

A kutatási szerződésben foglaltak szerint a támogatási időszakban a következő kutatási feladatokkal foglalkoztunk:

### **2003 évben:**

#### *1. Konformációs változások a foszfoglicerát kináz (PGK) molekuláris felismerési folyamataiban*

A kinázok általában az ATP és ADP nukleotidok kétértékű fémionokkal komplexált formáit hasznosítják szubsztrátként. A kétértékű fémion természetes körülmények között általában a magnézium ion, szerepe azonban még nem tisztázott. A vizsgálataink tárgyát képező foszfoglicerát kináz (PGK) a glikolízis során állít elő MgADP-ből és 1,3-bisz-foszfoglicerátból MgATP-t és 3-foszfoglicerátot. A foszfo-transzferhez elengedhetetlen a kétértékű fémion jelenléte. A PGK számos kristályszerkezete ismert már, azonban ATP-vel alkotott komplexeinek szerkezetét eddig még nem sikerült tisztázni.

Röntgenkristallográfia segítségével meghatároztuk a sertésizom PGK MgATP szubsztráttal és szubsztrátként nem viselkedő ATP-vel alkotott kettős komplexeinek atomi felbontású szerkezetét abból a célból, hogy egyrészt tisztázzuk a  $Mg^{2+}$ -ion szerkezetre gyakorolt szerepét, másrészt a MgATP-vel alkotott kettős komplex geometriáját összehasonlítsuk a MgAMP-PCP-t, illetve MnAMP-PNP-t, mint nukleotid analógokat és 3-PG-t tartalmazó hármas komplexekben megfigyelt geometriával.

A két jó felbontású szerkezetben (PGK\*MgATP: 2,1 Å és PGK\*ATP: 1,9 Å) egyértelműen azonosítani tudtuk a MgATP-t, illetve az ATP-t. A két nukleotid konformáció összehasonlítása során egyértelművé vált, hogy a  $Mg^{2+}$ -ion a foszfát-lánc konformációjának kialakításában jelentős szerepet játszik, hiszen a két nukleotid adenin- és ribóz-gyűrűi nagyon hasonló geometriában kötődnek a fehérje nukleotid kötőhelyén, azonban foszfátláncaik konformációi jelentősen eltérnek egymástól.

A MgATP foszfátláncának konformációját összehasonlítva az egymástól jelentősen eltérő MgAMP-PCP és MnAMP-PNP foszfátláncainak konformációjával kiderült, hogy a szubsztrát MgATP konformációja sokkal inkább hasonlít a nukleotid analóg MgAMP-PCP konformációjára, mint (a MgADP konformációjára hasonlító) MnAMP-PNP konformációjára. A MgATP foszfátlánca a térben a két nukleotid analóg által mutatott konformáció között helyezkedik el, ami megerősíti azt az elképzelésünket, hogy a PGK kinázreakciójának lefutása során a MgATP foszfátlánca két kötőhely között oszcillál és így közelít egymáshoz két szerkezeti elemet, ami a reakcióhoz elengedhetetlenül szükséges doménzáródást indukálja.

A két fehérjeszerkezet koordinátáit letétbe helyeztük az RCSB fehérjeadatbankban 1VJC (PGK\*MgATP) és 1VJD (PGK\*ATP) azonosítók alatt. Munkánkról az MTA Enzimológiai Intézetében végzett enzimkinetikai mérések eredményeivel kiegészített közleményt írtunk a Biochemistry folyóirat számára (B. Flachner, Z. Kovári, A. Varga, Z. Gugolya, F. Vonderviszt, G. Náray-Szabó, M. Vas: 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, 3436-49, 2004).

## 2. A tetrahidrobiopterin (BH4) kofaktor szerepe a nitrogen monoxid szintetáz (NOS) aktiválódásában

Munkánk során DFT számítások segítségével tisztázni kívántuk a tetrahidrobiopterin (H4B) kofaktor enzimaktiválódásban betöltött szerepét. Számításainkban elsősorban a reakció eddig kísérletileg nem tanulmányozott Fe(II)-oxy intermedierjét kívántuk vizsgálni és modelleztük a kofaktor és az intermedier közti elektrontranszfert. Eredményeink arra utaltak, hogy a bekötődő molekuláris oxigén gyenge H-hidas kölcsönhatásba lép a szubsztrát argininnel és egyben jelentősen elmozdítja annak guanidin csoportját. A konformációs változás következtében az L-Arg a környezetében lévő Glu371 aminosavval lép kapcsolatba. Az NOS kristályszerkezetéből a számítás alapjául szolgáló modellbe integrált vízmolekula az optimálás során eredeti helyzetéből szintén elmozdult, de számításaink a feltételezett guanidin-víz kölcsönhatást nem erősítették meg. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy az első reakciólépéshez szükséges proton magától a szubsztráttól származik.

