



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**EXTRACELLULÁRIS ENZIMEK ÉS
BIOAKTÍV ANYAGOK
KÖLCSÖNHATÁSAINAK
MODELLEZÉSE**

ECKER JÁNOS

GÖDÖLLŐ

2022

A doktori iskola

megnevezése: Biológiai Tudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológiai tudományok

vezetője: Dr. Nagy Zoltán
Tanszékvezető egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Növénytermesztési-tudományok Intézet
Növényélettan és Növényökológia Tanszék

Témavezető: Dr. Fülöp László
PhD, Dr. Habil.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Az extracelluláris enzimek vagy exoenzimek a sejten kívüli térben látják el funkciójukat. Ilyen enzimeket baktériumok és eukarióta szervezetek egyaránt termelnek, és számos biológiai folyamatban vesznek részt, például makromolekulák lebontásában. Bizonyos enzimek xenobiotikumok átalakítására is képesek, így a bioremediációban is van szerepük, valamint a szennyezők átalakításával akár olyan biológiailag aktív másodlagos termékek is nyerhetők, amelyek majd peszticidek vagy antimikrobiális gyógyszerek hatóanyagaivá válhatnak. Az exoenzimek szekréció után kikerülnek a sejt kontrollja alól, így – az enzimtől függően – változatos fizikai-kémiai közegekben kell katalitikus aktivitással rendelkezniük. Azonban az enzimek vizsgálata körülményes, hosszadalmas, és gyakran nehéz a körülményeket optimalizálni. Így a különböző közegekben végzett enzimaktivitás-vizsgálatok elvégzése mellett azok molekulaszintű modellezése is igen fontos feladat. Utóbbi módszerek előnye, hogy kevésbé anyagigényesek, így jól megválasztott szoftveres háttérrel és a lehetőségek, illetve a kitűzött célok szempontjából kellően pontos modellekkel számos molekulaszintű mechanizmus szemléltethető, valamint a molekulákra vonatkozóan is számos tulajdonság elemezhető és számszerűsíthető. Ezek a megközelítési módok még viszonylag újszerűek, azonban eszköztáruk folyamatosan gyarapodik, és az alkalmazott módszerek egyre pontosabb eredményeket adnak. Ezért tudományos relevanciájuk ma már megkérdőjelezhetetlen, amit számos hazai és külföldi kutatócsoport, neves folyóiratokban közölt eredményei is alátámasztanak. Ebből kifolyólag érdemes ilyen kutatásokkal

foglalkozni, mert az eredményekre nemzetközi viszonylatban is igény mutatkozik.

A gyakorlatban a *Phanerochaete chrysosporium* nevű bazídiumos gombát elterjedten használják szerves szennyezőanyagok lebontására, ugyanis exoenzimei nem szubsztrátspecifikusak. A gomba által termelt lignin-peroxidáz a lignin biodegradáció egyik kulcsenzime. A gomba képes különböző xenobiotikumok bontására, azonban a metabolizmusban résztvevő endo- és exoenzimek konkrét szerepe még nem tisztázott. Az atrazin mint széleskörűen alkalmazott növényvédőszer, a lignin-peroxidáz pedig mint xenobiotikumok lebontására használható enzim jó modellek a téma megközelítéséhez.

A gomba által termelt, veratril-alkohol (1,2-dimetoxi-benzol) nevű másodlagos anyagcseretermék mediátor szerepet tölt be a lignin-peroxidáz által katalizált reakciókban, jelenlétében bizonyos végtermékek nagyobb mennyiségben keletkeznek. A lignin-peroxidáz esetén ismert még az 1,4-dimetoxi-benzol mint mediátor. Fontos kérdés, hogy a különböző mediátorok hogyan befolyásolják az enzim térszerkezetét, milyen szubsztrátok esetén működnek.

Az atrazin (1-klór-3-etil-amin-5-izopropil-amin-2,4,6-triazin) nevű szimmetrikus triazin-származék az egyik legszélesebb körben alkalmazott herbicid az Egyesült Államok és Ausztrália mezőgazdaságában. Leginkább a kukorica és a cukornád kétszikű gyomnövényeinek pre- és posztemergens elpusztítására használható fel. Az atrazin extracelluláris enzimekkel történő metabolizmusa egy viszonylag intenzíven kutatott terület, azonban az eddigi eredmények meglehetősen ellentmondásosak, a szer ezen enzimekkel történő lebontásának mechanizmusa kevésbé ismert. Számos baktérium és gomba képes az atrazin bizonyos mértékű degradációjára, azonban a konkrét enzimek szerepe, és a reakcióútvonalak nincsenek teljesen feltárva.

A *Phanerochaete chrysosporium* szintén képes a herbicid bontására, azonban kiderült, hogy a lignin-peroxidáz tisztított formában nem reagál az atrazinnal. Ez önmagában legfeljebb egy negatív eredmény lenne, amely nem érdemel figyelmet, azonban a lignin-peroxidáz képes az atrazinnal szerkezeti hasonlóságot mutató vegyületek lebontására. A kérdés így az, hogy a szubsztrát (atrazin) és az enzim (lignin-peroxidáz) oldaláról melyek azok a fizikai, kémiai és szerkezeti paraméterek, amelyek meghatározzák az adott vegyület bonthatóságát, hozzáférhetőségét.

Ismeretes, hogy a lignin jelenléte a cellulázok jelentős részének aktivitás-csökkenését okozza. Modellezéssel és véletlen aminosav-cserékkel hatékonyabb cellulázokat lehetne előállítani, és a lignin-celluláz kölcsönhatásokról is többet lehetne megtudni.

Emellett a bioüzemanyagok (bioetanol, biodízel) előállításában is lehetne alkalmazni a molekulamodellőzés módszertanát, tekintve, hogy ezen energiaforrások iránt egyre növekszik az igény, és enzimes úton is lehetőség van az előállításukra. Az enzimek célzott módosításával, és szimulált körülmények közötti tesztelésével időt és anyagi forrásokat lehetne megspórolni a nagyobb aktivitású enzimek előállításához vezető úton.

Ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk az atrazin – lignin-peroxidáz közötti „inkompatibilitás” okairól, az enzim-szubsztrát interakciók atomi szintű leírása válik szükségessé. Ehhez felhasználhatjuk a molekulamodellőzés szinte teljes eszköztárát, és a munka során az alábbi célokat tűzzük ki.

1. Ahhoz, hogy az atrazint felhasználhassuk molekuladinamikai számítások során, kvantumkémiai módszerekkel kiszámoljuk a vegyület paramétereit: a nem kötő Lennard-Jones/van der Waals kölcsönhatásokat, geometriát, töltéseket, kötэшosszakát, kötэшszögeket és torziós szögeket.

2. A lignin-peroxidáz és az atrazin térszerkezetét felhasználva enzim-ligandum dokkolással megvizsgáljuk, hogy atrazinnak van-e affinitása az enzim aktív centrumához, majd a kapott komplex stabilitását és viselkedését molekuladinamikai szimulációkkal vizsgáljuk tovább. A szimulációk alatt kapott komplexekről kvantitatív adatokat (kötési energiák, az enzim aktív centruma aminosavainak konformációváltásai) gyűjtünk.
3. A kapott adatok kiértékelésével, atomi szintű magyarázatot adunk arra a tényre, hogy a lignin-peroxidáz tisztított formája nem képes bontani az atrazint. (Az atrazinnal szerkezeti hasonlóságot mutató vegyületeket viszont igen.)
4. Molekulamodellőzés segítségével megpróbáljuk feltérképezni a biopolimerázok működését. Emellett próbálunk összefüggéseket keresni a biopolimerek és biopolimerázok közötti gátló mechanizmusokra is, melyek akadályozhatják a biomassza eredményes feldolgozását. További célunk az is, hogy áttekintsük a biopolimerázok modellezésen alapuló fejlesztéseit, melyek szerepet játszhatnak a hatékonyabb biomassza feldolgozásában.
5. Vizsgáljuk a bioüzemanyagok előállításában szerepet játszó katalitikus folyamatokat, azon célból, hogy molekulamodellőzés segítségével hogyan optimalizálhatóak, és segítségükkel hogyan tehető hatékonyabbá a bioüzemanyagok előállítása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A felhasznált szoftverek bemutatása

Ebben az alfejezetben röviden bemutatjuk azokat az alkalmazásokat, amelyek előállították a munka különböző fázisaihoz szükséges adatokat és modelleket. A kvantumkémiai (QM) adatok előállításával kezdődő, és egészen a molekuladinamikai (MD) szimulációk kiértékeléséig tartó folyamat különböző állomásait különböző szoftverek jelzik, amelyek számára mindig az előző programmal előállított adatok szolgálnak bemenetként, ezért ezen alkalmazásokat is a felhasználásuk sorrendjében tárgyaljuk, ugyanis a szoftverek ismerete egyúttal átláthatóvá teszi a munkafolyamat logikáját, és tisztázza a bemeneti adatok eredetét is.

