



Politechnika Poznańska

**Wydział Inżynierii
Materiałowej i Fizyki
Technicznej**



ROZPRAWA DOKTORSKA

Jakub Dąbrowski

Ocena roli wiązań wodorowych w stabilności α -helikalnych peptydów poprzez symulacje dynamiki molekularnej

Promotor: dr hab. Arkadiusz Ptak, prof. PP

Poznań 2023

Chciałbym serdecznie podziękować mojemu promotorowi, dr hab. Prof. PP Arkadiuszowi Ptakowi za wszelką okazaną pomoc, cierpliwość, liczne dyskusje nad wynikami oraz wsparcie.

Dziękuję także mojej rodzinie i przyjaciołom za wiarę we mnie oraz motywację do dalszej pracy.

Spis treści

STRESZCZENIE	7
SUMMARY	9
1. Wstęp.....	11
1.1. Motywacja i cel badań.....	11
1.2. Opis zawartości pracy.....	13
2. Zagadnienia wprowadzające.....	15
2.1. Budowa peptydów i białek	15
2.2. Metody badania struktury polipeptydów i białek	20
2.3. Modele teoretyczne wymuszonego siłą zerwania wiązania	23
3. Metody obliczeniowe	27
3.1. Mechanika molekularna i pole siłowe	27
3.2. Dynamika molekularna.....	32
3.3. Sterowana dynamika molekularna.....	35
3.4. Metody rozpoznawania drugorzędowej struktury białek	36
4. Modele molekularne polipeptydów	39
4.1. Model dekaalaniny	39
4.2. Model dekaalaniny bez sieci wiązań wodorowych	45
4.3. Model AAKA(AEAAKA) ₅ AC.....	47
4.4. Porównanie uzyskanych geometrii modeli z danymi krystalograficznymi	55
4.5. Symulacje kontrolne	59
5. Wpływ sieci wiązań wodorowych na sztywność i stabilność α -helisy.....	64
5.1. Sieć wiązań wodorowych w dekaalaninie	64
5.2. Symulacje dynamiki molekularnej modeli dekaalaniny z i bez sieci wiązań wodorowych ..	68
5.3. Symulacje sterowanej dynamiki molekularnej modeli dekaalaniny z i bez sieci wiązań wodorowych	73
6. Parametry kinetyczne i termodynamiczne pojedynczego wiązania wodorowego.....	81
6.1. Zastosowanie modeli wymuszonego siłą zerwania wiązania	81
6.2. Wyznaczenie wkładu entalpowego i entropowego energii wiązania wodorowego.....	93
7. Podsumowanie i wnioski	101
8. Bibliografia.....	104
Spis rysunków	108
Spis tabel	111
Wykaz osiągnięć naukowych	112

Wykaz skrótów:

- AFM** – mikroskopia sił atomowych (*ang. atomic force microscopy*)
AMBER – pole siłowe opracowane na Uniwersytecie Kalifornijskim (*ang. assisted model building with energy refinement*)
BE – model termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału Bella-Evansa
CD – spektroskopia dichroizmu kołowego (*ang. Circular Dichroism*)
CHARMM – pole siłowe opracowane w Uniwersytecie Harvarda (*ang. chemistry at Harvard macromolecular mechanics*)
DFS – dynamiczna spektroskopia sił (*ang. dynamic force spectroscopy*)
DHS – model termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału Dudko-Hummer-Szabo
FF – pole siłowe (*ang. force field*)
FNDY – model termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału Friddle-Noy-De Yoreo
IFF – międzywarstwowe pole siłowe (*ang. interface force field*)
IUPAC – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (*ang. The International Union of Pure and Applied Chemistry*)
MC – metody Monte Carlo
MD – dynamika molekularna (*ang. molecular dynamics*)
NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*and. nuclear magnetic resonance*)
PBC – periodyczne warunki brzegowe (*ang. periodic box cell*)
PDB – bank danych strukturalnych białek i kwasów nukleinowych (*ang. Protein Data Bank*)
RMSD – odchylenie średniej kwadratowej pozycji atomów (*ang. root mean square deviation*)
SAPT – metoda rachunku zaburzeń o adaptowanej symetrii (*ang. symmetry-adapted perturbation theory*)
SMD – sterowana dynamika molekularna (*ang. steered molecular dynamics*)
STRIDE – algorytm identyfikacji struktur drugorzędowych (*ang. structural identification*)
UFF – uniwersalne pole siłowe opracowane w Uniwersytecie Stanu Colorado (*ang. universal force field*)
XRD – dyfrakcja rentgenowska (*ang. X-ray diffraction*)

Na Rysunkach zastosowano notację oznaczeń atomów:

XXX YY ZZ,

gdzie: XXX oznacza 3 literowy skrót aminokwasu, YY oznacza numer aminokwasu w łańcuchu peptydowym, ZZ oznacza rodzaj pierwiastka

The way to get good ideas is to get lots of ideas, and throw the bad ones away
Linus Pauling

STRESZCZENIE

Niniejsza praca o charakterze teoretyczno-obliczeniowym prezentuje zagadnienia związane ze stabilnością struktury drugorzędowej peptydów, będącej kluczowym czynnikiem decydującym o zachowaniu oraz funkcji peptydów i białek. Jedną z najczęściej występujących form przestrzennych struktury peptydów jest α -helisa, szeroko występująca w świecie białek. Struktura ta przypomina sprężynę, zbudowaną ze skręconego w przestrzeni łańcucha aminokwasów. Przyjmuje się, że ważną rolę w stabilizacji tej struktury pełnią wiązania wodorowe, choć ich dokładny udział w formowaniu i stabilizacji α -helisy nie jest znany.

Celem pracy było określenie wpływu wiązań wodorowych na stabilność α -helikalnej struktury peptydów oraz wyznaczenie wielkości energetycznych i kinetycznych charakteryzujących pojedyncze wiązania wodorowe. Głównymi narzędziami stosowanymi w badaniach były metody dynamiki molekularnej i sterowanej dynamiki molekularnej, opartych na polu siłowym. Jako peptydy modelowe wybrano dwa niewielkie polipeptydy – dekaalaninę oraz peptyd o sekwencji AAKA(AEAAKA)₅AC. Peptydy te zostały wybrane z uwagi na ich dużą zdolność do tworzenia stabilnej drugorzędowej konformacji α -helikalnej. Uzyskana w wyniku modelowania geometria drugorzędowa peptydów została zweryfikowana za pomocą algorytmu matematycznego identyfikującego drugorzędową strukturę białek oraz porównana z geometriami uzyskanymi w wyniku badań rentgenograficznych.

Pole siłowe CHARMM36 posłużyło do opracowania modeli, a następnie przeprowadzenia symulacji dwóch α -helikalnych peptydów. Dodatkowo, wykonując modyfikację części parametrów pola siłowego dotyczących elektrostatyki, uzyskano możliwość symulowania braku sieci wiązań wodorowych w jednym z modeli peptydów (dekaalaniny). Stosując dynamikę molekularną wraz ze zmodyfikowanym polem siłowym możliwym stało się pokazanie jak brak sieci wiązań wodorowych wpływa na stabilność modelowego peptydu. Symulacje metodą sterowanej dynamiki molekularnej pozwoliły na wykonanie eksperymentu obliczeniowego podobnego do badań eksperymentalnych wykonywanych za pomocą mikroskopu sił atomowych, polegających na rozciąganiu pojedynczego peptydu. Dzięki możliwości sterowania prędkością rozciągania i wyznaczaniu siły przyłożonej do cząsteczki peptydu wykonano szereg obliczeń, na podstawie których wyznaczono stałe sprężystości peptydu z i bez sieci wiązań wodorowych. Ich porównanie pozwoliło na określenie wpływu sieci wiązań na sztywność i stabilność peptydu.

Metoda sterowanej dynamiki molekularnej wykorzystana została również przy badaniu kolejnego peptydu, AAKA(AEAAKA)₅AC. Dzięki możliwości sterowania prędkością rozciągania oraz możliwości wyznaczenia siły, przy której pęka wiązanie wodorowe, możliwym stało się wykonanie serii eksperymentów obliczeniowych tzw. dynamicznej spektroskopii sił dla badanego modelu peptydu, a następnie wyznaczenie parametrów energetycznych pojedynczego wiązania wodorowego, nie tylko

korzystając z trzech modeli termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału (modele Bella-Evansa, Dudko-Hummer-Szabo oraz Friddle-Noy-De Yoreo), ale również modyfikując jeden z nich. Modyfikacja miała na celu wyznaczenie składowych energii swobodnej pojedynczego wiązania wodorowego, tj. zmian entalpii i entropii. Przeprowadzone w tym celu symulacje zawierały dwie serie pomiarowe, zmiennie-prędkościową oraz zmiennie-temperaturową. Z obu serii w odpowiednich krokach obliczeniowych wyznaczono kolejno interesujące parametry, a dokładny opis metody zawarty został w treści pracy.

Dzięki przeprowadzonym eksperymentom obliczeniowym udało się wyznaczyć udział sieci wiązań wodorowych w sztywności α -helikalnego peptydu, jako $C \approx 67\%$. Pokazano również, że bez sieci wiązań wodorowych reprezentowanej w dynamice molekularnej głównie dzięki międzyatomowym oddziaływaniom elektrostatycznym struktura α -helisy jest niestabilna i szybko ulega degradacji. Dzięki zastosowaniu modeli termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału udało się wyznaczyć parametry energetyczne i kinetyczne pojedynczego wiązania wodorowego w badanym układzie m.in. średni czas życia $t_{\text{HB}}(0) = (82 \pm 25)$ ps oraz energię wiązania $\Delta G_{\text{bu}} = (1,59 \pm 0,51)$ kcal·mol⁻¹. Dzięki zaproponowanej modyfikacji modelu Dudko-Hummera-Szabo wyznaczono energię swobodną wiązania wodorowego $\Delta G_{\beta} = (2,04 \pm 0,21)$ kcal·mol⁻¹, a także jej skład entalpowy $\Delta H = (3,69 \pm 0,36)$ kcal·mol⁻¹ i entropowy $T\Delta S = (1,64 \pm 0,38)$ kcal·mol⁻¹ dla $T = 300$ K. Schemat eksperymentu obliczeniowego przedstawionego w niniejszej pracy można wykorzystać w badaniach teoretycznych innych oddziaływań międzymolekularnych, a także wiązań specyficznych białko-ligand, dzięki czemu badacze mogą uzyskać więcej dodatkowych informacji o energetyce oddziaływania niż podczas stosowania standardowego modelu Dudko-Hummera-Szabo.

SUMMARY

“Evaluation of the role of hydrogen bonds in the stability of α -helical peptides using molecular dynamics simulations”

This theoretical and computational thesis presents studies on the stability of the secondary structure of peptides, which is a key factor in determining the behavior and function of peptides and proteins. One of the most common forms of peptide structures is the α -helix, which is widely present in proteins. This structure resembles a spring, built of a twisted chain of amino acids. It is assumed that hydrogen bonds play an important role in stabilizing this structure, although their exact role in the formation and stabilization of the α -helix is not known.

The aim of the work was to determine the influence of hydrogen bonds on the stability of the α -helical structure of peptides and to determine the energetic and kinetic quantities characterizing individual hydrogen bonds. Molecular dynamics and steered molecular dynamics based on a force field were used in the research. Two small peptides – decaalanin and the AAKA(AEAAKA)₅AC polypeptide – were selected as model peptides due to their high ability to form a stable α -helical conformation. The helical geometry of the models was verified using mathematical tools and compared with two exemplary geometries obtained from X-ray studies.

The CHARMM36 force field was used to model and simulate two α -helical peptides. Additionally, by modifying some of its electrostatic parameters, it was possible to simulate the lack of hydrogen bond network in one of the peptides (decaalanine). By applying molecular dynamics with the modified force field, it was possible to show how the lack of hydrogen bond network affects the stability of the model peptide. The steered molecular dynamics method allowed for a computational experiment similar to atomic force microscope experiments involving stretching a single peptide. By controlling the stretching velocity and determining the applied force on the peptide molecule, a series of calculations were performed to determine the elastic constants of the peptide with and without the hydrogen bond network. Their comparison allowed for determination of the influence of hydrogen bonds on the stiffness and stability of the peptide.

The steered molecular dynamics method was also used to study another α -helical peptide, AAKA(AEAAKA)₅AC. By controlling the stretching velocity and determining the force at which the hydrogen bond breaks, it was possible to perform computational experiments of the so-called dynamic force spectroscopy for the studied peptide model, and then determine the energetic parameters of a single hydrogen bond, not only using three models of thermally activated escape from the potential well (Bella-Evans, Dudko-Hummer-Szabo, and Friddle-Noy-De Yoreo models), but also modifying one of them. The modification aimed to determine the free energy components of a single hydrogen bond, i.e., changes in enthalpy and entropy. The simulations conducted for this purpose included two sets of

measurements, namely, variable-velocity and variable-temperature sets. From both sets, the interesting parameters were calculated successively in appropriate steps, and a detailed description of the methodology is included in the content of the thesis.

Thanks to computational experiments, the contribution of hydrogen bond network to the stiffness of α -helical peptides was determined to be $C \approx 67\%$. It was also shown that without the hydrogen bond network, the α -helix structure is unstable and quickly degrades. By using the models of thermally activated escape from potential well, the energetic and kinetic parameters of a single hydrogen bond in the studied system were determined, including the average lifetime $t_{\text{HB}}(0) = (82 \pm 25)$ ps and the bond energy $\Delta G_{\text{bu}} = (1.59 \pm 0.51)$ kcal·mol⁻¹. By proposing a modification of the Dudko-Hummer-Szabo model, the free energy of hydrogen bond $\Delta G_{\beta} = (2.04 \pm 0.21)$ kcal·mol⁻¹, as well as the enthalpic and entropic contributions of this energy: $\Delta H = (3.69 \pm 0.36)$ kcal·mol⁻¹ and $T\Delta S = (1.64 \pm 0.38)$ kcal·mol⁻¹ for $T = 300$ K, were determined. The computational methodology presented in the thesis can be used in theoretical studies of other intermolecular interactions, including protein-ligand specific bonds, enabling researchers to obtain additional information on the energetics of interactions beyond the standard Dudko-Hummer-Szabo model.

1. Wstęp

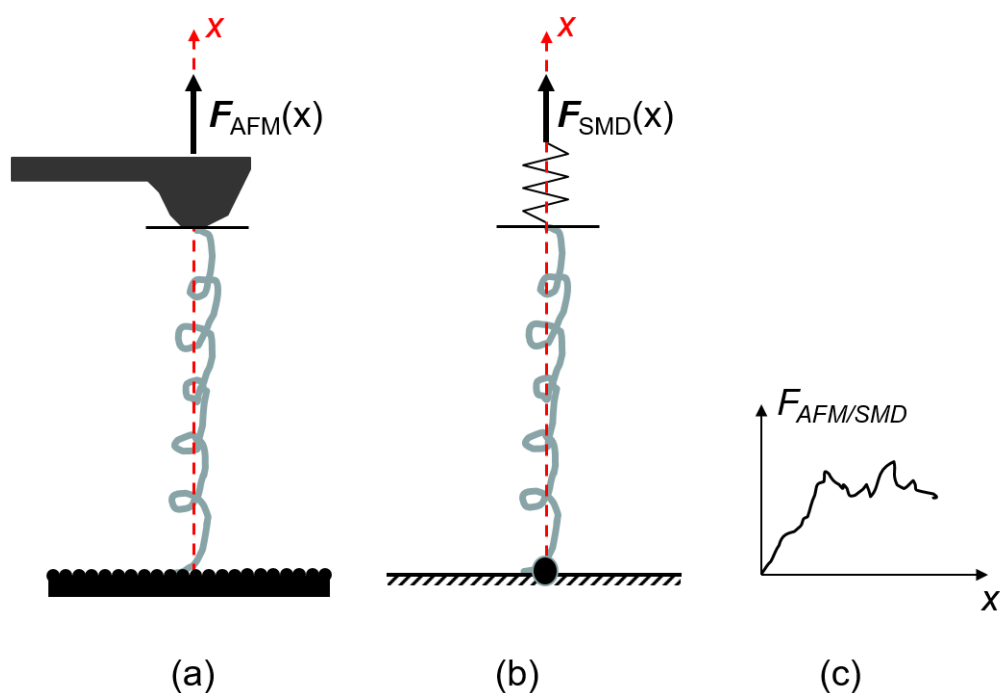
1.1. Motywacja i cel badań

Wiedza o strukturze układów biologicznych pomaga w określaniu funkcji biomolekuły lub jej poszczególnych części. Zrozumienie mechanizmów funkcjonowania biomolekuł, a w szczególności białek oraz kwasów nukleinowych jest niezmiernie ważne dla możliwości kontroli procesów zachodzących w stanach chorobowych, infekcjach bakteryjnych czy wirusowych. Wraz z rozwojem technik eksperymentalnych, jak i obliczeniowych, możliwym stało się wykonywanie eksperymentów mechanicznych na złożonych układach biopolimerowych jakimi są białka. Otwiera to również zupełnie nowe możliwości z punktu widzenia projektowania funkcjonalnych materiałów nanoinżynierskich. Szczególnym zainteresowaniem w ostatniej dekadzie cieszą się tzw. zszyte peptydy (*ang. stapled peptides*), tj. pojedyncze peptydy o określonej konformacji helikalnej stabilizowane poprzez mostki węglowodorowe przyłączone do peptydu. Wytwarzanie takich struktur pozwala na projektowanie nowej klasy leków celowanych (*ang. target drugs*), np. inhibitorów w oddziaływaniach pomiędzy białkami lub pomiędzy białkami a kwasami nukleinowymi [1,2]. Przykładem mogą być badania, zarówno eksperymentalne, jak i obliczeniowe, tropokolagenu – podstawowej jednostki funkcjonalnej kolagenu, białka fibrylarnego, które stanowi podstawowy składnik substancji międzykomórkowej, dającej tkankom większą sprężystość [3]. Tropokolagen zbudowany jest z trzech α -helikalnych peptydów owiniętych wokół siebie. Poznanie jego własności mechanicznych pozwoli na głębsze zrozumienie działania dużych kompleksów biomolekuł oraz tkanek podczas obciążenia mechanicznego na poziomie makroskopowym. Dodatkowo, badania nad białkowymi materiałami hierarchicznymi pozwolą poszerzyć wiedzę dotyczącą stanów patologicznych spowodowanych uszkodzeniami białek na poziomie molekularnym, takich jak choroba Alzheimera, progeria czy podczas uszkodzeń fragmentów tkanek [4]. Powyższe zagadnienia ściśle wiążą się z własnościami struktur helikalnych białek, w szczególności α -helisy. Dlatego naukowcy intensywnie badają ten typ drugorzędowej struktury, zwłaszcza, że od kilkunastu lat możliwym jest wykonywanie eksperymentów prowadzonych bezpośrednio na pojedynczych peptydach.