A reakcióban a kofaktorból képződő gyök szerkezetét illetően két lehetőséget vizsgáltunk meg: ezek egyike a kofaktor és a hem közti protonvándorlás, míg a másik a kofaktor N5 helyzetben történő deprotonálódása. Korábbi tanulmányok feltételezték, hogy a kofaktor N3 atomja és a hem propionát oldallánca között hidrogén-híd alakul ki, azonban számításaink a protontranszfert nem erősítették meg. Ezzel szemben a kofaktor N5 helyzetű deprotonálódása során számított spinsűrűségek a kísérleti eredményekkel jó egyezést mutattak. Számításaink alapján elképzelhető, hogy a reakcióban a kofaktor N5 nitrogénjének deprotonálódása a megfelelő H3B gyök képződéséhez és az enzim által kötött oxigén redukciójához vezet. Eredményeink arra utalnak, hogy az enzim aktivált állapotában a kötött molekuláris oxigén és a H4B kofaktor között direkt csatolás alakul ki. A vizsgálatainkról írott közleményt a Chemical Physics Letter folyóiratban közzeltük (D. K. Menyhárd: Electron transfer between the heme bound oxygen and THB4 cofactor of NOS: a DFT study Chemical Physics Letters, 392, 439-443 (2004)).

## 3. Új ciklooxigenáz-2 (COX-2) ligandumok azonosítására szolgáló virtuális szűrési eljárás kidolgozása

Az eredeti munkatervben vállalt feladatokon túlmenően 2003-ban foglalkoztunk egy gyógyszeripari szempontból jelentős enzim, a ciklooxigenáz 2 ligandumkötésben szerepet játszó kölcsönhatásainak vizsgálatával. Munkánk során az enzim röntgenszerkezetéből kiindulva eljárást dolgoztunk ki nagy affinitású ligandumok gyors azonosítására. A szerkezet alapú virtuális szűrést egy nagy kapacitású dokkoló algoritmus, a FlexX segítségével valósítottuk meg. Vizsgálataink rámutattak arra, hogy a tesztkörülmények a tényleges biológiai vizsgálatokhoz hasonlóan a virtuális tesztelés során is optimálhatók és optimálандók. Számításaink során vizsgáltuk a szűrésre kiválasztott molekulák (adatbázisok) preprocessálásának (a gyorsdokkolás előtti energiaminimálásnak), a szűréshez használt kristályszerkezet energiaminimálásának és a kapott megoldások, azaz a COX2-molekula komplexek posztprocesszálásának (a gyorsdokkolás utáni energiaminimálásnak) hatását. Hasonlóképpen tanulmányoztuk több, a molekula és a fehérje közti kölcsönhatás számítására szolgáló függvény (F-Score, Dock-score, PMF-score, ChemScore) hatékonyságát is.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a pre- és posztprocesszálás a szűrés hatékonyságát jelentősen növeli. Vizsgálataink során ismert, hatékony molekulák felhasználásával optimáltuk a szűrési feltételeket és megmutattuk, hogy az aktív és inaktív molekulák diszkriminációja legsikeresebben az F-Score függvényének alkalmazásával oldható meg. Az újonnan kifejlesztett ChemScore függvény használatával az aktív vegyületek a véletlenszerű kiválasztáshoz képest mintegy 9-szeres hatékonysággal azonosíthatók. Eredményeinket a THEOCHEM folyóiratban közzeltük (A. Bauer, Z. Kovári, G. M. Keserü:

Optimization of Virtual Screening Protocols: FlexX-based Virtual Screening for COX-2 Inhibitors Reveals the Importance of Tailoring Screen Parameters THEOCHEM, 676, 1-5, 2004).