Avogadro. Egyszerűen kezelhető modellező program, amely képes a kézzel rajzolt molekulák szerkezeti és energetikai optimalizálására. Az atrazin (ATZ) molekula 3D szerkezetének előállításához használtuk, amely aztán a Visual Molecular Dynamics-hez került.

Visual Molecular Dynamics (VMD). A VMD egy molekuláris modellező és vizualizáló számítógépes program, amelyet elsősorban a MD szimulációk eredményeinek megtekintésére és elemzésére fejlesztettek ki. Tartalmaz továbbá eszközöket nukleinsav és fehérje szekvenciaadatokkal és tetszőleges grafikus objektumokkal való munkához.

Force Field Toolkit (ffTK). A VMD-en belüli olyan bővítmény, amely segíti a felhasználókat a CHARMM-kompatibilis erőter-paraméterek, köztük töltések, kötések, szögek és torziós szögek megállapításában. Ezekhez az eszközökhöz a mellékelt grafikus felhasználói felületen keresztül lehet hozzáférni, ami nagyban leegyszerűsíti az alapul szolgáló számítások beállítását és elemzését.

A beállított paraméterek QM szoftverhez kerülnek a kvantum adatok megállapításához, majd visszakerülnek a ffTK-hez, ahol egy végső optimalizáció során CHARMM36 erőterrel válnak kompatibilissé.

Gaussian 09 (G09). Elsősorban QM modellezésre használt szoftver, amely a ffTK-tal beállított adatok alapján megállapítja kvantum szinten a töltéseket, kötéseket, szögeket és torziós szögeket. Az adatokat végül a ffTK kompatibilissé teszi a CHARMM36 erőterrel. Az adatok alkalmassá válnak MD szimulációkban való részvételre.

Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD). Egy MD szimulációra szolgáló szoftver, amely a Charm++ párhuzamos programozási modell segítségével készült. Hatékony párhuzamosíthatóságáról ismert, és gyakran használják több millió atomot tartalmazó rendszerek szimulációjára. Grafikus felülettel nem rendelkezik, parancssorból indítható. Kimeneti fájljai a VMD-szel elemezhetők.

Docking Server & Autodock Tools. Fehérje-ligandum dokkolásra alkalmas szoftverek. A Docking Server csak online érhető el, egy központi szerveren fut, ezért a nagy számítási igényű dokkolásokat is gyorsabban és precízebben végzi, mint egy hagyományos PC-n futó szoftver. A bemeneti struktúrák (enzim és ligand) a VMD-ből is származhatnak, kimeneti fájljai pedig szintén megjeleníthetők és elemezhetők a VMD-szel, valamint előkészíthetők MD szimulációra a NAMD-szal.

Az Autodock szintén egy dokkoló szoftver, azonban ezt nem használtuk. Ennek grafikus felülete az Autodock Tools, amelyet a Docking Server által generált adatok megjelenítéséhez használtunk.

Az atrazin paramétereinek kiszámítása

Az erőter kiválasztása gyakran azon alapul, hogy az adott erőter egyáltalán milyen molekulákat képes kezelni. A CHARMM erőter nem tartalmazza azokat az adatokat, amelyeket additív módon alkalmazni tudnánk az ATZ molekulára, ezért az erőter bővítése szükséges, hogy az új molekulát is kezelni tudja. Az optimalizálási eljárásnak meg kell egyeznie azzal, amit az erőter (CHARMM) fejlesztéséhez használtak. A munka során ezt a standard eljárást alkalmaztuk.

A paraméterezési munkafolyamat a következő lépéseket és számításokat tartalmazza: 1. Hiányzó Lennard-Jones (LJ)/van der Waals (vdW) paraméterek hozzárendelése, 2. Geometria optimalizálása, 3. Víz kölcsönhatási energia számítása, 4. Töltések optimalizálása, 5. A potenciális energia második deriváltjának számítása, 6. Kötések és szögek optimalizálása, 7. Torziós vizsgálat, 8. Torziós szögek optimalizálása. Az ATZ paraméterezését a VMD (v1.9.3) szoftver Molefacture (v1.3) és fftk (v1.1) bővítményei, valamint a NAMD (v2.12) segítségével végeztük. Az fftk bemeneti QM adatait a G09 (Revision B.01) segítségével számoltuk ki. Az ATZ 3D szerkezetét és a VMD-hez tartozó bemeneti fájlját az Avogadro (v1.1.1) programmal állítottuk elő. Az ATZ töltéseinek ábrázolását a VMD Tachyon Parallel/Multiprocessor Ray Tracer nevű bővítményével rendereltük.

Hiányzó Lennard-Jones/van der Waals paraméterek hozzárendelése. A Molefacture segítségével a nem poláros hidrogének parciális töltéseit +0,09-re rögzítettük a CHARMM-erőterrel való kompatibilitás érdekében. Erre azért van szükség, mert a CHARMM esetében a hidrogéneket nem mindig ábrázoljuk explicit módon, hanem inkább úgy kezeljük őket, mint a nem-hidrogénatom

részét, amelyhez kovalensen kötődnek. Például egy metil-csoportot négy önálló atomként is lehet kezelni (egy szén és három hidrogén), vagy akár egyetlen atomként, a LJ/vdW paramétereket és töltéseket pedig a hidrogének kihagyásának figyelembevételével módosíthatjuk. Bár ez a megközelítés minden hidrogénre alkalmazható, jellemzően csak a nem poláros (alifás és aromás) hidrogénekre alkalmazzuk; a H-kötéses kölcsönhatások szempontjából fontos poláros hidrogének külön atomként vannak jelen a rendszerben.

A CHARMM36 teljes topológiájának és paraméterkészletének keresztellenőrzése után 6 kötés, 11 szög, 11 torziós szög és 3 LJ/vdW paraméter hiányzott, a redundáns adatokat nem vettük figyelembe. A LJ/vdW paramétereket analógia útján rendeltük hozzá, a referenciákat szintén a CHARMM36 topológiai és paraméteradataiból kaptuk.

Geometria optimalizálása. A G09 számításokat MP2/6-31G* elmélet-báziskészlet kombinációval végeztük.

Víz kölcsönhatási energia számítása. Az ATZ parciális töltéseinek meghatározásához szükséges a molekula vízkölcsönhatási helyeinek jellemzése kétdimenziós optimalizálással.

Minden parciálisan pozitív töltésű atom kölcsönhatásba léphet a víz oxigénjével, ezért azokat donornak, és minden parciálisan negatív töltésű atom kölcsönhatásba léphet a víz hidrogénjeivel, ezért azokat akceptornak határoztuk meg. Az egyetlen kivételt az etil-amin és az izopropil-csoportok sp^3 szénatomjai jelentik, ahol a vízmolekulák megközelítését a velük kötésben lévő hidrogének akadályozzák, ezért ezeket a csoportokat nem vettük be az optimalizálásba. A QM számításokat HF/6-31G* kombinációval végeztük.

Töltések optimalizálása. Az ATZ nettó töltését nullára állítottuk, és a nem poláris hidrogének rögzített töltéseit eltávolítottuk. Az optimalizálási rutint addig ismételtük, amíg két iterációs lépés nem

mutatott különbséget, és a szerkezeti és a topológia fájlt (PSF, TOP) frissítettük a végleges töltések értékeivel.

A potenciális energia második deriváltjának számítása. A potenciális energia második deriváltjának számítása hatékony módszer a kötések és szögek mentén bekövetkező torzulásokhoz kapcsolódó potenciális energiafelület rekonstrukciójára.

A számítást az ATZ korábban már optimalizált geometriájára alkalmaztuk. Az MP2/6-31G* szinten végeztük el a frekvenciák számítását, a molekuláris szimmetria számításán belüli felhasználása nélkül.

Kötések és szögek optimalizálása. A Geometry Weight értéket 1,0-ról 2,0-ra állítottuk, az Angles-Eq. Deviation tőrés határát pedig 10,0-ról 5,0-ra csökkentettük. Az első módosítás nagyobb súlyozást jelent, amely ahhoz kapcsolódik, hogy a hagyományos mechanikával optimalizált geometria mennyire egyezik a QM-optimalizált geometriával. Az utóbbi érték határozza meg azt a küszöbértéket, amely alatt az eltérések már nem járulnak hozzá az objektív függvényhez. A túl szoros Eq. Deviation küszöbértékek általában nagy erőállandókat eredményeznek, így az észszerű küszöbértékek kritikusak a megfelelően közeli optimalizált geometriák elérése és a környező potenciális energiafelület reprodukálása közötti kölcsönhatás kiegyensúlyozásához. Az iterációkat NAMD-szal végeztük, amíg az értékek konvergáltak egy minimumhoz.