Struktura drugorzędowa peptydów zdeterminowana jest nie tylko kolejnością aminokwasów, bardzo ważnym czynnikiem mającym wpływ na powstanie i stabilizację struktur peptydów jest formowanie się wiązań wodorowych, będących specyficznymi oddziaływaniami między atomami donora i akceptora atomu wodoru. Badania wykonane za pomocą metod fizyki obliczeniowej wskazują, że izolowane wiązanie wodorowe ma energię ok. $6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, natomiast wiązanie wodorowe peptydu w wodzie osiąga niższą energię, ok. $1,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Mniejsza energia w rozpuszczalniku wskazuje, że wiązanie wodorowe nie może być opisywane jako integralna własność molekuly, a jako holistyczne oddziaływanie uwzględniające rozpuszczalnik, w jakim peptyd wraz z wiązaniami wodorowymi się znajduje. Dodatkowo, dynamika ośrodka sprawia, że wiązania te mogą pękać i wiązać się na nowo

w czasie kilku pikosekund. Te entropowe efekty spowodowały potrzebę wyznaczenia nie tylko energii wiązania wodorowego, ale i wkładów entalpowych i entropowych w energię aktywacji wiązania wodorowego w celu jego dokładniejszego opisu.

Celem pracy doktorskiej było przeanalizowanie stabilności struktury α -helikalnego polipeptydu podczas jego rozciągania ze szczególnym uwzględnieniem roli wiązań wodorowych w stabilizacji struktury przestrzennej oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych i energetycznych pojedynczego wiązania wodorowego, takich jak energia aktywacji i jej wkłady entalpowy i entropowy. Wykonane obliczenia metodą sterowanej dynamiki molekularnej (SMD) można opisać jako komputerowy eksperyment wytrzymałościowy, analogiczny do eksperymentu rozciągania pojedynczego peptydu wykonanego za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM; rysunek 1.1). Z danych uzyskanych z obliczeń wyciągnięto szereg informacji dotyczących stabilności i sztywności struktury α -helikalnej z i bez sieci wiązań wodorowych w modelowanych polipeptydach oraz parametry pojedynczego wiązania wodorowego.



Rysunek 1.1. Schemat porównawczy eksperymentu wykonywanego za pomocą AFM (a) oraz eksperymentu komputerowego przeprowadzanego metodą SMD (b). W obu przypadkach otrzymać można zależność siły działającej na cząsteczkę od wydłużenia badanego peptydu (c)

Ekspertymenty pozwalające na rozciąganie pojedynczych molekuł pozwoliły scharakteryzować m.in. mechaniczne własności pojedynczych polipeptydów, jak i pozwoliły częściowo opisać proces rozwijania się peptydu [5,6]. Równocześnie, rozwój informatyki i ciągły wzrost mocy obliczeniowej

komputerów pozwolił na prowadzenie obliczeń i symulacji metodami dynamiki molekularnej (MD) na coraz to większych układach, wraz ze stosowaniem modeli *explicite* rozpuszczalnika, tj. umieszczeniem symulowanego peptydu w otoczeniu tysięcy – dziesiątek tysięcy molekuł rozpuszczalnika. Pierwsza praca dotycząca symulacji MD peptydu [7] z 1977 roku dotyczyła obliczeń prowadzonych na modelu zawierającym 58 aminokwasów nieuwzględniających atomów wodoru i czterech dodanych molekuł wody. Całkowita długość trwania wspomnianej symulacji to 9 ps. W chwili obecnej symuluje się układy zawierające nie kilkaset, ale nawet kilka milionów atomów – przykładem może być symulacja białka SPIKE wirusa SARS-CoV-2, w której badano zachowanie się dużego biopolimeru zawierającego około 1,7 miliona atomów w czasie symulacji rzędu kilku mikrosekund [8]. Możliwość prowadzenia coraz dłuższych symulacji na coraz większych układach pozwoliła odtwarzać obliczeniowo eksperymenty i zjawiska zachodzące na poziomie atomowym. Dzięki temu możliwym jest odtworzenie wykonywanych obecnie eksperymentów AFM metodami obliczeniowymi, otrzymanie danych jak przy spektroskopii sił i na ich podstawie, stosując modele termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału [9-13] dla wiązania wodorowego, wyznaczenie jego parametrów kinetycznych i energetycznych.

Możliwość ta została wykorzystana w niniejszej rozprawie doktorskiej. Ponadto, wprowadzając do jednego z modeli teoretycznych modyfikację, wyznaczono wkład entalpowy i entropowy w energię aktywacji. Korzystając z możliwości ingerencji w parametry stosowanego pola siłowego, zaproponowano modyfikację oddziaływań elektrostatycznych dla wybranych atomów symulując brak sieci wiązań wodorowych tworzących α -helisę. Dzięki temu możliwa była ocena wpływu roli wiązań wodorowych na stabilność takiej struktury. Dodatkowo, w pracy pokazano, że proces deformacji mechanicznej α -helikalnych polipeptydów w skali atomowej jest zależny od szybkości przykładanego obciążenia mechanicznego, co jest zgodne z badaniami eksperymentalnymi i modelami teoretycznymi.

1.2. Opis zawartości pracy

Rozprawa doktorska została zrealizowana pod kierunkiem dr. hab. Arkadiusza Ptaka, prof. PP, w Zakładzie Fizyki Obliczeniowej i Nanomechaniki Instytutu Fizyki, na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej. Rozprawa ma charakter teoretyczno-obliczeniowy; jej wyniki zostały opublikowane w dwóch artykułach w czasopismach z listy JCR (wymienione w wykazie osiągnięć naukowych na końcu rozprawy), a także zamieszczone zostały w przygotowanym manuskrypcie pt. "The role of hydrogen bonds in the stability and the stiffness of α -helical deca-alanine". Autor rozprawy samodzielnie wykonał wszystkie zawarte w pracy obliczenia, opracował wyniki obliczeń, dokonał ich analizy i interpretacji, formułując stosowne wnioski. Układ redakcyjny rozprawy jest standardowy, z zamieszczonymi na wstępie streszczeniami w języku polskim i angielskim.

Rozdział pierwszy zawiera motywację i cel badań, wraz z opisem zawartości pracy.

Rozdział drugi zawiera opis zagadnień wprowadzających do tematyki pracy. Przedstawiony został, między innymi, podział wielopoziomowej struktury białek. Z uwagi na znaczącą rolę wiązań wodorowych w tej budowie zamieszczono krótki opis tych oddziaływań. Dodatkowo zamieszczono opis głównych metod eksperymentalnych, za pomocą których bada się strukturę polipeptydów i jej własności. Przedstawiono teoretyczne modele wymuszonego siłą zerwania wiązania, zastosowane w celu wyznaczenia parametrów pojedynczego wiązania wodorowego.

W rozdziale trzecim zamieszczono opis stosowanych w pracy metod obliczeniowych. Rozdział ten zawiera opis mechaniki molekularnej, metody dynamiki molekularnej oraz sterowanej dynamiki molekularnej. Dodatkowo zamieszczono w nim metody identyfikacji i klasyfikacji rodzaju struktury drugorzędowej peptydów i białek.

Rozdział czwarty przedstawia modele peptydów, jakie zostały wybrane do badań: dekaalaninę oraz peptyd złożony z sekwencji aminokwasów AAKA(AEAAKA)₅AC (A – alanina, K – lizyna, E – glutamina i C – cysteina). Przedstawiono szczegółowo ich budowę oraz opis geometrii (m.in. rozkład długości wiązań wodorowych, wartości kątów torsyjnych), parametry optymalizacji geometrii oraz symulacji podgrzewania modelu i symulacji równowagowej. W celu ewaluacji poprawności zbudowanych modeli, dokonano ich porównania z wybranymi strukturami krystalograficznymi białek zawierających regiony bogate w α -helisy. W rozdziale tym zaproponowano również model peptydu dekaalaniny bez sieci wiązań wodorowych, dzięki któremu dokonano porównania zmian strukturalnych modelu peptydu z i bez sieci tych wiązań w następnym rozdziale.

W rozdziale piątym przedstawiono wyniki dwóch typów symulacji – metodą MD oraz metodą SMD, zarówno dla modelu dekaalaniny z pełnym opisem elektrostatycznym wiązań wodorowych, jak i dla modelu z brakiem sieci wiązań wodorowych. Porównanie wyników dla obu serii symulacji umożliwiło pokazanie wpływu wiązań wodorowych na stabilność struktury drugorzędowej α -helikalnego peptydu oraz na oszacowanie udziału wiązań wodorowych w sztywności modelowanego peptydu.

W rozdziale szóstym przedstawiono wyniki dwóch serii symulacji metodą SMD dla modelu α -helikalnego peptydu złożonego z sekwencji aminokwasów AAKA(AEAAKA)₅AC. Każda z serii symulacji wykonana została dla szeregu wartości prędkości rozciągania v_{SMD} , następnie z uzyskanych danych wyznaczono średnią siłę zerwania wiązania wodorowego. Dla danych z pierwszej serii pomiarowej zastosowano modele teoretyczne wymuszonego siłą zerwania wiązania, aby uzyskać parametry energetyczne i kinetyczne pojedynczego wiązania wodorowego. Dla danych z drugiej serii pomiarowej zastosowano zmodyfikowany przez autora rozprawy jeden z modeli w celu wyznaczenia wkładu entalpowego i entropowego w energię aktywacji pojedynczego wiązania wodorowego.

W rozdziale siódmym przedstawiono podsumowanie pracy, gdzie zebrano najważniejsze wyniki pracy oraz przedstawiono wnioski końcowe.

2. Zagadnienia wprowadzające

2.1. Budowa peptydów i białek

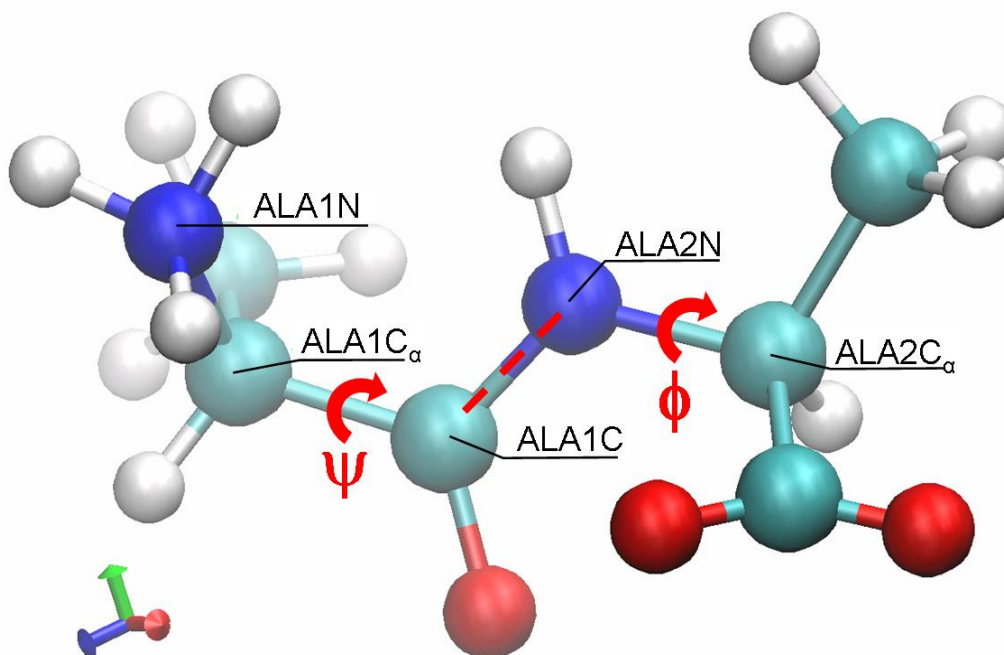
Białka charakteryzują się złożoną, wielopoziomową (hierarchiczną) budową. Podstawową jednostką składową peptydów i białek są aminokwasy, związki organiczne, które zawierają grupę karboksylową $-\text{COOH}$ oraz grupę aminową $-\text{NH}_2$. Aminokwasy mogą się ze sobą łączyć za pomocą wiązania peptydowego, czyli wiązania amidowego między grupą α -karboksylową jednego aminokwasu a grupą α -aminową następnego $-\text{CO}-\text{NH}-$ tworząc łańcuchy zbudowane z dwóch, trzech i więcej aminokwasów [14,15]. Z uwagi na to, że białka składają się często z wielu różnych aminokwasów, które to dodatkowo mogą ze sobą oddziaływać, zachodzi proces zwijania się łańcuchów peptydów, tworząc tym samym skomplikowane geometrycznie formy. W celu opisu tych form wprowadzono rozróżnienie na 4 poziomy struktur białek:

1. struktura pierwszorzędowa – kolejność występowania poszczególnych aminokwasów w łańcuchu peptydowym,
2. struktura drugorzędowa – przestrzenna struktura fragmentów łańcucha polipeptydowego,
3. struktura trzeciorzędowa – struktura zwiniętego, długiego łańcucha polipeptydowego złożonego z wielu struktur drugorzędowych,
4. struktura czwartorzędowa – struktura zwiniętego białka złożonego z wielu łańcuchów polipeptydowych czyli podjednostek.

Tematyka badawcza niniejszej pracy dotyczy struktury drugorzędowej białek, a więc przestrzennego ułożenia aminokwasów względem siebie we fragmentach łańcucha peptydowego. Zmiana wzajemnego ułożenia aminokwasów możliwa jest dzięki obrotom aminokwasów względem osi odpowiednich wiązań biegnących wzdłuż szkieletu peptydu [15]. Aminokwasy tworzą względem siebie kąty torsyjne – kąty dwuścienne pomiędzy dwiema płaszczyznami określonymi przez trzy atomy w cztero-atomowej sekwencji części molekuly. Zgodnie z Międzynarodową Unią Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) zdefiniować można kąty torsyjne:

- ϕ – kąt opisujący rotację wokół wiązania $\text{N}-\text{C}_\alpha$,
- ψ – kąt opisujący rotację wokół wiązania $\text{C}_\alpha-\text{C}$.

Atom C_α definiowany jest jako pierwszy atom węgla w szkielecie występujący po grupie aminowej w łańcuchu $-\text{NH}_2-\text{C}_\alpha\text{H}-\text{R}-\text{CO}-$. W łańcuchu peptydowym aminokwasy numeruje się w kolejności od aminokwasu C-terminalnego do N-terminalnego. Położenie kątów torsyjnych ϕ i ψ przedstawiono na rysunku 2.1.



Rysunek 2.1. Kąty torsyjne ϕ i ψ definiujące drugorzędową strukturę peptydów i białek. Przedstawiony peptyd to di-alanina w konformacji α -helikalnej. Kolory reprezentują odpowiednie pierwiastki: turkusowy – węgiel, niebieski – azot, czerwony – tlen, biały – wodór. Zaznaczono kąty torsyjne ϕ i ψ , oraz wiązanie peptydowe między atomem węgla w 1 alaninie, a atomem azotu w 2 alaninie.

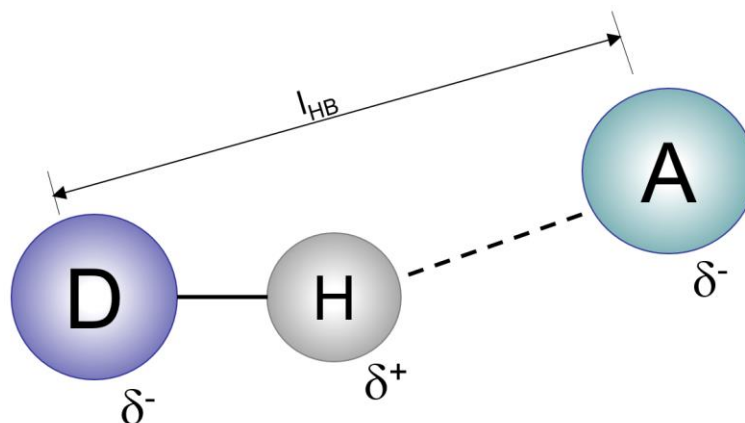
Poszczególnym konformacjom łańcuchów peptydowych przypisano charakterystyczne wartości kątów torsyjnych [15,16]:

- α -helisa – wartości bliskie $\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$,
- β -harmonijka – wartości bliskie $\phi = -119^\circ$, $\psi = 113^\circ$,
- skręt – wartości bliskie $\phi = -60^\circ$, $\psi = 30^\circ$,
- w pełni rozciągnięty łańcuch – $\phi = 180^\circ$, $\psi = 180^\circ$.

W rzeczywistości kąty dla powyższych konformacji znajdują się w przedziałach wartości bliskich podanym wartościom, dlatego też powyższą definicję struktur drugorzędowych nie należy traktować sztywno. W przyrodzie występują również inne rodzaje helis, np. π -helisa lub 3.10-helisa [17], niemniej wymienione cztery typy występują najczęściej. W praktyce do oceny typu konformacji wykorzystuje się np. mapę Ramachandrana [16] lub algorytmy identyfikujące strukturę białek (rozdział 3.4).