## **2004 évben:**

### *1. Konformációs viszonyok: a NO konformációs szabadsági fokainak feltérképezése a nitroforin4 (NP4) fehérje aktív helyén*

A nitroforinok vérszívó rovarok nyáltermelő mirigyeiben található hem fehérjék. Natív, savas kémhatású környezetben a Fe(III)-t tartalmazó hem köti a NO-t. A rovar arra használja a nitroforint, hogy a megkötött NO molekulát az áldozatba juttassa, ahol az a közel semleges környezetben a NO-t felszabadítja – így gátolja a véralvadást. A szerkezeti változásokat leíró három röntgenszerkezetet felhasználva (üres nitroforin pH 7.5-n, üres nitroforin pH 5.6-n, nitroforin-NO komplex pH 5.6-n) kiszámítottuk a nitroforin pH- és komplexálódás-függő protonálódási állapotait (a pKa számításokat egy ZAP nevű programmal végeztük (Grant, J.A., Pickup, B., and Nicholls, A., J. Comp. Chem., 2001, 22, 608-640)). Az eredményeket összevetve azt tapasztaltuk, hogy egy 8 aminosavból álló csoport (Asp27, Asp30, Glu32, Asp35, Lys81, His124, Asp129, Asp132) az amely a pH változásra reagál. Az alacsony pH-n komplexált és a fiziológias pH-n komplexálatlan szerkezetekben ez a 8 aminosav eltérően protonált, és ez számos H-híd felhasadásához vezet. Ezek közül sikerült elkülönítenünk 3 olyan – eltemetett és aktív hely közeli – H-hidat amely a NO megkötését követő átrendeződés hatásától függetlenül, egyedül a pH megváltozás miatt bomlik fel.

Megállapítottuk azt is, hogy a fehérje mátrix belseje felé forduló aminosavak közül az Asp30-as oldallánc az egyetlen melynek protonálódási állapota csak a pH függvénye, azaz alacsony pH-n minden szerkezetben (komplexált és komplexálatlan) protonált, azonban fiziológias pH-n nem. Molekuladinamikai szimulációt hajtottunk végre két modell rendszeren. Mindkét esetben a kiindulási szerkezet az alacsony pH-n meghatározott NP4-NO komplex volt. Az első számításban (5 ns, NPT) a protonálódások a pKa számításnak megfelelően voltak beállítva, a második szimulációban (5 ns, NPT) egy változást eszközöltünk, az Asp30 oldalláncot deprotonáltuk.

Sikerült megmutatnunk, hogy a NP4-NO komplex stabilitását jelentősen csökkenti az Asp30 deprotonálódása, valamint hogy a deprotonálódás hatására kialakuló szerkezet a hurok régiókban (A-B hurok, G-H hurok) fellazul –itt jelentősen megnőnek a számított hőmozgástényezők (kísérleti eredményekkel összehangban). A deprotonálódás okozta szerkezeti átalakulás is a hurok régiókra korlátozódik, melyekről megmutatták, hogy döntő befolyással bírnak a NP NO iránti affinitására. Megmutattuk, hogy a pH változás hatására lejátszódó, konformációs és flexibilitás béli változások jól modellezhetők az Asp30 deprotonálásával – így elsőként tettünk javaslatot az Asp30 e folyamatban betöltött kulcs fontosságú szerepére.

Eredményeinket a FEBS Letters folyóiratban közöltük (D. Menyhárd, G. M. Keserű: Protonation state of Asp30 exerts crucial influence over surface loop rearrangements responsible for NO release in nitrophorin 4. FEBS Letters 579(24), 5392-5398 (2005)).

### *2. Low-mode (LMOD) keresésen alapuló platformfüggetlen konformerkereső és dokkoló eljárás kidolgozása*

Az LMOD módszereket (konformációs keresés, fehérje szerkezetek konformációs analízise, fehérje hurkok optimalizálása, flexibilis dokkolás) Kolossváry István egy C nyelven írt, önálló szoftver könyvtárban írta meg. A könyvtár a fordított kommunikáció elvén működik, amelynek lényege az, hogy a könyvtár maga egyetlen külső függvényhívást sem tesz, hanem ha ilyen hívásra szükség van, a könyvtár visszatér a hívóprogramba egy üzenettel. Ebben az üzenetben közli, hogy milyen adatra van szüksége, majd amikor ezt az adatot megkapta,