Torziós vizsgálat. Mivel a ffTK kizárja a hidrogénekre végződő torziós szöveget, amikor az adatokat közvetlenül a készülőben lévő paraméterfájlból olvassa be, a korábban talált 11 torziós szöveget kézzel adtuk hozzá. A szkennelési intervallumokat (+/-) 180°-ra, a lépésközt pedig 10°-ra állítottuk be, így összesen 22 szkennelést készítettünk elő a QM számításokhoz (MP2/6-31G*).

Torziós szögek optimalizálása. A paraméterezés utolsó fázisában a G09 által szolgáltatott adatokat a NAMD hagyományos mechanikai módszerével kell finomítani, hogy a QM profilhoz illeszkedjenek. A torziós szögek teljes leírásához gyakran több olyan kifejezésre van szükség, amelyek a megfelelő periodicitást (\mathbf{n}) és fáziseltolódást (σ) hordozzák egy erőállandó mellett (\mathbf{k}).

A bemeneti \mathbf{n} és σ értékeket a CHARMM36 analóg torziós paramétereiből vettük. A finomítási algoritmust „downhill”-re, a toleranciaértéket pedig 0,0001-re állítottuk. A folyamatot addig iteráltuk, amíg a mechanikai profil kellően közel nem került a QM profilhoz.

Az atrazin és a lignin-peroxidáz interakciói

Az ATZ 3D modelljét és a szerkezet energiainimalizálását az Avogadro programmal végeztük. A dokkolási eljárást a Docking Server webes alkalmazással végeztük, az eredményeket pedig az AutoDockTools (v1.5.6) segítségével elemeztük. Az alkalmazott enzimszerkezetet az RCSB PDB adatbázisából (PDB: 1B82) nyertük 1,8 Ångström (Å, 10^{-10} m) felbontással. Az enzim *Phanerodontia chryso sporium* organizmusból származott és egy, a jelen munka szempontjából nem releváns R114A mutációt tartalmazott. A lignin-peroxidáz (LiP) MD szimulációit a NAMD szoftverrel végeztük el a CHARMM36 erőtérrrel. Az ATZ CHARMM-kompatibilis paramétereit a VMD szoftver fTK bővítményével és a G09 szoftverrel számoltuk ki az előző fejezetben már ismertetett módon. A képek renderelése a Tachyon Parallel/Multiprocessor Ray Tracer és az AutoDockTools programokkal történt.

Előkészítés dokkolásra. A hisztidineket protonáltuk (HSD forma; hisztidin hidrogénnel a delta nitrogénnel), az enzimszerkezetet

(hemmel és két Ca^{2+} ionnal) szolvatáltuk, a töltéseket semlegesítettük, és a NaCl koncentrációt $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ -ra (fiziológiás érték) állítottuk be. Energiaminimalizálást 30 000 lépésig futtattunk Conjugate Gradients módszerrel. Ez a módszer lineáris (azaz $\mathbf{Ax} = \mathbf{b}$ alakú) egyenletrendszerek megoldására alkalmas; a kerekítési hibák miatt iterációs módszernek tekintendő. A hőmérsékletet 288 K, 298 K és 308 K értékre állítottuk be, hogy három különböző konformert hozzunk létre. Ezután MD szimulációt futtattunk minden egyes minimalizált szerkezeten 10 nanoszekundumig (ns, 10^{-9} s). A hidratált komplexek esetében jól használható izoterm-izobár NPT-sokaságot (állandó részecskeszám, nyomás és hőmérséklet) alkalmaztunk periodikus peremfeltételekkel (Periodic Boundary Conditions), amelyek egy praktikusán végtelen nagy rendszert feltételeznek, hiszen az oldatban lévő makromolekula körül vákuum van, azonban az oldatot mint elemi cellát vesszük figyelembe, ezáltal mégis minimalizáljuk a felületi hatásokat, emellett részecskerácsos Ewald-elektrosztatikát (Particle Mesh Ewald Electrostatics) alkalmaztunk, 1 bar állandó nyomással. Lehetőség van biológiai molekulák szimulációjának elvégzésére a kondenzált fázisban úgy, hogy a nem kötő kölcsönhatásokat gyakorlatilag mind meg lehet tartani. Régebben ugyanis az erőforrások megtakarítása érdekében a számításokban nem vették figyelembe a meghatározott távolságon túli atom-atom nem kötő kölcsönhatásokat; a Particle Mesh Ewald használata szükségtelenné teszi ezt az egyszerűsítést, azaz nincs távolság alapú csonkítás a nem-kötő kölcsönhatásoknál. A 10 ns hosszúságú szimulációk mindegyikéből 1-1 olyan szerkezetet választottunk ki, amelynek a ligandum hozzáférési csatornája nyitott állapotban van. Ezek a konformerek voltak a dokkolási eljárás bemeneti struktúrái.

Enzim-ligandum dokkolás. A dokkolás módszerével előrejelezhető egy adott molekula (ligandum) affinitása/orientációja egy másik (biopolimer) molekulához. A pusztán geometriai komplementaritásra alapuló módszer esetén a ligandumot és a fehérjét az alak, felület, oldhatóság alapján értékelik, ezek alapján következtetnek, hogy a két struktúrát van-e értelme egymásra dokkolni, kompatibilisek-e egymással. A módszer ugyan meglehetősen gyors, de nem veszi figyelembe a komponensek dinamikus változásait, a konformáció változásának hatásait a kötődésre. A konkrét szimuláció esetén a fehérje és a ligandum el vannak szeparálva egymástól, a dokkolás indítása után a ligandumnak meg kell találnia az ideális konformációs állapotot, a célszekvencián belül. Minden konformációs változás után a szoftver kiszámolja az aktuális állapot energiáját. A módszer jóval számításigényesebb, de ez a megközelítés kevésbé absztrakt, mint a geometriai alapú.

A dokkoláshoz a LiP-nak csak az „A” alegységét használtuk (a két alegység azonos) oldószert nélkül. A szimulációs doboz (Simulation Box) középpontja a His82 aminosav volt, amely a ligandum hozzáférési csatornájának bejárata, és a doboz méretét 20 20 20 Å-re állítottuk be. A LiP és az ATZ parciális atomtöltéseit a hagyományos Gasteiger-módszerrel számoltuk ki, amely az atomok elektronegativitását veszi figyelembe. Minden LiP konformer esetében a teljes dokkolási folyamat 255 dokkolási pályát tartalmazott. A folyamat során a LiP szerkezete merev maradt, csak az ATZ volt rugalmas, ezért volt szükséges korábban egy nyitott állapotú ligandum csatornát tartalmazó konformer kiválasztása.

Molekuladinamikai finomítás és energetikai kiértékelés. A legnagyobb frekvencia értékkel rendelkező dokkolási eredményt választottuk ki, és az ATZ-LiP komplexet szolvatáltuk és minimalizáltuk azonos körülmények között. A komplexet 5 ns

hosszúságú MD szimulációval finomítottuk, ugyanazzal a hőmérsékleti értékkel és beállításokkal, amelyeket az adott konformer létrehozása során használtunk, hogy tanulmányozzuk a stabilitását. A kötési szabadenergiákat szolvatált fázisban a NAMD Energy bővítmény segítségével számoltuk ki. A kötési szabadenergiák a vdW, elektrosztatikus, poláris és nem poláris tagokból tevődnek össze. Végül az 5 ns-os finomítás mellett egy 100 ns hosszú MD szimulációt is végeztünk a kanonikus NVT-sokasággal (állandó részecskeszám, térfogat és hőmérséklet), hogy némileg több információt gyűjtsünk az ATZ viselkedéséről nagyobb időskálán. A NVT-t csak egyfajta durva és gyors szimuláció céljából alkalmaztuk; nem igazán elterjedt, mivel nem teszi lehetővé a rendszer számára a megfelelő relaxációt, és nem reprezentál kísérleti körülményeket. Mivel az NPT-sokasággal végzett 5 ns-os szimuláció ekkorra már tisztázta, hogy az ATZ hogyan viselkedik az enzim ligandum csatornájában, ezért ezt a 100 ns-os NVT szimulációt már csak egy gyorsabb (bba)n lefuttatható és könnyen kiértékelhető megerősítésnek szántuk.

