

*Kalászi Adrián*

# **Konformációs flexibilitás és 3D QSAR**

*Témavezető: dr. Farkas Ödön, docens*

*Kémia Doktori Iskola – vezetője: Dr. Inzelt György, egyetemi tanár*

*Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia doktori  
program – vezetője: Dr. Horváth István Tamás, egyetemi tanár*

*Készült az*

*ELTE TTK, Kémiai Intézet, Kémiai Informatika Laboratóriumban*

*2007*

## 1. A kutatási téma előzményei

A gyógyszerkutatás egyik fontos lépése, a vezérmolekula keresése. E folyamat során egyre intenzívebben használják a virtuális szűrővizsgálatot (VS). A VS olyan *in silico*, modellező és szimulációs módszerek gyűjtőneve, amelyek a vizsgálandó molekulatárak szűrésére – szerkezeti diverzitásának növelésére, vagy éppenséggel fókuszálására – használhatók. A VS hatékonyságát jelentősen növelheti a farmakofor előzetes ismerete. A farmakofor meghatározása nem egyszerű feladat, még akkor sem, ha a kötőhely térszerkezete ismert, de még nagyobb kihívást jelent, ha nem rendelkezünk ilyen 3D információval.

Egy olyan kísérleti és számítási alapokon nyugvó eljárás kifejlesztésén dolgozunk, amely képes előállítani a farmakofort akkor, ha térszerkezeti információval nem rendelkezünk a kötőhelyről. Ekkor, pusztán a ligand molekulák kísérletileg meghatározott kötődési aktivitás értékeit vesszük figyelembe.

A módszer kifejlesztésénél a kiindulási ötletünk az volt, hogy egy speciális, flexibilis molekulákból álló könyvtár segítségével térképezzük fel az aktív helyet. Ettől a tartól nem várjuk el, hogy hatékony gyógyszermolekulát tartalmazzon, ugyanakkor a tárat úgy kell összeállítani, hogy az *in vitro* meghatározott kötődési aktivitások különbsége lehetőleg csak a konformációs eloszlástól függjön.

A doktori dolgozatom e kutatási folyamat első lépéseit foglalja össze.

## **2. A munka célkitűzései**

Doktori munkám során első feladatomban az volt, hogy egy mucin epitóp pentapeptideket tartalmazó molekulatár esetén határozzam meg a kötődésért felelős konformációt. A molekulatár egyes tagjai kísérletileg meghatározott kötődési aktivitás értékkel rendelkeztek, de a célfehérje háromdimenziós térszerkezete ismeretlen volt. Miután a szakirodalomban nem volt olyan módszer, amely e feladatot megnyugtató módon képes lett volna megoldani, célul tűztük ki, egy általánosan használható, ilyen eljárás megvalósítását.

## **3. Alkalmazott módszerek**

Olyan számítási eljárást terveztem és valósítottam meg, amely egy molekulatár esetén az egyes molekulák konformációs eloszlását modellezi és megkeresi azokat a konformációs térfogatókat, amelyek a kötődő konformációkat tartalmazhatják.

A konformációs eloszlás modellezését végző modul részét képező konformációs analízis algoritmust FORTRAN77 nyelven valósítottam meg, a molekuladinamikai szimulációkat és a geometria-optimalizációs eljárásokat a GROMACS programcsomag keretein belül végeztem. Bizonyos egyszerűbb részfeladatokat unix shell script használatával és awk nyelven írt eljárások alkalmazásával végeztem el. A trajektóriák egyes konformációit MySQL adatbázisban tároltam.

A bioaktív-konformáció kereső algoritmust JAVA nyelven írtam, kihasználva a nyelv objektum-orientált környezetét. A bioaktív-konformáció kereső eljárás párhuzamosítható részeit többszálú (multi thread) algoritmusokkal valósítottam meg. Ez a JAVA kód tartotta a közvetlen kapcsolatot a MySQL szerverrel is. A molekula leírására a ChemAxon Kft. Marvin csomagjában található molekula leíró osztályt használtam.

#### 4. Kutatási eredményeim tézisei

- Levezettem, hogy a szerkezet-hatás összefüggés szétválasztható egy konformációs flexibilitásnak és molekula rigid kötődésének megfelelő tagra. Ha elő tudunk állítani olyan molekulakönyvtárat, ahol az egyes molekulák rigid kötődésének megfelelő tagját állandónak vehetjük, a mért (például  $IC_{50}$  vagy  $K_i$ ) értékek reciproka egyenesen arányos lesz a bioaktív-konformáció oldatbeli relatív sűrűségével.
- Megmutattam, hogy a rigid kötődést leíró tag állandóságának feltétele, hogy a molekuláknak azonos módon és azonos helyre kell kötődniük, és az egyes molekulákat felépítő atomoknak csoportosíthatónak kell lenniük egy úgynevezett PCORE, és esetlegesen egy off-PCORE halmazba. A PCORE halmaznak neveztem el az olyan atomok halmazát, amelyek lényeges szerepet játszanak a kötődésben. Az off-PCORE halmazba sorolt atomok pedig a kötődést nem, vagy csak közvetve, csak a PCORE konformációs viselkedésének módosításával befolyásolják. A PCORE halmaznak minden molekula esetén ugyanolyan típusú atomokból kell állnia, és szükséges, hogy a PCORE a kötődés során kialakuló konformációját (farmakofor) az oldatban is felvegye.
- Elkészítettem egy olyan, 3D farmakofor kereső inverz QSAR eljárást (IQsar), amely modellezi az egyes ligand molekulák oldatbeli konformációs eloszlását, majd egy közös térbe, a PCORE atomok által leírt térbe vetíti. Ebben a térben az általam levezetett összefüggés alapján megkeresi azokat a konformációs térfogatókat, amelyek a ligand bioaktív konformációjával azonosíthatók. A számítási eljárás két fő modulból áll.
- Megterveztem és megvalósítottam az eljárás első modulját, amely az egyes molekulák konformációs terét térképezi fel. Ez a konformációs analízis eljárás sztohasztikus alapon működik úgy, hogy magas energiájú molekuladinamikai szimulációkat végez, és térszerkezeti változástól függően geometria-optimalásokat hajt végre. A módszer ciklikus és lineáris molekulákra is alkalmazható.