visszatér pontosan arra a helyre, ahol az adatra szükség van, és onnan folytatja a számítást. Az LMOD módszerek egyetlen adatot igényelnek a számítások során, az energia gradiensét különféle geometriáknál. Így a hívóprogram mindössze a gradiens számítást kell elvégezze, az összes többi feladatot a könyvtár maga hajtja végre. Éppen ezért lehetséges, hogy a kifejlesztett LMOD könyvtárat mindössze néhány tucat sornyi kód megírásával bármelyik modellező programba be lehet építeni. A beépítés során a könyvtárral egyetlen egy függvényen keresztül kell kommunikálni, és ezt a függvényhívást egy végtelen ciklusból kell megtenni. A végtelen ciklusban a hívófüggvény minden egyes visszatéréskor közli, hogy új gradiensre van-e szüksége, vagy hogy végzett-e a számítással. Ez utóbbi esetben a végtelen ciklusból a hívóprogramnak ki kell törnie, és ezzel az implementáció be is fejeződött. Természetesen a végtelen ciklust egy másik függvényben lehet elrejtetni, és így a hívóprogramban a meglehetősen bonyolult LMOD számítást ténylegesen egyetlen függvényhívással lehet végrehajtani. A könyvtár az összes megtalált konformációt ill. dokkolási konfigurációt egy bináris fájlba írja ki, ahonnan a hívóprogram a szerkezeteket tetszőleges formátumban elmentheti, akár közvetlenül egy adatbázisba írhatja ki. Az LMOD könyvtár a konformációs keresés, valamint a dokkolás részleteit a felhasználótól a hívófüggvény paraméterlistáján keresztül kapja meg, és a hibakezelés is ugyanilyen módon történik. Az LMOD könyvtár jelenleg a közkedvelt Tinker ([dasher.wustl.edu/tinker/](http://dasher.wustl.edu/tinker/)) és Amber ([amber.scripps.edu](http://amber.scripps.edu)) modellező programcsomagokban áll a kutatóközösség rendelkezésére, valamint nagyon hatékony implementáció született a NAB (Nucleic Acid Builder, David Case professzor, Scripps Research Institute, [www.scripps.edu/mb/case/](http://www.scripps.edu/mb/case/)) programrendszerben is.

### *3. Foszfinozitol kináz 3 (PI3K) alfa izoformájának 3D szerkezetpredikciója, ligandumkötődés vizsgálata*

A munkatervnek megfelelően megvalósítottuk a PI3K fehérje gamma homológiamodellezéssel történő szerkezetpredikcióját. Az eljárás során a PDB adatbázisban FASTA keresést hajtottunk végre, amelynek eredményeképp a legreménytelibb templákként a fehérje alfa izoformája adódott. A ClustalW program segítségével a két izoforma szekvenciáját illesztettük (azonosság 30.5%, homológia 64.3%). Mivel az alfa izoforma 1E8Z kódon hozzáférhető kristályszerkezetében több flexibilis régióról sem férhető hozzá szerkezeti információ, ezért a szerkezetpredikciót a templát ismert szerkezetének megfelelő régiókra korlátoztuk és ennek megfelelően készítettük el a végleges szekvenciaillesztést. A modellépítést a Modeller programcsomaggal valósítottuk meg. A térbeli peremfeltételek figyelembevételével előállított modellek mindegyikét további vizsgálatoknak vetettük alá, közülük a Procheck programmal legjobb minőségűnek ítélt szerkezetet finomítottuk. A finomítás során az energetikailag kedvezőtlen kontaktusokra, kötéstávolságokra és szögekre, valamint az aromás oldalláncok gyűrűinek planaritására koncentráltunk. A finomítás eredményeképpen kapott szerkezetet a Procheck programmal újravizsgáltuk, ennek minősége már megfelelőnek bizonyult. Az eredményekről angol nyelvű összefoglaló készítettünk, amit a jelentéshez mellékelünk. A kutatásokban partnerként közreműködő ComGenex Rt. tulajdonosváltása miatt a témát nem vittük tovább.

### **2005 évben:**

2005 év folyamán a kutatási tervnek megfelelően elsősorban a Nitrogén monoxid reduktáz (NOR) vizsgálatával foglalkoztunk. Vizsgáltuk egy neurodegeneratív megbetegedésekben szerepet játszó prion protein konformációs flexibilitását. A metodikai kutatások területén elvégeztük néhány, konformációs analízis módszer összehasonlító elemzését. A kutatási tervben szereplő, humán P450 izoformák szerkezetpredikciójára vonatkozó elképzelésünket az időközben kísérleti módszerekkel meghatározott szerkezetek publikálása miatt (Ekroos,

M., Sjögren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4 (2006) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (37), pp. 13682-13687.; The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution (2004) Journal of Biological Chemistry, 279 (37), pp. 38091-38094.; Wester, M.R., Yano, J.K., Schoch, G.A., Yang, C., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F. The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution (2004) Journal of Biological Chemistry, 279 (34), pp. 35630-35637.; Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8: Evidence for a peripheral fatty acid binding site (2004) Journal of Biological Chemistry, 279 (10), pp. 9497-9503.; Hernandez, C.E., Kumar, S., Liu, H., Halpert, J.R. Investigation of the role of cytochrome P450 2B4 active site residues in substrate metabolism based on crystal structures of the ligand-bound enzyme (2006) Archives of Biochemistry and Biophysics, 455 (1), pp. 61-67.) nem valósítottuk meg.