A modellezés alapjai, biopolimerázok

Az adatbázisokban való kereséshez a következő keresőszavakat használtuk: *polysaccharides, cellulose hemicellulose lignin biodegradation, modification, immobilization, industry, O-glucosyl hydrolase, cellulase enzyme modeling, molecular modeling, computation, cellulase modification, cellulose enzyme modification modeling*. A keresést OR (VAGY) és AND (ÉS) kifejezésekkel kombináltuk. A kereséseket 2020-ig végeztük. A cikkeket és az azokban szereplő hivatkozásokat is áttekintettük. A fent kiemelt problémakör szempontjából érdekesnek talált cikkeket a következő

kategóriákba soroltuk: *Poliszacharidok biológiai lebontása; Szubsztrátok mechanikai és fizikai-kémiai módosítása; Cellulóz, hemicellulóz, lignin módosítása; Enzimek módosítása; Enzimek immobilizálása; Enzimek molekuláris modellezése.* Ezekből a cikkekből állítottuk össze tanulmányunkat, hogy megvizsgáljuk az extracelluláris enzimek modellalapú módosításának és a racionális tervezésük alkalmazásának elterjedtségét a hagyományos módszerekkel szemben.

A tanulmányban szereplő adatok alapján az alábbi enzim-ligandum dokkolásokat végeztük el azon célból, hogy eredményeik alapján felvázolhassuk az extracelluláris enzimekkel kapcsolatos kutatások további lehetőségeit: egy korábban már tanulmányozott *Cellulomonas* sp. CelB7 celluláz katalitikus doménjére dokkoltunk külön-külön egy cellulóz és egy lignin részletet, egy xylanáz (PDB: 1J01) katalitikus doménjére külön-külön egy xylán és egy lignin részletet, egy mannanáz (PDB: 2X2Y) aktív centrumára külön-külön egy mannan és egy lignin részletet, valamint az ATZ-nal kapcsolatos munkában már használt LiP-ra (PDB: 1B82) külön-külön egy lignin és egy celluláz részletet. A dokkolások során az enzim mindkét alegysége jelen volt. A dokkolásokat a Patch Dock programmal végeztük el.

Modellezés a bioüzemanyagok előállításában

Szemléltetésképpen elkészítettük egy átészterestéses reakció energiainimalizációval nyert modelljét. Van perspektíva azon megközelítésben, hogy bioüzemanyagokat részben vagy egészben olyan enzimekkel állítsunk elő, amelyeket előzetesen molekulamodellezéssel optimalizáltunk, majd csak ezután szintetizáltunk.

EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

Az atrazin CHARMM36-kompatibilis paraméterei

A MD számítások során a CHARMM36 erőter által beolvasott konkrét paramétereket négy fájl tartalmazza: PDB (atrazin.pdb), szerkezet (atrazin.psf), topológia (atrazin.top) és CHARMM36-kompatibilis paraméter fájl (par_charmm36_atrazine.par). Ezeket a fájlokat szabadon elérhetővé tettük.

Hiányzó Lennard-Jones/van der Waals paraméterek hozzárendelése. A paraméterek keresztellenőrzése során 3 LJ/vdW paraméter hiányzott: egy C2 (sp^2 -hibridállapotú szén), C3 (sp^3 -hibridállapotú szén) és egy Npl (sp^2 -hibridállapotú nitrogén három másik atomhoz kötődve, formálisan semleges) típust. A hozzárendelt paramétereket a CHARMM36 erőter topológiai és paraméteradataiból nyertük.

A C2 típust 2 vagy 3 nitrogén között elhelyezkedő 6 tagú gyűrűben lévő aromás szénnek, az egyikhez kétszeres kötéssel kötődve; a C3 típust sp^3 -hibridállapotú szénnek, az Npl típust pedig semleges nitrogénnek jelöltük, az ATZ-t aromás aminnak tekintve.

Töltések optimalizálása. Az ATZ atomjai töltéseinek értékei megtalálhatók a PSF fájlban. Az 1,3,5-triazin gyűrű szénatomjai és N2-je rendelkeznek a legnagyobb abszolút értékű töltésekkel.

Torziós szögek optimalizálása. Az átlagos négyzetes eltérés gyöke (Root Mean Square Deviation, RMSD; a variancia négyzetgyöke) értéke az első optimalizálás után 0,446; a végső (5.) optimalizálás után pedig 0,225 volt. Az RMSD a modell által megjósolt értékek és a megfigyelt értékek közötti különbségek gyakran használt

mérőszáma; az előre jelzett és megfigyelt értékek közötti különbségek második mintavételi pontjának négyzetgyökét vagy e különbségek négyzetes átlagát jelenti. A végső finomítás eredménye megfelelő illeszkedést mutat a QM céladatokhoz.

Az atrazin – lignin-peroxidáz komplex dinamikája

Az enzim-ligandum dokkolás értékelése. Minden konformer esetében az ATZ kötődése a LiP célhelyéhez termodinamikailag kedvező, de a gyakorisági érték csak 16% és 10% 288 K, illetve 308 K hőmérsékleten. Ezen komplexek kialakulásának a valószínűsége tehát alacsony. A 298 K-en létrehozott LiP konformer esetében a frekvencia 53%, ezért ez volt az 5 ns-os finomítási folyamat bemeneti szerkezete, a komplex stabilitásának és az ATZ kölcsönhatásának tanulmányozására a ligandum csatorna aminosavaival.

Az ATZ és a LiP kölcsönható oldalláncainak aminosavai közötti fehérje-ligandum kölcsönhatások a következő kategóriákba sorolhatók: H-kötés, poláros, hidrofób és egyéb. Az Asp183 C α karbonil-csoportja H-kötéseken keresztül érintkezik az ATZ izopropil-amin nitrogénjével. A C α karbonil-csoport oxigénje és az s-triazin gyűrű 1-es számú nitrogénje között is van egy meghatározatlan kapcsolat. E két atom közötti távolság mindössze 2,68 Å. Mivel a nitrogén és az oxigén között nincs közvetlen kapcsolat, és mindkét atom negatív parciális atomtöltéssel rendelkezik, ezért ez az állapot energetikailag kedvezőtlen, és egy teljesen dinamikus rendszerben nem maradhat fenn.

A dokkolási komplex szerkezeti stabilitása. A ligandum csatorna aminosavak C α RMSD értékei és az ATZ minimalizálása azt mutatta, hogy a kiindulási szerkezet – a [298 K] dokkolási komplex – nem volt optimális állapotban. A 30 000 lépés elegendő volt ahhoz, hogy a komplex elérje a relaxált állapotot. A minimális RMSD érték 0,040 Å

volt, a maximális érték 1,490 Å. A rendszer 29,55 pikoszekundum (ps, 10^{-12} s) alatt érte el a maximális értéket, és körülbelül 20 ps után a rendszer már relaxált állapotban volt, azonban következtetéseket csak a MD által kapott eredményekből lehet levonni.

A ligandum csatorna viselkedése atrazin jelenlétében. A LiP ligandum csatorna aminosavainak fluktuációja és deformációja vizes oldatban egy ismert jelenség. A csatorna a kristályszerkezethez képest figyelemre méltó torzulásokat mutat még egy 150 ps hosszú MD szimuláció során is. A ligandum csatorna aminosavainak ilyen gyors konformációs változásai jellemzőek a LiP-re, amikor a csatorna környezetében nincs jelen potenciális szubsztrát vagy egyéb, kisméretű molekula. Bizonyos molekulák jelenlétében (pl. veratril-alkohol, amely a LiP enzim természetes szubsztrátja) a megfigyelt jelenségek a ligandum és a ligandum csatorna aminosavak között kialakult különböző kölcsönhatásoknak megfelelően eltérőek lehetnek.

Az ATZ jelenlétében a csatorna fluktuációja rövid idő alatt csökken, és a finomító (5 ns) MD szimuláció utolsó 150 ps-ja jelentősen alacsonyabb RMSD-értékeket mutat a különböző időskálákból származó adatokhoz képest. Mivel a ligandum csatorna aminosavainak gyors konformációs változásai ATZ hiányában egyértelműen kimutathatók voltak, az ATZ nélküli MD szimuláció első 150 ps-ját használtuk referenciaként. Az ATZ jelenlétében a finomítás első 150 ps-ja kevés különbséget mutat, és a 151-300 ps intervallum értékei a teljes tartományban egyértelműen alacsonyabbak a referenciánál. Körülbelül 80 ps után ezek a változások többnyire az első 150 ps értékei alatt maradnak. Az ATZ-LiP komplex végállapotának vizualizációja megerősíti, hogy az ATZ molekula nem jut el a csatornán keresztül a hemet tartalmazó aktív centrumba, mert a ligandumot az enyhén fluktuáló ligandum csatorna

aminosavai veszik körül. Ez az aktív centrumnak a ligandumtól való sztérikus akadályozását okozza. A ligandum csatorna aminosavak zsugorodása rövid idő alatt (ps skálán) következik be ATZ jelenlétében, és ez az enyhe fluktuáció 4-5 ns alatt stabilan fennmarad. Az ATZ és a hem váz relatív helyzete azt mutatja, hogy csak az ATZ hidrofób izopropil-amin csoportja és a hem néhány oldallánca orientálódik egymás felé.