Wysoka stabilność podstawowych struktur peptydów możliwa jest dzięki oddziaływaniom pomiędzy odpowiednimi atomami w łańcuchu peptydowym, w tym wiązaniom wodorowym. Wiązanie wodorowe powstaje pomiędzy atomem wodoru i atomem elektroujemnym zawierającym wolne pary elektronowe, i ma głównie charakter elektrostatyczny. Należy jednak pamiętać, że wiązanie wodorowe jest efektem kwantowomechanicznym, którego istotą jest częściowe wnikięcie protonu wodoru, biorącego udział w wiązaniu kowalencyjnym, w głąb powłoki elektronowej pobliskiego elektroujemnego atomu (np. fluoru, tlenu, azotu), powodując jej znaczną deformację, choć nie dochodzi

do powstania orbitalu molekularnego. Wiązanie to możemy wyrazić za pomocą wzoru $D-H\cdots A$, gdzie H prezentuje atom wodoru, D jest atomem będącym donorem protonu, tworzącym wiązanie kowalencyjne z atomem wodoru, a A jest atomem elektroujemnym będącym akceptorem protonu wodoru [14].



Rysunek 2.2. Model wiązania wodorowego. D – donator, A – akceptor, H – atom wodoru, l_{HB} – odległość pomiędzy donorem a akceptorem. δ^- i δ^+ oznaczają ładunek cząstkowy ujemny i dodatni.

Ze względu na energię wiązania wodorowego, wyróżnić można podział wiązań wodorowych na:

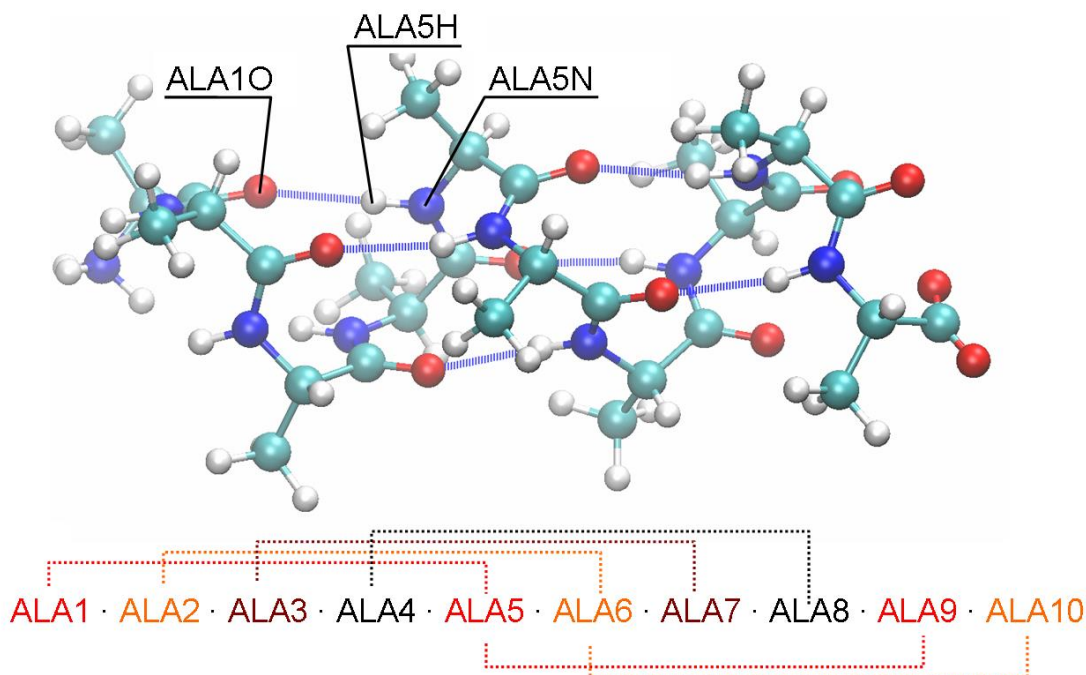
- silne – energia oddziaływania w zakresie $14 - 40 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, długość wiązania $2,2 - 2,5 \text{ \AA}$,
- średnie – energia oddziaływania w zakresie $4 - 14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, długość wiązania $2,5 - 3,2 \text{ \AA}$,
- słabe – energia oddziaływania w zakresie $0 - 4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, długość wiązania $3,2 - 4,0 \text{ \AA}$.

Oczywiście, powyższy podział oraz prezentowane wartości energii i długości wiązania nie są ściśle i prezentują skomplikowany i ciągły charakter tego oddziaływania. Ponieważ wiązanie wodorowe ma charakter kwantowy, z punktu widzenia metod *ab initio* (w tym przypadku Hartree-Focka) w skład jego energii wchodzi zależne od położenia jąder atomowych i elektronów energie: elektrostatyczna, transferu ładunku, polaryzacji i wymiany elektronów [19]. O ile energia elektrostatyczna może mieć charakter przyciągający lub odpychający, energia polaryzacji ma charakter przyciągający, energia transferu ładunku charakter odpychający. Oczywiście w zależności od metody wyznaczania energii wiązania wodorowego skład i sposób liczenia energii może się różnić, np. metoda rachunku zaburzeń o adaptowanej symetrii (SAPT) zawiera składowe energie elektrostatycznej E_{elec} , energii odpychania walencyjnego E_{exch} , energii indukcyjnej E_{ind} i dyspersyjnej E_{dysp} [20]. Metody kwantowe wyraźnie pokazują, że przy obserwowanych eksperymentalnie długościach wiązań wodorowym pomiędzy tlenem a azotem [21,22] składnik elektrostatyczny jest największy, i jego wkład znacząco rośnie wraz z odległością pomiędzy atomami tworzącymi wiązanie wodorowe (tabela 2.1).

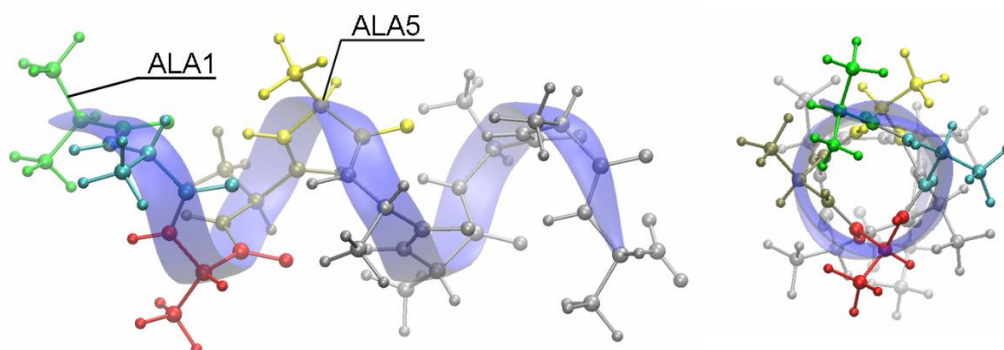
Tabela 2.1. Składowe całkowitej energii wiązania wodorowego wyznaczone w ramach metody SAPT między dwiema molekułami wody [20]

R [Å]	$E_{\text{elec}}[\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$E_{\text{exch}}[\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$E_{\text{ind}}[\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$E_{\text{dysp}}[\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}]$
3,0	-7,12	4,90	-1,63	-1,54
3,7	-2,79	0,30	-0,18	-0,31
4,8	-1,12	0,00	-0,12	-0,05

W prostszych metodach obliczeniowych takich jak MD wiązanie wodorowe modeluje się potencjałem typu Lennarda-Jonesa 12-10, lub też za pomocą dwóch potencjałów: elektrostatycznego i Lennarda-Jonesa 12-6 (Patrz Rozdział 2.1). Warto wspomnieć, że zakres energii wiązań wodorowych w biomolekułach jest dosyć szeroki i oscyluje w zakresie 4,8 – 6,0 kcal·mol⁻¹ (20 – 25 kJ·mol⁻¹) [21], niemniej w przypadku peptydów w roztworach wodnych obserwuje się wiązania wodorowe w zakresie słabych wiązań wodorowych tj. od 0,5 – 4,0 kcal·mol⁻¹ [23]. Jak pokazują metody kwantowe, energia wiązania wodorowego jest zależna głównie od odległości, jednakże kąt pomiędzy donorem, wodorem a akceptorem może mieć również wpływ na wartość tej energii, w zależności od budowy i geometrii aminokwasu. Aby struktura α -helikalna była stabilna, wiązania wodorowe muszą istnieć pomiędzy atomem tlenu z aminokwasu i a wodorem związanym z atomem azotu w aminokwasie $i+4$, tworząc specyficzną sieć oddziaływań (rysunek 2.3). W ten sposób powstała struktura geometryczna posiada około 3,6 aminokwasu na pełen zwój helisy [17]. Długość powtarzającej się α -helikalnej struktury została oceniona na około 5,4 Å (0,54 nm). Ponieważ, jak wspomniano, definicja poprzez podanie kątów torsyjnych może nie być ścisłą, często zaleca się również identyfikować α -helikalną strukturę jako zawierającą sieć wiązań wodorowych pomiędzy i -tymi a $i+4$ -tymi aminokwasami [15].



Rysunek 2.3. Model prezentujący α -helikalny peptyd, dekaalaninę z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi charakterystycznymi dla α -helisy ($i - i+4$, czerwony, kreskowane linie) oraz schemat sieci tych wiązań. Zaznaczono atomy tworzące pierwsze wiązanie wodorowe, atom tlenu z 1. aminokwasu oraz atomy wodoru i azotu z 5. aminokwasu. Kolory reprezentują odpowiednie pierwiastki: turkusowy – węgiel, niebieski – azot, czerwony – tlen, biały – wodór.

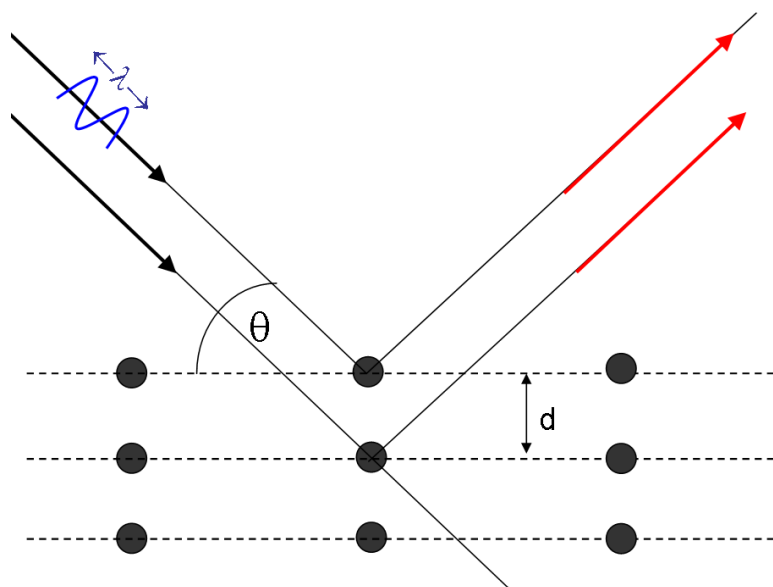


Rysunek 2.4. Model prezentujący α -helikalną strukturę dekaalaniny wzdłuż osi polipeptydu (niebieska wstęga) oraz rzut prostopadły do osi polipeptydu. Na rysunku zaznaczono aminokwas 1 (zielony) i aminokwas 5 (żółty), które współtworzą pełny zwój α -helisy (przyjmuje się 3,6 aminokwasu na zwój).

Prace eksperymentalne pokazują, że aminokwasy cechują się różną skłonnością do tworzenia helisy (*ang. helix propensity*) [18]. Aminokwasy takie jak alanina czy lizyna wykazują dużą skłonność do tworzenia helikalnych struktur, podczas gdy np. glicyna nie sprzyja ich tworzeniu. Powyższe jest bardzo ważne podczas projektowania sekwencji aminokwasów, za pomocą których chcemy uzyskać stabilną strukturę α -helikalną.

2.2. Metody badania struktury polipeptydów i białek

Strukturę polipeptydów i białek oraz jej własności badać można za pomocą metod eksperymentalnych oraz teoretycznych. W niniejszym podrozdziale przedstawione zostaną główne metody eksperymentalne, podczas gdy w następnym rozdziale opisane zostaną zastosowane metody obliczeniowe. Główną metodą służącą badaniom struktury związków chemicznych nieorganicznych jak i organicznych, tworzących kryształy jest metoda dyfrakcji rentgenowskiej (XRD). Pierwszy raz XRD w celu badania struktury skryształowanego białka – mioglobiny – zastosowali M. Perutz i J. Kendrew. Równie ważnym było określenie struktury przestrzennej kwasów nukleinowych, na podstawie wyników otrzymanych wspomnianą metodą, wykonane przez F. Cricka, J. Watsona i M. Wilkinsa. Oba osiągnięcia poskutkowały przyznaniem nagrody Nobla w 1962 roku, odpowiednio z chemii oraz fizjologii i medycyny. Na chwilę obecną ocenia się, że około 90% struktur białek i kwasów nukleinowych dostępnych w międzynarodowej bazie danych struktur białek i kwasów nukleinowych Protein Data Bank (PDB) to struktury uzyskane tą metodą. XRD wykorzystuje promieniowanie rentgenowskie (promieniowanie to charakteryzuje się krótką długością fali ok. 1 Å), które padając na analizowany kryształ pod różnymi kątami, oddziałuje z chmurami elektronowymi atomów tworzących kryształ. Zgodnie z prawem Bragga $n\lambda = 2d\sin\theta$ (rysunek 2.5), powstałe w ten sposób refleksy są rejestrowane w postaci obrazów dyfrakcyjnych (w starszych technikach na kliszach filmowych, w dzisiejszej aparaturze korzysta się z detektorów promieniowania) i analizowane.

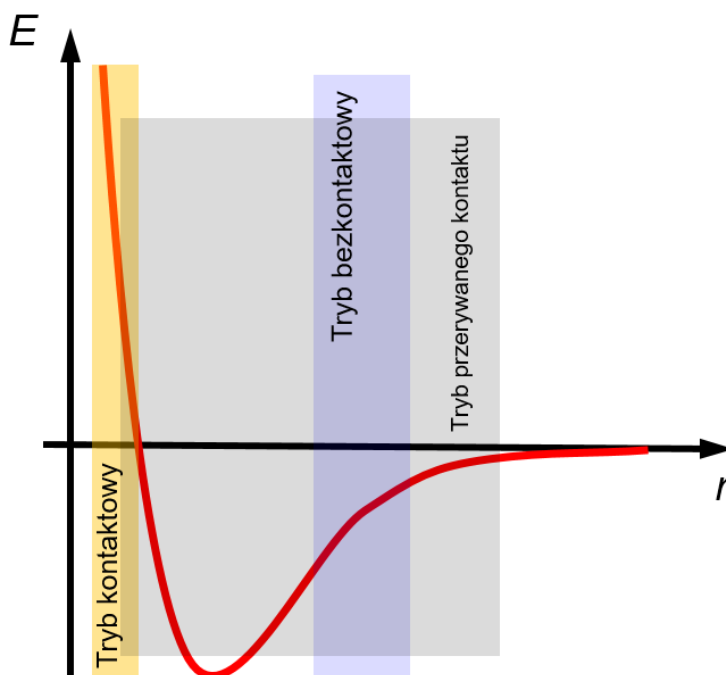


Rysunek 2.5. Schemat rozpraszania promieniowania X na płaszczyznach kryształu. λ oznacza długość fali promieniowania padającego na kryształ, d – odległość między płaszczyznami, θ jest kątem między płaszczyzną a padającym promieniowaniem.

Zazwyczaj analiza sprowadza się do wyznaczenia trójwymiarowej mapy gęstości elektronowej w komórce elementarnej kryształu. Następnie mapa taka zostaje poddana dalszej analizie matematycznej, dzięki której możliwe jest wyznaczenie pozycji i odległości atomów względem siebie, a co za tym idzie kątów i długości wiązań. Ważnym jest też ustalenie natury odpowiednich wiązań, możliwe dzięki ustaleniu rozkładu gęstości chmur elektronowych wokół atomów. W wyniku opracowania geometrii oraz natury wiązań możliwym jest opracowanie modelu przestrzennego badanej biomolekuły, który następnie posłużyć może do dalszych badań obliczeniowych. Standardowa rentgenografia pozwala na badanie struktury makrokryształów białek o wielkości ok. 50 μm , ale dzięki rozwiązaniom takim jak seryjna krystalografia femtosekundowa możliwym są badania nanokryształów o wielkości od 100 nm do 10 μm . Warto wspomnieć, że uzupełnieniem badań rentgenograficznych jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Uzupełnia ona badania krystalograficzne, ponadto ma tę przewagę, iż dzięki niej możemy badać strukturę 3D białek zanurzonych w naturalnym środowisku – w roztworze wodnym, a także uzyskać informacje o kinetyce reakcji. W przypadku badań strukturalnych białek oraz kwasów nukleinowych wykorzystuje się metody 2D spektroskopii NMR, oparte na jądrowym efekcie Overhausera. Zjawisko to polega na wzajemnym przekazywaniu energii między układami jąder, które biorą udział w rezonansie (jądra rezonansowe), a układami jąder, które nie są w danej chwili pobudzone (jądra nierezonansowe). W wyniku oddziaływań dipolowych energia pobudzenia z jąder nierezonansowych (oświetlanych dodatkowo promieniowaniem o odpowiednio dobranej częstotliwości) przenoszona jest do grupy jąder rezonansowych (mechanizm ten nosi nazwę relaksacji skośnej). Wykorzystując fakt, iż szybkość tego mechanizmu jest zależna od odległości r między oddziałującymi ze sobą dipolami jądrowymi jak r^{-6} , wyznaczyć można odległości międzyatomowe, co pozwala na określenie trójwymiarowej struktury badanego białka w roztworze [27,28]. Narzędziem, które pozwala na szybką identyfikację typu struktury białek w buforach fizjologicznych jest dichroizm kołowy (CD). Metoda ta, dzięki analizie widm pozwala na oszacowanie drugorzędowego składu strukturalnego białek w próbce. Pomimo, że metoda ta nie daje szczegółowej informacji o położeniach atomów, jak XRD lub NMR, jest szeroko stosowaną metodą w pracach badawczych dotyczących polipeptydów i białek [29].

