

## Válasz

Jedlovsky Pál  
az MTA doktora

MTA doktori értekezésemre adott bírálatára

Szeretném megköszönni Jedlovsky Pál bírálónak, az MTA doktorának, az értekezésemre adott pozitív értékelését. Az egyes részecsről szóló külön értékelést igen tanulságos volt olvasnom. A szerkezeti részt bevezető kissé hosszabb alfejezet terjedelmén sokat gondolkoztam az íráskor. Általánosságban azt az elvet követtem, hogy olyasmit írjak a dolgozatba, illetve arra helyezem a hangsúlyt, ami vagy nem található meg a hivatkozott saját és egyéb referenciákban, vagy ilyen módon összegyűjtve nincs meg e korábbi cikkekben vagy monográfiákban. A kísérletes szerkezetmeghatározási módszerek korlátai tipikusan egy ilyen téma volt. Valamilyen okból nem népszerű/célszerű emlegetni ezeknek az általunk is referenciaként használt (és nyilvánvalóan elismert) műszeres technikáknak a korlátait: nagyon kevés olyan művet találtam, ami e korlátokat összefogottan tárgyalná kitérve a célpont-ligandum komplexekre is. Mivel tehát e korlátok nincsenek bent a tágabb köztudatban, így egy kívülálló olvasóban (aki ráakad erre az értekezésre valahol a világhálón) joggal merülhet fel a kérdés, hogy az elméleti módszerekkel miért akarunk olyasmit számítani, amit ki lehet mérni, vagy durvábban fogalmazva mi az értelme egyáltalán ezen a területen az elméleti jellegű munkáknak (és az értekezésnek). Természetesen a szakértő olvasónak vagy bírálónak ez a rész talán kicsit feleslegesnek vagy túl hosszúnak is tűnhet, így maximálisan érthető a bírálat erre vonatkozó kritikai megjegyzése. A dolgozathoz fűzött további kérdésekre és megjegyzésekre az alábbiakban válaszolok részletesen.

1) Valóban itt a megfogalmazás nem volt szerencsés és csak arra kívántam utalni, hogy az explicit vízmodellek az említett tulajdonságokat/paramétereket (geometria, töltések) atomi szinten figyelembe veszik, felhasználják.

2) Igen, a kötőhelyek (kötési módok) megtalálása után (vagy annak során) a közelítő  $\Delta G_b$  számítása is megtörténik, a dokkolás során iránytűként is alkalmazott pontozófüggvények segítségével, amelyek jórészt a 4. egyenletben is feltüntetett tagokat alkalmazzák. A Wrap 'n' Shake esetében is hasonlóan történik egy intermolekuláris kölcsönhatási energia érték ([D4] közlemény 1. egyenlete) számításával, amely alapján az egyes kötőhelyek rangsorolhatók is. Természetesen a kapott szerkezetek alapján a  $\Delta H_b$  és a teljes  $\Delta G_b$  számítása is elvégezhető, például a [D27] közleményünkben leírt módszerrel.

3) Ez nem jelent problémát, mivel a lerázási (Shaker) fázisban már egy teljes értékű erőter alapján történik az explicit vízmodellt alkalmazó MD számítás. A csomagolási fázis (Wrapper) esetében az AutoDock 4.2.3 korlátozott erőtere kerül alkalmazásra, a kérdésben is említett módosítással (a megfelelő kölcsönhatások kikapcsolásával). Majd a lerázási fázisban a csomagolási fázisban kapott szerkezeteket (a komplexet tartalmazó koordináta fájlt) inputként használjuk és TIP3P vízzel teli dobozba helyezve, AMBER99SB-ILDN erőter alapján történik a szerkezetek további finomítása és a ligandumok lerázása. A Shaker további részletei a [D4] közlemény „Additional file 2” mellékletének Table S1 táblázatában található (a főszövegben sajnos ezekre a fontos részletekre nem volt elég hely).

4) A kérdésben hivatkozott simulated annealing of chemical potential (SACP) technikát a szerzők Metropolis Monte-Carlo (MC) keresés keretében alkalmazzák vízmolekulák vagy fragmensek kötési módjának kiszámítására nagy kanonikus sokaságokat (fix  $\mu$ , V, T) előállítva és az SA során a  $\mu$ -t változtatva, miközben a részecskeszám (N) változhat. Munkánk során többnyire MD szimulációkban az izoterm-izobár (fix N, T, p) sokaságokat generálunk, tehát alapvetően más utat követünk. Az említett kereső eljárásoknak és sokaságoknak létjogosultsága van az említett kötési módok előállításában és ezek akár kombinálhatók is. Az (N, T, p) MD szimulációk explicit vízmodellel együtt alkalmazva biztosítják, hogy az egyensúlyi állapot a szabadentalpia függvény minimuma közelében helyezkedjen el (a célpont-ligandum kötődési folyamat követésére ideálisak, ha a kísérleti körülményekkel való összevethetőséget tekintjük). Ezen túlmenően az MD biztosítja a rendszer időfüggésének követését is, amelyből a vízmolekulák mobilitására nyerhető információ (időfüggést az sztochasztikus MC nem szolgáltat, viszont nagyobb energiagátakon képes túljutni, amelyeken a determinisztikus MD esetleg nem). Az adott vízpozíciók stabilitása ui. nem pusztán termodinamikai, hanem

kinetikai szempontból is vizsgálat tárgyát kell, hogy képezze (a célpontra történő tartózkodási időt tekintve), hasonlóan a ligandumok kötődési problémájához (Copeland et al., *Nat Rev Drug Discov* 2016, 15, 87–95; Schuetz et al., *Drug Discov Today* 2017, 22, 896–911).