A szubsztrátok a LiP felszíni Trp171 aminosavának közvetítésével történő elektronátvitel útján oxidálódhatnak, amely hipotézis azon a megfigyelésen alapul, hogy ezen aminosav mutációja a veratril-alkohol oxidációjával szembeni enzimatis aktivitás elvesztéséhez vezetett. A mutánsok azonban továbbra is képesek voltak két olyan szubsztrát oxidációjára, amelyek a veratril-alkoholhoz képest alacsonyabb redoxpotenciállal rendelkeztek, ahogyan az ATZ is. A Trp171 hiányában a LiP még mindig képes katalizálni a reakciókat, de a ligandum csatornán keresztül a hem pereme és a ligandum közötti közvetlen kapcsolat elengedhetetlen. A Trp171 pontos funkciója nem teljesen tisztázott, mivel ez az enzim rigid területe, és a W171A mutáció nem okoz releváns szerkezeti változást. Merev karaktere alapján nem valószínű, hogy a Trp171-es terület kompetitív ligandum csatornaként működhet.

Az energiaadatok azt sugallják, hogy a ligandum csatorna aminosavainak csökkent fluktuációja ATZ jelenlétében a kedvező kölcsönhatásoknak és az aminosavak és a ligandum közötti stabil kontaktusnak köszönhető. Az 5 ns hosszú szimuláció utolsó 150 ps-ának energiaeredményei azt mutatják, hogy a komplex egyensúlyi állapotban van, az energiaértékek a teljes tartományban negatívak.

A számított kötési szabadenergiák (ΔG_{bind}) megerősítik, hogy az ATZ képes beépülni a ligandum csatorna környezetébe, azonban a MD utolsó 150 ps-ában a kötési szabadenergiák lassan emelkedő

tendenciája figyelhető meg. Emellett az ATZ és a hem váz között a ΔG_{bind} bizonyos időpontokban pozitív értéket mutat; ezek az eredmények energetikailag kedvezőtlen és átmeneti kapcsolatra utalnak.

A további, 100 ns hosszú MD szimuláció azt mutatja, hogy 5,6-5,7 ns után az ATZ és a ligandum csatorna közötti kapcsolatok kezdenek felbomlani. Az RMSD értékek egyértelműen jelzik, hogy a ligandum integrálódása csak átmeneti jelenség. Az ATZ parciális atomtöltései egy ideiglenes ATZ-csatorna komplexet hoznak létre, de az enzim kinetikus energiája az ATZ izopropil-amin csoportjával kölcsönhatásba lépő néhány hem oldallánc atomból származó kedvezőtlen kölcsönhatásokkal együtt rövid idő alatt legyőzi ezeket a hatásokat, ezért az ATZ nem tudja elérni a hem peremét. Az ATZ kiszorulhat a csatornából, és az enzim visszatér eredeti állapotába, a ligandum csatorna aminosavainak fluktuálásával, valamint a nyitott és zárt állapotok periodikus váltakozásával. A 100 ns alatt az enzim másodlagos szerkezete már nem változott jelentősen.

A ligandum csatorna három aminosavának van a legjelentősebb hatása az ATZ hozzáférhetetlenségére: Phe148, Asp183 és Gln222. A Phe148 fenil-csoportja kölcsönhatásba lép az s-triazin gyűrű delokalizált elektronrendszerével. Az Asp183 karboxil-csoportjának szénatomja 0,62 parciális töltéssel rendelkezik, és kölcsönhatásba lép az s-triazin gyűrű N1 atomjával, amelynek parciális töltése -0,759. A Gln222 amino-csoportjának hidrogénjei 0,32, illetve 0,30 parciális töltéssel rendelkeznek. Ezek az atomok az s-triazin gyűrű N1, N2, N3 és C1 atomjaival lépnek kölcsönhatásba, amelyek parciális töltései -0,759, -0,244, -0,19, illetve -0,26.

Fontos megjegyezni, hogy az ATZ delokalizált s-triazin gyűrűjében lévő szénatomok és az 1-es számú nitrogén korábban kiszámított parciális atomtöltései a vegyület többi atomjához képest

jelentősen magasabb abszolút értékeket mutatnak. A beépített ATZ helyzete arra utal, hogy ezek a delokalizált elektronrendszer által generált parciális töltések lehetséges korlátozó tényezők, és felelősek lehetnek a ligandum hozzáférhetlenségéért.

Biopolimerázok és molekulamodellezés

Cellulázok. A növényi sejtfalban található biopolimerek három fő csoportra oszthatók: cellulóz, hemicellulóz és lignin. Ezek szoros összekapcsolódása teszi olyan nehezzé a biomassza hasznosítását.

Az általunk használt baktérium törzset (*Cellulomonas* sp.) úgy választottuk ki, hogy ebben a baktériumban a biopolimerek bontásához szükséges enzimek jó része megtalálható, így könnyebben nyomon tudtuk követni a különböző enzimek 3D szerkezetét és hasonlóságait is. Elsőnek egy korábban már tanulmányozott celluláz katalitikus doménjét és cellulázkötő doménjét (CBM) használtuk fel a modellezésre.

A kétféle domén alapvetően különbözik egymástól. A katalitikus doménben elsősorban α -hélix részek találhatók, míg a CBM-ben inkább a β -lemez szerkezet dominál. Ez általánosságban igaz más O-glikozil hidrolázok kötő és katalitikus doménjeire is. A cellulóz lebontásában számos más enzim is részt vesz a cellulázokon kívül, többek között – a teljesség igénye nélkül – különféle β -glükánázok, β -glükozidázok és cellobiohidrolázok is. A cellulázok igen fontosak a biomassza degradációjában; a CBM odakapcsolja az enzimet a cellulóz rostokhoz, fellazítja azokat, hogy a katalitikus domén aktív centruma elvégezhesse a katalízist.

A cellulázok tevékenysége folytán a keletkező kisebb oligomerek sokszor gátolják az enzim további működését azáltal, hogy ezek a

kisebb fragmentumok kötődnek az enzimhez, ezáltal gátolva annak működését.

A lignin nagyobb koncentrációban gátolja a celluláz működését, ezt a tényt több esetben is kimutatták. Modellezéssel igazoltuk azt, hogy a lignin képes kapcsolódni a *Cellulomonas* sp. CelB7 celluláz katalitikus doménjéhez bizonyos esetekben. A kapott dokkolási eredmények kisebb mértékben mutatták ezt a kapcsolódást, így ez igazolhatja azt, hogy a lignin kevésbé gátolja a celluláz működését, vagy nagy koncentráció kell ahhoz, hogy a lignin számottevően gátolhassa a celluláz enzimet.

Xylanázok. A biopolimerek lebontásában szerepet játszó másik fontos enzimesoportot a különböző xylanázok alkotják. A xylanázok a hemicellulóz xylán részeint bontják le különböző módon. A xyloglükán oldalláncok a hemicellulózban jelentős részek, így a xylanázok fontos enzimek a biomassza lebontásában.

Sok hasonlóság van a cellulázok és a xylanázok között, ez tulajdonságaikban is megmutatkozik. Az ezzel kapcsolatos modellezésünk igen hasonlít a celluláz hasonló komplexére. Talán ez magyarázza azt a tényt, hogy a celluláz enzimek között található több olyan is, melynek van xylanáz aktivitása is. A cellulolitikus és a hemicellulolitikus enzimek között vizsgálták az együttműködés lehetőségét, és kimutatták a kölcsönös szinergizmust.

A *Cellulomonas fimi* xylanáz katalitikus doménje erős affinitást mutat a ligninnel szemben. Ezt szintén kimutattuk enzim-ligandum dokkolással. A modell nagy hasonlóságot mutat a cellulóz ligninhez való kötődéséhez, mely nem meglepő, hiszen sok celluláznak van xylanáz aktivitása is.