Opisując metody eksperymentalne badania struktury polipeptydów i białek, z uwagi na charakter pracy wspomnieć należy o metodzie AFM. Metoda ta nie pozwala na przestrzenne zobrazowanie struktury atomowej polipeptydów oraz białek, ale pozwala na prowadzenie eksperymentów mechanicznych z pojedynczymi biopolimerami [5]. Zasada działania AFM polega na pomiarze siły oddziałującej pomiędzy atomami próbki a specjalnie w tym celu przygotowanym ostrzem. Wychylenia mikrobilki z ostrzem podczas skanowania próbki są rejestrowane, a następnie analizowane. Zakres sił, jakie można mierzyć za pomocą tej metody, to od 10^{-6} N do 10^{-12} N. AFM pracować może w trzech podstawowych trybach: kontaktowym, w którym ostrze AFM znajduje się w zakresie sił krótko zasięgowych odpychających; bezkontaktowym, w którym ostrze znajduje się w zasięgu sił długo

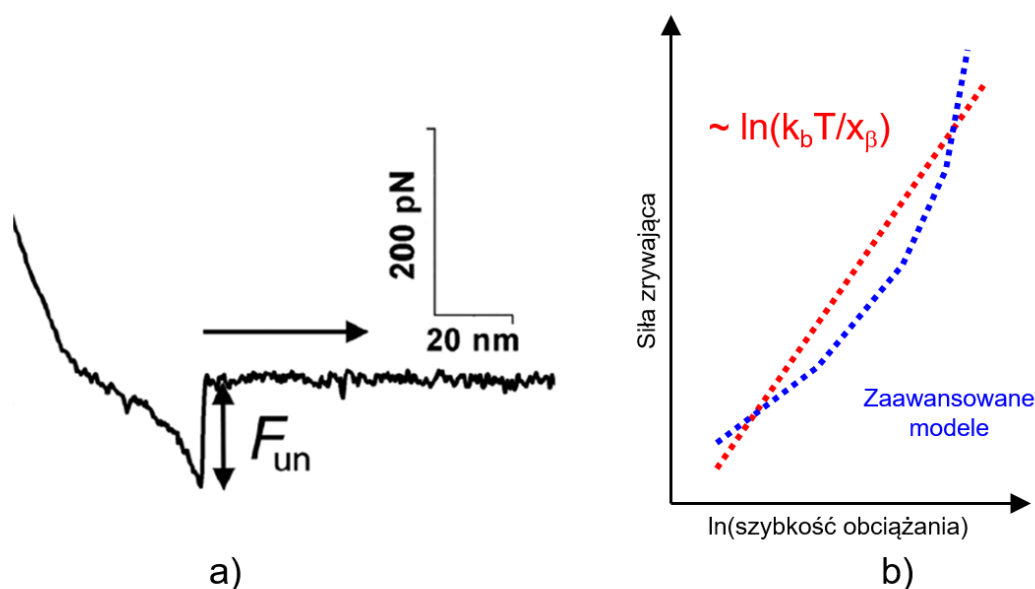
zasięgowych elektrostatycznych lub przyciągających van der Waalsa; oraz kontaktu przerywanego, w którym mikrobeltka wprowadzana jest w drgania powodujące cykliczne uderzanie ostrza o powierzchnię (rysunek 2.6)



Rysunek 2.6. Potencjał typu Lennarda-Jonesa z zaznaczonymi strefami zasięgu oddziaływań wykorzystywanych w trzech podstawowych trybach pracy AFM.

Ten sposób działania, wraz ze skanowaniem, tj. przemieszczaniem ostrza nad próbką, oraz rejestrowaniem sił, pozwala na mapowanie powierzchni badanego materiału. Uwzględniając, że na ostrze mogą oddziaływać siły nie tylko międzyatomowe, ale i elektrostatyczne czy magnetyczne, techniką tą można obrazować szereg różnych materiałów organicznych jak i nie organicznych. Inną zaletą metody jest możliwość pomiarów siły tarcia w skali atomowej. Nieocenioną zaletą AFM jest możliwość rejestrowania siły podczas rozwijania polipeptydów i białek. Spektroskopia sił jest metodą pozwalającą na badanie oddziaływań pomiędzy molekułą a podłożem lub sił wiążących molekuły. Techniki spektroskopii sił pozwalają na pomiar własności mechanicznych pojedynczych polimerów (zarówno nieorganicznych jak i organicznych) lub nawet pojedynczych wiązań. Wykorzystując AFM, rejestruje się tzw. krzywe (charakterystyki) siły, czyli zależności siły mierzonej przez ugięcie mikrobeltki mikroskopu w funkcji przemieszczenia się skanera piezoelektrycznego. Dynamiczna spektroskopia sił (DFS) jest rozwinięciem powyższej techniki pozwalającym na rejestrowanie krzywych siły przy różnych szybkościach separacji ostrza od próbki, np. badanej molekuły. Wyniki uzyskane za pomocą tej metody można analizować stosując modele termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału, dzięki czemu uzyskuje się informację na temat kinetyki zrywania pojedynczego wiązania. Generalnie, modele te wykazują logarytmiczną (lub zbliżoną) zależność rejestrowanej siły od szybkości obciążenia r_F , tj. szybkości przykładania siły, zazwyczaj definiowanej jako pochodna siły w czasie.

Dodatkowo, zaawansowane modele pozwalają na wyznaczenie parametrów opisujących dokładniej oddziaływanie np. wysokość bariery potencjału tj. energię aktywacji wiązania. Z uwagi na charakter eksperymentów obliczeniowych metodą SMD (por. rysunek 1.1 a) i b) oraz rysunek 2.7), która pozwala na symulowanie eksperymentu AFM, obie techniki są stosowane jednocześnie w celu opisu badanego oddziaływania w wielu problemach badawczych [4,30].



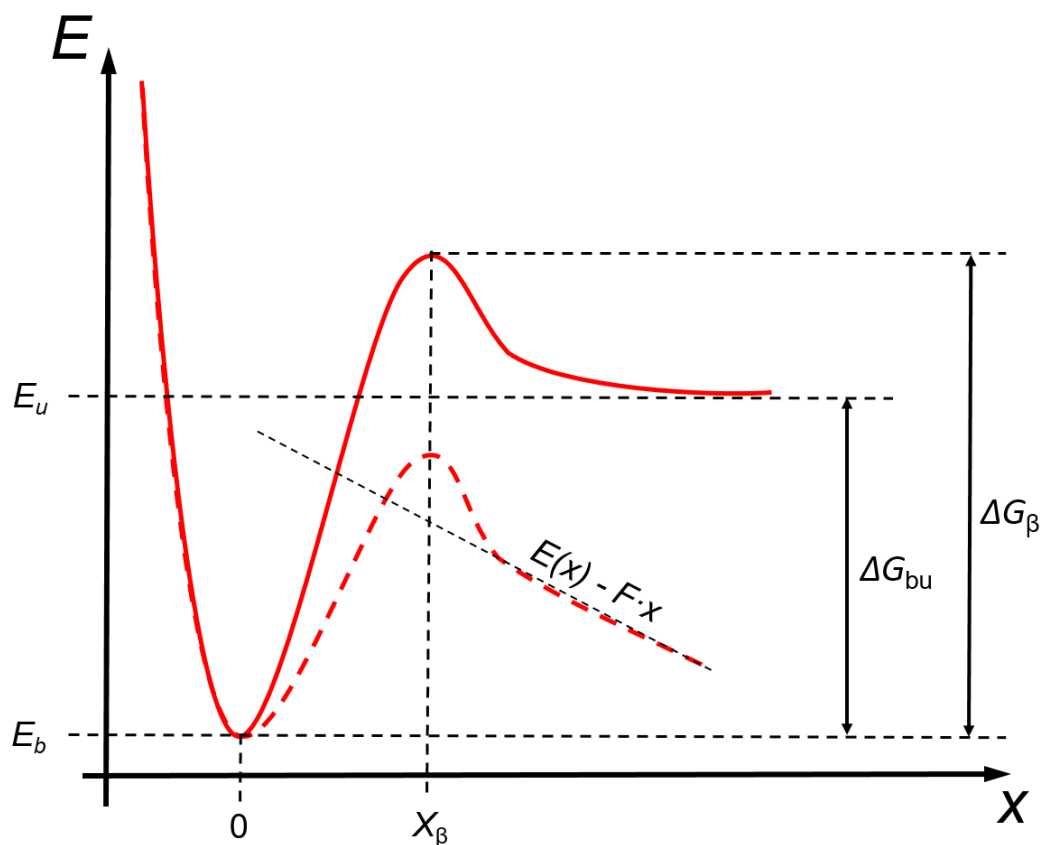
Rysunek 2.7. Przykładowy profil siły w funkcji przesunięcia skanera (tzw. krzywa siły) dla oddziaływania białko-ligand w eksperymencie spektroskopii sił [31] (a) oraz teoretyczna zależność rejestrowanej siły zrywającej od szybkości obciążania (b). Kolorami zaznaczono przebieg prostego (czerwony) oraz jednego z zaawansowanych (niebieski) modeli aktywowanej ucieczki z jamy potencjału, opisujących zależność siły od szybkości obciążenia.

2.3. Modele teoretyczne wymuszonego siłą zerwania wiązania

Modele teoretyczne wymuszonego siłą zerwania wiązania, a dokładniej modele indukowanej siłą i termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału (ang. *thermally activated and force-facilitated escape from one-dimensional well*) znalazły szerokie zastosowanie w badaniu procesów dotyczących m.in. wiązania się liganda z białkiem czy zjawiska nanoadhezji, za które odpowiedzialne jest wiele oddziaływań takich jak siły van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne czy siły kapilarne. Modele te pozwalają na analizę zależności siły zrywającej od szybkości obciążania badanej molekuly w eksperymentach DFS z wykorzystaniem AFM, jak i SMD.

Energię swobodną oddziaływania wiążącego można przedstawić za pomocą potencjału o charakterze potencjału Lennarda-Jonesa z występującą barierą aktywacji powstającą wskutek przyłożenia zewnętrznej siły, po przekroczeniu której układ przechodzi ze stanu związanego **b** do stanu

zerwanego u (rysunek 2.8). Różnicę energii pomiędzy stanem związanym a zerwanym można zdefiniować jako energię wiązania ΔG_{bu} . Im większa ta wartość, tym silniejsze jest wiązanie. Dodatkową wielkością charakteryzującą potencjał oddziaływań to odległość od minimum potencjału do bariery potencjału, x_β . Warto zauważyć, że im większa jest ta odległość, tym szersza jest studnia potencjału – co oznacza większy czas życia wiązania (większą stabilność wiązania). Wysokość bariery w stosunku do minimum potencjału to energia aktywacji ΔG_β , będąca energią potrzebną do zerwania wiązania, czyli pokonania bariery. Modele indukowanej siłą i termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału zakładają, że pokonanie bariery można ułatwić za pomocą zwiększania temperatury układu tworzącego wiązanie lub też za pomocą przyłożenia zewnętrznej siły, która obniża barierę potencjału, ułatwiając jej przekroczenie. Badania eksperymentalne oraz prace teoretyczne wykazały, że istnieje zależność siły zrywania wiązań od szybkości obciążania, co dało podstawę do opracowania modeli wymuszonego siłą zerwania wiązania opisujących parametry potencjału oddziaływania takie jak szerokość bariery x_β , energię aktywacji ΔG_β czy energię wiązania ΔG_{bu} .



Rysunek 2.8. Schemat energii swobodnej oddziaływania pomiędzy dwoma ciałami prezentujący przebieg energii bez przyłożonej siły (linia ciągła) oraz po przyłożeniu siły deformującej oddziaływanie (linia przerywana). ΔG_{bu} – różnica energii swobodnej stanu związanego w stosunku do zerwanego, ΔG_β – energia swobodna aktywacji bez przyłożonej siły deformującej oddziaływanie, x_β – odległość pomiędzy minimum potencjału (stan związany) a maksimum bariery potencjału, E_b – energia stanu związanego, E_u – energia stanu zerwanego

W oparciu o model Kramersa [9] Bell wyprowadził wzór na zależność stałej dysocjacji wiązania od przyłożonej siły:

$$k_{\text{off}}(F) = k_{\text{off}}^0 \exp\left(\frac{F x_{\beta}}{k_B T}\right) \quad 2.3$$

gdzie k_{off}^0 – stała dysocjacji wiązania bez przyłożonej siły zewnętrznej, x_{β} – odległość pomiędzy minimum potencjału (stan związany) a maksimum bariery potencjału, k_B – stała Boltzmana, T – temperatura [10]. Na podstawie równania 2.3 Evans i Ritchie [11] wyznaczyli logarytmiczną zależność siły zerwania wiązania F_{unb} od szybkości obciążenia r_F :

$$F_{\text{unb}} = F_{\beta} \ln\left(\frac{r_F}{F_{\beta} k_{\text{off}}^0}\right) \quad 2.4$$

gdzie r_F zakładana jest w modelu jako stała a $F_{\beta} = k_B T \cdot x_{\beta}^{-1}$ nazywana jest siłą fluktuacji termicznych. Model Bella-Evansa, pomimo szerokiego stosowania, ma ograniczenia – za jego pomocą otrzymać można informację na temat stałej dysocjacji wiązania oraz szerokości studni potencjału x_{β} , bez informacji na temat jej wysokości (energii aktywacji) lub energii wiązania. Dodatkowo, model ten nie uwzględnia ponownego wiązania zerwanych wiązań, co jest dość powszechnym zjawiskiem w przypadku bardziej dalekozasięgowych oddziaływań niż wiązania kowalencyjne oraz niewielkich prędkości rozciągania wiązań. Z uwagi na powyższe opracowane zostały bardziej zaawansowane modele uwzględniające w pewnym stopniu kształt potencjału – model Dudko-Hummera-Szabo (DHS) [12], czy też zjawisko ponownego wiązania – model Friddle’a-Noya-De Yoreo (FNDY) [13].

Model DHS wyprowadzony został z teorii Kramersa uwzględniając stochastyczny charakter ucieczki ze studni potencjału. W takim ujęciu, wyrażenie na stałą dysocjacji pod wpływem siły $k_{\text{off}}(F)$ ma następującą postać:

$$k_{\text{off}}(F) = k_{\text{off}}^0 \frac{\int_{\text{studnia}} e^{\frac{E(x)-Fx}{k_B T}} dx \int_{\text{bariera}} e^{\frac{-E(x)-Fx}{k_B T}} dx}{\int_{\text{studnia}} e^{\frac{E(x)}{k_B T}} dx \int_{\text{bariera}} e^{\frac{-E(x)}{k_B T}} dx} \quad 2.5$$

Autorzy zaproponowali liniowo-kubiczny kształt potencjału energii w części od minimum do bariery (wykładnik $\gamma = 2/3$) i wyprowadzili wyrażenie na najbardziej prawdopodobną siłę zrywającą:

$$F_{\text{unb}} = \frac{\Delta G_{\beta}}{\gamma x_{\beta}} \left\{ 1 - \left[\frac{k_B T}{\Delta G_{\beta}} \ln \frac{k_{\text{off}}^0 k_B T \exp\left(\frac{\Delta G_{\beta}}{k_B T}\right)}{x_{\beta} r_F} \right]^{\gamma} \right\} \quad 2.6$$

W wyrażeniu tym oprócz k_{off}^0 i x_{β} występuje energia aktywacji wiązania, ΔG_{β} . Zatem stosując ten model do eksperymentalnie wyznaczonej zależności siły zrywającej od szybkości obciążenia można wyznaczyć tę energię.

Model FNDY jest rozszerzeniem modelu Bella-Evansa zawierającym dodatkowy parametr tzw. siłę równowagową F_{eq} (ang. *equilibrium force*), która jest siłą wystarczającą do pokonania bariery potencjału przez układ znajdujący się w stanie równowagi pomiędzy zrywaniem i odtwarzaniem zerwanych wiązań:

$$F_{eq} = \sqrt{2k_{eff}\Delta G_{bu}} \quad 2.7$$

gdzie k_{eff} jest stałą sprężystości układu, a ΔG_{bu} jest różnicą energii swobodnej pomiędzy stanem związanym a zerwanym. W tym modelu zależność siły zrywającej od szybkości obciążania opisuje wyrażenie:

$$F_{unb} \cong F_{eq} + F_{\beta} \ln \left(1 + e^{-\gamma} \frac{r_F}{F_{\beta} k_{off}(F_{eq})} \right) \quad 2.8$$

gdzie γ jest stałą Eulera-Mascheroniego równą 0,577, a $k_{off}(F_{eq})$ jest stałą dysocjacji wiązania pod wpływem siły F_{eq} . Za pomocą tego modelu można wyznaczyć siłę F_{eq} , a w konsekwencji wartość ΔG_{bu} .

Stosując powyższe modele można z danych eksperymentalnych otrzymać parametry potencjału charakteryzującego wiązanie. Pomimo, że modele te bazują na różnych założeniach, równoczesne ich stosowanie do odpowiednich zakresów szybkości obciążania pozwala uzyskać uzupełniające się informacje na temat energetyki badanego oddziaływania.

