáról,

hanem abszolút irányultságukról is szerezhetünk információt. A PCA sajátértékeket és sajátvektorokat az apo enzim és a D-ADP komplex C_{α} -atomjaira számoltam. A PCA módusok számítása előtt a fehérje egészét érintő translációs, rotációs mozgásokat a trajektóriák N-domén β magra történő szuperponálásával távolítottam el. Ezzel információt nyerhetünk a C-domén N-doménhez viszonyított relatív mozgásáról. C-domén β magra végzett szuperpozícióval is számoltam PCA módusokat, mivel az eredmények ekvivalensek voltak az N-domén β magra szuperponált esetben tapasztaltakkal, ezen eredményeket jelen munkában nem ismertetem. A PCA sajátértékeket és sajátvektorokat csak a fehérje C_{α} -atomjaira számoltam, ezzel ugyanis jelentősen csökkenthető az eljárás számítógép-memória igénye.

A PCA sajátértékek teljes fehérjefluktuációhoz (Mean Square Fluctuation (MSF), azaz az RMSF négyzete) szolgáltatott akkumulált, relatív járuléka láthatók a 19. ábrán.



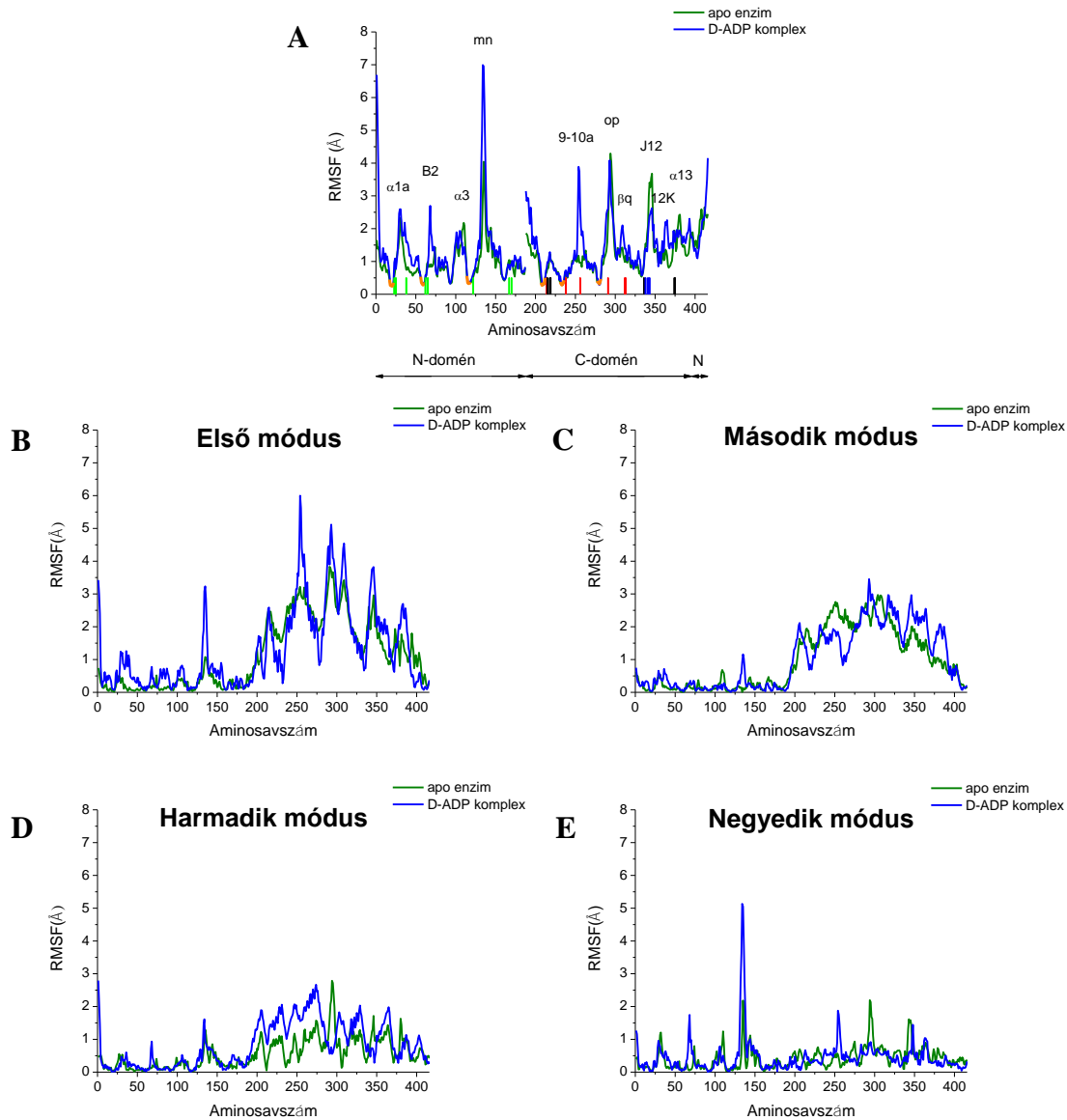
19. ábra A PCA sajátértékek akkumulált, relatív járuléka a teljes fehérjefluktuációhoz (MSF) apo enzim (zöld görbe) és D-ADP komplex (kék görbe) esetén. Az ábrán csak az első 50 sajátérték járuléka vannak feltüntetve. Az első három módus megközelítőleg, képes leírni a teljes fehérjemozgást mindkét rendszer esetében, hiszen az összfluktuáció 79-80 %-áért felelősek.

A 3N (3X416=1248) PCA sajátértékből az apo enzim első 3 sajátértéke a fehérje teljes fluktuációjának 80 %-ához, míg az első 6 sajátérték 88 %-ához járul hozzá. Lebontva, a 1. / 2. / 3. módusokhoz tartozó sajátértékek rendre a teljes fluktuáció 40,1 % / 30,3 % /

9,0 %-át teszik ki $964,3 \text{ \AA}^2 / 728,8 \text{ \AA}^2 / 216,0 \text{ \AA}^2$ értékekkel (nincs ábrázolva). A D-ADP komplex esetében az első 3 PCA módus sajátértékei a teljes fehérjefluktuáció 79 %-át, míg az első 6 módushoz tartozók 89 %-át teszik ki. Lebontva az első három módusra, az 1. / 2. / 3. módusok sajátértékei rendre a teljes fluktuáció 40,3 % / 24,1 % / 14,5 %-áért felelősek $1298,7 \text{ \AA}^2 / 776,5 \text{ \AA}^2 / 466,2 \text{ \AA}^2$ értékekkel (nincs ábrázolva).

Az adatok alapján elmondható, hogy az első három módus megközelítőleg, képes leírni a teljes fehérjemozgást mindkét rendszer esetében, hiszen az összfluktuáció 79-80 %-áért felelősek. Így várhatóan ezen módusok vizsgálata elegendő lehet, hogy a fehérje kollektív mozgásait kellő pontossággal karakterizálhassuk.

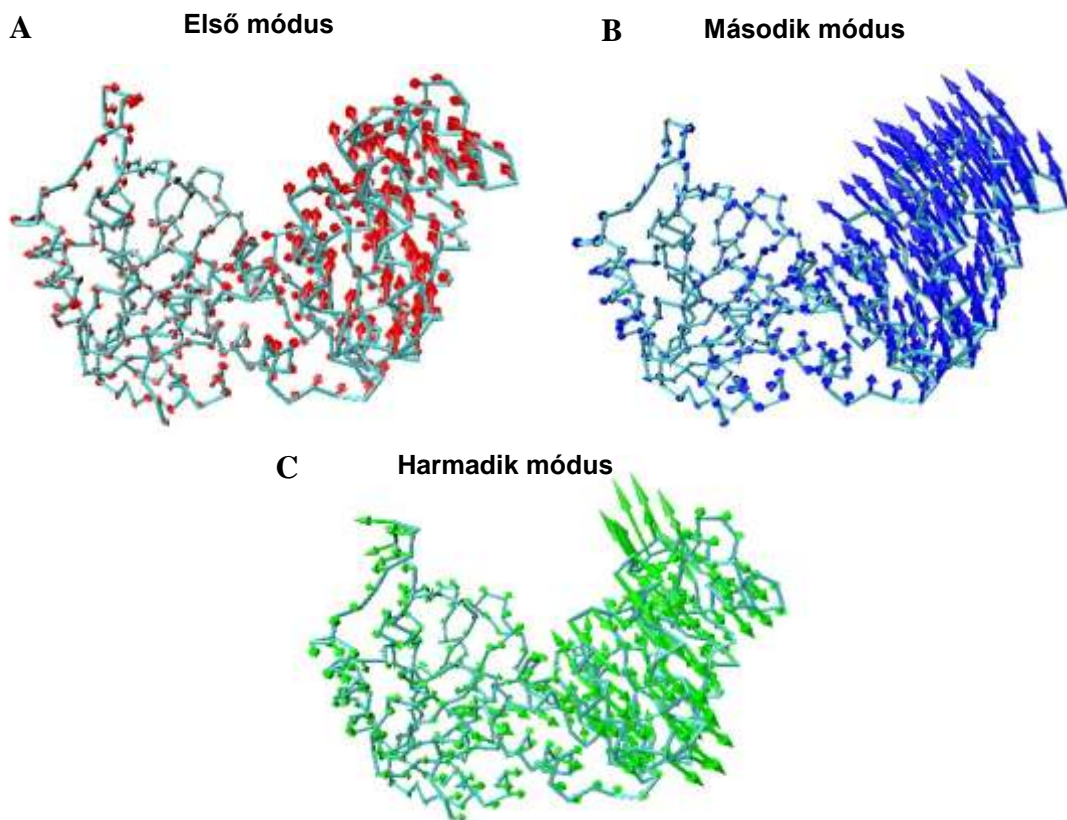
A 20. ábrán az egyes C_α -atomok fluktuációs járuléka látható az első 4 módus mentén. Összehasonlításképpen a C_α -atomok N- és C-domén β magra szuperponált, teljes RMSF értékeit is bemutatom (az ábra (A) része). Mindkét rendszerre elmondható általánosan, hogy az első 4 módus RMSF görbéi nagy hasonlóságot mutatnak a teljes – MD szimulációkból közvetlenül számolt – RMSF görbékkel. A módus RMSF és MD RMSF görbék megfelelő csúcsai és minimumai azonos pozíciókban találhatóak, ami azt bizonyítja, hogy mindössze négy koordinátával (első 4 módus) jól reprodukálhatók az MD RMSF értékei. Az első 3 módus görbéjén jól látszik, hogy a mozgó C-domén (N-doménre szuperponáltunk) minden C_α -atomja általánosan nagy fluktuációkat mutat az N-domén C_α -atomjaihoz képest. Ez egy megnövekedett alapvonalként jelentkezik mindkét rendszer görbéjén, és a C-domén N-doménhez viszonyított kollektív, merev test szerű mozgásáról árulkodik. A görbék alapján világos, hogy a negyedik módusnak nincs járuléka a kollektív mozgásokhoz, ugyanis e módusnál a C-domén RMSF értékeiben nem látható alapvonal növekedés. A kollektív mozgások jellemzésére mindkét rendszer esetén elegendő az első három módus. Az is egyértelműen látszik, hogy az első módus járul hozzá legnagyobb mértékben a nagy skálájú mozgásokhoz. Mivel a negyedik PCA módusok a fenti eredmények alapján egyik rendszer esetében sem játszanak szerepet a kollektív mozgásokban, így a továbbiakban nem tanulmányoztam őket.



20. ábra A C_{α} -atomok (A) teljes RMSF értékei, valamint RMSF járuléka (B) az első, (C) a második, (D) a harmadik és (E) a negyedik módus mentén apo enzim (zöld görbe) és D-ADP komplex (kék görbe) esetén. Mivel a negyedik módusnak nincs járuléka a kollektív mozgásokhoz (lapos C-domén alapvonal), ezen mozgások jellemzésére elegendő az első három módus mindkét rendszer esetén.

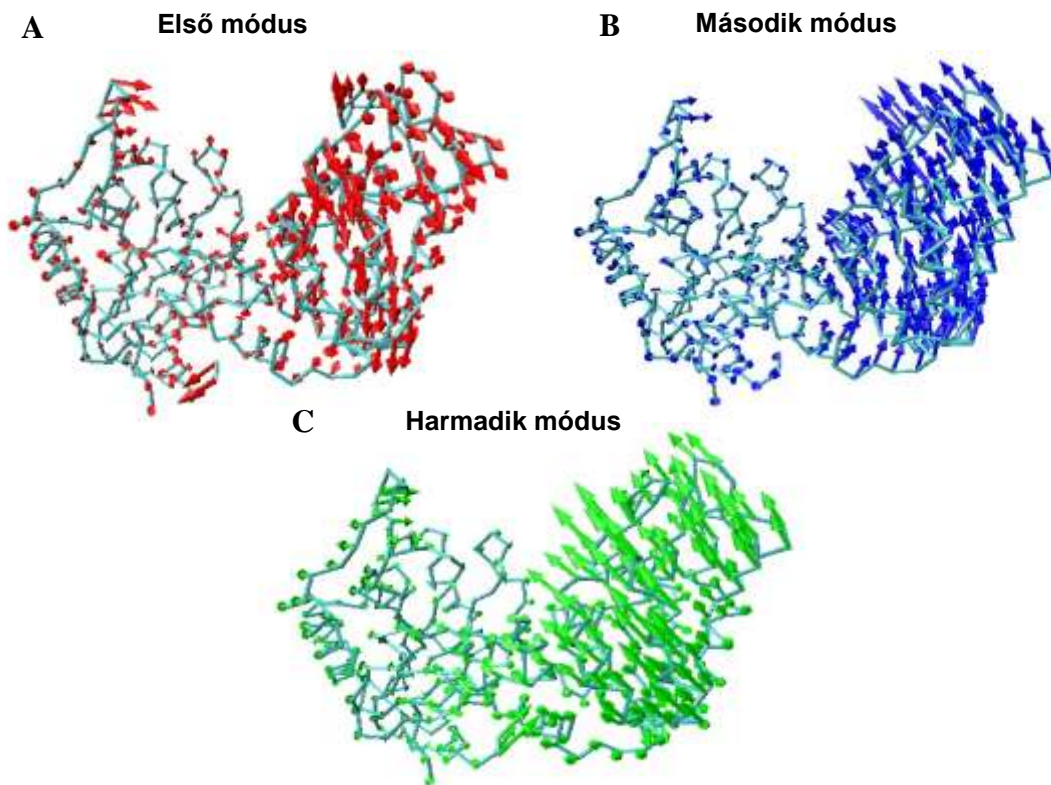
A 21. ábra az apo enzim C_{α} -atomjainak első ((A), piros), második ((B), kék) és harmadik ((C), zöld) PCA módusokhoz tartozó komponens vektorait ábrázolja a fehérje háromdimenziós, C_{α} -reprezentációján. Jól látszik, hogy mindhárom módus esetében a C-doménhez tartozó komponens vektorok amplitúdója nagyobb, mint az N-doménhez

tartozóké. Érthető, hiszen N-domén β magra szuperponált trajektóriákra számoltam a PCA módusokat, így az ábrák a C-domén N-doménhez viszonyított relatív mozgását mutatják. Általánosságban megállapítható, hogy mindhárom módus esetén a C-domén C_{α} -atomjai azonos irányban, azonos amplitúddal mozognak, azaz mozgásuk erősen korrelált. Tehát mindhárom módus a C-domén merev test szerű mozgását írja le. Az ábrák így megerősítik a fenti vizsgálatoknál látottakat, miszerint az első három módus a fehérje kollektív mozgásait jellemzi. A 21. ábra alapján elmondható, hogy az apo enzim első PCA módusa a C-domén N-doménhez viszonyított nyíró mozgását, a második módus a csuklómozgását, míg a harmadik módus a csavarodását írja le. Érdekes, hogy a hPGK kollektív mozgásának egy, a Gerstein-féle osztályozásban nem szereplő mozgásforma is az eleme. Ez a csavarodó doménmozgás, melynek során a doménrotáció egy, a doméntesten áthaladó tengely körül történik (21. (C) ábra).



21. ábra Az apo enzim C_{α} -atomjainak (A) első (piros), (B) második (kék) és (C) harmadik (zöld) PCA módushoz tartozó komponens vektorai a fehérje 3 dimenziós, C_{α} -reprezentációján. Az első módus a C-domén N-doménhez viszonyított nyíró mozgását, a második módus a csuklómozgását, míg a harmadik módus a csavarodását írja le.

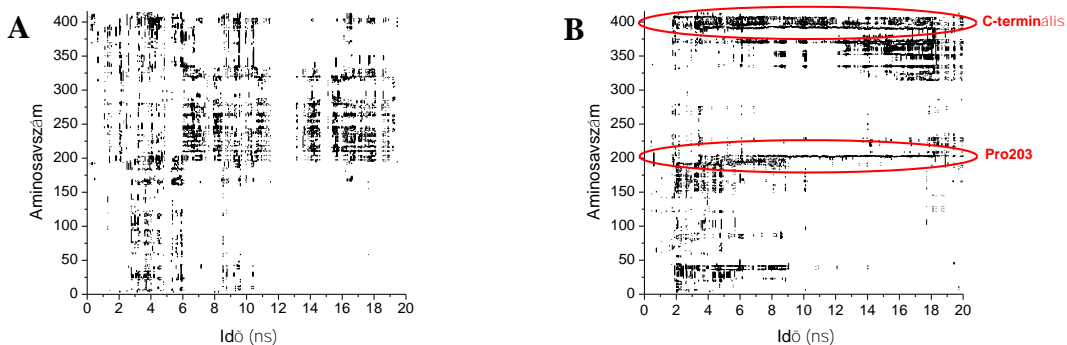
A 22. ábra a D-ADP komplex első három PCA módusához tartozó C_α komponens vektorokat jeleníti meg a fehérje háromdimenziós, C_α -reprezentációján. Hasonlóan az apo esethez, az azonos szuperpozíciós eljárás miatt, a C-domén komponens vektorainak amplitúdója nagyobb, mint az N-doménhez tartozóké. Az ábrák tehát a C-domén N-doménhez viszonyított relatív mozgását mutatják. Itt is igaz, hogy a C-domén C_α -atomjainak mozgása erősen korrelált mindhárom módus esetében, tehát a módusok a C-domén merev test szerű mozgását írják le. A 22. ábra alapján megállapítható, hogy a D-ADP komplex első PCA módusa ((A), piros) a C-domén N-doménhez viszonyított csavarodó mozgását, a második módus ((B), kék) a csuklómozgását, míg a harmadik módus ((C), zöld) a nyíró mozgását írja le.



22. ábra A D-ADP komplex C_α -atomjainak (A) első (piros), (B) második (kék) és (C) harmadik (zöld) PCA módushoz tartozó komponens vektorai a fehérje 3 dimenziós, C_α -reprezentációján. Az első módus a C-domén N-doménhez viszonyított csavarodó mozgását, a második módus a csuklómozgását, míg a harmadik módus a nyíró mozgását írja le.

Csuklópontok meghatározása. Miután megbizonyosodtunk afelől, hogy a domének valóban végeznek merev test szerű mozgást a szimuláció időskáláján, a doménmozgás további karakterizálása céljából azonosítani kívántuk a fehérje csuklópontjait. Ezek az interdomén régió azon pontjai, melyek körül a doménrotációk megvalósulnak, így alapvetően meghatározzák a doménmozgás karakterét.

A csuklópont meghatározáshoz elsőként a DynDom programot alkalmaztuk. A program által beolvasott két konformáció közül az egyik mindig a szimuláció első konformációja (referencia), a másik pedig a szimuláció pikoszekundumonként kiírt, aktuális konformációja volt. Így lehetőség nyílt időben nyomon követni az egyes aminosavak dinamikai részvételét a konformációváltozásokban. A módszerrel megkülönböztethetők az időben permanens, a konformáció változás szempontjából releváns csuklópontok és a pillanatnyilag csuklószerű jeleket produkáló aminosavak. Mint az a 23. (A) ábrán látható, az apo enzim esetében a program sok, az aminosav szekvencia mentén diffúz módon elszórt csuklópontot azonosított. Valószínűsíthetően a doménmozgások amplitúdója nem elegendően nagy a szimuláció során ahhoz, hogy a program által használt klaszterelemzési algoritmus dinamikai doméneket azonosíthasson. Ezzel szemben, a 23. (B) ábra alapján megállapítható, hogy a D-ADP komplex Pro203 aminosavját a szimuláció során végig funkcionáló, permanens csuklópontnak minősítette a program. Emellett a C-domén C-terminálisánál is jelentős, permanens csukló régiót jelez. Ez az a régió, mely visszahajlik az N-doménhez.