A kapcsolat részben az enzimeknek (celluláz és xylanáz) a lignin felületére való adszorpciójával magyarázható, de a kötődés részletes mechanizmusai még mindig kevésbé ismertek. A lignin-enzim

kölcsönhatások mögött meghúzódó mechanizmusok továbbra is tisztázatlanok. A cellulázok és xylanázok nem specifikus adszorpciója a ligninhez megakadályozza a biomassza enzimátikus átalakítását. A számítások azt mutatják, hogy a negatívan töltött felülettel rendelkező celluláz és xylanáz csökkentheti a lignin általi gátlást. Lehetséges olyan nagy aktivitású cellulázok és xylanázok előállítása, amelyek ellenállnak a lignin által közvetített inaktiválásnak, bár további munkára van szükség ezen probléma megértéséhez.

Mannanázok. A mannánok szintén a hemicellulózok közé tartoznak. A mannanázok a hemicellulóz ramnogalakturonán részeihez oldalláncként kapcsolódó mannopiranóz oligomerek lebontásában vesznek részt. A mannanázok monomer és dimer formában is megtalálhatók. A mannanáz-mannóz dokkolási komplex többféle is lehet, attól függően, hogy a mannán a monomer enzimhez vagy a dimer enzimhez kapcsolódik. A mannanáz enzim tartalmaz egy katalitikus és egy szubsztrátkötő részt is. A dokkolási komplex az eddig tárgyalt többi enzim-szubsztrát kapcsolathoz hasonlóan stabil és alkalmas lehet a szubsztrát bontására.

A xylanáz és a mannanáz között szinergikus hatást írtak le. Ennek ellenére a két enzim kevéssé hasonlít egymásra, így a kooperatív működésükre ez aligha lehet magyarázat.

A hemicellulózokkal és azok lebontásában szereplő idáig ismertetett enzimekkel nem merülnek ki a lehetőségek. Az eddig tárgyaltakon kívül a hemicellulózban a teljesség igénye nélkül vannak még glüko-piranozid, galakto-piranozid, ramno-piranozid és arabino-furanozid oldalláncok is. A gélszerű pektin főként galakturonsavból álló heteropoliszacharid – több ponton is kapcsolódik a hemicellulózokhoz. Az ezen oldalláncok lebontásában szereplő további enzimek is igen sokrétűek. A hemicellulózok és

hemicellulázok változatossága, valamint azok modellezése egy későbbi tennivaló lesz, amely kihívásokkal teli feladatok elé állíthat.

Szinte semmilyen irodalmi hivatkozás nincs arra vonatkozóan, hogy a lignin-mannanáz kapcsolat létezik-e, és milyen hatásai vannak. Sikerült modellezni ezt a kapcsolatot. A lignin-részlet jól illeszkedik a mannanáz aktív centrumához, bár a kölcsönhatás jellege még nem teljesen tisztázott, és további vizsgálatokra van szükség.

Beszámoltak arról, hogy a vízdoldható (kis molekulatömegű) lignin fokozza az enzimátikus emészthetőség sebességét, azonban a lignin-enzim kölcsönhatás katalitikus mechanizmusa továbbra is megfoghatatlan. Ebben nyújthat segítséget a molekulamodellezés is, mely talán magyarázatot adhat a jelenségre. A lignin negatív hatásainak mérséklése érdekében kiterjedt kutatásokat végeztek a lignin-enzim kölcsönhatások alapvető mechanizmusainak feltárására, hogy olyan technológiákat fejlesszenek ki, amelyek leküzdhetik a lignin enzimátikus hidrolízisre gyakorolt negatív hatásait.

Lignin-peroxidázok. A biopolimerek harmadik csoportját a lignin alkotja. A LiP-t az ún. fehérrothadást (fehér korhasztó) okozó gombák termelik. Katalizálja a veratril-alkohol oxidációját, valamint a lignin lebomlását, és akadályozza a lignin depolimerizációját is. (Megjegyzés: a barna korhasztó gombák bontják a fában lévő cellulózt és hemicellulózt. A cellulózt és hemicellulózt hidrogén-peroxiddal (H_2O_2) bontják le, így nem keletkeznek szacharidok, nincs hasznosulás, csak oxidáció).

Mindkét monomer tartalmaz egy-egy hem vázat, így ezeket az enzimeket hem-peroxidázoknak nevezik, amelyek H_2O_2 -t igényelnek oxidánsként.

A ligandum a két alegység közé illeszkedik. Felmerül annak lehetősége, hogy mindkét (azonos szekvenciájú) alegység jelenléte

szükséges lehet a lignin felismeréséhez és lebontásához – ennek megállapításához további mérések szükségesek.

Rendkívül savas körülmények között a LiP nem katalizál megfelelően. Azonban, ha kicserélik a LiP hem vázát a mangán-peroxidázban lévő vázra, úgy a katalitikus hatékonyság jelentősen megnő.

Ha már vizsgáltuk a lignin cellulázra történő hatását, akkor megpróbáltuk a cellulóz LiP-ra gyakorolt hatását is modellezni. Meglepődve tapasztaltuk, hogy létezik valamilyen kapcsolat a cellulóz és a LiP között. A cellulóz az esetek többségében a LiP homodimer nem katalitikus helyére kötődött, de néhány esetben a cellulóz az aktív centrum közelében kapcsolódott az enzimhez. Ha nem is kapcsolódik a cellulóz szorosan az aktív centrumhoz, képes lehet a lignin kapcsolódását részlegesen vagy teljesen megakadályozni.

Ez a jelenség teljesen új, nem írtak le hasonló eredményt. Ezt a molekulamodellézést tette lehetővé. Természetesen ezt a gyakorlatban is igazolni kell, sok kísérletet kell végezni ahhoz, hogy ezt pontosan le lehessen írni. Mindenesetre a modellézés mutatja azt, hogy milyen új lehetőségek rejlenek ebben a módszerben.

Későbbi kutatásaink egyik célja annak felderítése, hogy véletlenszerű aminosavcserék okoznak-e eltérő térszerkezetet, valamint az eltérő térszerkezet okoz-e az enzim aktivitásában, szubsztrátkötő képességében eltéréseket, és ezeket meg tudjuk-e molekuláris szinten magyarázni. Emellett érdekes lenne megvizsgálni, hogy a lignin jelenléte miért okozza a cellulázok (és más hidrolázok) jelentős részének aktivitás-csökkenését. Ha sikerülne véletlen aminosav-cserékkel hatékonyabb cellulázokat előállítani, azzal lehetségessé válna, hogy a lignin-celluláz interakcióról is többet tudjunk meg.

Új lehetőségek feltárása. A biomassza újrahasznosítása manapság nemcsak azért nélkülözhetetlen, mert a fosszilis energiaforrások fokozatosan kimerülnek, hanem mert csökkenteni kell a növekvő energiafelhasználás okozta környezetszennyezést. Cikkünk a jelenleg használatos növényi biomassza-feldolgozási módszerek eredményeit kívánja áttekinteni. Célunk volt a jelenleg nem használt, de publikált módszerek áttekintése is. Feltártuk a biomassza újrahasznosításában alkalmazható új módszereket és az enzimek modellezését felhasználva az újabb lehetőségeit. Ennek az áttekintésnek az eredményei szinte minden területen megdöbbentőek. Előrelépés történt a biomassza előkezelésében, valamint a felhasznált enzimek sokféleségében és alkalmazásában. Viszont a molekuláris modellezés alapján történő fejlődésben nagyon kevés előrelépés történt. Szintén minimális az előrelépés a meglévő enzimek módosításában, a biomassza feldolgozása során a megváltozott működés és a környezeti feltételekhez való alkalmazkodás érdekében. Alig van olyan publikáció, amelyben molekuláris modellezési technikákat alkalmaznának az enzimműködés módosításra, javítására és az enzimek különféle környezeti feltételekhez való adaptálására. Véleményünk szerint a modern számítási, biokémiai és biotechnológiai módszerek segítségével hatékonyabb és biomassza-feldolgozásra alkalmas enzimek célirányos tervezése lenne lehetséges.

A közelmúltban vizsgált és alkalmazott módszerekkel együtt feltártuk a növényi szerkezeti biomassza hasznosításának legújabb lehetőségeit, eredményeit. Minden területen történt előrelépés, és ez a terület folyamatos fejlődést mutat. Új fizikai és kémiai módszereket fejlesztettek ki a biomassza előkezelésére, amelyek a biomassza anyagok hatékonyabb kinyerését eredményezhetik. A mikroorganizmusokban található enzimek széles skáláját izolálták és

használták fel a biomassza feldolgozásában. Tanulmányozták az enzimek működési mechanizmusát, emellett új és hatékonyabb módszereket fejlesztettek ki. Véleményünk szerint van néhány olyan terület, ahol az utóbbi időben kevesebb fejlődés történt. Ezek közé tartozik a meglévő enzimek tulajdonságainak megváltoztatása racionális tervezéssel, amely a szerkezetmodellezésen, MD szimulációkon, enzim-szubsztrát kölcsönhatásokon és virtuális mutagenézisen alapul.