3. Metody obliczeniowe

3.1. Mechanika molekularna i pole siłowe

Dla każdego układu fizycznego poddawanego symulacjom, jednym z najważniejszych parametrów jest jego energia. Modelując biopolimery musimy pamiętać, że molekuly te mają wymiary rzędu nanometrów, dlatego też przy wszelkich obliczeniach energii musimy brać pod uwagę efekty kwantowe. Aby rozwiązać dokładnie zagadnienie energetyczne dla molekuly, musielibyśmy rozwiązać elektronowe równanie Schrödingera dla każdego ustalonego położenia jąder atomowych. Niestety, dla układów złożonych jakimi są polipeptydy i białka, rozwiązanie takiego zagadnienia byłoby matematycznie trudne i bardzo czasochłonne. Nie mniej, stosując przybliżenie Borna-Oppenheimera można założyć, że jądra atomowe znajdują się w potencjale pochodzącym od gęstości elektronowej oraz od innych jąder atomowych. Zastąpienie potencjału pochodzącego od kwantowych (elektronowych) stopni swobody odpowiednio sparametryzowanym potencjałem klasycznym pozwala na uzyskanie modelu mechanicznego, który jest podstawą mechaniki molekularnej. Parametryzacja ta powinna być tak dobrana, aby jak najdokładniej odpowiadała opisowi kwantowemu molekuly. Pole siłowe (FF) można zatem zdefiniować jako pole skalarne $V(\mathbf{r})$ energii oddziaływań wewnątrz-molekularnych w przestrzeni konfiguracyjnej jąder. Siły oddziaływujące na atomy można wówczas wyznaczyć jako składowe wektora $\mathbf{F} = -\nabla V(\mathbf{r})$ w przestrzeni $3N$ -wymiarowej. Ogólna postać takiego sparametryzowanego potencjału klasycznego opisującego molekule ma postać:

$$H(\mathbf{p}, \mathbf{r}) = V(\mathbf{r}) + T(\mathbf{p}) \quad 3.1$$

gdzie \mathbf{p} – pędy atomów, \mathbf{r} – położenia atomów, $T(\mathbf{p})$ – klasyczna energia kinetyczna atomów traktowanych jak punkty materialne, $V(\mathbf{r})$ jest funkcją potencjalną układu. Energię kinetyczną $T(\mathbf{p})$ opisujemy jako:

$$T(\mathbf{p}) = \sum \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} \quad 3.2$$

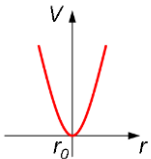
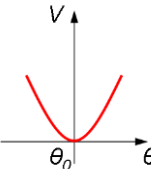
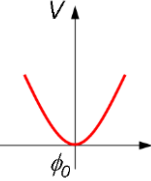
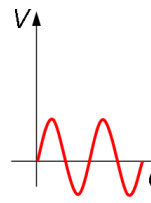

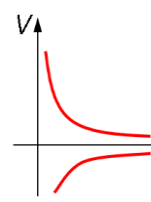
Energia potencjalna $V(\mathbf{r})$ w tym podejściu jest reprezentowana w postaci sumy łatwo interpretowalnych i weryfikowalnych eksperymentalnie członów, które odpowiadają za możliwe w molekule zmiany geometryczne, takie jak deformacja wiązań, kątów między nimi, obroty części molekuł wokół osi. Dodatkowo uwzględnione są oddziaływania międzyatomowe, takie jak oddziaływania elektrostatyczne oraz Van der Waalsa. W klasycznych polach siłowych wiązania traktowane są jako nierozzerwalne. Drgania wiązań traktowane są jak drgania sprężyny w zakresie stosowalności prawa Hooke'a. Podobnie, kąty walencyjne, czyli kąty leżące pomiędzy sąsiednimi wiązaniami również opisuje się za pomocą potencjału harmonicznego. Oddziaływania elektrostatyczne mogą być opisywane za pomocą potencjału elektrostatycznego, ale istnieją również metody zaawansowanego opisu elektrostatyki, stosowane w zależności od problematyki, przed którą staje badacz wykorzystujący FF. Oddziaływania Van der Waalsa najczęściej opisuje się za pomocą wspomnianych już potencjałów Lennarda-Jonesa, najczęściej

typu 12-6. Niemniej, z uwagi na wielość FF, poszczególne mogą się różnić dodatkowymi formułami mającymi opisać wybrane zjawisko. Dodatkowo, parametry opisujące funkcje zawarte w polu siłowym dla tych samych atomów czy związków również mogą się różnić, dlatego też ważnym jest, aby przed zastosowaniem do wybranego problemu badawczego, zapoznać się z danym polem siłowym i sprawdzić, do jakiego rodzaju molekuł czy związków jest dedykowane. Istnieje wiele pól dedykowanych biopolimerom (np. CHARMM, AMBER), oddziaływaniom warstw związków nieorganicznych (np. IFF) czy też ogólnego zastosowanie (np. UFF) [32,33]. Pełna postać funkcji pola siłowego CHARMM w wersji 36 przedstawia się następująco:

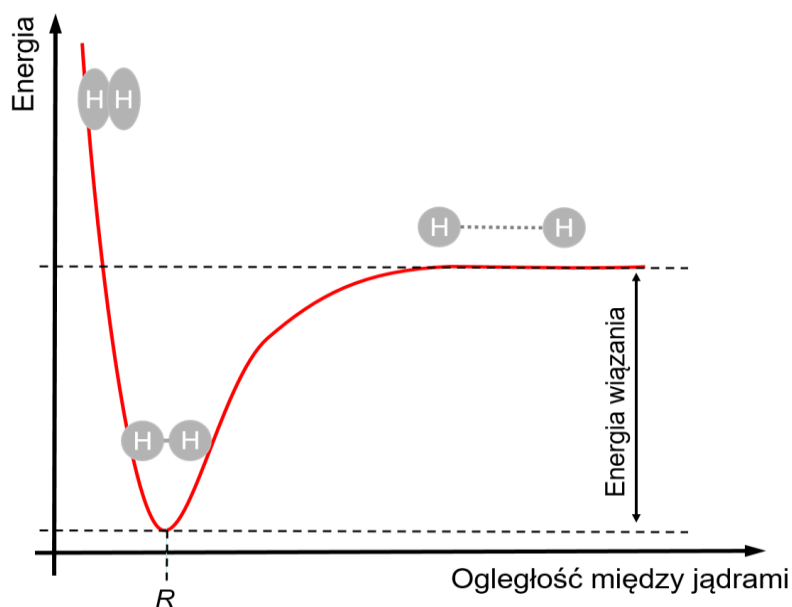
$$\begin{aligned}
 V_{FF} = & \sum \frac{1}{2} k_r (r - r_0)^2 \\
 & + \sum \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum \frac{1}{2} k_\varphi (\varphi - \varphi_0)^2 + \sum \frac{1}{2} k_\omega [1 + \cos(n\omega - \delta)] \\
 & + \sum 4\varepsilon_{AB} \left[\left(\frac{\sigma_{AB}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{AB}}{r} \right)^6 \right] + \sum \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{q_A q_B}{r}
 \end{aligned}
 \tag{3.3}$$

W zależności od pola siłowego powyższe wzory mogą mieć różną postać, niemniej każde FF stara się mechanicznie jak najlepiej przybliżyć różne typy oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych oraz międzycząsteczkowych. Aby prawidłowo opisywać oddziaływania w molekułach, polimerze czy peptydzie niezbędne jest zróżnicowanie traktowania atomów w danym polu siłowym. Własności danego atomu zależą od jego konfiguracji elektronowej oraz umiejscowienia danego atomu w molekułach np. atomy węgla w benzenie mogą mieć inne własności niż atomy węgla w szkielecie peptydowym, również wiązania w poszczególnych molekułach tworzone przez węgiel mogą mieć różne parametry. W polu siłowym wykonuje się zróżnicowanie atomów poszczególnych pierwiastków na kilka kategorii, zwanych typami potencjału. Dla każdego typu potencjału atomu wyznacza się osobne parametry takie jak stałe siłowe wiązania, długości równowagowe wiązań etc. Parametry te wyznaczone są różnymi metodami – zarówno eksperymentalnymi, takimi jak kalorymetria, spektrometria mas, rentgenografia, dyfrakcja elektronów i neutronów, IR, Raman, NMR, jak i metodami obliczeniowymi (metody kwantomechaniczne *ab initio*).

Tabela 3.1. Składowe pola siłowego CHARMM w wersji 36 wraz z krótkim opisem [33]

Postać funkcji	Przebieg funkcji	Opis funkcji
$V_r = \frac{1}{2}k_r(r - r_0)^2$		<p>potencjał energii wiązań kowalencyjnych, przybliżonych modelem oscylatorów harmoniczych, zachowujących się zgodnie z prawem Hook'a (energia odkształcenia wiązania jest proporcjonalna do kwadratu wartości odkształcenia od długości równowagi). k_r - stała siłowa, r_0 - długość równowagowa wiązania, r - długość wiązania</p>
$V_\theta = \frac{1}{2}k_\theta(\theta - \theta_0)^2$		<p>potencjał energii kątów między wiązaniami, przybliżonych modelem oscylatorów harmoniczych. k_θ - stała siłowa, θ_0 - kąt równowagowy, θ - kąt między atomami</p>
$V_\phi = \frac{1}{2}k_\phi(\phi - \phi_0)^2$		<p>potencjał energii niewłaściwych kątów torsyjnych, czyli takich, które znajdują się w układzie trzech atomów pierścienia i podstawnika na środkowym z tych atomów. k_ϕ - stała siłowa, ϕ_0 - kąt równowagowy, ϕ - kąt między atomami</p>
$V_\omega = \frac{1}{2}k_\omega[1 + \cos(n\omega - \delta)]$		<p>potencjał energii dwuściennych kątów torsyjnych wiązań, wokół których możliwy jest obrót. k_ω - stała siłowa, k_ω - parametr reprezentujący kąt równowagowy, ω - parametr reprezentujący kąt równowagowy, n - parametr określający periodyczność danego wiązania</p>
$V_{AB} = 4\varepsilon_{AB} \left[\left(\frac{\sigma_{AB}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{AB}}{r} \right)^6 \right]$ $\varepsilon_{AB} = \sqrt{\varepsilon_A \varepsilon_B}, \sigma_{AB} = \frac{1}{2}(\sigma_A + \sigma_B)$		<p>potencjał energii oddziaływań niewiązujących van der Waalsa pomiędzy atomem A i B, opisywany potencjałem Lennarda-Jonesa. Wykładnik potęgi równy 6 wynika z przyciągającego oddziaływania van der Waalsa pomiędzy wyindukowanymi dipolami elektrycznymi neutralnych atomów. Wykładnik równy 12 wiąże się z energią odpychania na małych odległościach. Wielkość ε jest miarą energii przyciągania (minimum potencjału, występujące dla $r_{AB} = 2^{1/6}\sigma$), natomiast σ_{AB} jest odległością, dla której między atomami $V=0$. Odległość między atomami A i B to r.</p>
$V_e = \frac{1}{4\pi\varepsilon\varepsilon_0} \frac{q_A q_B}{r}$		<p>potencjał kulombowskich energii potencjalnych. ε_0 oraz ε oznaczają przenikalność dielektryczną próżni i ośrodka, q_A, q_B - ładunki elektrostatyczne atomów A i B, r - odległość między atomami A i B</p>

Wszystkie układy (chemiczne, biologiczne, fizyczne) dążą do osiągnięcia stanu o jak najniższej energii. Dzięki matematycznej postaci FF, znając geometrię molekuly można dokonać algorytmicznego poszukiwania minimum funkcji opisującej oddziaływania w molekule – operacja ta nazywana jest optymalizacją geometrii. Każda możliwa konformacyjnie postać molekuly odpowiada punktowi na powierzchni energii całkowitej cząsteczki w funkcji współrzędnych wszystkich jąder tworzących tą cząsteczkę. Minimum na tej wielowymiarowej powierzchni jest punktem stacjonarnym, z którego przesunięcie jąder powoduje wzrost energii cząsteczki. Przyjmuje się, że takie minimum odpowiada najstabilniejszej konformacji molekuly, a zatem najbardziej prawdopodobnej w naturze. Do poszukiwania minimum energetycznego stosowane są algorytmy iteracyjne wyszukiwania minimum (ekstremum funkcji) zadanej funkcji celu – w tym przypadku energii całkowitej FF. W przypadku cząsteczek i opisującego je pola siłowego ideał tej metody jest znalezienie takiego zestawu odległości i kątów pomiędzy atomami w cząsteczce, aby energia pola siłowego dla takiej geometrii była minimalna (rysunek 3.1), czyli pochodna funkcji energii po współrzędnych jest zerowa. Najczęściej używane algorytmy w modelowaniu biomolekuł to algorytmy I-stopnia (wykorzystujące I pochodną funkcji), np. algorytm najszybszego spadku oraz algorytmy sprzężonych gradientów, a także algorytmy II-stopnia (wykorzystujące również II pochodną lub jej przybliżenia), np. Newtona lub kwazi-Newtonowskie. Do przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej, czyli możliwych geometrii cząsteczki, wykorzystuje się też metody Monte Carlo (MC), oparte na losowych zmianach poszczególnych odległości i kątów w molekule.



Rysunek 3.1. Ideowy schemat energii wewnętrznej cząsteczki H_2 opisanej funkcją Lennarda-Jonesa w funkcji odległości między jądrami atomów wodoru. Dla pewnej równowagowej odległości R pomiędzy atomami wodoru funkcja opisująca energię cząsteczki przyjmuje wartość minimalną – dla tej odległości (geometrii) cząsteczka znajduje się w stanie stacjonarnym. Optymalizacja geometrii jest procedurą mającą na celu znaleźć metodami obliczeniowymi odległość R .

Najprostszym algorytmem służącym optymalizacji geometrii jest algorytm najszybszego spadku. W przypadku tej metody, wielkością umożliwiającą minimalizację jest kierunek spadku gradientu energii \mathbf{d} :

$$\mathbf{d} = -\nabla U(\mathbf{r}) \quad 3.4$$

gdzie $U(\mathbf{r})$ jest energią pola siłowego, na podstawie której dokonuje się minimalizacji, \mathbf{r} opisuje położenia atomów cząsteczki. W przypadku tego algorytmu wybieramy konformację początkową (oznaczymy ją \mathbf{r}_0), definiujemy maksymalną liczbę kroków obliczeń i wykonujemy kolejne iteracje obliczeń zgodnie z poniższym wyrażeniem tak długo, aż liczba kroków nie osiągnie założonego limitu:

$$\mathbf{r}_{k+1} = \mathbf{r}_k - \alpha_k \nabla U(\mathbf{r}_k) \quad 3.5$$

Wielkość α_k jest współczynnikiem regulującym wielkość kroku. Należy pamiętać, że algorytm najszybszego spadku nie gwarantuje uzyskania minimum globalnego, natomiast będzie kierował w kierunku najbliższego minimum lokalnego funkcji. Liczba kroków minimalizacji energii powinna być tak dobrana, aby w skończonym czasie możliwym było osiągnięcie minimum. W praktyce liczba ta jest wyznaczana empirycznie podczas obliczeń wstępnych i testowych ponieważ silnie zależy ona od złożoności układu jaki jest poddawany minimalizacji. Pewnym problemem w przypadku optymalizacji geometrii dużych molekuł w rozpuszczalniku jest fakt, że FF nie uwzględniają zmian entropii wpływających również na strukturę molekuly. Dlatego częstą praktyką jest – jeśli to możliwe – porównanie uzyskanej po optymalizacji struktury z danymi krystalograficznymi, lub skorzystanie z metod identyfikacji rodzaju struktury drugorzędowej w celu porównania uzyskanej geometrii z danymi eksperymentalnymi [34]. Problem minimalizacji energii (optymalizacji geometrii) jest w dalszym ciągu szeroko analizowany i badany, zwłaszcza w kontekście przewidywania drugorzędowej struktury białek. Minimalizacja energii jest zabiegiem stosowanym przed każdą symulacją MD czy MC. Dzięki osiągnięciu przez optymalizowaną molekulę stanu o najniższej energii, zapewnia się stabilizację algorytmów całkujących w MD oraz uzyskuje się najbardziej prawdopodobną, naturalną geometrię molekuly.

3.2. Dynamika molekularna

Dynamika molekularna jest metodą obliczeniową polegającą na numerycznym rozwiązywaniu równań ruchu Newtona dla układu wielu atomów. W tym celu należy posłużyć się FF jako opisem oddziaływań pomiędzy wszystkimi atomami w symulowanej molekuale. Sformułowanie równań ruchu i ich numeryczne scałkowanie po czasie prowadzi do uzyskania trajektorii (zbioru pędów i położeń w funkcji czasu) wszystkich atomów w przestrzeni fazowej przy ustalonych położeniach początkowych. Metoda MD jest metodą deterministyczną, zatem wynik symulacji zależy ściśle od parametrów początkowych.

