

Válasz

Ferenczy György
az MTA doktora

MTA doktori értekezésemre adott bírálatára

Szeretném megköszönni Ferenczy György bírálómnak, az MTA doktorának, az értekezésemre adott pozitív értékelését és gondolatébresztő kérdéseit, amelyekre az alábbiakban válaszolok részletesen.

1)

a) A fragmens-dokkolás célja a ligandumnak a kérdésben is említett nagy konformációs szabadságából eredő keresési probléma leegyszerűsítése. A fragmens-dokkolási elvet emiatt széleskörűen alkalmazzák lokális dokkolásokban, viszont *blind docking* (FBD) esetére kevesebb tapasztalat áll rendelkezésre. Mi a D11-es publikációban a meglehetősen problematikus N-terminális hiszton peptid ligandumokon próbáltuk ki az FBD alkalmazhatóságát. E peptidek sekély kötőzsebekbe, viszonylag gyengén kötődnek és a kötődés előtt általában nem rendelkeznek stabil konformációval. Eredményeink azt mutatják, hogy a kötődés magját képező, legerősebben kötődő (horgonyzó) fragmensek jó pontossággal bedokkolhatók, majd ezek „összehegesztése” a teljes peptid hosszabb szakaszának kötött szerkezetét is megadja. Ahogy a konklúzióban is taglaltuk, az FBD megközelítés egy lépést jelent a pontosabb és gyorsabb megoldás felé az ilyen problémás rendszerek dokkolásánál, azonban észleltük a meglévő korlátokat is.

b) A munkáink során – kevés kivételtől eltekintve – a Fehérje Adatbankban meglévő szerkezeteket használtunk a módszerek validációjához. Sajnos csak ritkán adódott olyan alkalom, hogy egy megjósolt szerkezetet le tudtunk közölni, atomi felbontású kísérletes szerkezeti igazolás nélkül, hiszen a kísérletes alátámasztást a bírálók elvárják, főleg ha egy új módszert vezetünk be. (A 3. ábrán bemutatott tanulmányunk egy ilyen kivételes, prospektív szerkezetet közölt, más megközelítéssel, nem FBD-vel, amelyet később atomi szintű kísérlet is igazolt.)

c) A D12 tanulmányban közölt PepGrow protokoll az előzőekben említett fragmens-alapú megközelítés tovább gondolása. Az FBD korábbi sikeres részét (a horgonyzó fragmensek gyors dokkolását) megtartva itt nem azok „összehegesztésével”, hanem *in situ*, a kötőzsebben tovább növesztésével jutunk el a teljes, kötött ligandum-szerkezethez. Ennek oka az volt, hogy még a dipeptid-fragmensek is igen változatos konformációkban dokkolódtak be úgy is, ha alapvetően jól eltalálták a kötőhelyet. Ráadásul e változatosság sokszor a hegesztésbe bevonandó végeknél volt a legnagyobb, ellehetetlenítve az összekapcsolásukat. A növesztés logikus alternatívája a hegesztésnek, így a D12-es tanulmányban ezt az utat jártuk végig, nagyobb sikerrel. A technika pontosabb és gyorsabb is lett, valamint más módszerekkel összevetve megállja a helyét a mezőnyben. A hegesztéses (összekötéses) technika főleg kis molekulák fragmenseinél működhet, a peptidek esetében egyértelműen a növesztés a célravezetőbb.

2) A kötődési mechanizmus tekintetében a végállapotra (belső kötési mód) közölt kísérleti komplex szerkezet a kötésben kulcsszerepet játszó SSTR4 aminosavaknál (D123, Y301) a D13-ban közölt eredményeinkhez hasonlóan kimutatta azok fontosságát a SST kötődésében. A végállapotra mi az SST - hozzávetőlegesen U alakú - molekulájának egy tükörképi kötési módját energetikailag kedvezőbbnek kaptuk (emellett a már korábban az SSTR2-re rendelkezésre álló szerkezet alapján vizsgáltuk a kísérletileg favorizált kötődési módot is a D13 tanulmányban), amely hasonló SSTR4 kötődési mintázatot mutat a kísérleti kötési móddal. A végállapot mellett a D13 tanulmányban a teljes kötődési útvonalat feltérképeztük, ami a prerekvizit kötőhelyekre történő tervezéshez is megnyitja az utat. A végállapotokban az SSTR altípusok között markáns különbségek egyelőre nem látszanak (kísérleti és elméleti eredményekben sem), így az altípus-szelektív tervezésben e prerekvizit kötési módok fontosak lehetnek.