Kiaknázatlan és óriási lehetőségek vannak olyan módosított enzimek előállítására, amelyek hatékonyabban működnek a biomassza feldolgozásához használt ipari körülmények között. Az enzimek racionális módosításával jelentősen növelhető a biomassza átalakításának, az enzimek vagy a folyamatok hatékonysága. Fizikai, kémiai, biokémiai, biotechnológiai és molekuláris biológiai módszerek állnak rendelkezésre az enzimek fehérje oldalláncainak módosítására a biomassza hatékonyabb hasznosítása érdekében, amelyek jobban megfelelnek az alkalmazott technikáknak.

E módszerek széles körű alkalmazásával további fejlődés várható ezen a területen, és csak támogatni lehet, hogy in silico modellezéssel, a molekulák virtuális módosításával, molekuláris szimulációkkal vizsgálják az enzimek működését különböző környezeti és/vagy ipari körülmények között. Ez segítené az eddig alkalmazott ipari biomassza hasznosítási módszerek fejlesztését anélkül, hogy a módszert kellene megváltoztatni, csupán az adott enzimeket kellene úgy módosítani, hogy azok az adott körülmények között hatékonyabban működjenek, így növelve a termelékenységet és csökkentve a költségeket.

A biomassza feldolgozásához jelenleg használt enzimek javítására számos lehetőség van. A számítógépes tervezési és modellezési technikák felhasználhatók az enzimek módosítására, hogy azok az adott fizikai-kémiai körülmények között hatékonyabban működjenek.

Az enzimek működésének és a katalitikus körülményeknek a tanulmányozásával az enzim szerkezetének a tényleges művelethez jobban illeszkedő módosításával lehet beavatkozni a kémiai reakciókba. Ehhez ismerni kell az alkalmazott enzimátikus folyamatokat, és számítógépes modellezéssel és tervezéssel módosítani kell az enzimek működését a jobb felhasználás reményében.

A poliszacharidokat lebontó enzimek gyakran kapcsolódnak a glikozilációval, az N- és O-kötésű glikánokhoz, amelyek szerepe csak részben ismert. A glikánok befolyásolhatják az enzimek kritikus tulajdonságait: Az N-glikoziláció javítja a termikus és proteolitikus stabilitást, az O-glikoziláció a proteolitikus stabilitás mellett javítja a CBM-kötési affinitást és stabilitást, de jelenlétük nem feltétlenül befolyásolja a katalitikus aktivitást. A glikozilált cellulázok modellezése javíthatja ismereteinket a glikánok különböző funkcióiról.

Leírtak egy glikozilált cellulázt, amelyben főként galaktóz-diszacharidokat lehetett találni. Ez a glikoziláció drámaian befolyásolta az oldhatatlan szubsztrátok hidrolízisét, a proteolitikus és termikus stabilitást, és szükségesnek bizonyult ahhoz, hogy ez az enzim zord környezetben, többek között ipari környezetben is működjön.

A modellezett metanolízis

Az átészterezési reakciót katalizáló lipáz enzimek esetében szintén felmerül a molekulamodellezés-alapú fejlesztések lehetősége. A triacilglicerol lipáz például egyaránt megtalálható állatokban, növényekben, gombákban és baktériumokban. A triglicerideket digliceridekre, majd monogliceridekre és szabad zsírsavakra hidrolizálja. Az enzim vízben jól oldódik, és az olajcseppek felszínén

fejti ki hatását. Az aktív helyhez való hozzáférést egy ún. fedél nyitása szabályozza, amely, ha zárva van, elrejti az aktív helyet körülvevő hidrofób felületet. A fedél akkor nyílik ki, amikor az enzim olaj-víz határfelülettel érintkezik (határfelületi aktiváció).

Lehetőség lenne – a cellulázokhoz és ligninázokhoz hasonlóan – aminosavak lecserélésére az enzim releváns pontjain, majd az így kapott (mutáns) modellek változó környezeti feltételek (pH, hőmérséklet) közötti tesztelésére. Amennyiben a szimulációk eredménye alapján az adott módosítások egy vagy több nagyobb aktivitású enzimváltozatot eredményeznek, amelyek a reakciókat gyorsabban, könnyebben előállítható körülmények között tudják katalizálni, úgy már célzottan tudnánk szintézissel létrehozni ezeket az enzimpopulációkat.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az atrazin kvantumkémiai paraméterei. A legtöbb publikáció a Param Chem webszerverről származó paraméterekre hivatkozik, amely egy olyan forrás, amely kizárólag analógián alapuló kezdeti paraméterekhez való hozzáférést tesz lehetővé. A probléma az, hogy ezek az eredmények tartalmazznak egy úgynevezett büntetőpontot (penalty score), mivel a feltöltött ligandumok csak a CHARMM általános erőterrel (CgenFF) vannak összevetve, ezért további számítások lennének szükségesek a paraméterek finomításához az új kémiai kontextusban. Ebben a munkában az analógián alapuló adatmennyiség a három nem kötő paraméterre korlátozódik, az ATZ a CHARMM36 erőter minden topológiájával és paraméteradatával keresztellenőrzésre került, (beleértve a CgenFF-et is), a többi kimeneti számadat pedig precíz optimalizációs módszerek és kvantumkémiai számítások eredménye.

A bemutatott munkafolyamat végeredménye az ATZ MD szimulációjához szükséges teljes paraméterkészlet.

A lignin-peroxidáz és az atrazin összeférhetlensége. Az enzim képes különböző xenobiotikumok lebontására, de a katalízishez szükséges enzim-szubsztrát kapcsolatok nem teljesen ismertek. Mivel a LiP nem képes az ATZ lebontására, a molekuláris szintű kölcsönhatások leírása jobb megértést adhat a ligandum csatorna szerkezet-funkció kapcsolatáról, valamint az egyes ligandumok hozzáférhetőségét meghatározó vagy korlátozó tényezőkről. Az enzim-ligandum dokkolás eredményei alapján az ATZ energetikailag kedvező pozíciót találhat a ligandum csatorna aminosavainak környezetében, bár ezen komplexek kialakulásának matematikai valószínűsége nem jelentős (10%, 16% és 53%-os gyakorisági értékek három különböző hőmérsékleten). Az ATZ-LiP komplex 5

ns-os MD szimulációja során a legjobb dokkolási eredménnyel (53%-os gyakoriság 298 K hőmérsékleten) az ATZ integrálódott az aminosavak közé, és nem tudott átjutni a csatornán. Ez a jelenség némileg ellentmond annak, hogy a kisméretű szubsztrátoknak szabad hozzáférésük van a hem felé, amikor a csatorna nyitott állapotú konformációban van. Az ATZ delokalizált heterociklusos s-triazin gyűrűjének parciális atomtöltései stabil enzim-ligandum komplexet hozhatnak létre, és ez lehet a magyarázata az ATZ hozzáférhetetlenségének.

Mivel az ATZ képes kötődni azokhoz az aminosavakhoz, amelyek a szubsztrátoknak az aktív centrum felé való hozzáférését biztosítják, fontos kérdés, hogy ez a kötődés átmenetileg befolyásolja-e az enzimaktivitást. Ha az ATZ képes inhibitorként viselkedni az egyes szubsztrátok esetében, akkor az ilyen kísérleti eredmények azt bizonyítanák, hogy az *in silico* megközelítésünk helyesen írja le a jelenséget, ezért ez a további vizsgálataink terepe. Eredményeink arra utalnak, hogy az atomok kinetikus energiája akár elegendő is lehet ahhoz, hogy az ATZ-t eltávolítsa a csatornából, ez a lehetséges jelenség egy másik vizsgálat tárgyát képezheti. Emellett a ligandum csatorna teljes funkcióját is fel lehetne térképezni, és meg lehetne magyarázni. Ismét megjegyezzük, hogy a LiP-nak két oxidációs helye van, de a közöttük lévő kapcsolat még nem tisztázott.

Enzimek célzott módosítása a biomassza hatékonyabb feldolgozása érdekében. Levonhatjuk azt a következtetést, hogy igen kevés szakcikk foglalkozik az extracelluláris enzimek molekulamodellezéssel történő tervezésével. Ugyan a módszerek rendelkezésre állnak, de ez a terület még egyáltalán nem tekinthető bejárattottnak. További kutatásaink szempontjából elsődleges annak feltárása, hogy véletlen aminosav-cserékkel lehetséges-e hatékonyabb cellulázokat előállítani, ezzel összefüggően pedig a

ligninnek mint a cellulázok egyik inhibitorának az enzimgátlást kiváltó konkrét mechanizmusának a minél pontosabb leírása. Az eddig elvégzett dokkolások alapján valóban megalapozott, hogy a lignin képes a cellulázok és xylanázok működését gátolni, emellett úgy tűnik, létezik lignin-mannanáz kölcsönhatás, sőt, cellulóz – lignin-peroxidáz kölcsönhatás is – ez utóbbi szintén érdekes, későbbi kutatás alapja lehet, hiszen lehet, hogy ennek is van hatása az enzimaktivitásra.