II zasada dynamiki przedstawia relację pomiędzy siłami działającymi na cząstkę a drugą pochodną położenia cząstki po czasie. Dla układu N cząstek można zapisać:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = \mathbf{F}_i, i = 1, 2, \dots, N \quad 3.6$$

gdzie m_i – masa i -tej cząstki, r_i – wektor położenia i -tej cząstki, F_i – wektor siły działającej na i -tą cząstkę, t – czas integracji. Wartość siły działającej na i -tą cząstkę można obliczyć znając postać całkowitego potencjału oddziaływań działającego na cząstkę:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla V_{FF_i} \quad 3.7$$

Ponieważ zagadnienie oddziaływania na siebie wielu ciał jest analitycznie nierozwiązywalne, w całkowaniu numerycznym równań ruchu stosuje się odpowiednie algorytmy. Istnieje wiele metod i algorytmów numerycznego całkowania – począwszy od schematu różnicowego Eulera, poprzez algorytmy Verleta, skończywszy na algorytmach Rungego-Kutty oraz algorytmach ekstrapolacyjno-interpolacyjnych. Dobór algorytmu zależy przede wszystkim od problemu obliczeniowego – przede wszystkim ilości elementów w symulowanym układzie i czasu symulacji. Twórcy pakietów oprogramowania służącego do prowadzenia symulacji wybierają algorytmy głównie opierając się na kryterium efektywności. Obecnie za pomocą MD symuluje się układy zawierające nawet do milionów atomów, odwzorowując procesy trwające do kilkudziesięciu-kilkuset nanosekund, co stanowi olbrzymie wyzwanie obliczeniowe. Należy zatem rozważyć, czy dobór mniej dokładnego, ale efektywniejszego algorytmu nie jest korzystniejszy, zwłaszcza w przypadku dużych układów biologicznych. W zagadnieniach związanych z symulacjami układów biologicznych najczęściej stosuje się algorytmy Verleta, uzyskane dzięki rozwinięciu równań ruchu w szereg Taylora dla położenia \mathbf{r} , prędkości \mathbf{v} i przyspieszenia \mathbf{a} :

$$\begin{aligned} r(t + \Delta t) &= r(t) + v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 + \dots \\ v(t + \Delta t) &= v(t) + a(t)\Delta t + \dots \\ a(t + \Delta t) &= a(t) + b(t)\Delta t + \dots \end{aligned} \quad 3.8$$

gdzie t oznacza aktualny czas, a Δt – krok czasowy. Algorytmy te posiadają ważną dla fizyki obliczeniowej cechę – dosyć dobrze spełniają prawo zachowania energii, pędu i momentu pędu. Wartość

energii w sposób oscylacyjny fluktuuje wokół pewnej wartości, co jest bardzo pożądane podczas długotrwałych symulacji. Dodatkowo, algorytmy te wymagają tylko jednokrotnego obliczenia sił w każdym kroku, oraz są stosunkowo łatwe do implementacji. Powszechnie stosowane są trzy główne typy algorytmów Verleta (w zależności od zagadnienia, mogą być modyfikowane np. w sytuacji równoleglenia obliczeń na klastrach obliczeniowych lub stacjach roboczych) – algorytm podstawowy (równanie 2.5), „leap-frog” (równanie 2.6) oraz prędkościowy (równanie 2.7):

$$r(t + \Delta t) = 2\Delta r(t) - r(t - \Delta t) + \frac{F(t)\Delta t^2}{m}$$

$$v(t) = \frac{[r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)]}{2}\Delta t + O(\Delta t^2)$$
3.9

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \Delta v \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right)$$

$$v \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) = v \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right) + \frac{F(t)\Delta t}{m}$$
3.10

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{F(t)\Delta t^2}{2m}$$

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{[F(t + \Delta t) + F(t)]\Delta t}{2m}$$
3.11

W przypadku symulacji molekuł stosuje się standardowo krok czasowy Δt rzędu femtosekundy (1 fs = $1 \cdot 10^{-15}$ sekundy). Jest to spowodowane koniecznością opisania najszybszego możliwego ruchu oscylacyjnego w molekułe, występującego w wiązaniu C-H. Mając zadany krok czasowy oraz znając początkowe położenia atomów symulowanej molekuły w przestrzeni (dodatkowo określając przestrzeń symulacji w postaci prostopadłościanu lub sfery) należy przypisać przed prowadzeniem symulacji każdemu atomowi w molekułe prędkości początkowe. Możliwe jest to dzięki zdefiniowaniu temperatury T , w jakiej prowadzona jest symulacja (metody kwantowe oraz sama mechanika molekularna nie uwzględniają wpływu temperatury). Prędkości początkowe przypisywane są losowo każdemu z atomów tak, aby spełniony był rozkład Maxwella-Boltzmana dla zadanej temperatury:

$$f(v) = 4\pi \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} v^2 e^{-\frac{mv^2}{2k_B T}}$$
3.12

gdzie m – masa atomu, k_B – stała Boltzmana, T – temperatura, f – ułamek cząstek o prędkościach leżących w wąskim przedziale (v ; $v+\Delta v$). Mając powyższe dane wejściowe można rozpocząć prowadzenie obliczeń w warunkach, kiedy liczba cząstek N , objętość symulowanego układu V i energia całkowita E układu jest stała. Ten sposób prowadzenia obliczeń nazywamy zespołem statystycznym mikrokanonicznym NVE. Innym sposobem jest utrzymanie podczas symulacji stałej objętości układu i temperatury – zespół NVT. Często stosowanym zespołem jest również zespół NpT, w którym stosuje

się algorytmy pozwalające na utrzymanie stałego ciśnienia i temperatury. Dobór zespołu statystycznego zależy od problemu badawczego i wielkości, które chcemy analizować po przeprowadzeniu obliczeń. Należy pamiętać, że np. w zespole NpT utrzymujemy stałe ciśnienie i temperaturę, jednakże w trakcie trwania symulacji zmienia się objętość symulowanego układu poprzez działanie algorytmu skalującego pozycje atomów. W tym przypadku chcąc analizować geometrię badanego układu musimy pamiętać, że jest ona zaburzona działaniem algorytmu utrzymującego stałe ciśnienie. W przypadku zespołu NVT symulujemy układ w stałej objętości i temperaturze, bez skalowania pozycji atomów – geometria molekuly nie jest zaburzona poprzez działanie algorytmów, niemniej wartości ciśnienia symulowanego układu będą fluktuowały w trakcie trwania symulacji. Najprostszą metodą utrzymywania stałej temperatury jest skalowanie prędkości atomów z każdym krokiem czasowym o każdorazowo wyliczony czynnik $k=(T_0T^{-1})^{1/2}$, gdzie T_0 jest temperaturą docelową, T jest temperaturą bieżącą wyznaczaną z energii kinetycznej atomów układu. Metoda ta jednak nie pozwala na utrzymanie stałej temperatury przez długie czasy symulacji rzędu kilku nanosekund, dlatego stosowane są zaawansowane algorytmy tzw. termostaty. Przykładem takiego termostatu jest termostat Berendsena, w którym skalowanie prędkości zależne jest od czynnika γ , zależnego od czasu relaksacji τ atomów zanurzonych w kąpielii cieplnej:

$$\gamma = \left[1 + \frac{\Delta t}{2\tau} \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad 3.13$$

Inną często stosowaną techniką pozwalającą na prowadzenie długich symulacji i utrzymywanie stałej temperatury jest prowadzenie dynamiki Langevina. Metoda ta jest rozwinięciem MD polegającym na dodaniu do równań ruchu współczynnika tłumienia tarcia z otoczeniem oraz losowych sił:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = \mathbf{F}_i - \gamma \frac{d\mathbf{r}}{dt} m_i + \mathbf{R}_i \quad 3.14$$

gdzie γ oznacza współczynnik tłumienia tarcia z otoczeniem, a \mathbf{R}_i oznacza losową siłę działającą na atom i . Zazwyczaj w dostępnych pakietach obliczeniowych definiuje się współczynnik γ (standardowo stosuje się wielkości rzędu kilku ps⁻¹). Dynamika Langevina pozwala na precyzyjniejsze kontrolowanie średniej energii kinetycznej układu a więc temperatury. Powyższa metoda jest przydatna w symulacjach prowadzonych w otoczeniu środowiska wodnego reprezentowanego przez obecność w przestrzeni symulacji molekuł wody (model środowiska *explicite*) jak i podczas symulacji prowadzonej w środowisku wodnym reprezentowanym odpowiednią parametryzacją pola siłowego i symulacji (model środowiska *implicite*). Warto zauważyć, że symulując układy biologiczne wpływ środowiska wodnego jest znaczący na konformacje i geometrię modelowanej molekuly, stąd też zaleca się stosowanie modelu *explicite*, czyli poprzez otoczenie w przestrzeni symulacji molekuly cząsteczkami wody. Atomy w tych cząsteczkach również są sparametryzowane, ich opis za pomocą parametrów (długość wiązań, kąt pomiędzy atomami H – O – H, ładunek oraz występowanie dodatkowych wirtualnych ładunków) nazywa się typami wody. Symulując układy biologiczne warto również

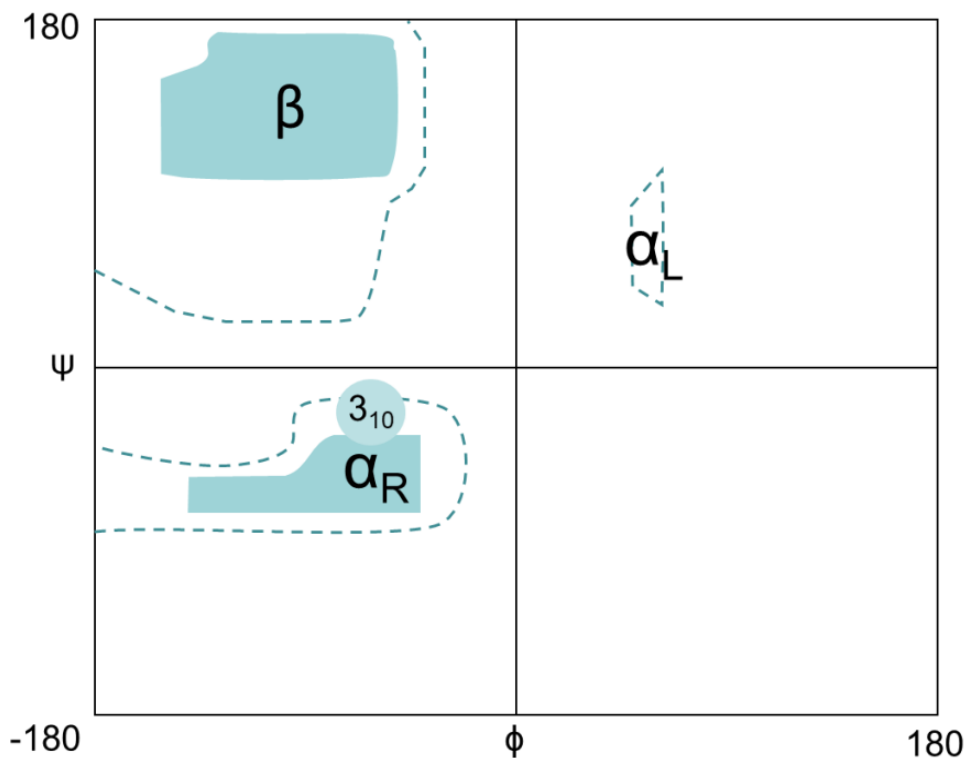
stosować technikę periodyczności środowiska, aby zapewnić ciągłość ośrodka, w którym znajduje się molekula. Tworzy się wirtualne obrazy przestrzeni symulacji, używając periodycznych warunków brzegowych (PBC) tak, aby jak najwierniej odtworzyć warunki naturalne rozpuszczalnika, w jakim znajduje się molekula i zapobiec efektom brzegowym (sytuacji, w której molekula zbliża się do krawędzi przestrzeni symulacji). Po przeprowadzeniu symulacji metodą MD otrzymujemy zbiór położeń i prędkości lub pędów wszystkich atomów układu w czasie. Zbiór ten, nazywany trajekcją, można następnie analizować, wyznaczając z niego interesujące badacza parametry takie jak: średnia długość wiązań, i kątów, odchylenie średniej kwadratowej pozycji atomów (RMSD), średnia temperatura, średnie energie wewnętrzne i wiele innych. [32,35]

3.3. Sterowana dynamika molekularna

Sterowana dynamika molekularna jest rozwinięciem dynamiki molekularnej [36]. W metodzie tej stosuje się dodatkowy potencjał pomiędzy wirtualnym atomem poruszającym się w określonym kierunku z zadaną prędkością a wybranym atomem lub grupą atomów symulowanej molekuly, której drugi koniec blokuje się w przestrzeni. Dzięki takiej operacji możliwym jest stopniowe rozciąganie lub ściskanie cząsteczki w czasie, rejestrując przy tym siłę działającą na uprzednio wybrany atom molekuly. Potencjał SMD opisany jest wyrażeniem:

$$V_{\text{SMD}} = \frac{1}{2}k_{\text{SMD}}(v_{\text{SMD}}t - \Delta r) \quad 3.15$$

gdzie k_{SMD} jest stałą siłową potencjału SMD, v_{SMD} jest prędkością, z którą porusza się wirtualny atom SMD (rysunek 3.2). W praktyce technika ta pozwala na prowadzenie wirtualnego eksperymentu analogicznego do spektroskopii sił wykonywanej za pomocą AFM. W wyniku obliczeń uzyskać można charakterystyki siły, które analizować można tymi samymi metodami jak w przypadku DFS. Należy jednak zwrócić uwagę na różne szybkości przykładania siły –w symulacjach SMD nawet do tysięcy $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$, podczas gdy w spektroskopii sił za pomocą AFM szybkość ta jest ok. 6 rzędów niższa. Pomimo tego w obu metodach obserwuje się zależność siły rozwijania od szybkości obciążenia, a dane z symulacji pozwalają pomóc w interpretacji wyników uzyskanych metodami eksperymentalnymi [31,35].



Rysunek 3.3. Ideowy schemat mapy Ramachandrana z zaznaczonymi obszarami struktury typu α -helisy prawoskrętnej (α_R), lewoskrętnej (α_L), helisy 3-10 (3_{10}) oraz beta-harmonijki (β).

Naniesienie wartości kątów torsyjnych dla każdego z aminokwasów na mapę Ramachandrana pozwala w prosty i szybki sposób zidentyfikować podstawowe (nie wszystkie) rodzaje struktury badanego peptydu. Bardziej wyrafinowanym sposobem identyfikacji jest zastosowanie odpowiednich algorytmów. Przykładem jest algorytm STRIDE, opracowany w celu rozpoznawania szeregu rodzajów struktur drugorzędowych białek. Oprócz kryterium kątów torsyjnych, algorytm ten zawiera dodatkowo potencjał typu Lennarda-Jonesa z potęgami 8-6 mający na celu identyfikować wiązania wodorowe pomiędzy odpowiednimi aminokwasami w analizowanym peptydzie. Identyfikacja wiązania wodorowego polega na wyznaczeniu energii tego wiązania z zależności:

$$E_{HB} = E_r E_t E_p \quad 3.16$$

E_r jest wspomnianym wcześniej potencjałem typu Lennarda-Jonesa 8-6:

$$E_r = \frac{C}{r^8} - \frac{D}{r^6} \quad 3.17$$

Gdzie r jest odległością między donorem a akceptorem tworzącym HB, parametr $C = -3 E_m r_m^8$ [kcal·Å⁸·mol⁻¹], parametr $D = -4 E_m r_m^6$ [kcal·Å⁶·mol⁻¹]. E_m oraz r_m są parametrami opisującymi optymalne minimum energii i odległość równowagową dla HB (w szkielecie peptydowym przyjęto $E_m = -2,8$ kcal·mol⁻¹, $r_m = 3,0$ Å). Składowe E_p oraz E_t opisujące zależności kierunkowe wiązania HB definiuje się odpowiednio:

$$E_p = \cos^2 p \quad 3.18$$

$$E_t = \begin{cases} (0.9 + 0.1 \sin 2t_i) \cos t_0, & 0 < t_i < 90^\circ \\ K_1(K_2 - \cos^2 t_i)^3 \cos t_0, & 90^\circ < t_i < 110^\circ \\ 0, & t_i > 110^\circ \end{cases} \quad 3.19$$

gdzie p i t_0 są kątami definiującymi odchylenie atomu wodoru od idealnego, liniowego wiązania wodorowego, K_1 i K_2 są stałymi siłowymi kątowymi. Warunkowa kombinacja wyrażeń na energię wiązania wodorowego w odpowiednio zdefiniowanych zakresach kątów pozwala na precyzyjniejsze przypisanie danej struktury do odpowiedniego typu. W niniejszej pracy do identyfikacji drugorzędowej struktury badanych modeli wykorzystana została implementacja algorytmu STRIDE w postaci wtyczki do pakietu oprogramowaniu VMD (*ang. Visual Molecular Dynamics*) [37,38].

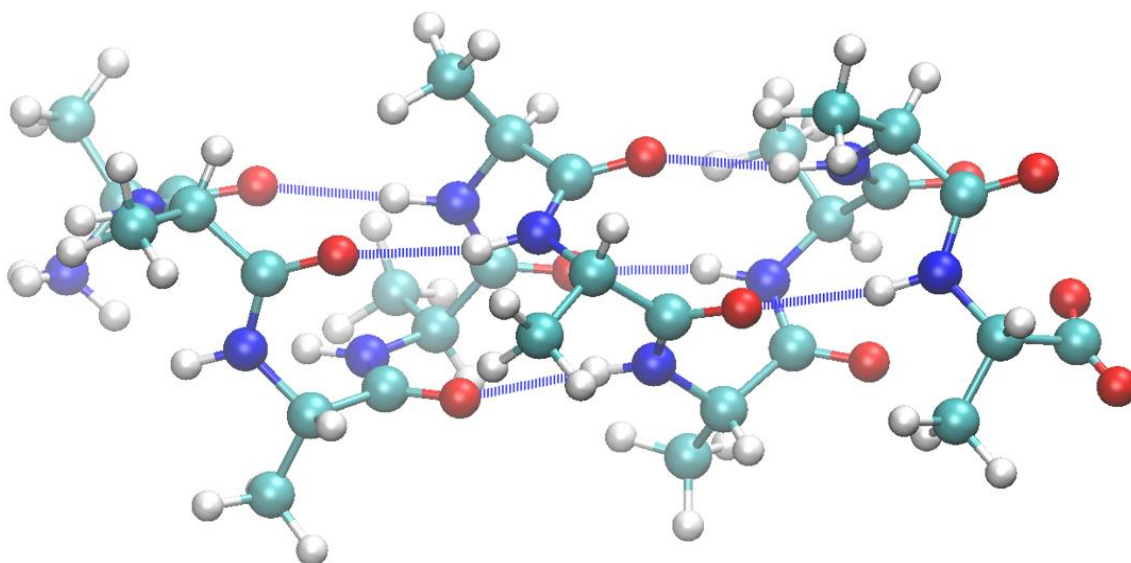
4. Modele molekularne polipeptydów

W przeprowadzonych obliczeniach wykorzystano dwa modele α -helikalnych peptydów, zbudowane za pomocą oprogramowania VMD [38] – dekaalaninę, złożoną z dziesięciu aminokwasów tego samego typu: alaniny, oraz AAKA(AEAAKA)₅AC, złożonego z alaniny (A), lizyny (K), kwasu glutaminowego (E) i cysteiny (C). Budowa modeli polegała na stworzeniu w przestrzeni trójwymiarowej łańcucha aminokwasów z uprzednio predefiniowanymi wartościami kątów torsyjnychmi $\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$. Tak uzyskane modele zostały zapisane w formacie Protein Data Bank (PDB), szeroko stosowanym do zapisu geometrii białek w przestrzeni. Przed przeprowadzeniem właściwych symulacji, struktury zostały poddane optymalizacji geometrii oraz stopniowemu podgrzewaniu w pakiecie obliczeniowym NAMD [39] z wykorzystaniem pola siłowego CHARMM36. Krok czasowy podczas symulacji to 1 fs. W celu ewaluacji poprawności uzyskanych struktur, porównano ich parametry geometryczne z wybranymi białkami, dla których znana jest geometria z badań krystalograficznych. Wartości parametrów geometrycznych podawane w tym rozdziale wyznaczone zostały jako średnie arytmetyczne, natomiast niepewności pomiarowe zostały obliczone jako odchylenie standardowe.