- Megterveztem és megvalósítottam két, különböző elven működő bioaktív-konformáció kereső eljárást.
- Elvégeztem egy oligotuftsin alapú hordozómolekula konjugációs helyei oldatbeli hozzáférhetőségének jellemzését. Megállapítottam, hogy a konjugálási helyek nagyjából egyformán, a molekula többi részéhez képest jobban hozzáférhetőek. A konjugálási helyekhez a későbbi kísérletek során jó hatásfokkal lehetett kapcsolni molekulákat.
- Bioaktív-konformáció keresést végeztem egy mucin epitóp pentapeptidekből álló tár esetén. A molekulák közös TQTXT motívumot tartalmaztak. A valószínűsíthető bioaktív konformációra jellemző térszerkezet kialakításában döntő szerepe van a Thr<sup>1</sup> oldallánca és a C-terminális között kialakuló hidrogénkötésnek. A kötődő konformációt ugyanakkor nagyobb biztonsággal tudnánk megjósolni, ha ciklikus származékokat is fel tudnánk venni a peptidtárba.
- Megállapítottam, hogy a módszer alapján kevés kiindulási információ esetén is képesek lehetünk olyan új, vizsgálandó szerkezetcsaládra javaslatot tenni, amelynek segítségével a kötődéskor fellépő konformációs viszonyok könnyebben tisztázhatók.
- Bioaktív-konformáció keresést végeztem egy olyan peptidtárra, ahol a közös  $\beta$ -amiloid epitóp szekvenciát, különböző lebegő (flank) szakaszokkal egészítették ki. Ekkor a PCORE régióként az FRHDSGY aminosavakból álló epitóp szekvenciát, az off-PCORE régióként pedig a lebegő szakaszokat definiáltam. Megállapítottam, hogy a talált bioaktív konformáció egy olyan síkalkatú kanyar szerkezet, ahol a kanyar csúcsán a szerin aminosav áll, és a kanyar szárai egyenesen és párhuzamosan futnak. A PCORE régiót a lebegő szakaszok nem temetik el, a célfehérje aktív helye számára jól hozzáférhető.

## 5. Eredmények összegzése

Kidolgoztam és megvalósítottam egy farmakofor kereső inverz QSAR eljárást, amelyet két peptid tár vizsgálatával teszteltem. Mindkét esetben a kapott farmakofort a QSAR modellekre általánosan használt, statisztikai belső validálási eljárásokkal ellenőriztem. A statisztikai külső validálás, és a meghatározott farmakoforok alapján rigid analóg keresése és kötődési vizsgálata nem képezte a dolgozat tárgyát, de rövid távú céljaink között szerepel.

## 6. A tézisek alapját képező közlemények

1. **Kalászi, A.**; Farkas, O. Lead conformer prediction based on a library of flexible molecules. *Journal of Molecular Structure-THOCCHEM* **2003**, 666, 645-649.
2. Mezo, G.; **Kalászi, A.**; Remenyi, J.; Majer, Z.; Hilbert, A.; Lang, O.; Kohidai, L.; Barna, K.; Gaal, D.; Hudecz, F. Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence. *Biopolymers* **2004**, 73, 645-656.
3. Manea, M.; **Kalászi, A.**; Mezo, G.; Horvati, K.; Horvath, A.; Farkas, O.; Przybylski, M.; Hudecz, F. Antibody recognition and conformational flexibility of a plaque-specific  $\beta$ -amyloid epitope modulated by non-native peptide flanking regions. *Journal of Medical Chemistry – kisebb javításokkal elfogadva* **2007**.  
(megjegyzés: a publikáció első szerzője megosztott helyen Manea, M. és **Kalászi, A.**)

## 7. Egyéb közlemények

4. Mező, G.; **Kalászi, A.**; Reményi, J.; Mihala, N.; Majer, Zs.; Hilbert, Á.; Láng, O.; Kőhidai, L.; Barna, K.; Gaál, D. Synthesis of new carrier molecules based on repeated tuftsin sequences. In *Peptides 2000.*; Martinez, J.; Fehrenz, J. A. Eds.; EDK: Paris, **2001**; pp 253-254.
5. **Kalászi, A.**; Farkas, O. Predicting lead compounds using libraries of flexible molecules. *Biopolymers* **2003**, *71*, 331.
6. Bagyi, I.; Balogh, B.; Czajlik, A.; Elias, O.; Gaspari, Z.; Gergely, V.; Hudaky, I.; Hudaky, P.; **Kalászi, A.**; Karolyhazy, L.; Keseru, K.; Kiss, R.; Krajsovszky, G.; Lang, B.; Nagy, T.; Racz, A.; Szentesi, A.; Tabi, T.; Tapolcsanyi, P.; Vaik, J.; Koo, J. C. P.; Chass, G. A.; Farkas, O.; Perczel, A.; Matyus, P. Generation and analysis of the conformational potential energy surfaces of N-acetyl-N-methyl-L-alanine-N'-methylamide. An exploratory ab initio study. *Journal of Molecular Structure-Theochem* **2003**, *625*, 121-136.
7. **Kalászi, A.**; Imre, G.; Jakli, I.; Farkas, O. Theoretical basis and a computational tool to identify binding conformations of flexible ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry - beüldve* **2007**.