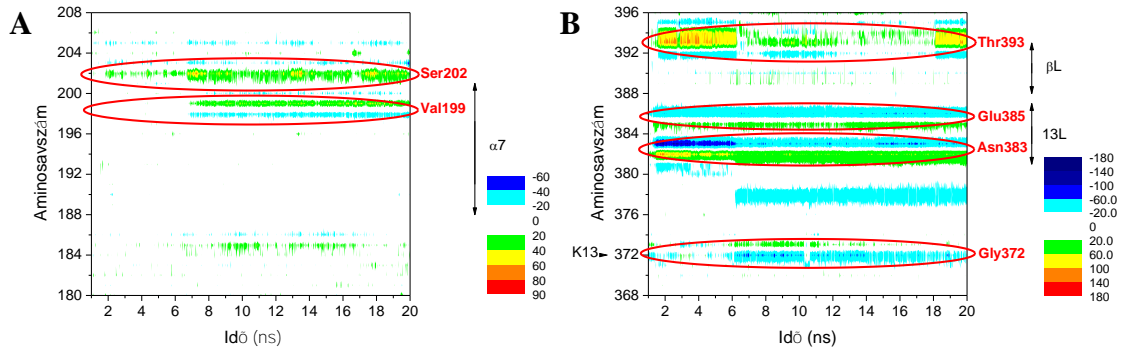
23. ábra A DynDom program által meghatározott csuklópontok (A) az apo enzimre és (B) a D-ADP komplexre. Míg az apo enzim esetében sok, addig a D-ADP komplexnél két permanens csuklópontot (piros színnel jelölt) azonosított a program.

Mivel a DynDom program által használt módszer nem elég érzékeny, hogy szimulációs adataink alapján megbízhatóan csuklópontokat azonosítson (főként apo enzim esetén), egy általunk fejlesztett, a 4.3. fejezetben ismertetett módszert is alkalmaztunk a csuklópontok meghatározására. A CHARMM program belső koordináta táblázatát használva, meghatároztuk a peptidgerinc egymást követő C_{α} -atomjai között definiált torziós szögeket a trajektória minden szerkezetében. Összehasonlítva őket a szimuláció első szerkezetének torziós szögeivel, a szögváltozások információt hordozhatnak a csuklópontok helyzetéről. A csuklópontok körül ugyanis nagy amplitúdójú torziós szögváltozásoknak kell történni, hogy a doménrotációk megvalósulhassanak.

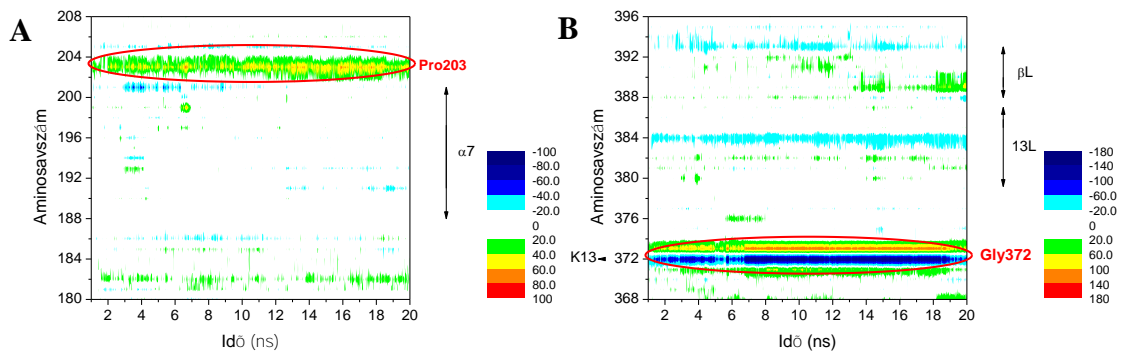
Analizálva a torziós szögváltozások időbeli fejlődését, mindkét rendszer (apo és D-ADP komplex) hurok régiói nagy amplitúdójú szögváltozásokat mutattak (nincs ábrázolva). Érthető, hiszen – mint azt a fluktuációs analízis során is láttuk – a hurok régiók a fehérje legflexibilisebb elemei. Az irodalmi áttekintés és az eddigi analízisek alapján nyilvánvaló, hogy a csuklópontoknak az enzim interdomén régiójában kell lenniük. Így a torziós szögváltozások analízisét csak az interdomén régiókra szűkítettük. Tehát a továbbiakban csak az $\alpha 7$ hélix körüli, 180-208 aminosavsorszámú és a C-terminális előtti, 368-396 aminosavsorszámú tartományt fogjuk vizsgálni (piros szalag reprezentációban láthatók az interdomén régiók a 26. ábrán). Szekvenciálisan két interdomén tartománya van a fehérjének, ugyanis a C-terminális visszahajlik az N-doménhez, így a fehérje főlánca kétszer fut végig az interdomén régión.

A 24. és 25. ábrák a torziós szögváltozások időbeli fejlődését mutatják ezen interdomén régiókban az apo enzim és a D-ADP komplex esetében. A 24. (A) ábrán az apo enzim $\alpha 7$ hélix körüli tartományában számolt torziós szögváltozások szerepelnek szintábrázolásban. Az ábra alapján egyértelmű, míg az $\alpha 7$ hélix (aminosavsorszám: 189 – 202) belsejében nincsenek torziós szögváltozások, addig a hélix C-domén felőli végén, a Val199 és Ser202 aminosavaknál nagy amplitúdójú szögváltozások figyelhetők meg. A 25. (A) ábrán ugyanezen régió ($\alpha 7$ hélix körül) torziós szögváltozásai vannak feltüntetve a D-ADP komplex esetére. Az apo enzimhez hasonlóan, itt is a $\alpha 7$ hélix C-domén felőli végén, a Pro203 aminosavnál látható nagy amplitúdójú szögváltozás. A DynDom program ugyanezen aminosavat azonosította csuklópontként, ami a módszerünk érvényességét bizonyítja. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az apo enzim $\alpha 7$ hélix körüli régiójában két csuklópont funkcionál, melyek a Val199 és

Ser202. D-ADP kötődés hatására viszont csak egyetlen csuklópont marad a régióban, a Pro203. A csuklópontok elhelyezkedését szemlélteti a 26. ábra a hPGK háromdimenziós szerkezetén (kék van der Waals gömbökkel).



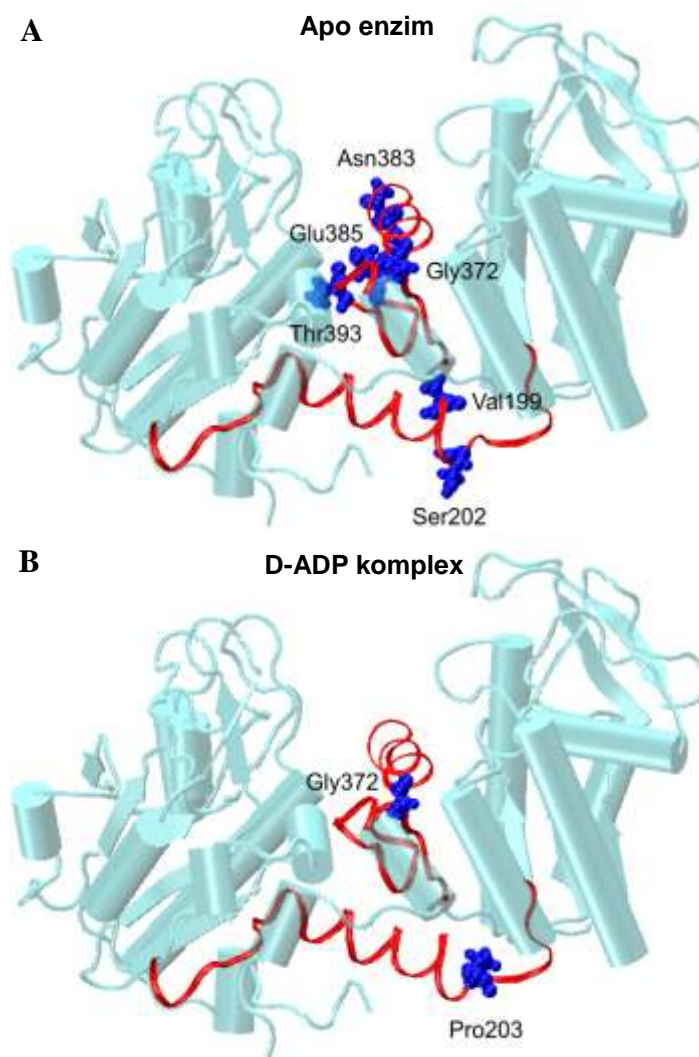
24. ábra Az egymást követő C_{α} -atomok között definiált torziós szögek változásai a szimuláció első szerkezetéhez képest az apo enzim két interdomén régiójában. A nagy torziós szögváltozást mutató szerkezeti elemeket (csuklópontok) piros ellipszis jelöli.



25. ábra Az egymást követő C_{α} -atomok között definiált torziós szögek változásai a szimuláció első szerkezetéhez képest a D-ADP komplex két interdomén régiójában. A nagy torziós szögváltozást mutató szerkezeti elemeket (csuklópontok) piros ellipszis jelöli.

A 24. (B) ábrán az apo enzim C-terminális előtti régiójának C_{α} torziós szögváltozásai láthatók az idő függvényében. Nagy szögváltozások a régió három pontján, a Gly372, az Asn383-Glu385 és a Thr393 aminosavaknál láthatók, melyek rendre a K13, 13L hurkokban és a β L redőben található (26. (A) ábra). A 25. (B) ábrán ugyanezen régió torziós szögváltozásai követhetők nyomon a D-ADP komplex esetében. Tekintélyes

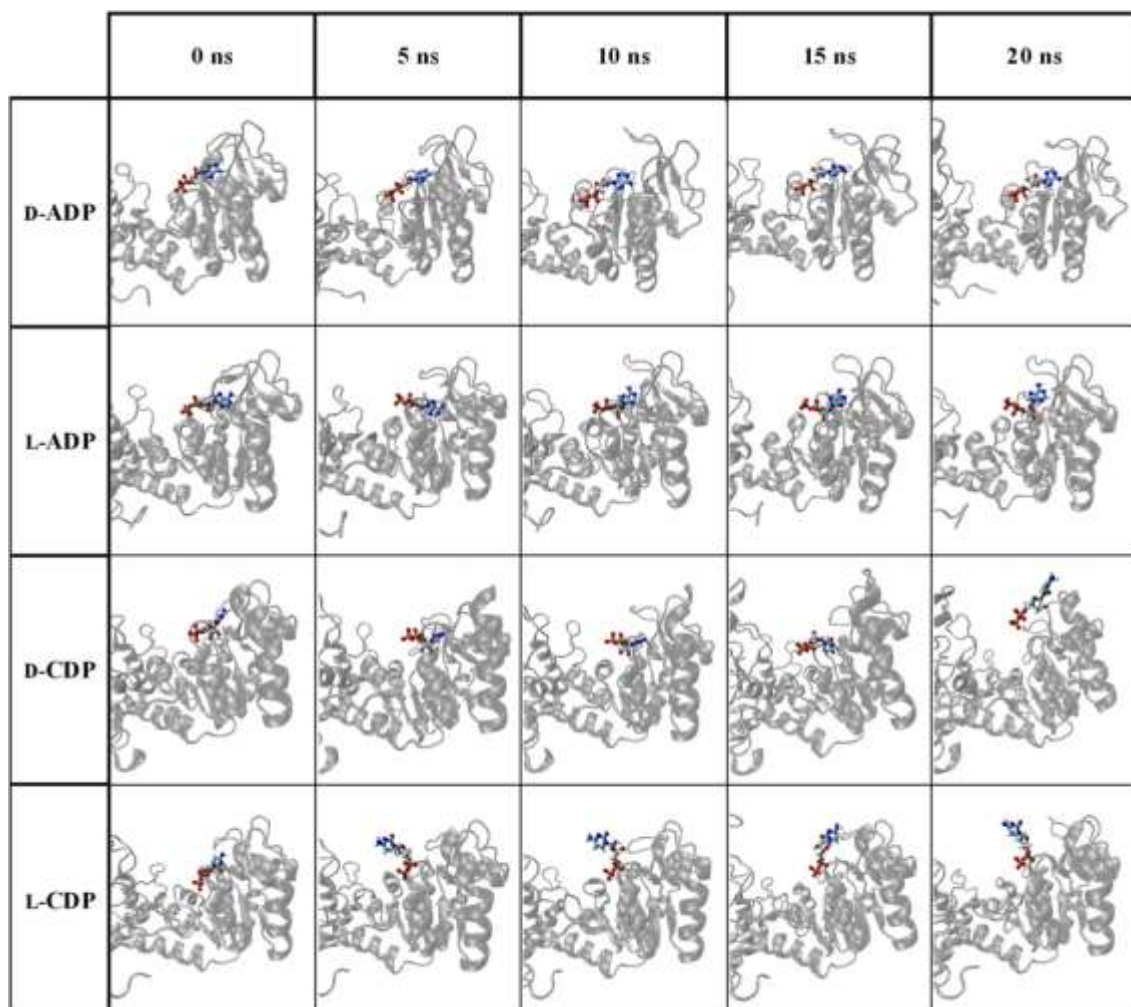
mértékű torziós szögváltozás látható az $\alpha 13$ hélix előtt elhelyezkedő Gly372 aminosavnál (26. (B) ábra). Ezen aminosavnál az apo enzim esetében is látható volt nagyobb torziós szögváltozás, de korántsem ilyen nagy mértékű. Az apo rendszer másik három aminosavjánál (Asn383-Glu385 és Thr393) észlelt nagy torziós szögváltozások ennél a rendszernél is megjelennek, de ezen szögváltozások amplitúdója sokkal kisebb, mint a Gly372 aminosavnál látható változása. Az eredmények alapján tehát elmondható, hogy az apo enzim C-terminális előtti régiójában három csuklópont vesz részt a doménmozgásokban, melyek közül egy, a Gly372 válik domináns csuklóponttá a D-ADP kötődés hatására (26. ábra). Az eredmény ismét összhangban van a DynDom program D-ADP komplexre adott eredményeivel.



26. ábra A csuklópontok elhelyezkedése az **(A)** apo enzim és a **(B)** D-ADP komplex szerkezetében. A csuklópontként funkcionáló aminosavakat kék van der Waals gömbök, a két interdomén régiót piros szalag reprezentáció szemlélteti. A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében a szubsztrátok nincsenek jelölve a komplex enzimben.

5.2. A D-/L-ADP - és D-/L-CDP komplexek dinamikai elemzése

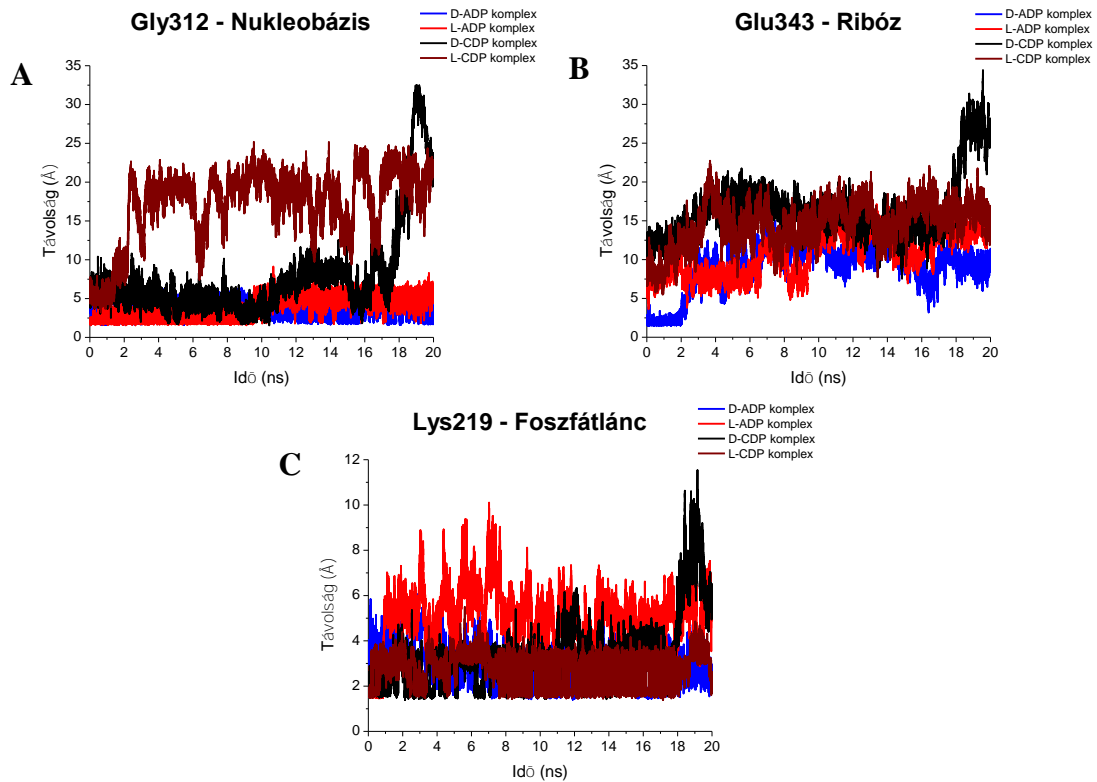
A nukleotid kötődés jellemzése. Doktori munkám második felében arra kerestem a választ, hogy milyen szerkezeti-dinamikai okokra vezethető vissza a hPGK széleskörű nukleotid specificitása és alacsony enantioszelektivitása. Hogyan magyarázható a különböző bázisú és kiralitású nukleotidok hPGK iránti különböző mértékű kötődési affinitása és katalitikus hatékonysága? Választ adhatunk-e ezen kérdésekre nanoszekundum időskálájú MD szimulációval?



27. ábra A D-/L-ADP - és D-/L-CDP komplexek 5 ns-ként készített pillanatképei a 20 ns szimulációk során. A szerkezetek a C-domén β magjára vannak szuperponálva. A nukleotidok atomjait CPK gömbök jelölik. Az 1,3-BPG szubsztrát egyik esetben sincs ábrázolva. Míg a D- és L-ADP szorosán, addig a D- és L-CDP lazán kötődik az enzimen.

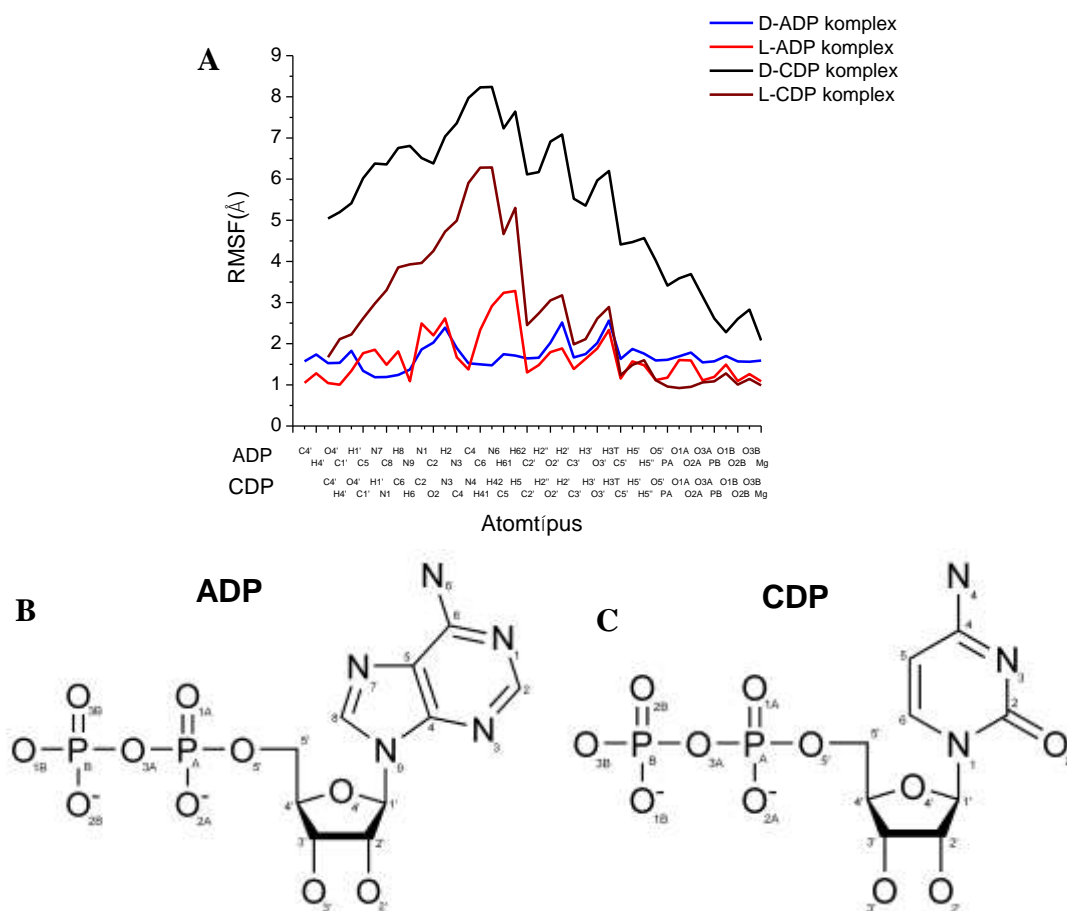
A fenti kérdések tisztázása érdekében 20 nanoszekundum hosszúságú MD szimulációt végeztünk a D-ADP -, L-ADP -, D-CDP - és az L-CDP komplexekre.