### *1. NADH kofaktor és NO kölcsönhatása a P450 NO-reduktáz fehérjében*

A nitrogénmonoxid reduktáz (NOR) a NO szint csökkentését, a NO dinitrogén oxiddá történő redukciója által végzi. A NOR hem fehérje, a ligandumkötő zsebe igen tágas, feltételezik, hogy a működéséhez szükséges NADH kofaktor is e hem feletti tágas üregben kötődik. Az első számítás során (Monte Carlo Multiple Minimum keresés (MCMM) (BatchMin program, AMBER\* erőter felhasználásával, melyhez a hem csoport, a NO molekula és a NADH kofaktor töltéseit kvantumkémiailag határoztuk meg), ennek megfelelően, bevezettünk egy kényszerfeltételt, amely a kérdéses C atom és a NO oxigénjének távolságát 3,4 +/- 0,5Å-re rögzíti. A keresés legkedvezőbb elrendeződéséből kiindulva LMCS (Low-Mode Conformational Search) számítást végeztünk a GB/SA szolvatációval, ahol már nem alkalmaztunk távolság-kényszert a NO és a NADH molekula között.

A számított modell összhangban van a kísérleti eredményekkel: az Arg64, Lys291, Arg174 csoportokról sikerült megmutatni, hogy valóban döntő fontosságúak a NADH koordinációjában, az ún. B' hélix részvételét a kofaktor megkötésben és elmozdulását is sikerült igazolni, valamint megmutattuk, hogy a NO környezetéből induló és az oldószerbe vezető H hidas láncolatot (mely a katalizált átalakuláshoz szükséges protont képes szállítani) nem rontja el a NADH megkötődése annak ellenére, hogy az ebben résztvevő aminosavaknak szabad mozgást biztosítottunk. Egy eddig nem feltételezett de nagyon jelentős kölcsönhatás lehetőségére is fény derült: az általunk számított szerkezetben a NADH a hem csoport egyik propionátjával is H-hidas kapcsolatot alakít ki. A kialakított komplex modellt kiindulási szerkezetnek használva 5ns-os NPT molekuladinamikai szimulációt hajtottunk végre, hogy a modell stabilitását vizsgáljuk valamint, hogy a fehérje mátrixon belüli víz struktúráját felderítsük. A kéziratot a Journal of Molecular Graphics and Modelling folyóiratban közzeltük (Dóra K. Menyhárd, György M. Keserű: Binding mode analysis of the NADH cofactor in nitric oxide reductase: A theoretical study Journal of Molecular Graphics and Modelling 25(3), 363-372 (2006)).

### *2. Prion protein fragmens konformációs átalakulásának vizsgálata*

Bár az eredeti kutatási tervben ez a téma nem szerepelt, a csoportunk és a BME Általános és Analitika tanszéke közt kialakult együttműködés alapján kezdtünk el e területen dolgozni. Egyes neurodegeneratív megbetegedések kialakulásáért a megfelelő fehérje hibás poszt-transzlációs feltekeredése lehet felelős, egy ilyen fehérje az általunk vizsgált prion glycoprotein (PrP). A PrP endogén (PrPC) és a patogenetikus formája (PrPSc) mind az  $\alpha$ -hélix, mind a  $\beta$ -redő tartalmában különbözik, különösen ez utóbbi növekedése (3%-ról 43-45%-ra) szignifikáns a PrPC  $\rightarrow$  PrPSc konformációs átalakulás során. A PrPSc ellenáll a proteolitikus emésztésnek és amiloid plakkok kialakulásához vezet az agyban. A PrPC forma szerkezetét NMR-spektroszkópiával meghatározták: egy három hélix alkotta globuláris

doménből, két rövid  $\beta$ -redős szakaszból áll, az N-terminális kiterjedt régió rendezetlen. A PrPSc fomának nem sikerült a szerkezetét meghatározni, ezért a konformációs átalakulás mechanizmusa sem tisztázott. A mi számításaink a 115-122 szakaszra vonatkoznak, mely szekvenciát tartalmazó peptidekről megmutatták, hogy képesek megakadályozni a PrPC  $\rightarrow$  PrPSc átalakulást.