Bioüzemanyagok előállítása. Ugyan még nagyon kezdeti fázisban van, de azért már egyértelműen látszik annak lehetősége, hogy a molekulamodellezéssel kapott eredményeket felhasználjuk például bioetanol és biodízel hatékonyabb előállítására. Ezen bioüzemanyagok szintézisét szintén végezhetik enzimek, azonban ezek felhasználása egyelőre költséges és lassú. Jól megválasztott módszerekkel lehetőség lenne arra, hogy célzottan tervezzünk hatékonyabb és gyorsabb enzimeket, aztán ezeket szimulált körülmények között leteszteljük, majd végül csak a céljainknak legmegfelelőbbeket expresszáltassuk, illetve állítsuk elő.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kvantumkémiaili számításokkal sikerült megállapítanunk az atrazin nevű, fotoszintézisre ható herbicid parciális töltéseit, kötэшosszait és -szögeit, valamint a torziós szögeket. A kapott értékeket aztán visszafordítottuk a hagyományos mechanika nyelvére, és elsőként állítottuk elő az atrazin CHARMM36 erőterrel kompatibilis paramétereit, amelyek jóval pontosabb értékek, mint a hagyományos, analógián alapuló paraméterek. Az atrazint így már fel lehet használni molekuladinamikai szimulációkban, fehérje-ligandum, enzim-ligandum és egyéb interakciók atomi szintű tanulmányozására.

2. Enzim-ligandum dokkolással megállapítottuk, hogy az atrazin kötődése a lignin-peroxidáz ligandum csatornájához termodinamikailag kedvező, azonban némileg hőmérséklet-függő és a csatorna nyitott állapota esetén is az atrazin lehetséges konformációinak csak kisebb része jelent megfelelő orientációt. Molekuladinamikai szimulációval és számításokkal elsőként kimutattuk, hogy az atrazin jelenléte a lignin-peroxidáz ligandum csatornájában az aminosavak fluktuációját szignifikánsan csökkenti. Ezen fluktuációk a kisméretű, potenciális szubsztrátok esetében elengedhetetlenek a szubsztrátnak az aktív centrumhoz való továbbításában. Ezzel magyarázatot adtunk az atrazinnak a lignin-peroxidáz aktív centrumához való hozzáférhetetlenségére. Az atrazin – lignin-peroxidáz komplex interakcióinak energetikai kiértékelésével leírtuk, hogy az enzim és az atrazin oldaláról melyek azok a kölcsönhatások, amelyek magyarázatot adnak a hozzáférhetetlenségre. Megállapítottuk, hogy az atrazin s-triazin gyűrűjének delokalizált elektronrendszere okozza a lignin-peroxidáz

csatornájának drasztikus fluktuáció-csökkenését. Ezzel magyarázatot adtunk a csatorna működőképességének csökkenésére/megszűnésére.

3. Molekulamodellezés segítségével igazoltuk, hogy a lignin nagyobb koncentrációban valóban gátolhatja a cellulázok és a xylanázok működését. Modellezéssel sikerült elsőként megállapítani, hogy létezik lignin-mannanáz kapcsolat, így az enzimgátlás ebben az esetben is fennállhat. Modellezés segítségével elsőként írtuk le, hogy a cellulóz oligomer bizonyos körülmények esetén képes lehet gátolni a lignin-peroxidáz működését.

4. Egy átfogó, áttekintő tanulmányt publikáltunk a legmodernebb biomassza-hasznosító technikákról. Megállapítottuk, hogy a molekulamodellezésen és enzimmodosításon alapuló módszertan még kevésbé elterjedt.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Szakmai folyóiratban megjelent cikk az értekezés témakörében

1. FÜLÖP, L.; ECKER, J. (2020): An overview of biomass conversion: exploring new opportunities. In: *PeerJ*, 8: e9586. DOI: <https://doi.org/10.7717%2Fpeerj.9586>
2. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2018): Lignin peroxidase ligand access channel dysfunction in the presence of atrazine. In: *Scientific Reports*, 8: 5989. DOI: <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-018-24478-w>
3. ECKER, J. (2016): Generating CHARMM-compatible force field parameters for atrazine. In: *Journal of Universal Science Online*, 3: (1) 1-8. p. DOI: <https://doi.org/10.17202%2FJUSO.2016.3.1>

Szakmai folyóiratban bírálat alatt lévő cikk az értekezés témakörében

1. DANCS, G.; KAKUCSKA, G.; DOBRÁNYI, SZ.; ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2022): Efficient method for the determination of the neutral lipid content of oil-producing microalgae strains required for biodiesel. In: *Fuel*, Bírálat alatt.

Szakmai folyóiratban megjelent cikk az értekezés témakörén kívül

1. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2014): Molecular modeling of DDT's and its major metabolites' adsorption in the interlaminar space of montmorillonite. In: *Journal of Universal Science Online*, 1: (1) 12-19. p. DOI: <https://doi.org/10.17202%2FJUSO.2014.1.12>

Konferencia kiadványok

1. ECKER, J., FÜLÖP, L. (2017): Dysfunction of the lignin peroxidase ligand channel in the presence of atrazine. In: REMÉNYI, A.; DORMÁN, GY. (Szerk.), *ECBS 2017 5th European Chemical Biology Symposium: Program and book of Abstracts*, Budapest, Magyarország: Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE). 43. p. <http://www.ecbs2017.eu/>
2. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2017): Dysfunction of the lignin peroxidase ligand channel in the presence of atrazine. *5th European Chemical Biology Symposium - ECBS 2017*, 2-4 July 2017 - Budapest, Hungary. Hungarian Chemical Society. Poszter prezentáció. Megjelenés: Magyarország. <http://www.ecbs2017.eu/>
3. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2017): CHARMM-kompatibilis atrazin paraméterek számítása kvantumkémiai módszerekkel. In: Magyar Kémikusok Egyesülete Vegyészkonferencia 2017, *Program és előadásösszefoglalók*, Budapest, Magyarország: Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE). 49. p. <https://docplayer.hu/111080154-Vegyeszkonferencia-2017.html>
4. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2017): CHARMM-kompatibilis atrazin paraméterek számítása kvantumkémiai módszerekkel. *Vegyészkonferencia 2017*, Hajdúszoboszló, 2017. június 19-21. Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE). Poszter prezentáció. Megjelenés: Magyarország. <https://www.mke.org.hu/vegynkonf2017/>
5. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2017): Lignin-peroxidáz ligandum csatornájának molekuladinamikai vizsgálata atrazin jelenlétében. In: Magyar Kémikusok Egyesülete Vegyészkonferencia 2017, *Program és előadásösszefoglalók*, Budapest, Magyarország: Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE). 50. p. <https://docplayer.hu/111080154-Vegyeszkonferencia-2017.html>

6. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2017): Lignin-peroxidáz ligandum csatornájának molekuladinamikai vizsgálata atrazin jelenlétében. *Vegyészkonferencia 2017*, Hajdúszoboszló, 2017. június 19-21. Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE). Poszter prezentáció. Megjelenés: Magyarország. <https://www.mke.org.hu/vegkykonf2017/>
7. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2016): Extracelluláris lignin-peroxidáz atrazin bontásának modellezése. *MKE Szerves- és Gyógyszerkémi Szakosztályának QSAR és Modellezési Szakcsoportja és az MTA Szegedi Akadémiai Bizottságának Kemometria és Molekulamodellezés Munkabizottsága által szervezett KeMoMo-QSAR 2016 szimpózium*, MTA MAB Székház (Miskolc, Erzsébet tér 3.) 2016. május 12.- május 13. [Előadás]. Megjelenés: Magyarország. <http://www.chemicro.hu/QSAR/20160512.html>

Egyéb, az értekezés témakörében megjelent publikációk

1. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2018): Structure of a lignin peroxidase ligand access channel-atrazine complex after molecular dynamics simulation. *Mendeley Data*. DOI: <https://doi.org/10.17632/2Fb2wn6fdcj4.2>
2. ECKER, J.; FÜLÖP, L. (2018): Structure of a lignin peroxidase ligand access channel-atrazine docking complex. *Mendeley Data*. DOI: <https://doi.org/10.17632/2Fdvjms8448j.2>