Elsőként a D-/L-ADP és D-/L-CDP nukleotidok hPGK iránti kötődési affinitását szerettem volna jellemezni a MD szimuláció szolgáltatata adatok segítségével, azaz dinamikai alapokon. A 27. ábrán a négy szimuláció 5 nanoszekundumonként készített pillanatképei láthatók. Az egyes szerkezeteket minden esetben a C-domén (nukleotid kötő domén) β magjára szuperponáltuk, hogy a nukleotid pozíciók könnyen összehasonlíthatók legyenek. Az ábráson egyértelműen látszik, hogy mind a D-, mind az L-ADP szorosan kötődik az enzimhez a szimuláció teljes időtartama alatt. A nukleotidok adenin bázisa végig mélyen beágyazva marad a C-domén hidrofób zsebében (Ala214, Gly238, Leu256, Phe291, Gly312 és Leu313; 8. ábra és 3. táblázat). Ezzel szemben a D- és L-CDP citozin bázisa igen nagy mozgékonyt mutat és igen rövid idő alatt kiszabadul a hidrofób zsebből. Ezen eltérő kötődési módok részletes feltérképezése érdekében, a következő három fehérje-nukleotid távolságot monitoroztuk a szimuláció során: Gly312 - nukleobázis, Glu343 – nukleotid ribóz része és Lys219 – nukleotid foszfátlánca (28. ábra). A Gly312 peptid O-atomja és a nukleobázis amino csoportja között kialakuló H-híd távolságának monitorozásával nyomon követhető, hogy a bázis milyen mértékben nyúlik a hidrofób zsebbe. Ez a távolság érték körülbelül végig állandó volt mind D-, és L-ADP esetén (28. (A) ábra). A Glu343 karboxil és a ribóz hidroxil csoportja közötti H-híd távolság elég változékonyan, de hasonló módon alakult mindkét ADP enantiomer esetén (28. (B) ábra). A Lys219 (NH_3 csoport) és az α -foszfát között kialakuló elektrosztatikus vonzás viszont az L-ADP esetében kevésbé érvényesül, mint D-ADP-nél. Ezen kontaktustávolság mindvégig nagyobb volt az L-ADP-re, néhol a 8 Å-t is meghaladta (28. (C) ábra). Szimulációink során az L-ADP foszfátlánc más kötő aminosavakkal (pl.: Asp218, Asn336, Thr375) kialakított kontaktusait is monitoroztuk, ezek is az L-foszfátlánc eltérő kötődési módját bizonyították. Az L-foszfátlánc kölcsönhatásai többnyire gyengébbek voltak, mint a D-foszfátláncé (nincs ábrázolva).



28. ábra Nukleotidkötő aminosavak és a vizsgált négy nukleotid között mért távolságok időfejlődése a 20 ns szimulációk során. **(A)** Gly312 peptid O – nukleobázis amino csoport, **(B)** Glu343 karboxil csoport – ribóz hidroxil csoport, **(C)** Lys219 NH₃ csoport - α -foszfát.

A két szubsztrát RMSF értékeit tekintve, megállapítható, hogy az L-ADP valamivel nagyobb flexibilitással rendelkezik, mint tükörképi párja (29. ábra). Míg a D-ADP atomi fluktuációi minden esetben 3 Å alatt maradnak, addig az L-ADP nukleobázisának amino N-atomjánál látható egy 3 Å-nél nagyobb fluktuációs csúcs. (Az RMSF értékeket minden nukleotid esetében a trajektóriák C-domén β magra történő superponálásával számoltuk, hogy eltávolítsuk a domén teljes translációs, rotációs mozgásait.)

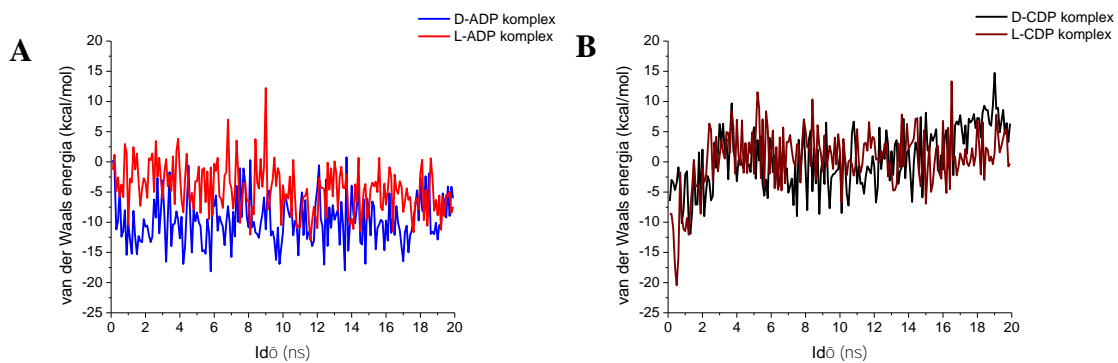


29. ábra (A) A nukleotid atomok 20 ns-ra átlagolt RMSF értékei a C-domén merev test szerű mozgásainak eltávolítását követően, D-ADP – kék görbe, L-ADP – piros görbe, D-CDP – fekete görbe, L-CDP – sötétpiros görbe. A D- és L-CDP igen nagy fluktuációt mutat a D- és L-ADP-hez képest. (B) Az ADP szerkezeti képlete az RMSF görbe vízszintes tengelyén szereplő atomtípusokkal. (C) A CDP szerkezeti képlete az RMSF görbe vízszintes tengelyén szereplő atomtípusokkal.

Szimulációink alatt a D- és L-CDP citozin bázisa igen rövid idő alatt disszociált a kötőzsebből (27. ábra). Valóban, a 28. (A) ábra alapján megállapítható, hogy a D-CDP nukleobázis a 17. nanoszekundum körül, míg az L-CDP nukleobázis már 2 nanoszekundum után elhagyta a hidrofób zsebet. Ezzel együtt a ribóz gyűrű sem kötődik olyan szorosan a Glu343 karboxil csoportjához, mint ADP esetében (28. (B) ábra). A Glu343 (karboxil csoport) – ribóz (hidroxil csoport) távolság mindkét CDP esetén meghaladta a 10 Å-t a szimuláció teljes időtartama alatt. Viszont a CDP enantiomerek foszfátlánca mindvégig a nukleotid kötőhely közvetlen közelében maradt

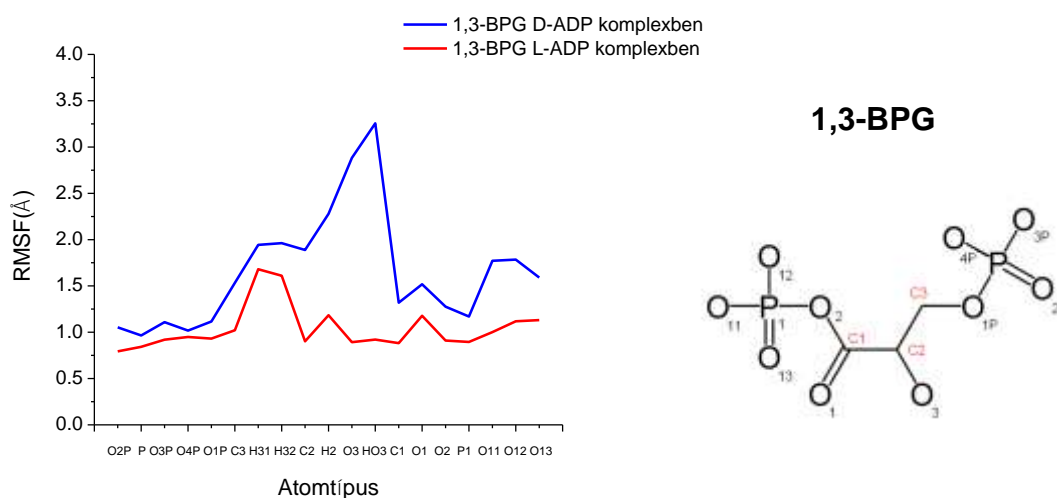
(28. (C) ábra), kölcsönhatásaik pedig többnyire stabilak voltak. (A 28. (C) ábra szerint ugyan a D-CDP foszfátlánc és a Lys219 között kötőgyengülés figyelhető meg a szimuláció végén, ez inkább a lizin oldallánc nagy fokú flexibilitásának köszönhető, mintsem a foszfátlánc mozgékonyságának.) Az atomi részletességgel számolt RMSF adatok is a CDP enantiomerek nagyfokú mozgékonyságáról és laza kötődéséről árulkodnak (29. ábra). A D-CDP bázis minden atomjára 5 Å feletti RMSF értékeket kaptunk, ami a hidrofób zsebből kiszabaduló citozin bázis nagy mértékű mozgási szabadságát tükrözi. A D-/L-CDP foszfátláncok fluktuációja viszont alacsony, jelezvén azok szoros kötődését.

A kötődési affinitás további jellemzése céljából a szubsztrátok és a fehérje között nemkötő kölcsönhatási energiákat (elektrosztatikus és van der Waals) számoltunk. Mivel az elektrosztatikus energia járuléka mindegyik nukleotidra azonos értékűnek adódott (-160 kcal/mol), a továbbiakban csak a van der Waals járulékokat ismertetem. Amint az a 30. (A) ábráról jól látszik, a van der Waals energia a D-ADP esetében -10 kcal/mol körül, míg L-ADP esetén -5 kcal/mol körül fluktuál, jelezvén a D-ADP valamivel nagyobb kötődési erősségét. A CDP enantiomerek van der Waals energiái igen rövid idő alatt (3 nanoszekundum) zérussá váltak, ami a részleges disszociációra utal (30. (B) ábra). Mivel a CDP enantiomerek részlegesen disszociáltak a hPGK kötőzsebéből, ezen nukleotidok komplexeit nem vetettük alá további analíziseknek.



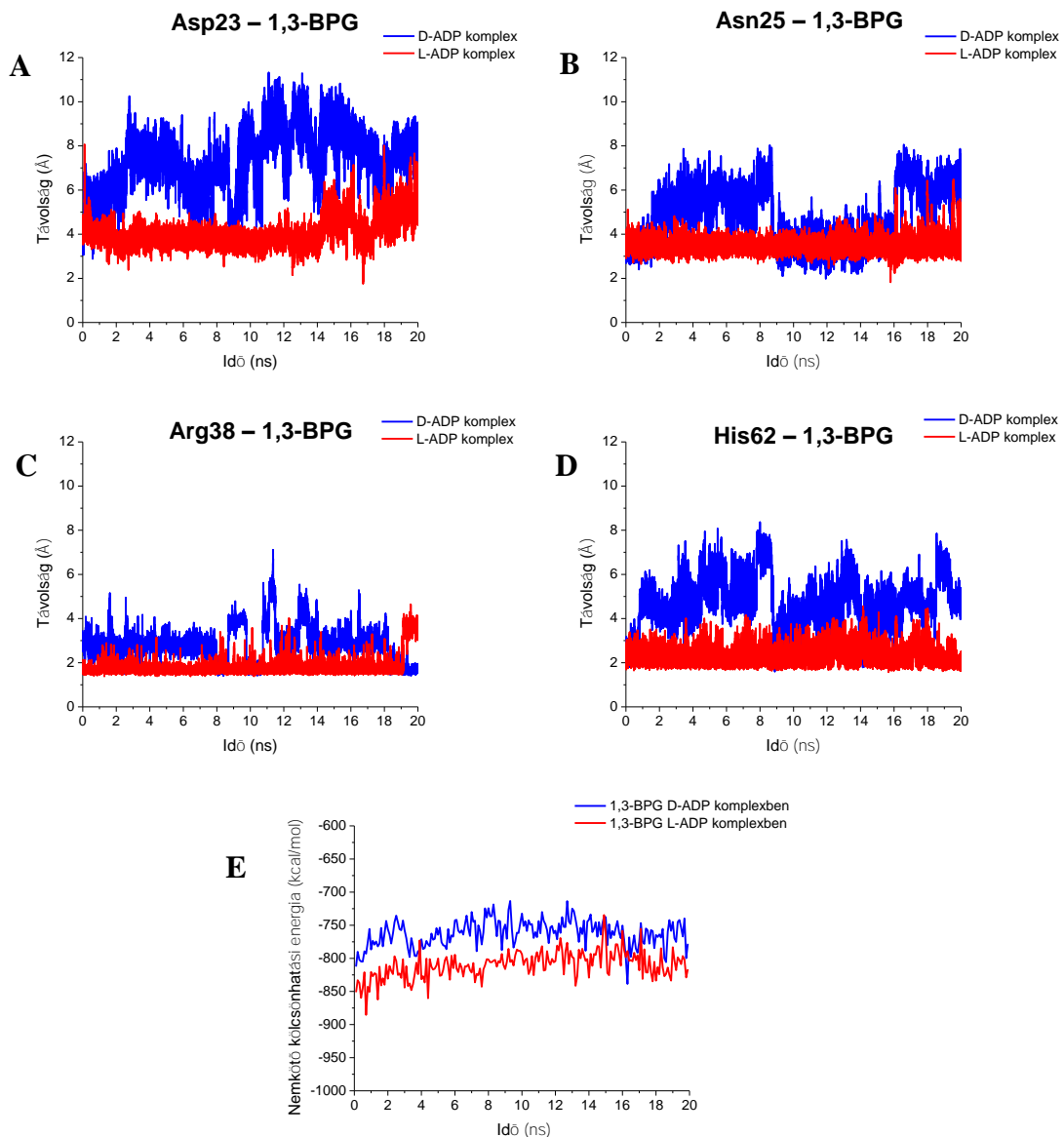
30. ábra Van der Waals energia a nukleotid kötőhely és a(z) (A) D-ADP (kék) / L-ADP (piros), (B) D-CDP (fekete) / L-CDP (sötétpiros) között. Az energia következetesen kisebb („mélyebb”) a szimuláció során a két ADP-re, mint a CDP-kre.

Az 1,3-BPG kötődés jellemzése D- és L-ADP jelenlétében. Az 1,3-BPG atomi részletességgel számolt RMSF értékei azt bizonyítják, hogy az 1,3-BPG a D-ADP komplexben nagyobb mozgékonyagra tesz szert, mint az L-ADP komplexben (31. ábra). Főként a molekula központi C-atomja (C2) és annak hidroxil csoportja (O3, HO3), valamint a foszfortranszfer során átadódó 1-foszfát O-atomjai (O11, O12, O13) mutatnak nagy fluktuációkat a D-ADP jelenlétében. Azért figyelemre méltóak ezek a fluktuációs különbségek, mert a lokális mozgások konvergáltak szimulációink időtartama alatt (mint azt a korrelációs analízis alkalmával bizonyítottam, lásd 5.1. fejezet).



31. ábra Az 1,3-BPG atomok 20 ns-ra átlagolt RMSF értékei a D-ADP komplexben (kék görbe) és az L-ADP komplexben (piros görbe) az N-domén merev test szerű mozgásainak eltávolítását követően. Az 1,3-BPG a D-ADP komplexben nagyobb fluktuációt mutat, mint az L-ADP komplexben. A grafikon mellett az 1,3-BPG szerkezeti képlete látható, az RMSF görbe vízszintes tengelyén szereplő atomtípusokkal.

Az 1,3-BPG és kötő aminosavai (Asp23, Asn25, Arg38 és His62; 10. ábra és 3. táblázat) között mért kontaktustávolságokat analizálva pedig megállapítható, hogy D-ADP jelenlétében az 1,3-BPG kölcsönhatásai gyengébbek, mint L-ADP jelenlétében (32. (A) – (D) ábra). Ezen eredményeket a szubsztrát nemkötő kölcsönhatási energiái is alátámasztják (32. (E) ábra). Míg a kölcsönhatási energia szimulációs átlaga -750 kcal/mol-nak adódott D-ADP jelenlétében, addig ez az L-ADP komplexben -820 kcal/mol volt. Azaz az 1,3-BPG kötődési erőssége D-ADP jelenlétében kisebb.

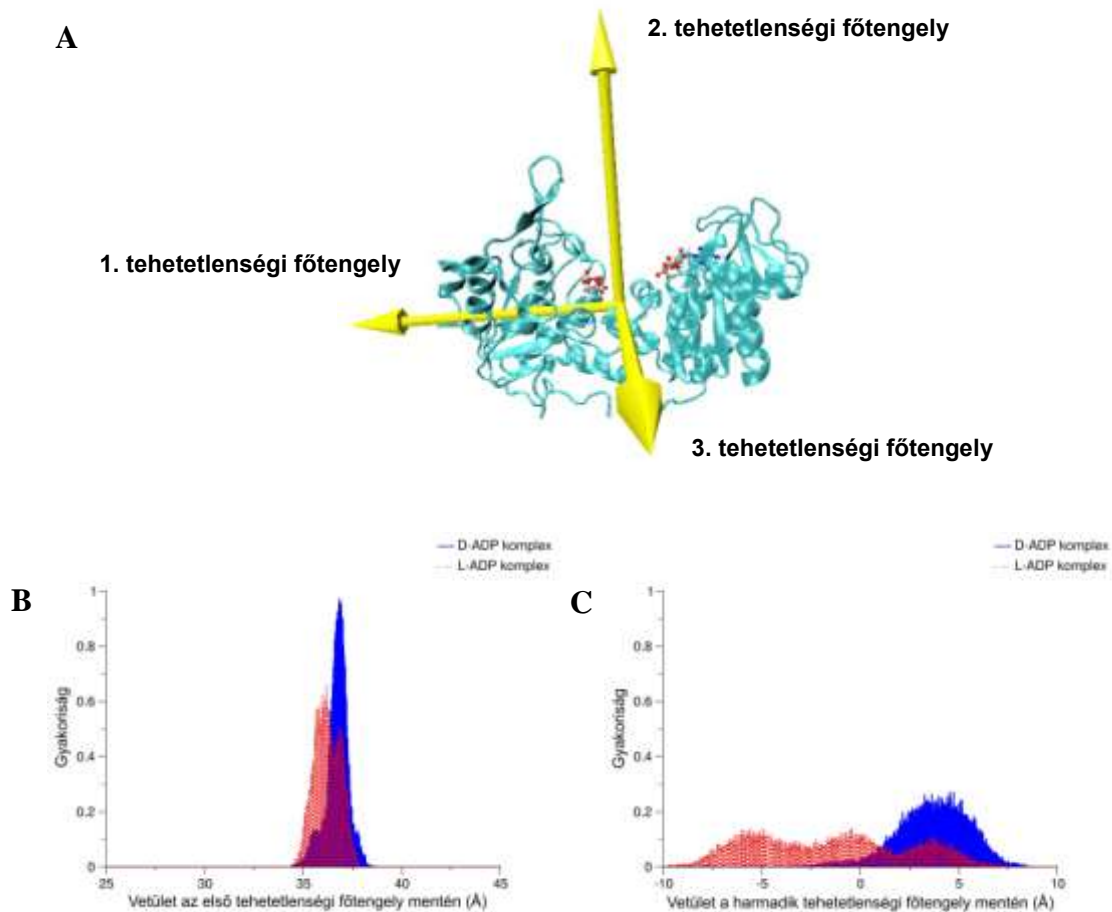


32. ábra Az 1,3-BPG és kötő aminosavai ((**A**) Asp23, (**B**) Asn25, (**C**) Arg38 és (**D**) His62) között mért távolságok időfejlődése a 20 ns szimulációk során. (**E**) Nemkötő kölcsönhatási energia az 1,3-BPG és kötőhelye között D-ADP (kék görbe) és L-ADP (piros görbe) jelenlétében. Az energia következetesen kisebb („mélyebb”) a szimuláció során az L-ADP komplexben.