Amennyire a kérdésben idézett JACS cikkből, valamint a szerzők egyéb [JACS 2011, 133, 10740–10743; PLoS ONE 2017, 12(8): e0183327] tanulmányaiból kivehető, a SACP alkalmazása viszonylag gyors, bár merev célmolekulát alkalmaznak. Megjegyzendő, hogy az MC a gyors dokkoló eljárásokban is alkalmazást nyert, bár a genetikus algoritmusok jobban teljesítenek, például az AutoDock esetében az újabb verziók át is tértek az utóbbira. Az MC alapú technikák alkalmazhatóságának egyetlen bizonyítéka, ha kipróbáljuk őket és a kísérleti értékekkel kvantitatíve összevetjük az eredményüket nagyobb adatmennyiségen. A SACP-MC is megérdemelne egy ilyen átfogóbb tesztet, elsősorban a vízpozíciók terén, összehasonlítva az MD alapú módszerek teljesítményével. A célpont-ligandum  $\Delta G_b$  esetében is célszerű lenne egy alaposabb validáció (a PLoS ONE cikk 5. ábráján van egy ilyen pár ponttal, de sajnos csak  $pIC_{50}$  értékekkel, amelyek használata maximum kvalitatív következtetésekre jó, ahogy a szerzők is tették). Sajnos a módszernek a közvetlen szoftver implementációját nem sikerült a cikkek alapján eddig megtalálnom a világhálón. A két megközelítés SACP-MC/MD kombinálása sem elképzelhetetlen, egyesítve akár a fent tárgyalt előnyeiket is.

5) A metadinamika is egy lehetőséget kínál a konformációs állapotok feltérképezésére, a keresés hatékonyságának növelésére. Segítségével át tudunk jutni olyan potenciális energiagáton (jól kiválasztott kollektív változók, CV mentén), amelyen az egyensúlyi MD számításokkal nem feltétlenül vergődünk át (vagy több időt venne igénybe bejárni a teljes teret). Ilyen klasszikus szituáció lehet, amikor egy ligandum bejutását egy kötőzsebbe meggátolja a célmolekula valamely fragmense, amely a kötőzseb szájára ráhajolva lezárja azt annak apo konformációjában. A ligandum bekötésakor aztán e fragmens félrehajlik és így a ligandum be tud jutni, kialakítva a holo konformációt. Ha a célunk ennek a kötődési (holo) konformációnak a gyors előállítás, akkor a metadinamika lehet az egyik járható út. Természetesen a metadinamika alkalmazható bármely említett típusú (orto/allosztérikus) kötőhely energetikai jellemzésére, amelyre az irodalomban példák is vannak. A  $\Delta G_b$  számítás az (energiagát előtt/mögött) alkalmazott módosító potenciálok felhasználásával történik. Hátránya a célpont-ligandum kötődés esetében a számos technikai buktatóból fakad kezdve a megfelelő CV-k kiválasztásával, konvergencia problémák stb., amelyeket részletesen taglal

például Raniolo és Limongelli [Nat Protoc 15, 2837–2866 (2020)] cikkében, amely emellett elég gyakorlatias leírást és pozitív alkalmazási példák referenciáit is tartalmazza.

6) Itt a TIP4P, TIP4P-Ew, TIP5P vízmodellekre utaltam, amelyeket szintén vizsgáltunk a [D18] tanulmányban.

7) Itt a 255-ös referencia egyik fő megállapítására utaltam, amely az absztraktban így került megfogalmazásra: „ The binding enthalpy, however, is notoriously more difficult to optimize than the binding entropy, a fact that has resulted in thermodynamically unbalanced molecules that do not achieve optimal potency.”. Bár talán azt várnánk, hogy a  $\Delta S_b$  optimalizálása nagyobb kihívás, ennek fő komponenseire, a deszolvatációs és konformációs entrópiaváltozásokra jó trükkök állnak rendelkezésre a tervezésben, úgy mint a hidrofób csoportok bevezetése, vagy konformációs korlátozások bevezetése a ligandumok szerkezetébe (255-ös ref. 870. oldal). Ezzel szemben, a  $\Delta H_b$  nyereség növelése sokszor a ligandum méretének növelését is jelenti, ami bizonyos határok után nem csak az említett  $\Delta S_b$  komponensek lerontásával, hanem a ligandum farmakokinetikai (biohasznosulási) értékének csökkenésével is jár. Tehát a  $\Delta H_b$  optimalizálásakor mindig figyelembe kell venni a  $\Delta S_b$  változását is, hogy ne essünk át a ló túlsó oldalára. Erre ad a cikk néhány praktikus tanácsot is, a Freire-től megszokott kiváló színvonalon.

8) Itt valóban nincs ellentmondás, hiszen a vízmodellek alkalmazása (akár implicit, akár explicit) sem igényel (mondjuk az explicit vízmolekula vagy a tervezésben érintett szerves molekulák esetében) parametrizálást, ha QM-et alkalmazunk. Annak meghatározása persze, hogy milyen vízmodell alkalmazása a legcélravezetőbb, az adott problémára, nem triviális. *Nota bene*, ez nem rontja a QM alkalmazhatóságát ilyen tekintetben, inkább egy alkalmazási kérdés, amelynek persze még nincsenek kőbe vésett szabályai (QM és MM szinten sem).

Pécs, 2025. 03. 11.

  
Hetényi Csaba