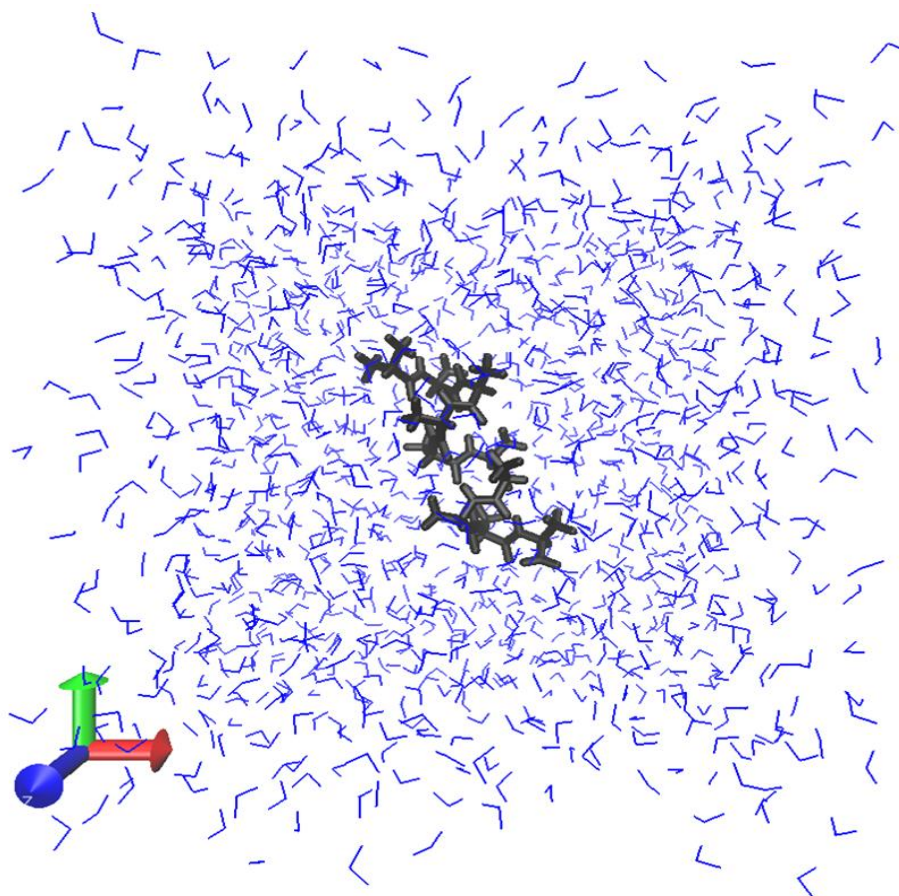
4.1. Model dekaalaniny

Model dekaalaniny zbudowany został z 10 reszt aminokwasowych alaniny. Wybór tego aminokwasu wynikał głównie z jego dużej skłonności do tworzenia α -helikalnych struktur [18]. Procedura budowania modelu i obliczeń wstępnych była następująca:

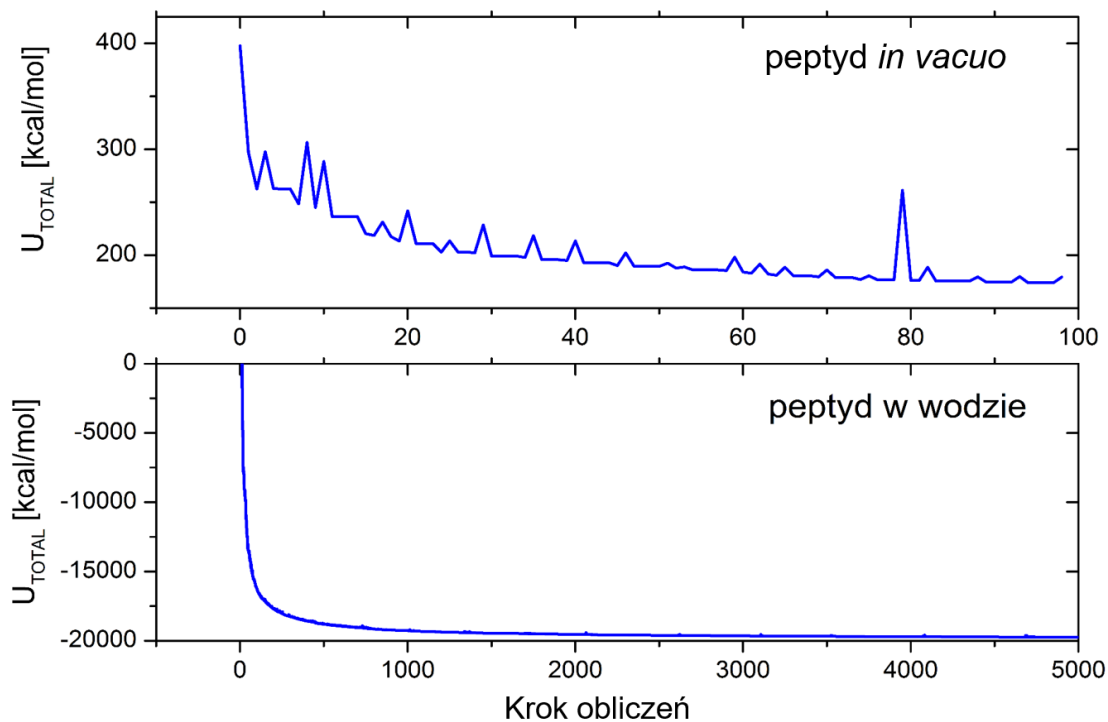
- budowa aminokwasu z predefiniowanymi kątami torsyjnymi ($\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$),
- optymalizacja geometrii modelu *in vacuo* – 100 kroków,
- umieszczenie modelu w pudle periodycznym o rozmiarach $35 \cdot 38 \cdot 31 \text{ \AA}$ z rozpuszczalnikiem – modelem wody TIP3P. Sam polipeptyd składa się z 115 atomów, natomiast struktura w pudle periodycznym wraz z rozpuszczalnikiem – wodą – zawiera 4219 atomów (1368 molekuł wody),
- optymalizacja geometrii całego układu – 5000 kroków,
- stopniowe podgrzewanie modelu od 0 K do 300 K w 450 000 kroków, co odpowiada czasowi symulacji 450 ps,
- symulacja wygrzewająca MD w stałej temperaturze $T = 300 \text{ K}$ przez 500 000 kroków, co odpowiada czasowi symulacji 500 ps.



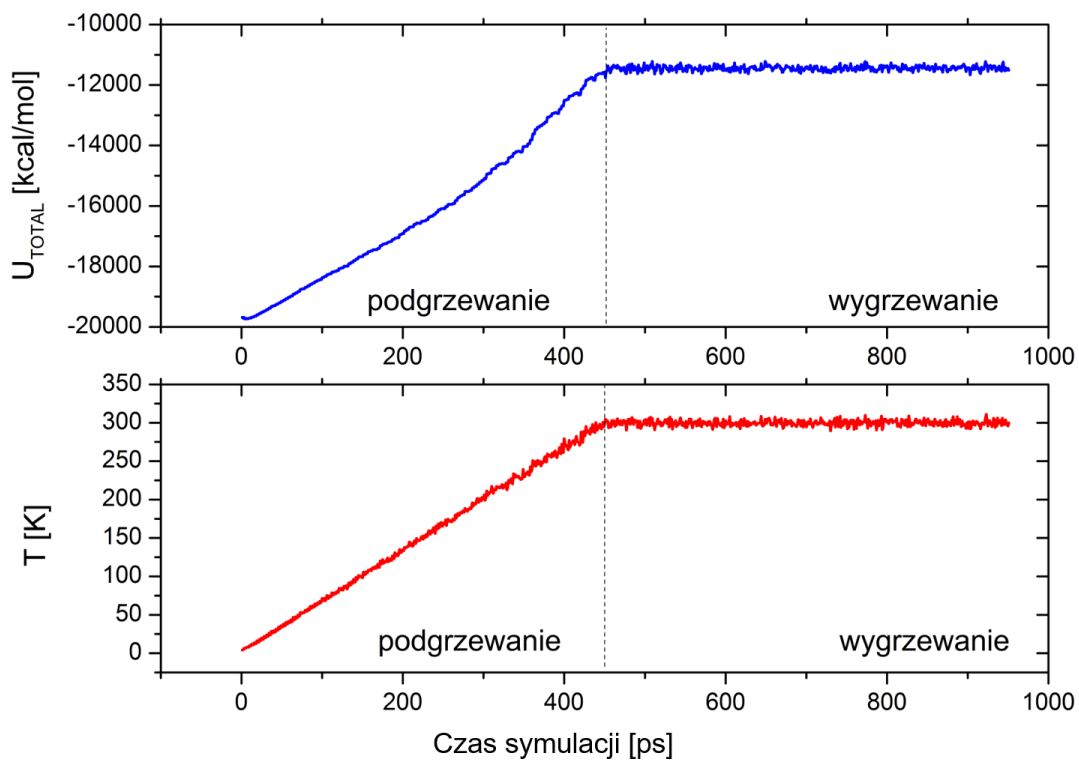
Rysunek 4.1. Model dekaalaniny przed optymalizacją geometrii. Kolory reprezentują odpowiednie pierwiastki: cyan – węgiel, niebieski – azot, czerwony – tlen, biały – wodór. Przerywaną niebieską linią zaznaczono wiązania wodorowe.



Rysunek 4.2. Model dekaalaniny w pudle periodycznym wypełnionym molekułami wody po optymalizacji geometrii i podgrzewaniu do temperatury 300 K. Kolorem niebieskim zaznaczono otaczające peptyd molekuly wody, kolorem czarnym zaznaczono dekaalaninę.



Rysunek 4.3. Przebieg energii całkowitej podczas optymalizacji geometrii peptydu *in vacuo* (100 kroków obliczeniowych) oraz peptydu w wodzie (5000 kroków obliczeniowych).



Rysunek 4.4. Przebieg temperatury (czerwona krzywa) oraz energii całkowitej układu (niebieska krzywa) podczas symulacji podgrzewania peptydu (450 000 kroków co odpowiada 450 ps) i wygrzewającej dynamiki molekularnej (500 000 kroków co odpowiada 500 ps).

Rysunek 4.3. przedstawia przebieg energii modelu podczas optymalizacji geometrii, zarówno peptydu *in vacuo* jak i całego układu (peptydu w pudle periodycznym z wodą). Podczas optymalizacji układ osiągnął widoczne *plateau* i minimalną energię całkowitą $-19\,750\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Po stopniowym podgrzaniu energia całkowita układu w temperaturze 300 K wynosiła $-11\,500\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Podczas symulacji wygrzewającej MD, zarówno temperatura układu jak i energia całkowita, zachowywały stały poziom (rysunek 4.4), co świadczy o stabilności symulacji.

W celu analizy uzyskanej geometrii pomierzono wartości kątów torsyjnych oraz odległości pomiędzy atomami tworzącymi wiązanie wodorowe (odległości donor – akceptor) po zoptymalizowaniu układu.

Tabela 4.1. Wartości kątów torsyjnych dla każdego z aminokwasów dla uzyskanej po obliczeniach optymalizacji geometrii dekaalaniny w wodzie

Aminokwas	ϕ [°]	ψ [°]
ALA1	0	-130,7
ALA2	-72,3	-37,4
ALA3	-60,0	-41,7
ALA4	-72,8	-36,1
ALA5	-57,3	-50,6
ALA6	-72,2	-24,1
ALA7	-57,5	-47,2
ALA8	-82,5	-38,6
ALA9	-62,6	153,9
ALA10	-127,8	0

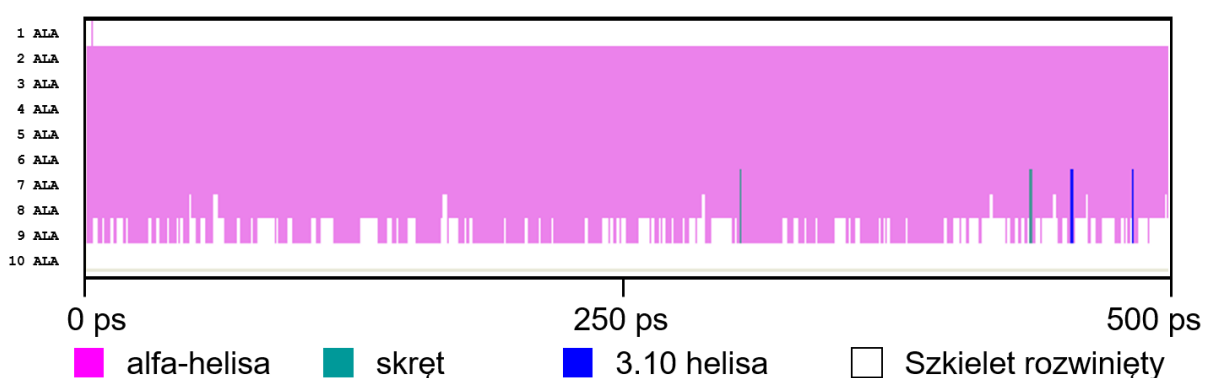
Tabela 4.2. Wartości odległości donor – akceptor wiązania wodorowego (HB) uzyskane po obliczeniach optymalizacji geometrii dekaalaniny w wodzie

Donor HB	Akceptor HB	Długość HB [Å]
ALA1	ALA5	3,12
ALA2	ALA6	2,83
ALA3	ALA7	2,75
ALA4	ALA8	3,09
ALA5	ALA9	3,01
ALA6	ALA10	5,14

Aminokwasy 1, 9 i 10 wartościami kątów torsyjnych odbiegają od struktury α -helikalnej (Tabela 4.1). Średnie wartości kątów torsyjnych dla aminokwasów 2 – 8 wynoszą odpowiednio $\phi = (-67,8 \pm 9,6)^\circ$, $\psi = (-39,4 \pm 8,6)^\circ$ i są zbliżone do wartości predefiniowanych ($\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$). Średnia odległość pomiędzy donorem a akceptorem dla uzyskanej geometrii wynosi $(3,3 \pm 0,9)$ Å. Na podstawie długości HB (tabela 4.2) można wnioskować, że podczas symulacji częściowo rozwinięta została końcowa część molekuly – długość ostatniego wiązania wodorowego ALA6 – ALA10 wzrosła do 5,14 Å. Ponieważ

jednak końcowe aminokwasy w każdym łańcuchu polipeptydowym wykazują się dużą dynamiką, uzyskana geometria została użyta do dalszych obliczeń metodą dynamiki molekularnej.

W dalszej części obliczeń przeprowadzono symulację wygrzewającą dynamiki molekularnej o czasie trwania 500 ps. W celu dokładnej identyfikacji struktury drugorzędowej zastosowano algorytm STRIDE (rysunek 4.5). W całym przedziale obliczeń aminokwasy 2 – 8 zostały zidentyfikowane jako α -helikalne. Aminokwasy 1 i 10 nie tworzą α -helikalnej struktury, natomiast aminokwas 9 częściej przyjmuje konformację α -helikalną niż rozwiniętą. Aminokwasy rozpoczynające i kończące łańcuch polipeptydowy wykazują się zawsze zwiększoną dynamiką – nie posiadają partnera współtworzącego z nimi wiązanie peptydowe i tym samym ich skłonność do tworzenia rozwiniętej geometrii jest znacznie większa podczas symulacji.



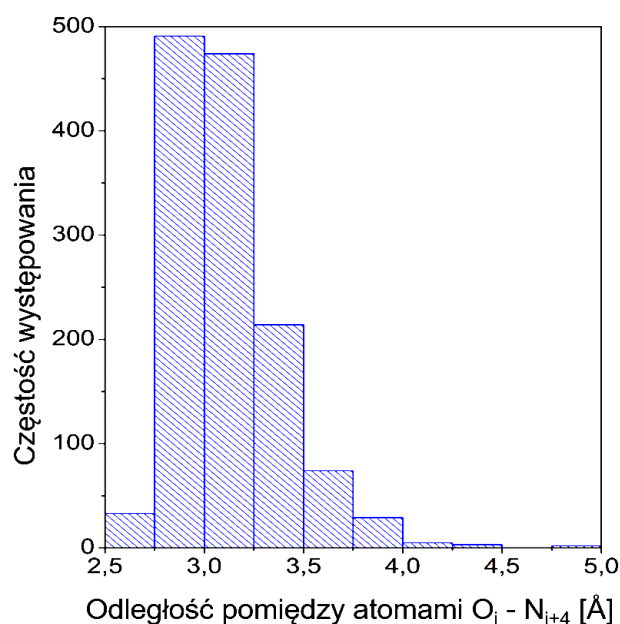
Rysunek 4.5. Ilustracja identyfikacji drugorzędowej struktury uzyskanej geometrii podczas dynamiki molekularnej w $T = 300$ K przez 500 ps z użyciem algorytmu STRIDE.