A fehérjekonformációk gyakorisági eloszlása. A szubsztrátkiralitás kollektív dinamikára gyakorolt hatását elsőként a fehérjekonformációk gyakorisági eloszlásának vizsgálatával kezdtük. A fehérjekonformációkat a domén tömegközéppontokat

összekötő vektor tehetetlenségi főtengelekre eső vetületeivel jellemeztük. A fehérje tehetetlenségi főtengelei a 33. (A) ábrán láthatók. Az utóbbi ábrát összehasonlítva a 21. és 22. ábrákkal, megállapítható, hogy az első és harmadik tehetetlenségi főtengelel iránya rendre a csukló- és nyíró doménmozgás irányával egyezik meg. Mivel a második tehetetlenségi főtengelelre eső vetület nem azonosítható egyértelműen egyik PCA kollektív módussal sem (talán a csukló és csavarodó mozgásnak van ilyen irányú komponense is), így az ilyen irányú vetületeket a továbbiakban nem vizsgálom. Tehát csak az első és harmadik tehetetlenségi főtengelelre (csukló és nyíró irányú) eső vetületek gyakorisági eloszlásait mutatom be a 33. ábrán. Az összehasonlíthatóság érdekében az eloszlásokat normáltam, valamint az x tengely mentén azonos hosszúságú távolságtartományt alkalmaztam mindkét tehetetlenségi főtengelel esetében.

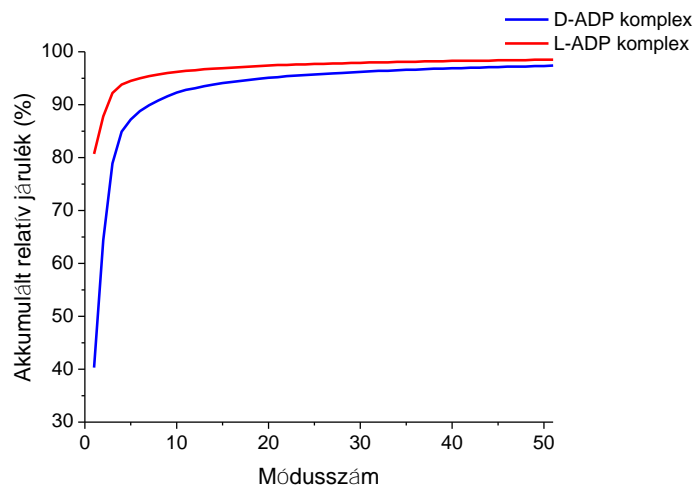
A 33. (B) ábrán az első tehetetlenségi főtengelelre eső projekciók gyakorisági eloszlásai láthatók D- és L-ADP komplexre. Az egyes csúcsok a fehérje különböző mértékben nyitott konformációinak felelnek meg. A D-ADP komplex esetén 37 Å-nél egyetlen jól definiált, nagy populációval rendelkező konformációs állapot jelenik meg. Ezzel szemben az L-ADP komplexnél két erősen átfedő konformációs csúcs figyelhető meg 36 és 37 Å-nél. Tehát a D-ADP komplexnél megfigyelt állapot mellett (37 Å) egy kevésbé nyitott konformációjú állapot (36 Å) is dominánssá válik az L-ADP komplexben. A 33. (C) ábra alapján elmondható, hogy az L-ADP komplex konformációs állapotainak gyakorisági eloszlása jelentős mértékben kiszélesedik a harmadik tehetetlenségi főtengelel mentén. Tehát a nyíró irányú doménfluktuációk erősen dominálnak az L-ADP komplexnél, azaz nagy a nyíró irányú flexibilitása a rendszernek. A D-ADP komplex esetében is megfigyelhető egy mérsékelt kiszélesedés nyíró irányban, de korántsem olyan mértékű, mint az L-ADP komplexnél.



33. ábra (A) A hPGK molekula három tehetetlenségi főtengelye. (B, C) A domének tömegközéppontjait összekötő vektor (B) első és (C) harmadik tehetetlenségi főtengelyre eső vetületeinek gyakorisági eloszlásai a D-ADP - (kék) és L-ADP (piros) komplexekben. Az L-ADP komplex konformációs állapotainak gyakorisági eloszlása jelentős mértékben kiszélesedik a harmadik tehetetlenségi főtengely mentén.

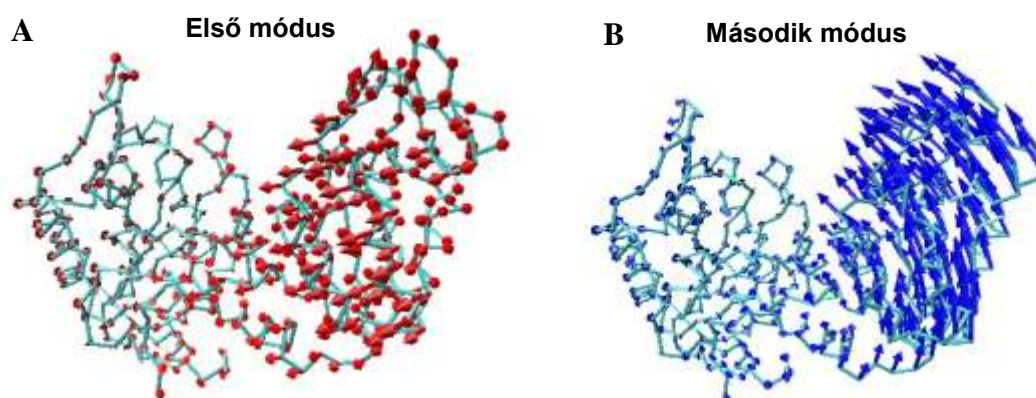
Az L-ADP komplex kollektív mozgásainak vizsgálata PCA módszerrel. A D-ADP komplexnél ismertetett (5.1. fejezet) módon számoltunk PCA módusokat L-ADP komplexre is. Azaz a számolások előtt eltávolítottuk a teljes fehérjét érintő translációs-rotációs mozgásokat az N-domén β mag szuperponálási módszerrel. Ezzel a C-domén N-doménhez viszonyított relatív mozgásai válnak analizálhatóvá. C-domén β magra végzett szuperpozícióval is számoltuk az L-ADP komplex PCA módusait, mivel az eredmények ekvivalensek voltak az N-domén β magra szuperponált esetben tapasztaltakkal, ezen eredményeket nem ismertetem. A PCA sajátértékeket és sajátvektorokat továbbra is csak C_{α} -atomokra számoltuk.

A 34. ábrán a sajátértékek teljes fehérjefluktuációhoz (MSF) adott, százalékban kifejezett akkumulált, relatív járuléka láthatók (összehasonlításképpen a D-ADP komplex görbéje is fel van tüntetve az ábrán). Már az első 3 sajátérték a fehérje teljes fluktuációjának 92 %-ához, az első 6 sajátérték pedig a 95 %-ához járul hozzá. Lebontva az első három módusra, az 1. / 2. / 3. módusok sajátértékei rendre a teljes fluktuáció 80,7 % / 7,0 % / 4,5 %-áért felelősek $3776,3 \text{ \AA}^2$ / $328,0 \text{ \AA}^2$ / $208,8 \text{ \AA}^2$ értékekkel (nincs ábrázolva). Figyelemre méltó, hogy az első módus a maga 80,7 %-os járulékaival rendkívül domináns a többi módushoz képest. Feltehetően ez az egy módus önmagában meghatározza a kollektív mozgás uralkodó jellegét. Összevetve a C_{α} atomok első négy módus mentén számolt RMSF értékeit a teljes RMSF értékekkel, megállapítható, hogy az első két módus elegendő az L-ADP komplex kollektív doménmozgásainak leírására (nincs ábrázolva). Így a továbbiakban csak az első két módust tanulmányoztam.



34. ábra A PCA sajátértékek akkumulált, relatív járuléka a teljes fehérjefluktuációhoz (MSF) D-ADP komplex (kék görbe) és L-ADP komplex (piros görbe) esetén. Az ábrán csak az első 50 sajátérték járuléka vannak feltüntetve. Az L-ADP komplex esetében már az első 3 sajátérték a fehérje teljes fluktuációjának 92 %-ához járul hozzá.

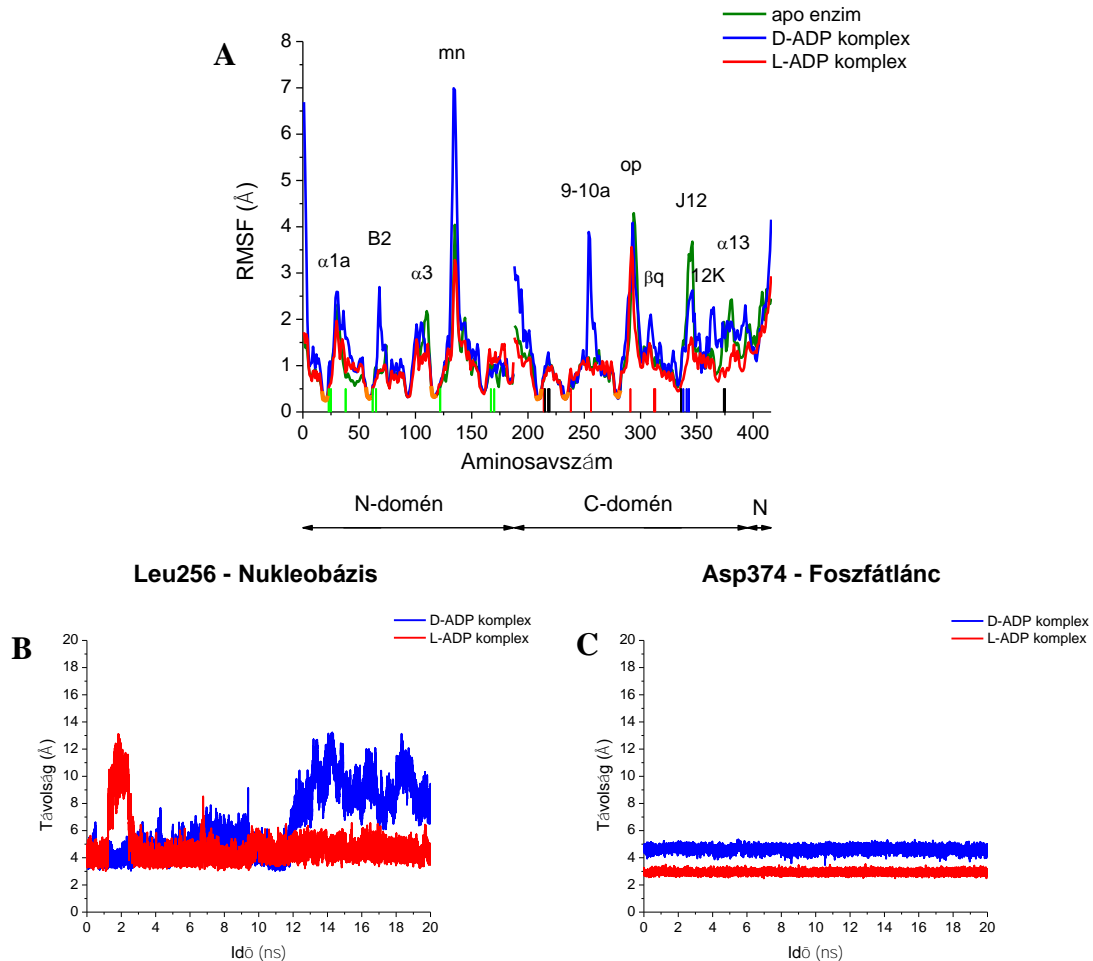
A 35. ábra az L-ADP komplex C_{α} -atomjainak első ((A), piros) és második ((B), kék) PCA módusokhoz tartozó komponens vektorait ábrázolja a fehérje háromdimenziós, C_{α} -reprezentációján. Jól látszik, hogy mindkét módus esetében a C-doménhez tartozó komponens vektorok amplitúdója nagyobb, mint az N-doménhez tartozóké. Érthető, hiszen N-domén β magra szuperponált trajektóriákra számoltam a PCA módusokat, így az ábrák a C-domén N-doménhez viszonyított relatív mozgását mutatják. Mindkét módusra igaz, hogy a C-domén C_{α} -atomok elmozdulásai erősen korreláltak. Tehát a módusok a C-domén merev test szerű mozgását jellemzik. A 35. ábra alapján elmondható, hogy az L-ADP komplex első PCA módusa a C-domén N-doménhez viszonyított nyíró mozgását, a második módus a csuklómozgását írja le.



35. ábra Az L-ADP komplex C_{α} -atomjainak (A) első (piros) és (B) második (kék) PCA módushoz tartozó komponens vektorai a fehérje 3 dimenziós, C_{α} -reprezentációján. Az első módus a C-domén N-doménhez viszonyított nyíró mozgását, a második módus a csuklómozgását írja le.

A D- és L-ADP komplex lokális mozgásainak fluktuációs analízise. A 36. (A) ábrán az apo enzim valamint a D- és L-ADP komplex C_{α} -atomjaira számolt RMSF értékeket mutatom be. Ugyan az apo enzim és a D-ADP komplex RMSF görbéjét az 5.1. fejezetben már ismertettem, a szubsztrátkiralítás lokális hatásainak feltérképezése érdekében – összehasonlításképpen - ismét bemutatom őket az L-ADP RMSF görbéjével együtt. A fluktuációk számítása előtt eltávolítottuk a két domén merev test szerű translációs, rotációs mozgásait. A korábban tárgyalt módon, a trajektória szerkezeteit a szimuláció első szerkezetének egyik illetve másik domén β magjára

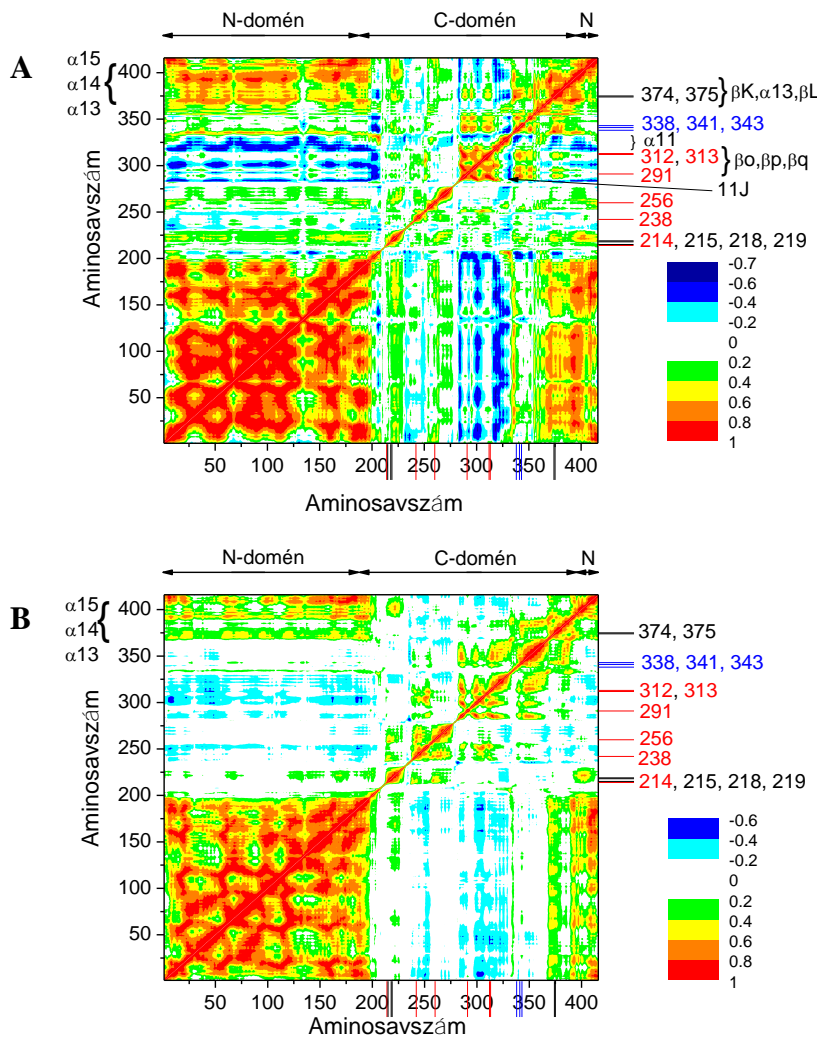
szuperponáltuk külön-külön. Míg a 36. (A) ábra N-doménre vonatkozó részét (aminosavszám: 1-187, 396-416) az N-domén β magra szuperponált trajektóriákból, addig a C-doménre vonatkozó részt (aminosavszám: 188-395) a C-domén β magra szuperponált trajektóriákból számoltuk.



36. ábra (A) Az apo enzim (zöld görbe), a D-ADP komplex (kék görbe) és az L-ADP komplex (piros görbe) 20 ns-ra átlagolt C_{α} RMSF értékei, a domének merev test mozgásainak eltávolítását követően. A görbék narancssárga, vastagon szedett részei a β magok elemeit, a függőleges vonalak pedig a szubsztrátkötő aminosavakat (zöld – 1,3-BPG kötő, fekete – nukleotid foszfátlánckötő, kék – ribózkötő, piros – báziskötő) jelölik. **(B, C)** Nukleotidkötő aminosavak ((**B**) Leu256, (**C**) Asp374) és a D-/L-ADP között mért távolságok időfejlődése a 20 ns szimulációk során.

Az ábra alapján általánosan megállapítható, hogy a lokális fluktuációk hasonlóak mindhárom rendszerben. A hurok régiók rendelkeznek a legnagyobb flexibilitással. Ezen túlmenően lényegi különbség a D- és L-ADP görbéje között, hogy bizonyos fluktuációs csúcsok az L-ADP komplexben nem, vagy sokkal kisebb mértékben jelentkeznek, mint a természetes komplexben. Így például a báziskötő aminosavakat tartalmazó szerkezeti elemek (9-10a, α hurok, β redő), melyek a D-ADP kötődésével nagy flexibilitásra tettek szert, az L-ADP komplexben hasonlóan alacsony fluktuációkat mutatnak, mint az apo rendszerben. (A kötő aminosavakat az ábrán függőleges vonal jelzi az x tengelyen, fekete – foszfátkötő, kék – ribózkötő, piros – báziskötő.) A ribóz- és foszfátkötő szerkezeti elemek (J12 hurok, α 13 hélix), melyek D-ADP kötődésével rigidebbé váltak, L-ADP komplexben még inkább veszítenek flexibilitásukból. Valószínűsíthetően az mn hurok flexibilitás csökkenését nem az eltérő nukleotidkiralitás okozza, hiszen igen távol helyezkedik el a nukleotid kötőhelytől (15. ábra). Megvizsgálva a 9-10a és az α 13 szerkezeti elemek nukleotidkötő aminosavainak (Leu256 - báziskötő és Asp374 - foszfátkötő) távolságát a nukleotidok megfelelő csoportjaitól, azt találtuk, hogy az L enantiomer mindkét oldallánchoz szorosabban kötődik (36. (B, C) ábra), ami megmagyarázza a fehérjefluktuáció csökkenéseket.

A D- és L-ADP komplexek korrelációs analízise. A 37. ábrán a D- és L-ADP komplexek C_{α} -atomjaira számolt kereszt-korrelációs mátrix látható. A D-ADP komplex kereszt-korrelációs mátrixát már az 5.1. fejezetben tárgyaltam, itt csak az L-ADP komplexszel történő könnyebb összehasonlítás érdekében szerepel ismét. A korrelációk számítása előtt eltávolítottuk a dinamikából a fehérje egészét érintő translációs, rotációs mozgásokat. A trajektória szerkezeteit C-domén β magjuknál fogva a szimuláció első szerkezetének C-domén β magjára szuperponáltuk. Ezzel a szubsztrátkiralitás C-doménon belüli mozgásokra kifejtett hatását követhettük nyomon. N-domén β magra végzett szuperpozíció mellett is számoltunk korrelációkat, azonban az N-doménon belüli mozgások korrelációiban nem okozott észrevehető különbséget a nukleotid kiralitásváltozása, így ezen eredményeket nem mutatom be.