3) Logikailag két stratégia adódik az explicit vízmolekulák bevonására a dokkolás során. Az egyik stratégia arra épít, hogy a vízmolekulák egyedi kötési szabadentalpia ($\Delta G_{b, \text{wat}}$) értéke alapján azokat a dokkolás előtt a helyükön hagyja, vagy eltávolítja, aszerint, hogy mennyire erősen kötődnek a célmolekulához. A kérdésben említett, többnyire Friesner és munkatársai (Schrödinger cég) nevéhez kötődő eljárások főleg ebben adnak segítséget. A másik stratégia, amit a HydroDock képvisel, nem hoz eleve egy termodinamikai döntést az egyes vizekre,

hanem a párhuzamos szálak egyesítése után az MD számítás segítségével szerkezeti megoldásokat ad, amelyekből aztán szerkezeti klaszterezéssel, vagy energetikai alapon kiválaszthatók a reprezentáns megoldások. A „vizes dokkolás” egy tyúk-tojás probléma és annak eldöntése, hogy a vizeket és a ligandumot milyen sorrendben vonjuk be (vagy a vizek esetében távolítsuk el) a dokkolási történetbe(ből), még nem lezárt kérdés. Az elsőként vázolt stratégia, amely a ligandumot kihagyja a vizekről hozott döntésnél elvileg is hibás és nem lehet teljeskörű, hiszen nyilvánvaló, hogy a ligandum kötődése megváltoztathatja az egyes vizek $\Delta G_{b,wat}$ értékeit is, így azokról a ligandum nélkül eldönteni, hogy maradnak vagy távoznak elég merész és általánosító elképzelés. Továbbá, a vízmolekulákat egyedileg ki-be rakosgatni az interfészbéli hálózatukból igen kockázatos, főleg nagyméretű, pl. fehérje-fehérje(peptid) interfészek esetében, amelyek sok vizet tartalmaznak, számos víz-víz kapcsolattal. Az első stratégiának kisebb ligandumok esetén lehet inkább sikere (az elvi hibája ellenére), ahol nincsenek ilyen kiterjedt interfészbéli vízhálózatok és/vagy a ligandum kötődése nem befolyásolja drámai módon az interfész vízszerkezetet.

4) Kisebb molekulák esetében a kérdésben említett energiatagok torzító hatása nem jelentkezik olyan mértékben, mint azt a peptid ligandumoknál tapasztaltuk. Az AutoDock pontozó függvényét kis méretű ligandumokra dolgozták ki, így ez a probléma nem merült fel, amikor ezeket a tagokat eredetileg beletették a pontozó függvénybe. Ezek egyszerű, ligandum-alapú tagok, így például a torziós szabadsági fokok befagyásából származó entrópiavesztést egyszerűen a torziók számából (N_{tor}) egy konstanssal való szorzással számítja. N_{tor} nyilván méretfüggő és nagyobb (pl. peptid) ligandumoknál alaposan túlbecsülheti a ténylegesen befagyó torziók számát.

5) A QM számításokat egyre többen alkalmazzák célpont-ligandum komplexek kötődési termodinamikájának becslésére szerkezeti végpontok alapján. A D27-es cikkben egy táblázatban ezeket a módszereket áttekintettük, illetve egy azóta megjelent review cikk (Ginex et al., Quantum mechanical-based strategies in drug discovery: Finding the pace to new challenges in drug design, Current Opinion in Structural Biology, Volume 87, 2024, 102870) többek között a mi eredményeinket is hivatkozva ad egy átfogó képet a területről. Amennyire jelenleg látszik, a szemiempirikus QM szinten igen jól pontozhatók az MM szinten optimalizált célpont-ligandum geometriák, amely első körben a kötődési entalpiaváltozás becslését teszi

lehetővé. Az oka a QM megközelítés használhatóságának az elektronikus effektusok energijárulékainak pontosabb számítása lehet. Ez várhatóan *ab initio* szinten még jobb eredményeket fog hozni (ezen is dolgozunk). Az entrópiákat tekintve a ligandum oldalon a molekuláris entrópiák számíthatók szintén QM szinten, ebből az entrópiaváltozásra is kapunk becslést (ennek beépítésén is dolgozunk). E QM-re épülő végpont energiaszámítási eljárások értelemszerűen nem igényelnek parametrizálást (szemben az MM-mel), így reményeink szerint általánosabban lehet majd alkalmazni őket a ligandum pontozásban. Ráadásul a gépidő tekintetében is abszolút versenyképesek, nagy rendszerekre is.

6) Az idézett Bioinformatics cikkünkben méretfüggő faktorokat (SNF, Table 2) használtunk egy sor EI előállítására. A cél az volt, hogy a ΔG_b -t „mentesítsük” annak méretfüggésétől és ennek kapcsán azt is megnéztük (a cikk akkori bírálójának kérésére), hogy az adott EI-k ilyen formában nyújtanak-e valami többet pl. a gyógyszer és nem gyógyszer halmazok elkülönítésében. Tehát itt az EI-k esetében az SNF-ekkel osztottunk, azaz a ΔG_b -t a mérettől függetlenítettük és ez alapján vontuk le az EI-kre a következtetéseket. Így tehát pont az EI-k esetében nem tudom ráfogni kizárólag a méretre a megkülönböztetést a 2 halmaz között. Az, hogy maguk az SNF-ek (pl. relatív molekulatömeg, vagy a Wiener-index) mennyire képesek disztingválni a gyógyszer és nem gyógyszer halmazok között, egy külön tanulmányban (D30) került további vizsgálatra, nagyobb elemszámon és ott ezt betegségtípusokra lebontva és általánosságban is kielemeztük.

Pécs, 2025. 03. 11.


Hetényi Csaba