A PrP 115-122 szakaszának megfelelő szekvenciájú modellünkön MCMM kereséseket hajtottunk végre (AMBER\* erőter felhasználásával) vákuum- és vizes közegben, majd a karakterisztikus minimum energiájú konformerek geometriáját DFT módszerrel optimaltunk (RI-PBE/SZP) és az energiájukat meghatároztuk (PBE/TZVPP). Az MCMM keresés globális minimuma mindkét közegben közel azonosnak adódott (az atompozíciók rms-e: 0.10 Å) és az NMR-el meghatározott szerkezettel is jó egyezést mutatott (a gerincszerkezet atomjainak rms-e: 1.58 Å). A közel 50000 konformer csoportosítására a terminális amionosavak távolságát választottuk; ennek alapján 10 konformáció-osztályba soroltuk őket. Ezen osztályok legalacsonyabb energiájú elemét vettük DFT analízis alá. Sikerült megmutatni, hogy a vizsgált konformerek stabilitását az N-H...O típusú hidrogén hidak határozzák meg, míg a N-H...N típusú kölcsönhatások nem játszanak jelentős szerepet. Eredményeinket a THEOCHEM folyóiratban közöltük (Horváth, V., Kovács, A., Menyhárd, D.K. Conformational studies on the prion protein 115-122 fragment Journal of Molecular Structure: THEOCHEM 804 (1-3), pp. 9-15, 2007).

### *3. Konformációs kereső algoritmusok összehasonlító vizsgálata különös tekintettel az LMOD módszerre*

A metodikai vizsgálatok területén öt jól ismert konformációs kereső algoritmus mintavételezési képességeit hasonlítottuk össze geometriai és energetikai kritériumok alapján. Ideális esetben egy konformációs kereső program a lehető legnagyobb számú, kis energiájú konformációt kell megtalálja (energetikai kritérium) úgy, hogy közben a lehető legtöbb különféle molekula alakot megvizsgálja, más szóval a konformációs teret a lehető legjobban bejárja (geometriai kritérium). A geometriai analízisre két módszert alkalmaztunk. Az egyik módszer az egyes algoritmusok által generált konformációk eloszlását hasonlítja össze sokdimenziós skálázással, a konformációk 3-dimenziós térbe való vetítése után, a másik módszer pedig a koordináta-kovariancia mátrixok sajátérték spektrumát vizsgálja. Az energetikai vizsgálat során minden egyes konformációt újraoptimaltunk egy egységes, szemiempirikus kvantumkémiai erőterrel. Az öt konformációs kereső program a DGEOM, QXP, ROTATE, LMOD és az OMEGA voltak, a molekula adatbázis pedig a LeadQuest könyvtár egy 604 vegyületből álló, maximálisan diverz része. A vizsgálat eredménye szerint az energetikai kritérium alapján egyértelműen az LMOD szerepelt a legjobban, míg a geometriai kritériumok alapján több módszer is jól használhatónak bizonyult, de ezek a keresések zömében csak nagy energiájú konformációkat szolgáltattak, amelyek azonban hasznosak lehetnek dokkolásnál, ahol a ligandumok általában nem a legalacsonyabb konformációjukkal komplexálódnak. Sebesség szempontjából az abszolút győztes az OMEGA volt. A teljes vizsgálatot tartalmazó kéziratot a J. Mol. Graphics and Modelling c. folyóiratban közöltük (Loferer, M.J., Kolossváry, I., Aszódi, A. Analyzing the performance of conformational search programs on compound databases Journal of Molecular Graphics and Modelling 25 (5), pp. 700-710, 2007).

### **2006 évben:**

A humán P450 fehérjék kísérleti szerkezetmeghatározása terén elért eredmények miatt 2005-ben a kutatási munkaterv megváltoztatására kényszerültünk. A rendelkezésünkre bocsátott kutatási források eredményes felhasználása érdekében a P450 területet érintő kutatási célok átgondolása mellett egy új, fehérjék molekuláris felismeréssel kapcsolatos témát vettünk fel a

támogatott kutatási tevékenységek közé. E kutatási témában célunk a gyógyszeripari szempontból kiemelt jelentőséggel bíró hisztamin receptorok aktiválódásának és gátlásának vizsgálata, valamint új hisztamin antagonisták azonosítására alkalmas virtuális szűrési módszerek kidolgozása volt.