37. ábra A C_{α} -atomok elmozdulásainak 20 ns-ra számolt kereszt-korrelációs mátrixa **(A)** D-ADP komplexre és **(B)** L-ADP komplexre, C-domén β magra történő szuperpozíciót követően. Pirossal az azonos irányú mozgást (korreláció), késsel az ellentétes irányú mozgást (antikorreláció) szemléltetjük. Az ábrák x és y tengelyén a fekete vonalak a nukleotid foszfátláncát kötő, a kék vonalak a ribózkötő, a piros vonalak pedig a báziskötő aminosavakat jelölik.

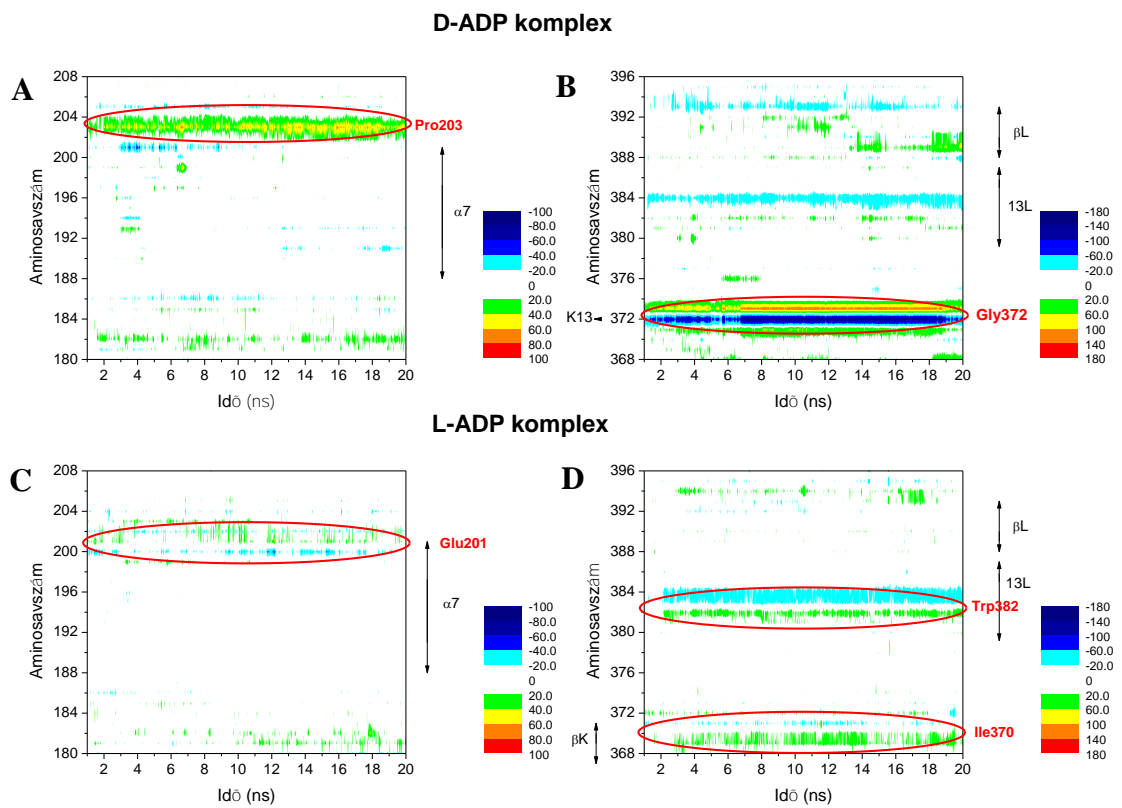
A 37. (A) és (B) ábrák jobb felső négyzete a C-doménon belüli mozgások korrelációit jeleníti meg. Általánosságban elmondható, hogy korrelációs mintázat nagyon hasonló a két komplexben. Mindkét rendszernél jellemzően a nukleotid kötőhelyek között alakul ki nagyobb pozitív korreláció. Ezek a korrelációk a D-ADP komplexben többnyire erőteljesebbek, bár a Gly238 és a Leu256, Phe291, Gly312, Leu313 kötőhelyek közötti

korreláció az L-ADP komplexben hangsúlyosabb. Továbbá, a D-ADP komplex esetében megfigyelhető o, p, q - 11J és β K, α 13, β L - α 11 szerkezeti párok antikorrrelációja nem jelentkezik az L-ADP komplexben.

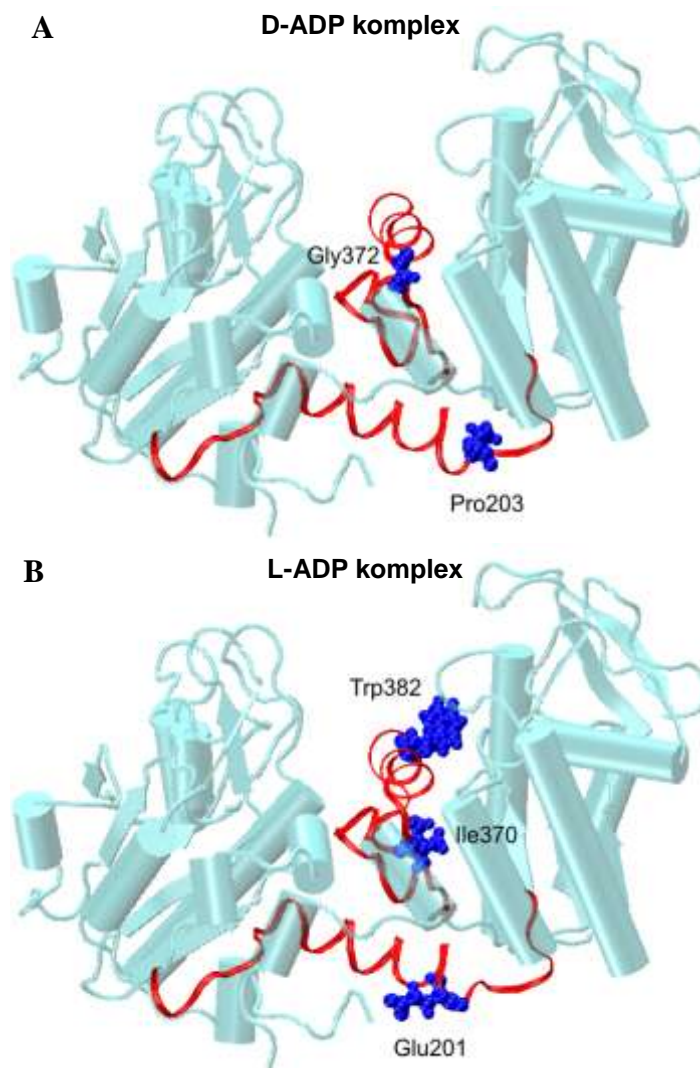
A 37. (A) és (B) ábrák bal alsó vörös négyzete azt jelzi, hogy az N-domén merev test szerű mozgást végez a C-doménhez képest mindkét rendszer esetén. A két ábra bal felső négyzeteit összehasonlítva megállapítható, hogy az L-ADP komplex C-terminálisa is, hasonlóan a D-ADP komplexhez, nagyobb pozitív korrelációkat mutat az N-doménnel. Emellett mindkét rendszer esetén nyomon követhető a két domén mozgásának antikorrreláltsága.

Az L-ADP komplex csuklópontjainak meghatározása. Az L-ADP komplex csuklópontjainak azonosításához az 5.1. fejezetben már ismertetett módszert alkalmaztam. A peptidgerinc C_{α} -atomjai között definiált torziós szögek referencia szerkezethez (szimuláció első szerkezete) viszonyított változásait analizáltuk. A 38. ábrán a torziós szögváltozások időbeli fejlődése követhető nyomon D- és L-ADP komplex esetén. A D-ADP komplex interdomén torziós szögváltozásait már fentebb ismertettem, itt csupán összehasonlításként szerepel ismét.

Az ábra (A) (D-ADP komplex) és (C) (L-ADP komplex) részén az α 7 hélix körüli - 180-208 aminosavszerű - interdomén tartomány torziós szögváltozásai láthatók. Mindkét rendszer esetén az α 7 hélix C-domén felőli végén figyelhetők meg nagyobb szögváltozások: D-ADP komplexnél a Pro203-nál, míg L-ADP komplexnél a Glu201-nél. Tehát a nukleotid kiralitásától függetlenül mindkét esetben funkcionál csuklópont az α 7 hélix C-terminálisánál (39. ábra). A 38. ábra (B) és (D) része a fehérje C-terminálisa előtti - 368-396 aminosavszerű - interdomén tartomány torziós szögváltozásait prezentálja. A két rendszer egyes csuklópontjai nem pontosan ugyanott helyezkednek el, de megfeleltethetők egymással, hiszen ugyanazon szerkezeti elemekben találhatók: β K redő C-terminálisánál: D-ADP komplexben Gly372, L-ADP komplexben Ile370; 13L huroknál: D-ADP komplexben Asn383, L-ADP komplexben Trp382. Alapvető különbség a két rendszer között, hogy a β K C-terminális csuklópontnál a szögváltozás amplitúdója D-ADP komplexben jóval nagyobb, és ezzel a Gly372 válik domináns csuklóponttá ebben a rendszerben. Az L-ADP komplex két csuklópontjánál mérsékelt szögváltozások jelentkeznek, melyek nagyságrendileg összemérhetők egymással (38. és 39. ábra).



38. ábra Az egymást követő C_{α} -atomok között definiált torziós szögek változásai a szimuláció első szerkezetéhez képest a D-ADP - (**A**, **B**) és L-ADP (**C**, **D**) komplex két interdomén régiójában. A nagy torziós szögváltozást mutató szerkezeti elemeket (csuklópontok) piros ellipszis jelöli.



39. ábra A csuklópontok (kék van der Waals gömbök) elhelyezkedése a **(A)** D-ADP - és az **(B)** L-ADP komplex szerkezetében. A két interdomén régiót piros szalag reprezentáció szemlélteti. A szubsztrátok nincsenek jelölve egyik komplex enzimben sem.

6.

Megbeszélés

6.1. A szubsztrátkötődés hatása a dinamikára

A domén tömegközéppontok távolságának időbeli fejlődését nyomon követve, információt szerezhettünk a domének relatív helyzetváltozásairól (13. ábra). Az eredmények alapján megállapítható, hogy mind az apo enzim, mind pedig a D-ADP komplex esetén megfigyelhető domén közeledés és távolodás. Tehát csuklómozgásra utaló jeleket mutat mindkét rendszer. Míg a mozgás periódusideje 20 nanoszekundum körül lehet az apo esetben, addig az feltehetően hosszabb a komplex rendszer esetén. Fontosnak tartom azonban megjegyezni, a szimulációs időtartam korántsem elegendően hosszú ahhoz, hogy biztonsággal állíthassuk, az apo rendszernél a doménmozgás periódusideje 20 nanoszekundum (a szimulációs időablak éppen 20 nanoszekundum volt). Eredményeink összhangban vannak a Haran és mtsai által PGK-ra végzett kísérleti jellegű munkákkal (142). Mutagenézist és fluoreszcencia energia transzfer módszert alkalmazva kimutatták, hogy az oldott apo enzim már nanoszekundumos időskálán is nagyszámú konformációs állapotban képes létezni és részleges doménzáródás figyelhető meg a nyílt konformációjú kristályszerkezetekhez képest. Ezzel szemben a természetes terner komplex (D-ADP komplex) ugyanezen időskálán jóval kevesebb konformációs állapotot térképez fel, és mindvégig nyílt konformációjú marad. Zerrad és mtsai (98) oldatban végzett SAXS mérésekkel bizonyították, hogy a komplex enzim ideje nagy részét teljesen nyílt konformációban tölti, a doménzáródás és maga a katalízis viszont igen rövid idő alatt játszódik le. Ezzel marad ideje a szubsztrátoknak és a produktumoknak diffúzióval bejutni illetve távozni a kötőhelyekről.

Szimulációink kiindulási szerkezetei mindkét rendszer esetében nyitott konformációjú kristályszerkezetből lettek származtatva. Ehhez képest mind az apo enzim, mind a komplex mutat további, bizonyos mértékű doménnyitódást. Zerrad és mtsai SAXS mérései szerint az oldott enzim nyugalmi állapotában jóval nyíltabb konformációt vesz fel, mint azt a különböző eredetű, nyitott konformációjú kristályszerkezetek mutatták.

Ezek a mérések tehát igazolják szimulációink érvényességét.

A szubsztrátkötődés hatása az enzim lokális mozgásaira. A C_{α} -atomok RMSF analizisével számot adtunk a fehérje lokális mozgásairól (14. ábra). Az eredmények alapján általánosan elmondható, hogy a mind az apo enzimben, mind a D-ADP komplexben a hurok régiók nagy flexibilitással rendelkeznek, ami jó egyezést mutat a csoportunk által élesztő PGK-ra közölt korábbi szimulációs eredményekkel (125). A fluktuációs adatok ismeretében az is megállapítható, hogy az 1,3-BPG kötődése a kötőhelye körüli aminosavak flexibilitását növeli. A D-ADP kötődés hatása összetettebb. Míg a foszfát- és ribózkötő aminosavak rigiditása, addig néhány báziskötő aminosavnak a flexibilitása nő a D-ADP kötődése által. A nukleobázist tehát egy többnyire laza hidrofób zseb veszi körül. Ezzel szemben a negatívan töltött foszfátláncot a kötő aminosavak elektrosztatikus kölcsönhatásai mereven tartják, feltehetően ennek köszönhető a ribóz- és foszfátkötő aminosavak flexibilitás csökkenése is. A katalízis szempontjából az utóbbi jelenségnek nagy jelentősége van, hiszen a foszfátlánc megfelelő pozicionálásval és a doménzáródással az akceptor β -foszfát kedvező orientációba kerülhet a foszfo-transzfer során. Valóban, ezen elektrosztatikus kölcsönhatásoknak köszönhető, hogy a foszfátlánc a C-doménből kifelé, az 1,3-BPG irányába mutat (97).

Fluktuációs analizisünk továbbá megmutatta, hogy a domének β magjai igen merev szerkezeti egységet képeznek a domének centrumában. Ez rámutat arra, hogy a β magok bizonyosan jó referenciapontként használhatók intradomén mozgások vizsgálatánál. Amennyiben a trajektória szerkezeteit az első szerkezet valamely doménjének β magjára szuperponáljuk, feltérképezhetővé válnak a domén egyes szerkezeti elemeinek β maghoz viszonyított intradomén mozgásai. Az itt leírt β mag szuperponálási technikát már röntgen-krisztallográfusok is alkalmazták szerkezeti elemek relatív elmozdulásainak vizsgálatára (101). Számolásaink tehát bizonyítják a módszer érvényességét.

A szubsztrátkötődés hatása az intra- és interdomén mozgások korrelációira. A C_{α} atomi elmozdulások korrelációinak számításával a fehérjedinamika további feltérképezése vált lehetővé (16. és 17. ábra). Analízisünk eredményei alapján az

interdomén mozgások egyértelműen kollektív jelleget mutattak mindkét rendszer esetén. A teljes N- illetve C-domén merev test szerűen együtt mozog, egymáshoz képest antikorreálán (mozgásuk irányultsága ellentétes).

A korrelációs analízis további figyelemre méltó eredménye, hogy a C-terminális mindkét rendszerben jelentős pozitív korrelációkat mutat az N-domén egészével. Azaz a C-terminális együtt mozog az N-doménnel. Ez érthető, hiszen a rendelkezésre álló kristályszerkezetek alapján egyértelmű, hogy a C-terminális visszahajlik az N-doménhez és annak szerkezetileg szerves részét képezi (143). Fontos megjegyezni, hogy ez a korreláció a D-ADP komplex esetén erőteljesebb és a C-terminális kiterjedtebb részét ($\alpha 14$ és $\alpha 15$ mellett $\alpha 13$ hélixet is) érinti.

Az intradomén mozgások korrelációs analízise alapján általánosan megállapítható, hogy a szubsztrátok kötődésével mind az N-, mind a C-doménon belüli mozgások korrelációja megnőtt. Az N-doménon belüli mozgások korrelációja egyik rendszer esetében sem jelentős. A C-doménben viszont a nukleotid kötő aminosavak között jelentős korrelációk mutatkoznak mindkét rendszer esetén. Tehát a kötő aminosavak szervezeten, együtt mozognak a szimuláció során. Bár szekvenciálisan távol lévő aminosavakról van szó, a kötőhely kialakításában együtt vesznek részt, tehát sztérikusan közel helyezkednek el. Feltehetően a térbeli közelségből adódó erős kontaktusoknak köszönhetőek ezek a korrelációk. A D-ADP komplexben bizonyos bázis- és ribózkötő aminosavak korrelációjának további erősödése figyelhető meg, ami feltehetően a bekötődő nukleotid közvetítő szerepével magyarázható. További érdekes jellegzetessége a D-ADP komplex dinamikájának, hogy bizonyos, a C-domén ellentétes oldalán található szerkezeti elemek erős antikorreálációt mutatnak egymással, ami valószínűsíthetően a domén csavarodó mozgására utal. Mint azt az irodalmi áttekintésben említettem, Guilbert és mtsai (123) NMA módszerrel vizsgálta az élesztő PGK kollektív mozgásait, eredményeinkkel összhangban számításaik szintén jósltak csavarodó jellegű doménmozgást.

Kollektív mozgások. A PCA módusok kiszámításával a fehérje kollektív mozgásait kívántuk jellemezni. Eredményeink alapján elmondható, hogy az 1248 PCA módus közül mindössze az első három segítségével leírható a rendszerek kollektív mozgása (21. és 22. ábra).

Apo enzim esetében az első három módus rendre nyíró, csukló és csavarodó doménmozgásnak felel meg. Ez azt jelzi, hogy apo enzim esetében a nyíró jellegű doménmozgás (fehérjefluktuáció 40,1 %-a) dominánsabb a csukló jellegűnél (fehérjefluktuáció 30,3%-a), de utóbbi is fontos komponense a fehérjedinamikának. A fehérjefunkció ismeretében első pillantásra ugyan meglepőnek tűnhet a nyírómozgás domináns volta, mégsem az, hiszen – mint arról az irodalmi áttekintésben már írtam – a doménmozgás különböző jellegű mozgások szuperpozíciójaként áll elő. Tehát nem létezik tisztán csukló- vagy nyíró jellegű doménmozgás. Emellett megjegyezném, hogy Gerstein és mtsai (69) egy korai munkában, mikor a PGK zárt konformációjú kristályszerkezetei még nem álltak rendelkezésre, a nyitott szerkezetek alapján és más ismert dinamikájú fehérjékkel való összehasonlítás alapján, nyíró doménmozgást jósolt PGK-ra. Érdekes módon a hPGK kollektív dinamikai repertoárja a nyíró és csuklómozgáson kívül – a Gerstein-féle osztályozásban nem szereplő – csavarodó doménmozgással is bővül. Ezen mozgás során a fehérje doménje egy, a doméntesten áthaladó tengely körül forog (21. (C) ábra). A PCA szolgáltatja eredmények összhangban vannak Guilbert és mtsai NMA számításaival (123), melyek szintén csukló, nyíró és csavarodó jellegű mozgáskomponenseket jósoltak az élesztő PGK kollektív mozgásaira.

D-ADP komplex esetén szintén a fentebb említett három mozgásforma határozza meg a kollektív mozgást, viszont itt az első módus csavarodó, a második csukló, a harmadik pedig nyíró doménmozgást ír le. Tehát a komplex rendszer dinamikájában a csavarodó doménmozgás (40,3%-a a teljes fehérjefluktuációnak) bizonyult dominánsnak, de a csukló jellegű mozgás (fehérjefluktuáció 24,1%-a) is meghatározó eleme a kollektív mozgásnak. Az eredmény megerősíti a korrelációs analízis alkalmával megfogalmazott feltételezésünket, miszerint a D-ADP komplex C-doménjének átellenes oldalain megfigyelhető antikorrrelációk, annak csavarodó jellegű mozgására utalhatnak. Zerrad és mtsai (98) SAXS és DEN (deformable elastic network refinement) módszereket alkalmazva megmutatták, hogy a hPGK katalitikus körülmények között valóban végez csavarodó jellegű doménmozgást, ami ahhoz szükséges, hogy a szubsztrátok a doménzáródás során „egy vonalba” kerülhessenek.

A szubsztrátkötődés és a csuklópontok kapcsolata. A doménmozgások további karakterizálása céljából azonosítottuk a fehérje csuklópontjait. Az apo enzim esetében az $\alpha 7$ hélix C-domén felőli végén kettő (Val199, Ser202), a C-terminális előtti régióban – a nukleotid kötőhely közelében – három csuklópont (Gly372, Asn383, Thr393) működik (26. (A) ábra). D-ADP kötődés hatására azonban lecsökken a csuklópontok száma, egy-egy működő csuklópont marad az $\alpha 7$ hélixnél (Pro203) és a C-terminálnál (Gly372), melyek közül az utóbbi dominánssá válik (26. (B) ábra). A Gly372 csuklópontra mivoltát korrelációs analízisünk is megerősíti. D-ADP kötődés hatására ugyanis nagy pozitív korreláció jelenik meg az $\alpha 13$ hélix és a teljes N-domén között (17. (B) ábra). Míg az $\alpha 13$ hélix után (szekvenciálisan) elhelyezkedő szerkezeti elemek erősen korrelálnak az N-doménnel, addig az $\alpha 13$ hélix előtt elhelyezkedő szerkezeti elemek viszont már nem korrelálnak vagy antikorrrelációt mutatnak az N-doménnel. A korrelációs minta határa pontosan az $\alpha 13$ hélix előtt elhelyezkedő Gly372-nél (K13 hurok, 2. táblázat) van. Tehát a Gly372 körül szűnnek meg, vagy kezdenek a szerkezeti elemek az N-doménnel együtt mozogni.

Kísérleti munkák is jó egyezést mutatnak eredményeinkkel. Például Szilagyi és mtsai nyitott (sertésizom D-ADP*3-PG*PGK) és zárt (*Trypanosoma brucei* D-ADP*3-PG*PGK) konformációjú kristályszerkezetek molekuláris grafikai összehasonlításával szintén csuklópontként azonosították az $\alpha 7$ hélix C-domén felőli végét (101). Emellett a βL redőt – mint fentebb említettem – fő csuklópontként határozták meg (aminosavszintű pontosság nélkül), ami szintén egyezést mutat az apo enzimre kapott eredményeinkkel, hiszen a Thr393 csuklópont része a βL redőnek. Ezzel szemben a K13 hurokban található Gly372, mint a D-ADP komplex domináns csuklópontja, nyilvánvaló eltérést jelent Szilagyi és mtsai eredményeihez képest.

A domén tömegközéppont távolság vizsgálatnál nyilvánvalóvá vált, hogy az apo enzim flexibilisebb, egységnyi idő alatt több konformációs állapotot térképez fel, mint a D-ADP komplex. Ezzel együtt az apo rendszer esetében több csuklópontot sikerült azonosítani, mint a komplexben. Valószínűsíthető tehát, hogy a csuklópontok mennyisége összefüggésben van a fehérje számára elérhető konformációs tér nagyságával. A csuklópontok számának növekedésével nő azon pontok száma, melyek körül a domén rotációt végezhet, azaz nő a szabadsági fokok száma, következésképpen a fehérje flexibilisebb lesz. Feltehetően ennek köszönhető, hogy az apo enzim esetében

már a nanoszekundumos időskálán is látható a doménfluktuációk egy teljes periódusa. Ezzel szemben a D-ADP komplexben egyetlen fő csuklópont koordinálja a doménmozgásokat, így lecsökken a fehérje számára elérhető konformációs tér nagysága, a fehérje doménmozgása irányítottabbá válik. Ezen körülmény pedig kedvező a katalízis szempontjából, hiszen a fehérje nem katalitikusan irreleváns konformációkban tölti az idejét, hanem irányítottan találja meg a legkedvezőbb aktív konformációt.

6.2. A szubsztrátkiralitás hatása a dinamikára

A D-/L-ADP és D-/L-CDP nukleotidok kötődési affinitása. A szimulációk szolgáltatott dinamikai adatok segítségével jóslatokat tettünk a különböző nukleobázisú (ADP, CDP) és kiralitású (D, L enantiomerek) nukleotidok kötődési affinitására vonatkozóan. Az eredmények azt sugallják, hogy a D- és L-ADP kötődési affinitása igen hasonló, valószínű az L-ADP valamelyest kisebb affinitással rendelkezik, amit az irodalmi adatok is igazolnak (lásd K_d adatok az 5. táblázatban, (106)). A csekély különbségért főként az L-ADP foszfátlánc gyengébb kötődése és az L-nukleobázis nagyobb mértékű flexibilitása tehető felelőssé (28. és 29. ábra). Például a foszfátlánc és a Lys219 közötti elektrosztatikus vonzás L-ADP esetén kevésbé érvényesült szimulációnk során. Ez összhangban van az irodalmi áttekintésben már említett, Varga és mtsai (106) által végzett mutációs kísérletekkel. Eszerint a Lys219 fontos szereppel bír a foszfátlánc pozícionálásában. A Lys219 Ala-ra történő mutálásával ugyanis minden esetben csökkent a nukleotidok kötődési affinitása és az enzim katalitikus hatékonysága.

Szimulációink során mindkét CDP enantiomer igen lazán kötődött a hPGK-hoz. Mind a D-, mind az L-bázis igen rövid idő alatt disszociált a hidrofób kötőzsebből. Emellett viszont foszfátláncuk mindvégig viszonylag szorosan kötődött a kötőhelyhez (27. és 28. ábra). A fluktuációs görbék is a bázisok mobilitásáról és a foszfátláncok rigiditásáról árulkodnak (29. ábra). A CDP nukleotidok nemkötő kölcsönhatási energiái szintén a gyenge kötődést bizonyítják (30. ábra). Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a D- és L-CDP kötődési affinitása a hPGK iránt jóval kisebb, mint az ADP nukleotidoké, ezt az eredményeinkkel egy időben közölt kötődési adatok is megerősítik (lásd K_d értékek az 5. táblázatban, (106)). Valószínű, a bázis és a kötőzseb közötti hidrofób

kölcsönhatások csökkenésével illetve megszűnésével magyarázható a CDP nukleotidok igen kis mértékű affinitása. A bázisok nagyfokú mozgékonyasága valamelyest növeli a foszfátláncok flexibilitását is, ezzel befolyásolja azok orientációját, ez pedig a hPGK CDP nukleotidokkal mutatott kisebb mértékű katalitikus hatékonyságához vezethet (lásd k_{cat}/K_M értékek az 5. táblázatban). Varga és mtsai (106) mutációs kísérleteik értelmezése során szintén hasonló következtetésekre jutott. A D- és L-CDP gyenge kötődési affinitása ellenére, a hPGK ezen nukleotidokra is aktív, azaz kis hatékonysággal ugyan, de képes őket trifoszfáttá foszforilálni (lásd 2.5.2. fejezet). Eredményeink fényében ennek az lehet az oka, hogy bár a CDP bázisok igen lazán kötődnek a fehérjéhez, foszfátláncaikat a fehérjével kialakított elektrosztatikus és H-híd kötések viszonylag mereven képesek tartani. Ez egyben megakadályozza a CDP teljes disszociációját, másrészt a katalízis szempontjából kedvező orientációban képes tartani a foszfátláncot. Bár így is a CDP foszfátláncok (különösen a D-CDP) nagyobb flexibilitással rendelkeznek, mint az ADP foszfátláncok (29. ábra).

A fluktuációs, kontaktustávolság és nemkötő kölcsönhatási energia adatok ismeretében azt lehet mondani, hogy az általunk vizsgált négy nukleotid kötődési affinitása növekvő sorrendben: D-CDP < L-CDP << L-ADP < D-ADP.

Az 1,3-BPG kötődési affinitása D- és L-ADP jelenlétében. Az 1,3-BPG kontaktustávolság, fluktuációs és kölcsönhatási energia adatai arról árulkodnak, hogy a szubsztrát kötődési affinitása D-ADP jelenlétében kisebb, mint LADP jelenlétében (31. és 32. ábra). A szubsztrát antagonizmus jelenségének tárgyalása során már említettem, hogy a Gondeau és mtsai (112) által közölt kötődési adatok azt bizonyítják, hogy 3-PG jelenlétében a D-ADP kötődési affinitása kisebb, mint az L-ADP nukleotidé. Mi itt hasonló esetet látunk az 1,3-BPG szubsztrátra nézve, azaz az 1,3-BPG affinitása csökken D-ADP jelenlétében. A Lallemand és mtsai (104) által nemrégiben közölt adatok megerősítik szimulációink eredményét, ugyanis tranziens kinetikai mérésekkel sikerült bizonyítaniuk, hogy D-ADP jelenlétében az 1,3-BPG disszociációs állandója nagyobb, mint L-ADP jelenlétében. Tehát arra lehet következtetni, hogy az 1,3-BPG és a D-ADP kölcsönösen csökkentik egymás kötődési affinitását az enzimhez. Mindez nem mondható el az L-ADP és az 1,3-BPG viszonyáról. Szimulációs adataink alapján feltételezhető, hogy a D- és L-ADP foszfátláncok eltérő kötődési módja tehető felelőssé

az 1,3-BPG affinitásában látott különbségeikért. Az eltérő orientáció következtében, L-ADP esetén a foszfátlánc 1,3-BPG-re kifejtett elektrosztatikus taszítása nem érvényesül olyan nagy mértékben, mint D-ADP esetén. Ezen hipotézis igazolása azonban további számolásokat igényelne.

A szubsztrátkiralitás hatása a kollektív mozgásokra. A fehérjekonformációk gyakorisági eloszlásainak számításával és PCA analízis segítségével a szubsztrátkiralitás kollektív mozgásra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A tehetetlenségi főtengelek projekciók gyakorisági eloszlásának ismeretében elmondható, hogy a D-ADP komplex mind a csukló, mind a nyíró irányú tehetetlenségi főtengelek mentén nagy rigiditással rendelkezik (33. ábra). Tehát a konformációs állapotok igen kis számát térképezi fel a rendszer a szimuláció során. Ez megerősíti a csuklóponthi analízis alkalmával megfogalmazott feltételezésünket, miszerint a D-ADP komplex kis számú csuklópontja kapcsolatban áll annak viszonylagos rigiditásával. Inoue és mtsai (144) közelmúltban közölt neutron spin echo mérései szerint a fehérje kollektív doménmozgásainak rigiditása nagy mértékben nő a természetes szubsztrátok kötődésével, ami összhangban van eredményeinkkel. A PCA analízis alapján a D-ADP komplex domináns kollektív mozgása a csavarodó jellegű doménmozgás (teljes fehérjefluktuáció 40,3%-a). Ez megmagyarázza a csukló és nyíró irányú mozgások beszűkülését, hiszen csavarodó doménmozgás esetén a domén tömegközéppontok távolsága csukló és nyíró irányban minimális mértékben változik.

Az L-ADP komplex esetében viszont a konformációs eloszlás mindkét, de legfőképpen a nyíró irányú tehetetlenségi főtengelek mentén erősen kiszélesedik (33. ábra). Ez egyértelműen az L-ADP komplex nagyfokú nyíró irányú flexibilitását jelzi. A fehérje nagyszámú konformációs állapotot vesz fel a szimuláció időtartama alatt. PCA módszert használva, hasonló eredményre jutottunk. L-ADP komplexnél az első PCA módus a nyírómozgásnak, míg a második módus a csuklómozgásnak felel meg (35. ábra). Mivel az első módus a teljes fehérjefluktuáció 80,7 %-át teszi ki, kijelenthetjük, hogy az L-ADP komplexben a nyíró jellegű doménmozgás a domináns. Érdekes módon a csuklómozgás (teljes fluktuáció 7 %-a) csak nagyon kis mértékben vesz részt a kollektív mozgás kialakításában. Ezzel szemben a D-ADP komplexnél a csuklómozgás - a maga 24,1 %-os járulékaival - jóval meghatározóbb eleme a kollektív mozgásnak. Ez

megmagyarázhatja az enzim különböző kiralitású nukleotidokra mért eltérő katalitikus hatékonyságait (lásd 5. táblázat). A D-ADP komplex dinamikájában ugyanis a katalitikusan kedvező csukló jellegű doménmozgások nagyobb szerephez jutnak (24,1%), mint az L-ADP komplexben (7%). Emellett az L-ADP nagyfokú nyíró irányú flexibilitása megakadályozza a szubsztrátok megfelelő orientációját.

Összegezve, a természetes kiralitású nukleotidot (D-ADP) kötő komplex jelentősen kevesebb számú konformációs állapotot térképez fel szimulációink alatt, mint a tükörképi párját (L-ADP) kötő komplex. Míg a D-ADP komplex kollektív mozgásait a katalitikusan kedvező csavarodó- és csukló jellegű doménmozgás szuperpozíciója alakítja, addig az L-ADP komplex dinamikájában a katalízis szempontjából kevésbé kedvező nyíró jellegű doménmozgás az uralkodó.

A szubsztrátkiralitás hatása a lokális mozgásokra. A D- és L-ADP komplexek C_{α} RMSF értékeit számolva, a szubsztrátkiralitás hatásait próbáltuk tetten érni a lokális mozgásokban (36. ábra). Az eredmények fényében elmondható, hogy az L-ADP komplex nukleotid kötőhelye valamelyest merevebb. Például a hidrofób kötőzseb, mely D-ADP kötődés hatására nagyfokú flexibilitásra tett szert, L-ADP komplexben olyan rigid, mint az apo enzim esetében. Gondeau és mtsai (97) D- és L-ADP-t tartalmazó komplexek (D-ADP*hPGK – 2ZGV, L-ADP*Mg*3-PG*hPGK – 3C3A) kristályszerkezeteit összehasonlítva, az L-ADP bázisát mintegy 40°-kal elcsavarodva találták a D-ADP-hez képest. Elképzelhető, hogy ilyen jellegű konformációs különbség okozza a bázis kötőhely flexibilitás csökkenését. Ennek tisztázása érdekében azonban a kötődési módok további analizisére lenne szükség. Ismervén az enzim katalitikus hatékonyságát D- és L-ADP-re, az eredmények azt sugallják, hogy a hidrofób kötőzseb bizonyos mértékű flexibilitása szükséges lehet a hatékony foszforiláció érdekében. A foszfátkötőhely tekintetében a két nukleotid hasonló hatással van fehérjére: mindkét enantiomer csökkenti a foszfátkötő aminosavak flexibilitását. Ez a foszfátlánc hasonlóan szoros kötődését jelzi mindkét nukleotid esetében (bár ez a kötődés L-ADP esetében kis mértékben gyengébb, lásd 5.2. fejezet). Mint azt a D-ADP-nél már fentebb említettem, a foszfátlánc kötő aminosavakkal történő pozicionálása kiemelten fontos a hatékony foszforiláció szempontjából.

A szubsztrátkiralitás hatása az intra- és interdomén mozgások korrelációira. A C_{α} elmozdulásokra számolt kereszt-korrelációs mátrixok hasonló mintázatot mutatnak mindkét komplexben (37. ábra). Az intradomén mozgásokat tekintve, a nukleotidkötő aminosavak mozgásai között figyelhetők meg nagyobb pozitív korrelációk. Tehát ezen oldalláncok rendezett módon, együtt mozognak. Valószínű, hogy a térbeli közelség és a szubsztrátokkal való szimultán kölcsönhatások tehetők felelőssé a nagyfokú korrelációkért. A D-ADP komplexben valamelyest erőteljesebb korrelációk alakulnak ki a nukleotidkötő aminosavak között. Ez összhangban van a fluktuációs analízis eredményeivel, ugyanis az RMSF görbék a D-ADP kötőhely rugalmasabb voltát jelezték. A flexibilis kötőhelyen nyilvánvalóan nagyobb korrelációk alakulhatnak ki az alkotó aminosavak között. A bizonyos mértékig rugalmas kötőhely feltehetően a szubsztrátnak kellő mozgási szabadságot biztosít a katalitikusan kedvező orientáció megtalálásában, ezzel növelve a katalitikus hatékonyságot. Fontos megjegyezni azonban, hogy a szubsztrát túlzott mozgási szabadsága, mint azt a CDP nukleotidok esetében láttuk, káros a hatékony foszforiláció szempontjából. A D- és L-ADP kötőhelyek közötti nagyon hasonló korrelációs mintázat ugyanakkor arról is árulkodik, hogy a két szubsztrát kötődési módja hasonló, mint azt a röntgen-krisztallográfiai analízisek is bizonyították (97). A hasonló korrelációs mintázat tehát megerősíti Gondeau és mtsai (97) feltételezését, miszerint a hPGK purin bázisú nukleotidok iránt mutatott alacsony enantioszelektivitása, azok hasonló kötődési módjának köszönhető.

A korrelációs analízis további fontos eredménye, hogy a D-ADP komplex C-doménjének ellentétes oldalain látott antikorrelációs mozgások, L-ADP komplexben nem jelentkeznek. Ez arra utal, hogy az L-ADP komplex doménmozgásaiban nincs csavarodó irányú komponens, amit a PCA analízis is bizonyít.

Az interdomén mozgások korrelációi is igen nagy hasonlóságot mutatnak a két rendszerben. A merev test szerű doménmozgásra utaló jelek mindkét komplexben megfigyelhetők, egyezésben eddigi eredményeinkkel.

A szubsztrátkiralitás és a csuklópontok kapcsolata. A C_{α} torziós szögváltozások analizálásával a szubsztrátkiralitás és a csuklópontok közötti kapcsolatot jellemeztük. Mind a D-, mind az L-ADP komplex egy-egy csuklóponttal rendelkezik az $\alpha 7$ hélix C-domén felőli végén, ezek a Pro203 (D-ADP) és a Glu201 (L-ADP) (39. ábra). A

csuklópontok helyzete és a szögváltozás amplitúdója hasonló a két esetben, tehát a szubsztrát kiralitásának nincs jelentős befolyása a kötőhelytől távoli csuklópontra. Ezzel szemben a kötőhelyhez közeli, C-terminális előtti interdomén régióban az eltérő szubsztrátkiralitás erősen érezteti hatását. Míg a D-ADP komplexben egy fő csuklópont dominál a Gly372 aminosavnál, addig az L-ADP komplexben két kevésbé jelentős, kisebb amplitúdójú szögváltozással jellemezhető csuklópont jelentkezik, melyek az Ile370 és a Trp382 (39. ábra). Tehát a D-ADP komplexben egy fő csuklópont körül valósulnak meg a doménrotációk, ami a mozgást nagy mértékben irányítottá teszi. Mint azt korábban tárgyaltam, valószínű, hogy ez az irányított mozgás a katalízis szempontjából kedvező, hiszen a fehérje nem katalitikusan irreleváns konformációk feltérképezésével tölti az idő nagy részét. Az L-ADP komplexben viszont három hasonló erősségű csuklópont koordinálja a doménrotációkat, ez nagyobb konformációs teret tesz elérhetővé a fehérje számára, következésképpen flexibilisebbé válik a molekula. Ezt az L-ADP komplex konformációs gyakorisági eloszlása is bizonyítja. Az eredmény azt sugallja, hogy az L-ADP komplex katalitikusan kevésbé hatékony, ami összhangban van az ismert kísérleti adatokkal (lásd 5. táblázat).

7.

Következtetések

7.1. A szubsztrátkötődés hatásai

Az apo és természetes szubsztrátjaival (D-ADP és 1,3-BPG) komplexet képező hPGK MD szimulációival nyomon követtem a szubsztrátkötődés fehérjedinamikára gyakorolt hatásait. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a fehérje doménjei szubsztrátok nélkül és azok jelenlétében is végeznek merev test szerű mozgást a nanoszekundumos időskálán. A kollektív doménmozgások karaktere azonban jelentősen eltér az apo és a terner komplex esetében. Az apo enzim már a 20 nanoszekundumos szimulációs időtartam alatt kis amplitúdójú csuklómozgás egy teljes periódusát írja le. Ezzel szemben a D-ADP komplexben megvalósuló csukló jellegű mozgáskomponens periódusideje túlmutat a szimulációs időablakon (20 ns). Míg az apo enzim doménmozgása túlnyomóan nyíró és csukló jellegű mozgások keveréke, addig a D-ADP komplex doménmozgása főként csavarodó és csukló jellegű mozgásokból tevődik össze. Az apo enzimben tapasztalt több, hasonló erősségű csuklópont helyett szubsztrátkötődés hatására egyetlen jól definiált, domináns csuklópont jelenik meg a szubsztrát kötőhelyek közelében, a K13 hurokban. Ezzel lecsökken a kollektív mozgás szabadsági fokainak száma, a doménmozgás irányítottabbá válik. Az elérhető konformációs tér beszűkülésével a fehérje hatékonyabban találhatja meg a katalitikusan aktív, zárt konformációt.