### *1. Eljárás humán P450 2C9 ligandumok azonosítására, az izoforma specificitás vizsgálata a 2C családban*

A kutatási tervnek megfelelően eljárást dolgoztunk ki 2C9 ligandumok azonosítására. Munkánkat az időközben nyilvánosságra hozott 2C9 szerkezetek elemzésével kezdtük. Ezek között megtalálható az enzim apo formája, valamint a warfarinnal, illetve fluboprofennal képzett komplex szerkezete is. A virtuális szűrési eljárást a FlexX algoritmus alkalmazásával valósítottuk meg. Meglepetésünkre a korábbi vizsgálatainkban megfelelő hatékonyságot biztosító, nagy felbontású, ligandumkötött kristályszerkezeteken végzett szűrővizsgálatok az apo formához hasonlóan nem hoztak eredményt. Ezért a szerkezetek összehasonlító elemzése alapján egy új, a két ligandumkötő helyet egyidejűleg magába foglaló, egyesített kötőhelyet hoztunk létre. Az így megadott kötőhely alkalmazásával az ismert 2C9 ligandumok 76%-át sikerült a rangsorolt szűrt adatbázis legfelső 1%-ban azonosítanunk. Ezáltal hatékony eljárást kaptunk 2C9 ligandumok nagy adatbázisokból történő azonosítására. Az eljárás teljesítőképességét szelektivitási vizsgálatokban is teszteltük. Ennek során az ismert 2C9 ligandumokat 2C8, 2C18 és 2C19 ligandumok közül kíséreltük meg felismerni. Az általunk kidolgozott módszer a 2C8 ligandumokkal kevert 2C9 ligandumok 88%-át ismerte fel. A 2C18 és 2C19 ligandumok esetében ennél gyengébb, de még elfogadható eredményeket kaptunk. Eredményeinket a Journal of Computer Aided Molecular Design folyóirathoz küldtük be, ahol azt közlésre elfogadták (Tímea Polgár, Dóra K. Menyhárd, György M. Keserű Effective virtual screening protocol for CYP2C9 ligands using a screening site constructed from flubiprofen and S-warfarin pockets, Journal of Computer Aided Molecular Design, közésre elfogadva).

### *2. Hisztamin receptorok szerkezetének, aktiválódásának és gátlásának vizsgálata*

A hisztamin receptorok vizsgálata során elsőként a homológiamodellezés módszerével 3D atomi modellt dolgoztunk ki a humán H1 receptorra. Genetikus algoritmus alapú dokkoló módszer alkalmazásával vizsgáltuk a különböző, ismert H1 agonisták és antagonisták kötődése során kialakuló kölcsönhatásokat. A kötőmódok elemzésével rámutattunk arra, hogy a receptorban azonosítható hét új hidrofób kölcsönhatásra kész aminosav (Tyr 108, Phe 184, Phe 190, Phe 199, Phe 424, Trp 428, Tyr 431). Ezek az aminosavak egy eddig nem ismert lipofil kötőzsebet definiálnak, amelyet felhasználhatunk új, szerkezetileg eltérő H1 ligandumok tervezése során. Eredményeinket a European Journal of Medicinal Chemistry folyóiratban közzeltük (Róbert Kiss, Zoltán Kovári, György M. Keserű: Homology modeling and binding site mapping of the human histamine H1 receptor Eur. J. Med. Chem. 39(11), 959-967 (2004)).

### *3. Hisztamin H4 receptor ligandumok azonosítására alkalmas virtuális szűrési eljárás kidolgozása és kísérleti validálása*

Munkánk folytatásaképpen elkészítettük a humán H4 receptor atomi felbontású 3D modelljét is. A homológiamodell építése során az általánosan alkalmazott marha rodopszin fehérje templát mellett különböző H4 ligandumok által szolgáltatott szerkezeti információkat is felhasználtunk. A különböző ligandumokkal készített H4 receptor modelleken dúsulási vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy virtuális szűrési eljárást dolgozzunk ki új H4 ligandumok azonosítására. A dúsulási vizsgálatokban feltérképeztük a különböző fehérjekonformációk, dokkoló algoritmusok és pontozófüggvények hatását az ismert H4 ligandumok nagy adatbázisokból történő azonosítására. A H4 agonisták dokkolása során megállapítottuk, hogy ezek az Asp94 (3.32), Glu182 (5.46) és Thr323 (6.55) aminosavakkal, míg az antagonisták csak az Asp94 (3.32) és Glu182 (5.46) aminosavakkal alakítanak ki