Ami a lokális mozgásokat illeti, míg az 1,3-BPG és a nukleobázis kötőhely flexibilisebbé, addig a foszfát- és ribóz kötőhely merevebbé válik szubsztrátkötődés hatására. Utóbbi két kötőhelynek fontos szerepe van a foszfátlánc katalitikusan kedvező pozicionálásában, rigiddé válásuk a foszfátlánc szoros kötődéséről árulkodik. A lokális intradomén mozgások a szubsztrátok kötődésével korreláltabbakká válnak. A nukleotid kötőhelyet alkotó aminosavak kompakt dinamikai egységként, nagy korrelációval mozognak együtt mind az apo, mind a terner komplexben. A kötő aminosavak korrelációja a D-ADP kötődésével erősödik, ami feltehetően a szubsztráttal kialakított szimultán kölcsönhatások közvetítő szerepével magyarázható.

7.2. A szubsztrátkiralitás hatásai

MD szimulációkat végezve a hPGK különböző kiralitású és nukleobázisú nukleotidokat kötő termer komplexein (D-/L-ADP - és D-/L-CDP komplex), a fehérje széleskörű nukleotid specificitásának és alacsony enantioszelektivitásának szerkezeti-dinamikai okát kerestem. Eredményeink alapján elmondható, hogy az ADP nukleotid mindkét enantiomerje hasonlóan nagy kötődési affinitást mutat az enzim iránt. Szimulációink során szorosan és stabilan kötődtek a fehérjén. Ezzel szemben eredményeink a D- és L-CDP jóval alacsonyabb kötődési affinitásáról árulkodnak. Mindkét kiralitású citozin bázis nagy fluktuációkat mutatva, instabilan kötődött a C-domén hidrofób zsebébe. A CDP foszfátláncok viszont az ADP foszfátláncokhoz hasonló módon, szorosan kötődtek az enzimhez szimulációink során. A foszfátkötő aminosavak tehát mindvégig hasonló orientációban tartották mind a négy nukleotid foszfátláncát. A hatékony foszforiláció kritikus feltétele a megfelelő foszfátlánc orientáció. Tehát a szorosan kötődő foszfátlánc (a bázis fluktuációjától függetlenül) lehet az oka, hogy a hPGK még az olyan kis affinitású nukleotidokra is, mint a D-/L-CDP, aktív tud maradni. Feltehetően a különböző nukleotid analógok foszfátláncai hasonló módon, katalitikusan megfelelő pozícióban, szorosan kötődnek az enzimhez. Ez okozhatja a hPGK széleskörű nukleotid specificitását. A katalitikus hatékonyságot pedig valószínűsíthetően a nukleobázis fluktuációjának mértéke és hidrofób kölcsönhatásai tovább árnyalják. Ennek eredménye a különböző nukleotidokra mért eltérő hatékonyság. A MD szolgáltatja dinamikai adatok fényében az általunk vizsgált négy nukleotid kötődési affinitása növekvő sorrendben: D-CDP < L-CDP << L-ADP < D-ADP.

Eredményeink alapján az 1,3-BPG kötődési affinitása D-ADP jelenlétében kisebbnek bizonyult, mint L-ADP jelenlétében. Ez az irodalomban leírt szubsztrát antagonizmusra emlékeztet, viszont ahhoz, hogy erről meggyőződhesünk biner komplexekre (1,3-BPG*hPGK, D-ADP*hPGK, L-ADP*hPGK) is végeznünk kellene szimulációkat. Doktori munkám keretei között erre már nem volt lehetőség.

Az eltérő kiralitású nukleotidokat kötő termer komplexek (D-ADP - és L-ADP komplex) kollektív mozgásait vizsgálva megállapítható, hogy az L-ADP komplex nagy nyíró irányú flexibilitással rendelkezik, szemben a D-ADP komplexszel, melynek doménmozgásait csavarodó- és csukló jellegű mozgáskomponensek uralják.

Feltehetően, a katalitikusan kedvezőtlen nyíró doménmozgás domináns volta kapcsolatba hozható az L-ADP komplex – D-ADP komplexhez viszonyítottan – kisebb katalitikus hatékonyságával. Az L-ADP komplex doménfluktuációit három, azonos mértékben koordináló csuklópont alakítja, szemben a D-ADP komplex egyetlen domináns csuklópontjával. Ez megmagyarázza az L-ADP komplex nagyobb mértékű flexibilitását.

Mindkét enantiomer kötőhelye kompakt dinamikai egységet képez, melynek alkotó aminosavai nagy korrelációkkal mozognak együtt. A D-ADP kötőhely elemei között többnyire hangsúlyosabb korrelációk figyelhetők meg. Az, hogy a kötőhelyek korrelációs mintázata a különböző kiralitású nukleotid bekötődésével nem változik nagy mértékben, a nukleotidok nagyon hasonló kötődési módjáról árulkodik. Az enzim alacsony enantioszelektivitása tehát az eltérő kiralitású nukleotidok hasonló kötődési módjával magyarázható.

A lokális mozgások tekintetében elmondható, hogy az L-adenin kötőhelye kisebb flexibilitással rendelkezik, mint a D-adeniné. Feltehetően a bázist kötő hidrofób zseb nagyobb mértékű flexibilitása jelentőséggel bír a hatékony foszforiláció szempontjából. Összevetve az általunk vizsgált négy nukleotid (D-ADP, L-ADP, D-CDP, L-CDP) ismert katalitikus hatékonyság adatait a MD szolgáltatja eredményekkel, lehetőség nyílik a hatékony foszforiláció dinamikai körülményeinek meghatározására. Eredményeink alapján a hPGK katalitikusan hatékony egy nukleotidra, ha (i) a nukleotid stabilan kötődik az enzimen a nanoszekundumos időskálán és atomjai kis fluktuációt mutatnak (legfőképpen foszfátlánc atomjai), (ii) a kollektív interdomén mozgások meghatározó eleme a csuklómozgás, (iii) az intra - és interdomén mozgások korreláltak, (iv) az interdomén mozgásokat kisszámú csuklópont koordinálja. Az eredmények azt sugallják, hogy akár nanoszekundum hosszúságú MD szimulációval is eldönthető – a fenti dinamikai körülményeket monitorozva – egy új gyógyszerjelölt nukleotid analógról, hogy jó szubsztrátja-e a hPGK-nak, azaz hatékonyan képes-e az enzim foszforilálni azt. Ezáltal a gyógyszertervezés és fejlesztés néhány költséges kísérleti lépése kiváltható lehet szimulációs vizsgálatokkal. Ezt valószínűsítik Henzler-Wildman és mtsai kísérleti és szimulációs munkái is (60,145), melyekben rávilágítottak a hierarchikusan szerveződő fehérjedinamika különböző időskálán megvalósuló mozgásai közötti kapcsolatra. A nanoszekundumos fluktuációk jellege alapvetően

meghatározza a milliszekundumos funkcionális mozgások karakterét. Mindez a nanoszekundum időskálán történő vizsgálatok biológiai jelentőségét és létjogosultságát bizonyítja.

8.

Összefoglalás

Doktori munkám során a humán 3-foszfoglicerát kináz (hPGK) dinamikai tulajdonságait vizsgáltam számítógépes szimulációs módszerekkel. Az enzim a foszfát csoport reverzibilis átadását katalizálja az 1,3-biszfoszfoglicerát (1,3-BPG) és a MgADP között, valamint rák- és vírus ellenes gyógyszerhatóanyagok, a D-/L-nukleozid analógok farmakológiai aktiválásában játszik szerepet. Munkám fő célja a szubsztrátkötődés és szubsztrátkiralitás fehérjedinamikára gyakorolt hatásainak atomi szinten történő nyomon követése volt. MD szimulációink megerősítették az ún. hinge bending hipotézist: az apo enzim és a természetes terner komplex (D-ADP*Mg*1,3-BPG*hPGK) már ns időskálán is mutat csukló jellegű doménmozgást. A csuklómozgás karaktere eltérő a két rendszerre. Míg az apo rendszer esetében a csuklómozgás periódusideje összemérhető a 20 ns szimulációs időablakkal, addig a D-ADP komplex esetében egyértelműen hosszabb annál. A kollektív doménmozgás mindkét rendszer esetében kevert jellegű, azaz a csukló jellegű mozgás mellett nyíró és csavarodó jellegű mozgáskomponensek is megjelennek. Az apo enzim flexibilisebb, az interdomén régióban több csuklópont vesz részt a doménrotációk koordinálásában. Ezzel szemben a D-ADP komplexben egyetlen, jól definiált, domináns csuklópont figyelhető meg. Azaz szubsztrátkötődés hatására a doménmozgások szabadsági foka lecsökken, az interdomén mozgás irányítottabbá válik. Szimulációval sikerült igazolni, hogy a vizsgált négy eltérő kiralitású és nukleobázisú nukleotid kötődési affinitása a hPGK iránt növekvő sorrendben a következő: D-CDP < L-CDP << L-ADP < D-ADP. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a hPGK széleskörű nukleotid specificitásáért a különféle nukleotid analógok hasonló foszfátlánc kötődési mechanizmusa tehető felelőssé. A katalitikus hatékonyság csökkenését pedig a bázisok megnövekedett fluktuációja és hidrofób kontaktusainak gyengülése okozhatja. Szimulációs eredményeink fényében a hatékony enzimaktivitás dinamikai körülményei a következők: (i) stabil nukleotidkötődés, (ii) jelentős interdomén csuklómozgás komponens, (iii) korreláló intra- és interdomén mozgások, (iv) kisszámú csuklópont.

9.

Summary

In the present work, the dynamic properties of human 3-phosphoglycerate kinase (hPGK) were investigated using various computational simulation methods. The biochemical function of the enzyme is to catalyze the reversible transfer of phosphate between 1,3-bisphosphoglycerate (1,3-BPG) and MgADP. In addition hPGK was found to be involved in the activation of D-/L-nucleoside analogues, a new class of anticancer and antiviral agents. Our main objective was the molecular understanding of the influence of substrate binding and chirality on protein dynamics. According to our simulation results both in the absence and presence of the natural substrates (1,3-BPG, MgADP) the enzyme exhibits a hinge bending type motion, which corroborates the previously proposed hinge-bending hypothesis. However the characteristics of this motion vary considerably for the two systems. In the apo form, the enzyme exhibits a hinge bending motion with a time period around 20 ns while that of the complexed form is much longer than our simulation time. The collective motion is a superposition of shear, hinge bending and twisting domain motions for both the apo and the complex form. The apo form is more flexible, there are more hinge points that contribute with similar significance to the hinge bending motion, while in the ternary complex only one dominant hinge point is identified. Upon substrate binding smaller conformational space is available for the enzyme, its domain motion becomes more directional. Based on our simulation data the ranking of the observed nucleotides with respect to the binding affinity towards hPGK is: D-CDP < L-CDP << L-ADP < D-ADP, which is in a good agreement with experimental data. We conclude that the similar binding mechanism of phosphate chain of the various nucleotide analogues may be responsible for the broad nucleotide specificity of the enzyme. Nevertheless the observed reduction in the catalytic efficiency on particular nucleotides can be due to the loss of strength of hydrophobic contacts between the nucleobase and protein. Based on our simulation results we propose the following conditions for an efficient catalytic activity: (i) stable nucleotide binding, (ii) significant hinge bending component of interdomain motions, (iii) correlating intra- and interdomain motions, (iv) low number of hinges.

10.**Irodalomjegyzék**

1. Fischer E. (1894) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. Ber Dtsch Chem Ges, 27: 2985-2993.
2. Teague SJ. (2003) Implications of protein flexibility for drug discovery. Nat Rev Drug Discov, 2: 527-541.
3. Ma B, Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. (1999) Folding funnels and binding mechanisms. Protein Eng, 12: 713-720.
4. Kumar S, Ma B, Tsai CJ, Wolfson H, Nussinov R. (1999) Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. Cell Biochem Biophys, 31: 141-164.
5. Tsai CJ, Kumar S, Ma B, Nussinov R. (1999) Folding funnels, binding funnels, and protein function. Protein Sci, 8: 1181-1190.
6. Ma B, Shatsky M, Wolfson HJ, Nussinov R. (2002) Multiple diverse ligands binding at a single protein site: a matter of pre-existing populations. Protein Sci, 11: 184-197.
7. Baxter RJ. Exactly solved models in statistical mechanics. Academic Press, London, 1982: 1-486.
8. Allen MP, Tildesley DJ. Computer simulation of liquids. Oxford University Press Inc., New York, 1987: 1-6.
9. Yamashita H, Endo S, Wako H, Kidera A. (2001) Sampling efficiency of molecular dynamics and Monte Carlo method in protein simulation. Chem Phys Lett, 342: 382-386.
10. Metropolis N, Ulam S. (1949) The Monte Carlo method. J Am Stat Assoc, 44: 335-341.
11. Metropolis N, Rosenbluth AW, Rosenbluth MN, Teller AH, Teller E. (1953) Equation of state calculations by fast computing machines. J Chem Phys, 21: 1087-1092.
12. Wood WW, Parker FR. (1957) Monte Carlo equation of state of molecules interacting with the Lennard-Jones potential. I. A supercritical isotherm at about

- twice the critical temperature *J Chem Phys*, 27: 720-733.
13. Alder BJ, Wainwright TE. (1957) Phase transition for a hard sphere system. *J Chem Phys*, 27: 1208-1209.
 14. Alder BJ, Wainwright TE. (1959) Studies in molecular dynamics. I. General method. *J Chem Phys*, 31: 459-466.
 15. Rahman A. (1964) Correlations in the motion of atoms in liquid argon. *Phys Rev*, 136A: 405-411.
 16. Harp GD, Berne BJ. (1968) Linear and angular momentum autocorrelation functions in diatomic liquids. *J Chem Phys*, 49: 1249-1254.
 17. Barker JA, Watts RO. (1969) Structure of water; A Monte Carlo calculation. *Chem Phys Lett*, 3: 144-145.
 18. Rahman A, Stillinger FH. (1971) Molecular dynamics study of liquid water. *J Chem Phys*, 55: 3336-3359.
 19. Barojas J, Levesque D, Quentrec B. (1973) Simulation of diatomic homonuclear liquids. *Phys Rev*, A7: 1092-1105.
 20. Ryckaert JP, Bellemans A. (1975) Molecular dynamics of liquid n-butane near its boiling point. *Chem Phys Lett*, 30: 123-125.
 21. McCammon JA, Gelin BR, Karplus M. (1977) Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267: 585-590.
 22. Leach AR. *Molecular modelling principles and applications*. Pearson Education Limited, Harlow, 2001: 353-405.
 23. Cornell WD, Cieplak P. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J Am Chem Soc*, 117: 5179-5197.
 24. Durrant JD, McCammon JA. (2011) Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol*, 9: 71.
 25. Jones JE. (1924) On the determination of molecular fields. I. From the variation of viscosity of a gas with temperature. *Proc R Soc Lond A*, 106: 441-462.
 26. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations. *J Comput Chem*, 4: 187-217.
 27. Christen M, Hunenberger PH, Bakowies D, Baron R, Burgi R, Geerke DP, Heinz

- TN, Kastenholtz MA, Krautler V, Oostenbrink C, Peter C, Trzesniak D, van Gunsteren WF. (2005) The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *J Comput Chem*, 26: 1719-1751.
28. Perutz MF, Mathews FS. (1966) An X-ray study of azide methaemoglobin. *J Mol Biol*, 21: 199-202.
29. Frauenfelder H, McMahon B. (1998) Dynamics and function of proteins: the search for general concepts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 4795-4797.
30. van Gunsteren WF, Dolenc J, Mark AE. (2008) Molecular simulation as an aid to experimentalists. *Curr Opin Struct Biol*, 18: 149-153.
31. Gnanakaran S, Hochstrasser RM, Garcia AE. (2004) Nature of structural inhomogeneities on folding a helix and their influence on spectral measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 9229-9234.
32. Peter C, Rueping M, Worner HJ, Jaun B, Seebach D, van Gunsteren WF. (2003) Molecular dynamics simulations of small peptides: can one derive conformational preferences from ROESY spectra? *Chemistry*, 9: 5838-5849.
33. Suydam IT, Snow CD, Pande VS, Boxer SG. (2006) Electric fields at the active site of an enzyme: direct comparison of experiment with theory. *Science*, 313: 200-204.
34. Lerbret A, Bordat P, Affouard F, Guinet Y, Hedoux A, Paccou L, Prevost D, Descamps M. (2005) Influence of homologous disaccharides on the hydrogen-bond network of water: complementary Raman scattering experiments and molecular dynamics simulations. *Carbohydr Res*, 340: 881-887.
35. Somani S, Chng CP, Verma CS. (2007) Hydration of a hydrophobic cavity and its functional role: a simulation study of human interleukin-1beta. *Proteins*, 67: 868-885.
36. Schames JR, Henchman RH, Siegel JS, Sotriffer CA, Ni H, McCammon JA. (2004) Discovery of a novel binding trench in HIV integrase. *J Med Chem*, 47: 1879-1881.
37. Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, Jolly SM, Wai JS, Zhuang L, Fisher TE, Embrey M, Guare JP, Jr., Egbertson MS, Vacca JP, Huff JR, Felock PJ, Witmer MV, Stillmock KA, Danovich R, Grobler J, Miller MD, Espeseth AS, Jin L, Chen IW, Lin JH, Kassahun K, Ellis JD, Wong BK, Xu W, Pearson PG, Schleif

- WA, Cortese R, Emini E, Summa V, Holloway MK, Young SD. (2004) A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 11233-11238.
38. Hong G, Cornish AJ, Hegg EL, Pachter R. (2011) On understanding proton transfer to the biocatalytic [Fe-Fe](H) sub-cluster in [Fe-Fe]H₂ases: QM/MM MD simulations. *Biochim Biophys Acta*, 1807: 510-517.
39. Lamoureux G, Roux B. (2003) Modeling induced polarization with classical Drude oscillators: Theory and molecular dynamics simulation algorithm. *J Chem Phys*, 119: 3025-3039
40. Patel S, Mackerell AD, Jr., Brooks CL, 3rd. (2004) CHARMM fluctuating charge force field for proteins: II protein/solvent properties from molecular dynamics simulations using a nonadditive electrostatic model. *J Comput Chem*, 25: 1504-1514.
41. Cieplak P, Dupradeau FY, Duan Y, Wang J. (2009) Polarization effects in molecular mechanical force fields. *J Phys Condens Matter*, 21: 333102.
42. Henzler-Wildman K, Kern D. (2007) Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450: 964-972.
43. Hukushima K, Nemoto K. (1996) Exchange Monte Carlo method and application to spin glass simulations. *J Phys Soc Jpn*, 65: 1604-1608.
44. Sugita Y, Okamoto Y. (1999) Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem Phys Lett*, 314: 141-151.
45. Zhang C, Ma J. (2010) Enhanced sampling and applications in protein folding in explicit solvent. *J Chem Phys*, 132: 244101.
46. Hamelberg D, Mongan J, McCammon JA. (2004) Accelerated molecular dynamics: a promising and efficient simulation method for biomolecules. *J Chem Phys*, 120: 11919-11929.
47. Smith AV, Hall CK. (2001) Protein refolding versus aggregation: computer simulations on an intermediate-resolution protein model. *J Mol Biol*, 312: 187-202.
48. Ding F, Borreguero JM, Buldyrey SV, Stanley HE, Dokholyan NV. (2003) Mechanism for the alpha-helix to beta-hairpin transition. *Proteins*, 53: 220-228.

49. Chakrabarty A, Cagin T. (2010) Coarse grain modeling of polyimide copolymers. *Polymer*, 51: 2786–2794.
50. Wolff K, Vendruscolo M, Porto M. (2011) Coarse-grained model for protein folding based on structural profiles. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 84: 041934.
51. Shaw DE, Maragakis P, Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror RO, Eastwood MP, Bank JA, Jumper JM, Salmon JK, Shan Y, Wriggers W. (2010) Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins. *Science*, 330: 341-346.
52. Shan Y, Kim ET, Eastwood MP, Dror RO, Seeliger MA, Shaw DE. (2011) How does a drug molecule find its target binding site? *J Am Chem Soc*, 133: 9181-9183.
53. Yang J, Wang Y, Chen Y. (2007) GPU accelerated molecular dynamics simulation of thermal conductivities. *J Comput Phys*, 221: 799-804.
54. Liu W, Schmidt B, Voss G, Müller-Wittig W. (2008) Accelerating molecular dynamics simulations using Graphics Processing Units with CUDA. *Comput Phys Commun*, 179: 634-641.
55. Friedrichs MS, Eastman P, Vaidyanathan V, Houston M, Legrand S, Beberg AL, Ensign DL, Bruns CM, Pande VS. (2009) Accelerating molecular dynamic simulation on graphics processing units. *J Comput Chem*, 30: 864-872.
56. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. W.H.Freeman & Co Ltd, New York, 2002: 566-592.
57. Frauenfelder H. (2002) Proteins: paradigms of complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 Suppl 1: 2479-2480.
58. Frauenfelder H, Leeson DT. (1998) The energy landscape in non-biological and biological molecules. *Nat Struct Biol*, 5: 757-759.
59. Brooks III CL, Karplus M, Montgomery Pettitt B. *Proteins*. John Wiley & Sons, New York, 1988: 94.
60. Henzler-Wildman KA, Lei M, Thai V, Kerns SJ, Karplus M, Kern D. (2007) A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature*, 450: 913-916.
61. Phillips DC. (1966) The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci Am*, 215: 78-90.

62. Jones S, Stewart M, Michie A, Swindells MB, Orengo C, Thornton JM. (1998) Domain assignment for protein structures using a consensus approach: characterization and analysis. *Protein Sci*, 7: 233-242.
63. Garel J. Folding of large proteins: Multidomain and multisubunit proteins. W.H. Freeman and Company, New York, 1992: 405–454.
64. Banks RD, Blake CC, Evans PR, Haser R, Rice DW, Hardy GW, Merrett M, Phillips AW. (1979) Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature*, 279: 773-777.
65. Labeit S, Kolmerer B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270: 293-296.
66. Bu Z, Callaway DJ. (2011) Proteins move! Protein dynamics and long-range allostery in cell signaling. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 83: 163-221.
67. Janin J, Wodak SJ. (1983) Structural domains in proteins and their role in the dynamics of protein function. *Prog Biophys Mol Biol*, 42: 21-78.
68. Herzberg O, Chen CC, Kapadia G, McGuire M, Carroll LJ, Noh SJ, Dunaway-Mariano D. (1996) Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 2652-2657.
69. Gerstein M, Lesk AM, Chothia C. (1994) Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry*, 33: 6739-6749.
70. Hayward S, Berendsen HJ. (1998) Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins*, 30: 144-154.
71. Frauenfelder H, Petsko GA, Tsernoglou D. (1979) Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature*, 280: 558-563.
72. Hartmann H, Parak F, Steigemann W, Petsko GA, Ponzi DR, Frauenfelder H. (1982) Conformational substates in a protein: structure and dynamics of metmyoglobin at 80 K. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 4967-4971.
73. Petsko GA, Ringe D. (1984) Fluctuations in protein structure from X-ray diffraction. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 13: 331-371.
74. Stein DS, Moore KH. (2001) Phosphorylation of nucleoside analog antiretrovirals: a review for clinicians. *Pharmacotherapy*, 21: 11-34.

75. Krishnan P, Gullen EA, Lam W, Dutschman GE, Grill SP, Cheng YC. (2003) Novel role of 3-phosphoglycerate kinase, a glycolytic enzyme, in the activation of L-nucleoside analogs, a new class of anticancer and antiviral agents. *J Biol Chem*, 278: 36726-36732.
76. Gumina G, Song GY, Chu CK. (2001) L-Nucleosides as chemotherapeutic agents. *FEMS Microbiol Lett*, 202: 9-15.
77. Krishnan P, Fu Q, Lam W, Liou JY, Dutschman G, Cheng YC. (2002) Phosphorylation of pyrimidine deoxynucleoside analog diphosphates: selective phosphorylation of L-nucleoside analog diphosphates by 3-phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem*, 277: 5453-5459.
78. Krishnan P, Liou JY, Cheng YC. (2002) Phosphorylation of pyrimidine L-deoxynucleoside analog diphosphates. Kinetics of phosphorylation and dephosphorylation of nucleoside analog diphosphates and triphosphates by 3-phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem*, 277: 31593-31600.
79. Becker MN, Obraztsova M, Kern ER, Quenelle DC, Keith KA, Prichard MN, Luo M, Moyer RW. (2008) Isolation and characterization of cidofovir resistant vaccinia viruses. *Virol J*, 5: 58.
80. Keeffe EB, Marcellin P. (2007) New and emerging treatment of chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5: 285-294.
81. Alexandre JA, Roy B, Topalis D, Pochet S, Perigaud C, Deville-Bonne D. (2007) Enantioselectivity of human AMP, dTMP and UMP-CMP kinases. *Nucleic Acids Res*, 35: 4895-4904.
82. Coates JA, Cammack N, Jenkinson HJ, Mutton IM, Pearson BA, Storer R, Cameron JM, Penn CR. (1992) The separated enantiomers of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH 189) both inhibit human immunodeficiency virus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 36: 202-205.
83. Mathe C, Gosselin G. (2006) L-nucleoside enantiomers as antiviral drugs: a mini-review. *Antiviral Res*, 71: 276-281.
84. Robak T, Szmigielska-Kaplon A, Pluta A, Grzybowska-Izydorczyk O, Wolska A, Czernerska M, Wierzbowska A. Novel and emerging drugs for acute myeloid leukemia: pharmacology and therapeutic activity. *Curr Med Chem*, 18: 638-666.
85. Lay AJ, Jiang XM, Kisker O, Flynn E, Underwood A, Condrón R, Hogg PJ.

- (2000) Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature*, 408: 869-873.
86. Lay AJ, Jiang XM, Daly E, Sun L, Hogg PJ. (2002) Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process. *J Biol Chem*, 277: 9062-9068.
87. Vishwanatha JK, Jindal HK, Davis RG. (1992) The role of primer recognition proteins in DNA replication: association with nuclear matrix in HeLa cells. *J Cell Sci*, 101 (Pt 1): 25-34.
88. Popanda O, Fox G, Thielmann HW. (1998) Modulation of DNA polymerases alpha, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1397: 102-117.
89. Segel GB, Feig SA, Glader BE, Muller A, Dutcher P, Nathan DG. (1975) Energy metabolism in human erythrocytes: the role of phosphoglycerate kinase in cation transport. *Blood*, 46: 271-278.
90. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. (1995) Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport. *Circ Res*, 77: 88-97.
91. Martinov MV, Plotnikov AG, Vitvitsky VM, Ataulakhanov FI. (2000) Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta*, 1474: 75-87.
92. Watson HC, Walker NP, Shaw PJ, Bryant TN, Wendell PL, Fothergill LA, Perkins RE, Conroy SC, Dobson MJ, Tuite MF, et al. (1982) Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase. *EMBO J*, 1: 1635-1640.
93. Lee JH, Im YJ, Bae J, Kim D, Kim MK, Kang GB, Lee DS, Eom SH. (2006) Crystal structure of *Thermus caldophilus* phosphoglycerate kinase in the open conformation. *Biochem Biophys Res Commun*, 350: 1044-1049.
94. Davies GJ, Gamblin SJ, Littlechild JA, Dauter Z, Wilson KS, Watson HC. (1994) Structure of the ADP complex of the 3-phosphoglycerate kinase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.65 Å. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50: 202-209.
95. Flachner B, Kovari Z, Varga A, Gugolya Z, Vonderviszt F, Naray-Szabo G, Vas M. (2004) Role of phosphate chain mobility of MgATP in completing the 3-phosphoglycerate kinase catalytic site: binding, kinetic, and crystallographic

- studies with ATP and MgATP. *Biochemistry*, 43: 3436-3449.
96. Harlos K, Vas M, Blake CF. (1992) Crystal structure of the binary complex of pig muscle phosphoglycerate kinase and its substrate 3-phospho-D-glycerate. *Proteins*, 12: 133-144.
 97. Gondeau C, Chaloin L, Lallemand P, Roy B, Perigaud C, Barman T, Varga A, Vas M, Lionne C, Arold ST. (2008) Molecular basis for the lack of enantioselectivity of human 3-phosphoglycerate kinase. *Nucleic Acids Res*, 36: 3620-3629.
 98. Zerrad L, Merli A, Schroder GF, Varga A, Graczer E, Pernot P, Round A, Vas M, Bowler MW. (2011) A spring-loaded release mechanism regulates domain movement and catalysis in phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem*, 286: 14040-14048.
 99. Auerbach G, Huber R, Grattinger M, Zaiss K, Schurig H, Jaenicke R, Jacob U. (1997) Closed structure of phosphoglycerate kinase from *Thermotoga maritima* reveals the catalytic mechanism and determinants of thermal stability. *Structure*, 5: 1475-1483.
 100. Bernstein BE, Hol WG. (1998) Crystal structures of substrates and products bound to the phosphoglycerate kinase active site reveal the catalytic mechanism. *Biochemistry*, 37: 4429-4436.
 101. Szilagyi AN, Ghosh M, Garman E, Vas M. (2001) A 1.8 Å resolution structure of pig muscle 3-phosphoglycerate kinase with bound MgADP and 3-phosphoglycerate in open conformation: new insight into the role of the nucleotide in domain closure. *J Mol Biol*, 306: 499-511.
 102. Bowler MW, Cliff MJ, Marston JPM, Baxter NJ, Hownslow AMH, Varga AV, Szabo J, Vas M, Blackburn GM, Waltho JP. The Structure of Human Phosphoglycerate Kinase in its Fully Active Conformation with Ground State Analogues. - to be published.
 103. Cliff MJ, Bowler MW, Varga A, Marston JP, Szabo J, Hounslow AM, Baxter NJ, Blackburn GM, Vas M, Waltho JP. (2010) Transition state analogue structures of human phosphoglycerate kinase establish the importance of charge balance in catalysis. *J Am Chem Soc*, 132: 6507-6516.
 104. Lallemand P, Chaloin L, Roy B, Barman T, Bowler MW, Lionne C. (2011)

- Interaction of human 3-phosphoglycerate kinase with its two substrates: is substrate antagonism a kinetic advantage? *J Mol Biol*, 409: 742-757.
105. Flachner B, Varga A, Szabó J, Barna L, Hajdú I, Gyimesi G, Závodszy P, Vas M. (2005) Substrate-assisted movement of the catalytic Lys 215 during domain closure: Site-directed mutagenesis studies of human 3-phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, 44: 16853-16865.
 106. Varga A, Chaloin L, Sagi G, Sendula R, Graczer E, Liliom K, Závodszy P, Lionne C, Vas M. (2011) Nucleotide promiscuity of 3-phosphoglycerate kinase is in focus: implications for the design of better anti-HIV analogues. *Mol Biosyst*, 7: 1863-1873.
 107. Szabo J, Varga A, Flachner B, Konarev PV, Svergun DI, Závodszy P, Vas M. (2008) Communication between the nucleotide site and the main molecular hinge of 3-phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, 47: 6735-6744.
 108. Bernstein BE, Michels PA, Hol WG. (1997) Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. *Nature*, 385: 275-278.
 109. Lee RA, Razaz M, Hayward S. (2003) The DynDom database of protein domain motions. *Bioinformatics*, 19: 1290-1291.
 110. Pickover CA, McKay DB, Engelman DM, Steitz TA. (1979) Substrate binding closes the cleft between the domains of yeast phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem*, 254: 11323-11329.
 111. Sinev MA, Razgulyaev OI, Vas M, Timchenko AA, Ptitsyn OB. (1989) Correlation between enzyme activity and hinge-bending domain displacement in 3-phosphoglycerate kinase. *Eur J Biochem*, 180: 61-66.
 112. Gondeau C, Chaloin L, Varga A, Roy B, Lallemand P, Perigaud C, Barman T, Vas M, Lionne C. (2008) Differences in the transient kinetics of the binding of D-ADP and its mirror image L-ADP to human 3-phosphoglycerate kinase revealed by the presence of 3-phosphoglycerate. *Biochemistry*, 47: 3462-3473.
 113. Vas M, Merli A, Rossi GL. (1994) Antagonistic binding of substrates to 3-phosphoglycerate kinase monitored by the fluorescent analogue 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate. *Biochem J*, 301 (Pt 3): 885-891.
 114. Merli A, Szilagyi AN, Flachner B, Rossi GL, Vas M. (2002) Nucleotide binding

- to pig muscle 3-phosphoglycerate kinase in the crystal and in solution: relationship between substrate antagonism and interdomain communication. *Biochemistry*, 41: 111-119.
115. Deville-Bonne D, Laine R, Garel JR. (1991) Substrate antagonism in the kinetic mechanism of *E. coli* phosphofructokinase-1. *FEBS Lett*, 290: 173-176.
116. Maury G. (2000) The enantioselectivity of enzymes involved in current antiviral therapy using nucleoside analogues: a new strategy? *Antivir Chem Chemother*, 11: 165-189.
117. Cook FP, Cleland WW. *Enzyme Kinetics and Mechanism*. Garland Science, New York, 2007: 1-28.
118. Larsson-Raznikiewicz M, Malmstrom BG. (1961) The metalion activation of 3-phosphoglycerate kinase in correlation with metal-binding studies. *Arch Biochem Biophys*, 92: 94-99.
119. Webb MR, Trentham DR. (1980) Analysis of chiral inorganic [16O, 17O, 18O]thiophosphate and the stereochemistry of the 3-phosphoglycerate kinase reaction. *J Biol Chem*, 255: 1775-1778.
120. Geerlof A, Schmidt PP, Travers F, Barman T. (1997) Cryoenzymic studies on yeast 3-phosphoglycerate kinase. Attempt to obtain the kinetics of the hinge-bending motion. *Biochemistry*, 36: 5538-5545.
121. Geerlof A, Travers F, Barman T, Lionne C. (2005) Perturbation of yeast 3-phosphoglycerate kinase reaction mixtures with ADP: transient kinetics of formation of ATP from bound 1,3-bisphosphoglycerate. *Biochemistry*, 44: 14948-14955.
122. Guilbert C, Perahia D, Mouawad L. (1995) A method to explore transition paths in macromolecules. Applications to hemoglobin and phosphoglycerate kinase. *Comput Phys Comm*, 91: 263-273.
123. Guilbert C, Pecorari F, Perahia D, Mouawad L. (1996) Low frequency motions in phosphoglycerate kinase. A normal mode analysis. *Chem Phys*, 204: 324-336.
124. Vaidehi N, Goddard WAI. (2000) Domain motions in phosphoglycerate kinase using hierarchical NEIMO molecular dynamics simulations. *J Phys Chem A*, 104: 2375-2383.
125. Balog E, Laberge M, Fidy J. (2007) The influence of interdomain interactions on

- the intradomain motions in yeast phosphoglycerate kinase: a molecular dynamics study. *Biophys J*, 92: 1709-1716.
126. Sali A, Blundell TL. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, 234: 779-815.
 127. MacKerell AD, Jr., Banavali N, Foloppe N. (2000) Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers*, 56: 257-265.
 128. Jones G, Willett P, Glen RC. (1995) Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol*, 245: 43-53.
 129. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kale L, Schulten K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, 26: 1781-1802.
 130. MacKerell AD, Bashford D, Bellott, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-McCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT, Prodhom B, Reiher WE, Roux B, Schlenkrich M, Smith JC, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiorkiewicz-Kuczera J, Yin D, Karplus M. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B*, 102: 3586-3616.
 131. Snyman JA. *Practical mathematical optimization: an introduction to basic optimization theory and classical and new gradient-based algorithms*. Springer Publishing, New York, 2005: 40-52.
 132. Ewald PP. (1921) Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann der Physik*, 369: 253-287.
 133. Darden T, Perera L, Li L, Pedersen L. (1999) New tricks for modelers from the crystallography toolkit: the particle mesh Ewald algorithm and its use in nucleic acid simulations. *Structure*, 7: R55-60.
 134. Nosé S. (1984) A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol Phys*, 52: 255-268.
 135. Hoover WG. (1985) Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys Rev A*, 31: 1695-1697.
 136. Ichiye T, Karplus M. (1991) Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. *Proteins*, 11: 205-217.

137. Hartigan JA. Clustering Algorithms. Wiley, New York, 1975: 223-246.
138. Amadei A, Linssen AB, Berendsen HJ. (1993) Essential dynamics of proteins. *Proteins*, 17: 412-425.
139. Leroux V, Gresh N, Liu W-Q, Garbay C, Maigret B. (2007) Role of water molecules for binding inhibitors in the SH2 domain of Grb2: A molecular dynamics study. *J Mol Struct: THEOCHEM*, 806: 51-66.
140. Hunenberger PH, Mark AE, van Gunsteren WF. (1995) Fluctuation and cross-correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations. *J Mol Biol*, 252: 492-503.
141. Radkiewicz JL, Brooks III CL. (2000) Protein dynamics in enzymatic catalysis: exploration of dihydrofolate reductase. *J Am Chem Soc*, 122: 225-231.
142. Haran G, Haas E, Szpikowska BK, Mas MT. (1992) Domain motions in phosphoglycerate kinase: determination of interdomain distance distributions by site-specific labeling and time-resolved fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 11764-11768.
143. Mas MT, Chen HH, Aisaka K, Lin LN, Brandts JF. (1995) Effects of C-terminal deletions on the conformational state and denaturation of phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, 34: 7931-7940.
144. Inoue R, Biehl R, Rosenkranz T, Fitter J, Monkenbusch M, Radulescu A, Farago B, Richter D. (2010) Large domain fluctuations on 50-ns timescale enable catalytic activity in phosphoglycerate kinase. *Biophys J*, 99: 2309-2317.
145. Henzler-Wildman KA, Thai V, Lei M, Ott M, Wolf-Watz M, Fenn T, Pozharski E, Wilson MA, Petsko GA, Karplus M, Hubner CG, Kern D. (2007) Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature*, 450: 838-844.

11.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Palmai Z**, Chaloin L, Lionne C, Fidy J, Perahia D, Balog E. (2009) Substrate binding modifies the hinge bending characteristics of human 3-phosphoglycerate kinase: a molecular dynamics study. *Proteins*, 77: 319-329.
2. **Palmai Z**, Perahia D, Lionne C, Fidy J, Balog E, Chaloin L. (2011) Ligand chirality effects on the dynamics of human 3-phosphoglycerate kinase: comparison between D- and L-nucleotides. *Arch Biochem Biophys*, 511: 88-100.

12.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Balog Erikának, témavezetőmnek, aki mindvégig lelkiismeretesen nyomon követte doktori munkám és tanácsaival segítette szakmai fejlődésem. Köszönöm, hogy annak idején felkeltette érdeklődésemet a számítógépes molekuláris biofizika iránt és megismertette velem ennek a tudománynak a szépségeit. Nagyon sokat tanulhattam tőle, nemcsak szakmailag, hanem emberileg is, amiért nagyon hálás vagyok.

Köszönettel tartozom Dr. Fidy Judit professzor asszonynak és Dr. Kellermayer Miklós professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetének volt és jelenlegi igazgatóinak, hogy lehetővé tették, hogy doktori munkámat az Intézetben végezhessem.

Köszönetet mondok Dr. David Perahia professzor úrnak (École Normale Supérieure de Cachan), aki szakmai észrevételeivel és ötleteivel segítette munkám.

Köszönettel tartozom Dr. Laurent Chaloin-nek (Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Université Montpellier), aki a röntgenszerkezetből származtatott humán modellszerkezetet a rendelkezésemre bocsátotta.

Hálás vagyok Dr. Vas Máriának (MTA, Enzimológiai Intézet) a sok, hasznos, szakmai segítségért, melyet a PGK röntgenszerkeztének tanulmányozása során adott.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szőke Éva professzor asszonynak, a SE Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének és Dr. Antal István, Doktori Iskola programvezetőnek, hogy lehetővé tették, hogy a Gyógyszerészeti tudományok korszerű kutatási irányai Ph.D. programban részt vehessek és támogatták a Ph.D. gyakornoki (predoktori) ösztöndíjra benyújtott pályázatomat.

Köszönet illeti a Semmelweis Egyetem Doktori Iskoláját a Ph.D. gyakornoki (predoktori) pályázat keretén belül nyújtott anyagi támogatásáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, hiszen szinte mindenki segítségemre volt valamiben, akár kutatási, akár oktatási kérdéssel kapcsolatban.

Szüleimnek köszönöm, hogy mindvégig megbíztak bennem és támogattak.