kölcsönhatást. Eredményeink arra utalnak, hogy a Thr323 (6.55) az agonisták kötődése mellett a receptorok aktivációjában is szerepet játszhat. A dúsulási vizsgálatok alapján a legjobb szűrési eredményt a hisztamin agonista jelenlétében készített, előzetesen optimált receptorkonformációval értük el. Eredményeink arra utalnak, hogy ez a modell a legalkalmasabb új H4 ligandumok nagy adatbázisokból történő azonosítására. Eredményeinket a European Journal of Medicinal Chemistry folyóiratban közzeltük (Róbert Kiss, Béla Noszál, Ákos Rácz, András Falus, Dániel Erős, György M. Keserű Binding Mode Analysis and Enrichment Studies on Homology Models of the Human Histamine H4 Receptor, Eur. J. Med. Chem. 2007, nyomdában [doi:10.1016/j.ejmech.2007.07.014](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.07.014)

### **2007 évben:**

Az OTKA Bizottság Elnökének egyedi engedélye alapján a hisztamin receptorok területén végzett kutatásainkat 2007. első félévében folytathattuk. E munka tette teljessé kutatásainkat abban az értelemben, hogy az előző évben kidolgozott virtuális szűrési módszerünket a gyakorlatban is kipróbálhattuk. Munkánk során egy több mint 8 millió molekulát tartalmazó adatbázis szűrésével az eddig ismert legnagyobb szerkezet alapú virtuális szűrővizsgálatot valósítottuk meg. A szűrővizsgálat eredményeképpen több vegyületcsaládot is azonosítottunk, amelyeket az általunk beállított humán H4 receptor kötődési tesztben kísérletileg is megvizsgáltunk. A kísérleti eredmények alapján három, az irodalomban eddig le nem írt vegyületcsaládot azonosítottunk, amelyek szubmikromoláris affinitással kötődnek a H4 receptorhoz. Az eredmények részben alapját képezhetik egy esetleges szabadalmi bejelentésnek, másfelől azonban alkalmasak a tudományos közlésre is. Jelenleg az e témakörben írandó cikkünk kéziratán dolgozunk, amelyet a Bizottság kérésére megküldünk. A támogatás időtartama alatt a kutatási tervben nem szereplő témában egy további közleményt publikáltunk.

Bakó, P., Makó, A., Keglevich, G., Menyhárd, D.K., Sefcsik, T., Fekete, J. : Alkali metal- and ammonium picrate extraction and complex forming capabilities of D-glucose and D-mannose-based lariat ethers Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 55 (3-4), pp. 295-302, 2006.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy munkánk során a támogatott időszakra kitűzött célok legtöbbször megvalósítottuk. Feltérképeztük a foszfoglicerát kináz molekuláris felismerési folyamataiban szerepet játszó konformációs változásokat. Elvégeztük a foszfoinozitol kináz 3 alfa izoformájának 3D szerkezetpredikcióját, azonban a ligandumkötődés vizsgálatára a kooperáló partner elállása miatt nem került sor. Felderítettük a tetrahidriopterin (BH4) kofaktor szerepe a nitrogén monoxid szintetáz (NOS) aktiválódásában. Meghatároztuk a NO kötőhelyét a nitroforin 4 (NP4) fehérje aktív helyén. Low-mode (LMOD) keresésen alapuló platformfüggetlen konformerkereső és dokkoló eljárást dolgoztunk ki, amely az AMBER programcsomagban is hozzáférhető. Elvégeztük a kifejlesztett eljárás több konformerkereső módszerrel történő összehasonlító vizsgálatát. Bár a humán P450 fehérjék izoformáinak 3D szerkezetpredikcióját az időközben nyilvánosságra hozott kristályszerkezetek miatt nem valósítottuk meg eljárást dolgoztunk ki humán P450 2C9 ligandumok azonosítására és az izoforma specificitás vizsgálatára a 2C családban. Felderítettük a NADH kofaktor és NO kölcsönhatás szerepét a P450 NO-reduktáz fehérjében. A támogatott időszak alatt megkezdett hisztamin receptorok kutatását érintő vizsgálataink alapján új lipofil zsebet találtunk a H1 receptorban, ligandum információkkal segített homológiamodellezéssel előállítottuk a H4 receptor első atomi felbontású modelljét és eljárást dolgoztunk ki új H4 ligandumok azonosítására. Utóbbi eljárást az eddig ismert legkiterjedtebb szerkezet alapú szűrővizsgálatban alkalmazva új, kísérletileg is megerősített H4 ligandumokat azonosítottunk. A támogatott időszakban megvalósított kutatómunka eredményeit összesen 10 közleményben foglaltuk össze, az összesített impakt faktor 24.7.