Na podstawie wyników uzyskanych dzięki STRIDE obliczono parametr α -helikalności A , który zdefiniować można jako stosunek liczby wystąpień α -helikalnych aminokwasów do liczby wszystkich wystąpień aminokwasów w jednostce czasu symulacji. Dokładniej zdefiniować można ten parametr jako sumę liczby aminokwasów α -helikalnych n liczoną od ramki i do ramki j , podzieloną przez liczbę wszystkich aminokwasów m pomnożoną przez liczbę sumowanych ramek $(j - i + 1)$:

$$A = \frac{\sum_{k=i}^j n_k}{m(j - i + 1)} \cdot 100\% \quad 4.1$$

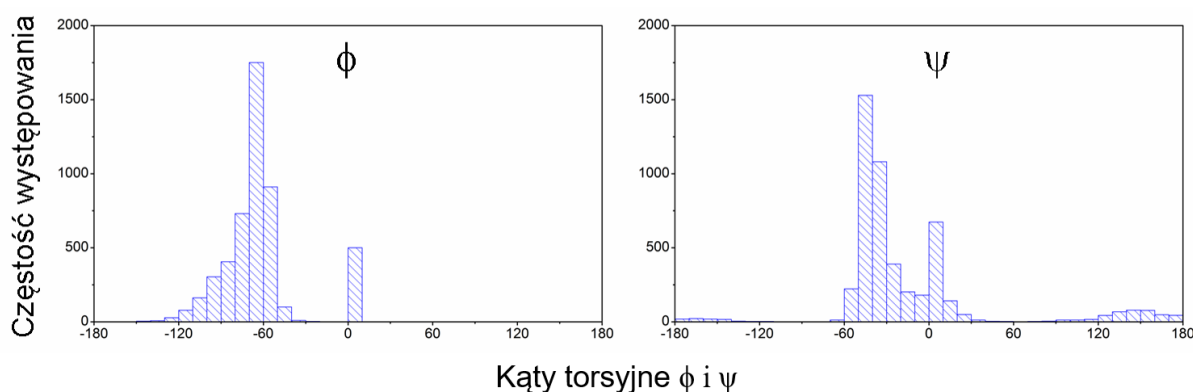
Liczba wszystkich aminokwasów m wynosi 10, początkowa ramka zapisanej symulacji $i = 1$, końcowa $j = 500$. Suma liczby aminokwasów, które podczas symulacji od ramki $i = 1$ do ramki $j = 500$ miały strukturę α -helikalną wynosi 3778 wystąpień, wobec tego obliczony parametr α -helikalności $A = 75,56\%$.

Dla przeprowadzonej symulacji wygrzewającej wyznaczono średnią wartość odległości donor-akceptor dla wszystkich wiązań HB. Z przeprowadzonych obliczeń uzyskano wynik $(3,2 \pm 0,4) \text{ \AA}$, co jest akceptowalnym wynikiem dla długości wiązań wodorowych $(2,5 \text{ \AA} - 3,5 \text{ \AA})$.



Rysunek 4.6. Rozkład częstości występowania odległości donor – akceptor w uzyskanej geometrii podczas symulacji wygrzewania MD. Analizowano wiązania wodorowe pomiędzy atomami tlenu O aminokwasu i a atomami azotu N aminokwasu $i+4$ (patrz rysunek 1.3 i 3.1).

Podczas symulacji wygrzewającej pomierzono wartości kątów torsyjnych dla aminokwasów 2 – 8 (zgodnie z wynikami algorytmu STRIDE, są one w α -helikalne podczas trwania symulacji wygrzewającej MD). Wartości średnie kątów torsyjnych uzyskane podczas symulacji wynoszą $\phi = (-65 \pm 10)^\circ$, $\psi = (-37 \pm 13)^\circ$.



Rysunek 4.7. Rozkład częstości występowania kątów torsyjnych wszystkich aminokwasów modelowanej struktury dekaalaniny podczas symulacji wygrzewającej MD

W uzyskanej końcowo symulacji 7 na 10 aminokwasów posiada geometrię α -helikalną ($A = 75.56\%$). Aminokwasy 1 i 10 jako końcowe nie posiadały konformacji α -helikalnej, natomiast aminokwas 9 wykazywał wyraźną tendencję do tworzenia tego typu struktury. Odległości pomiędzy

donorem a akceptorem wiązania wodorowego są w akceptowalnym przedziale. Po porównaniu ze strukturami referencyjnymi (rozdział 4.4) uzyskiwaną w ten sposób geometrię uznano za poprawnie reprezentującą α -helikalną strukturę drugorzędową.

4.2. Model dekaalaniny bez sieci wiązań wodorowych

W celu oceny roli wiązań wodorowych w stabilności i sztywności α -helisy postanowiono wykorzystać możliwość zmiany parametrów pola siłowego CHARMM36, tak, aby zredukować obecność wiązań wodorowych podczas prowadzenia symulacji MD i SMD. Metody kwantomechaniczne pozwalają wyznaczyć składowe całkowitej energii wiązania wodorowego, niemniej w polu siłowym, zgodnie ze wzorem 2.3, potencjał wiązania wodorowego reprezentowany jest za pomocą oddziaływania elektrostatycznego oraz potencjału van der Waalsa. Ponieważ energia elektrostatyczna ma decydujący wkład w całkowitą energię wiązania wodorowego dla odległości równowagowych i większych niż równowagowe dla wiązania wodorowego (tabela 2.1 i 4.3) możliwym jest modyfikacja ładunku w polu siłowym dla tych atomów, które oddziałując przyciągająco formują wiązania wodorowe między aminokwasami i a $i+4$.

Tabela 4.3. Porównanie udziału energii elektrostatycznej w całkowitej energii wiązania wodorowego w funkcji odległości R donora od akceptora [20]

R [Å]	E_{elec} [kcal·mol ⁻¹]	$E_{\text{pozostale}}$ [kcal·mol ⁻¹]	E_{HB} [kcal·mol ⁻¹]
3,0	-7,12	1,73	-5,39
3,7	-2,79	-0,19	-2,98
4,8	-1,12	-0,17	-1,29

Tak zmodyfikowane pole siłowe powinno symulować brak wiązań wodorowych podczas symulacji MD i SMD, o ile w tej drugiej metodzie model peptydu będzie rozciągany, tj. odległości między donorem a akceptorem będą równe bądź większe od odległości równowagowej. Symulacje ściskania peptydu wymagałyby dalszych ingerencji w polu siłowym i modyfikacji parametrów potencjału Lennarda-Jonesa.

Zgodnie z rysunkiem 2.3, pomiędzy atomem tlenu z aminokwasu n a atomem wodoru związanym z atomem azotu wiązaniem kowalencyjnym z aminokwasu $n+4$ istnieje oddziaływanie przyciągające elektrostatyczne. Domyślne ładunki elektrostatyczne cząstkowe dla tej pary wynoszą $q_O = -0,51$ e oraz $q_{\text{HN}} = +0,31$ e. W celu zasymulowania wyeliminowania tego oddziaływania przyciągającego, dla wszystkich atomów wodoru związanych z atomem azotu w szkielecie peptydowym zmieniono ładunek na $q_{\text{HN}} = 0,00$ e. Aby zachować całkowity neutralny ładunek polipeptydu dokonano kompensacji ładunku na tlenie, zmieniając ładunek do wartości $q_O = -0,20$ e (rysunek 4.8). Przeprowadzono szereg symulacji dla tej samej geometrii polipeptydu (dekaalaniny) w polu siłowym

z i bez modyfikacji parametrów elektrostatycznych. Wyniki porównawcze symulacji MD i SMD przedstawiono w następnym rozdziale pracy.

	Numer atomu	Nazwa łańcucha	Numer aminokwasu	Nazwa aminokwasu	Typ atomu	Nazwa atomu	Ładunek	Masa
Model z HB	13	XP1	2	ALA	N	NH1	-0.470000	14.0070
	14	XP1	2	ALA	HN	H	0.310000	1.0080
	15	XP1	2	ALA	CA	CT1	0.070000	12.0110
	16	XP1	2	ALA	HA	HB1	0.090000	1.0080
	17	XP1	2	ALA	CB	CT3	-0.270000	12.0110
	18	XP1	2	ALA	HB1	HA3	0.090000	1.0080
	19	XP1	2	ALA	HB2	HA3	0.090000	1.0080
	20	XP1	2	ALA	HB3	HA3	0.090000	1.0080
	21	XP1	2	ALA	C	C	0.510000	12.0110
	22	XP1	2	ALA	O	O	-0.510000	15.9990
Model bez HB	13	XP1	2	ALA	N	NH1	-0.470000	14.0070
	14	XP1	2	ALA	HN	H	0.000000	1.0080
	15	XP1	2	ALA	CA	CT1	0.070000	12.0110
	16	XP1	2	ALA	HA	HB1	0.090000	1.0080
	17	XP1	2	ALA	CB	CT3	-0.270000	12.0110
	18	XP1	2	ALA	HB1	HA3	0.090000	1.0080
	19	XP1	2	ALA	HB2	HA3	0.090000	1.0080
	20	XP1	2	ALA	HB3	HA3	0.090000	1.0080
	21	XP1	2	ALA	C	C	0.510000	12.0110
	22	XP1	2	ALA	O	O	-0.200000	15.9990

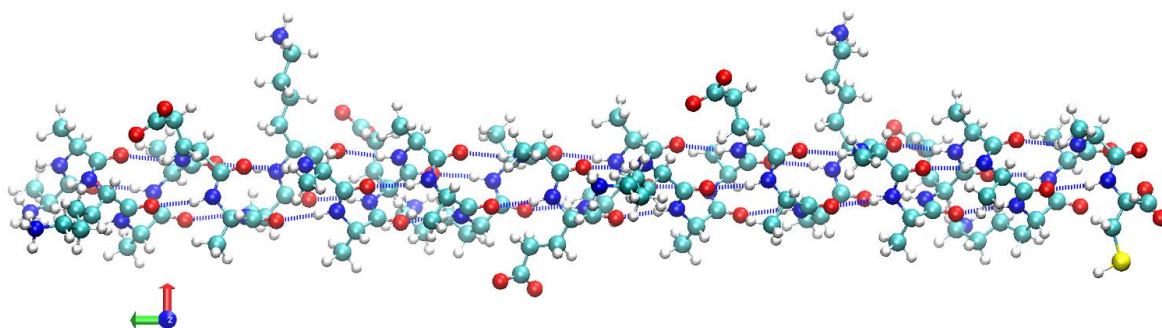
Rysunek 4.8. Modyfikacja parametrów pola siłowego pozwalająca modelować redukcję wiązań wodorowych. Na czerwono zaznaczono atomy, dla których zostały zmodyfikowane wartości ładunków elektrostatycznych używane podczas symulacji (tlen O oraz atom wodoru H przy azocie N).

4.3. Model AAKA(AEAAKA)₅AC

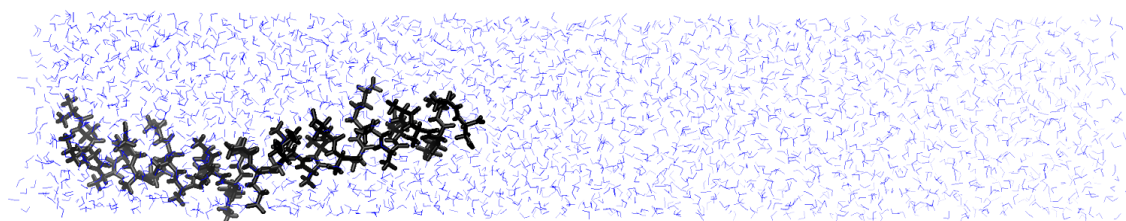
Model AAKA(AEAAKA)₅AC zbudowany został z 36 aminokwasów: alaniny A, lizyny K, kwasu glutaminowego E oraz cysteiny C. Analogicznie do modelu dekaalaniny, wybór aminokwasów wynikał z wysokiej skłonności tworzenia α -helikalnych struktur [18]. Procedura budowania modelu i obliczeń wstępnych była następująca:

- budowa aminokwasu z predefiniowanymi kątami torsyjnymi ($\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$),
- optymalizacja geometrii modelu *in vacuo* – 100 kroków,
- umieszczenie modelu w pudle periodycznym o rozmiarach $25 \cdot 165 \cdot 25.5 \text{ \AA}$ z rozpuszczalnikiem – modelem wody TIP3P. Sam polipeptyd składa się z 461 atomów, natomiast struktura w pudle periodycznym wraz z rozpuszczalnikiem – wodą – zawiera 9239 atomów (2926 molekuł wody),
- optymalizacja geometrii całego układu – 5000 kroków,
- stopniowe podgrzewanie modelu od 0 K do temperatury docelowej (stały wzrost 0,333 K na 1 ps) i symulacja MD w stałej temperaturze, co odpowiada łącznemu czasowi symulacji 1000 ps (1 ns),
- symulacja wygrzewająca MD w stałej temperaturze 2 000 000 kroków, co odpowiada czasowi symulacji 2 000 ps (2 ns).

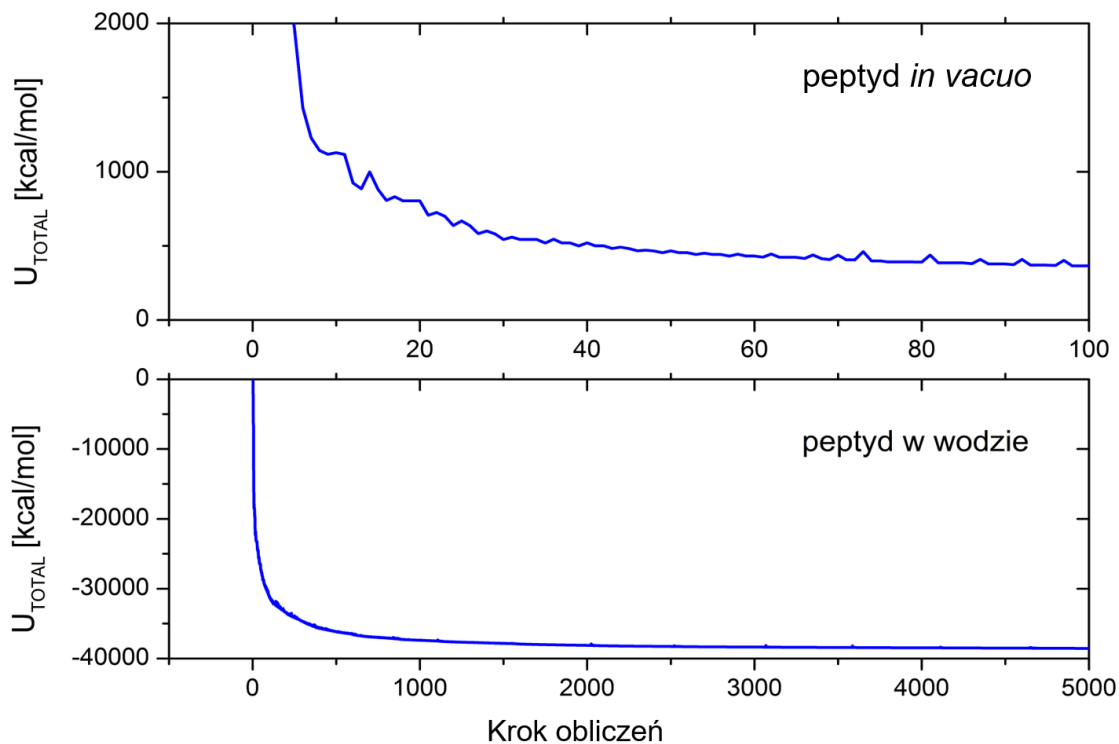
Symulacje podgrzewania i wygrzewania prowadzone były na potrzeby dalszych badań w temperaturach $T = 270, 280, 290, 300, 305$ i 310 K . Dokonano analizy geometrii struktury dla symulacji w $T = 300 \text{ K}$.



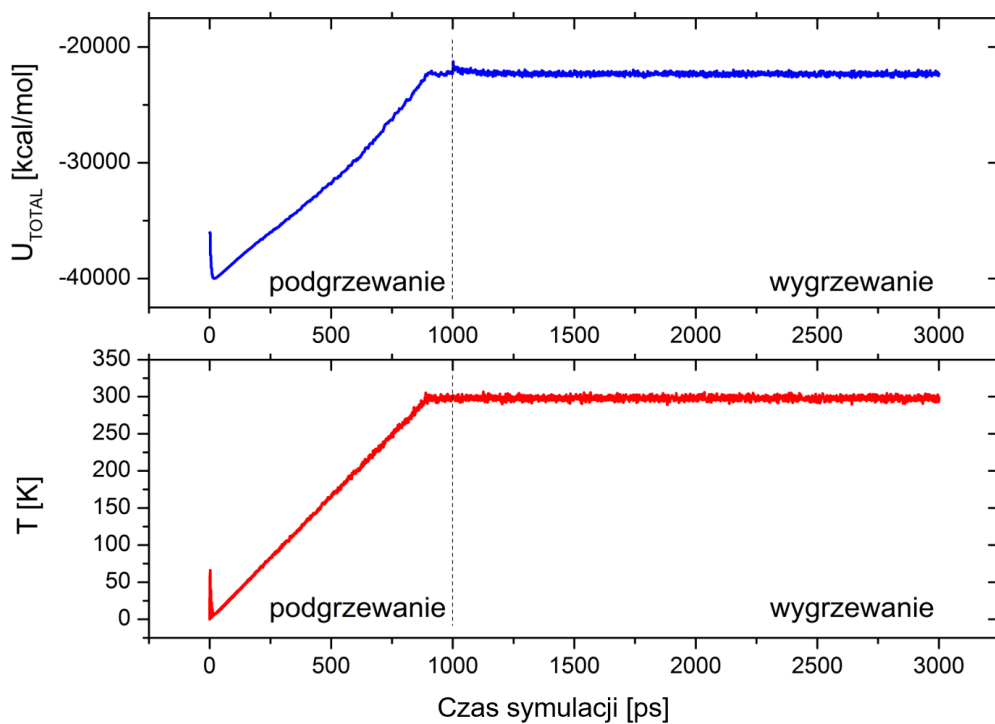
Rysunek 4.9. Model AAKA(AEAAKA)₅AC przed optymalizacją geometrii. Kolory reprezentują odpowiednie pierwiastki: cyjan – węgiel, niebieski – azot, czerwony – tlen, biały – wodór. Przerywaną niebieską linią zaznaczono wiązania wodorowe.



Rysunek 4.10. Zbudowany model AAKA(AEAAKA)₅AC w pudle periodycznym wypełnionym molekułami wody po optymalizacji geometrii i podgrzewaniu do temperatury 300 K. Kolorem niebieskim zaznaczono otaczające peptyd molekuly wody, kolorem czarnym zaznaczono polipeptyd.



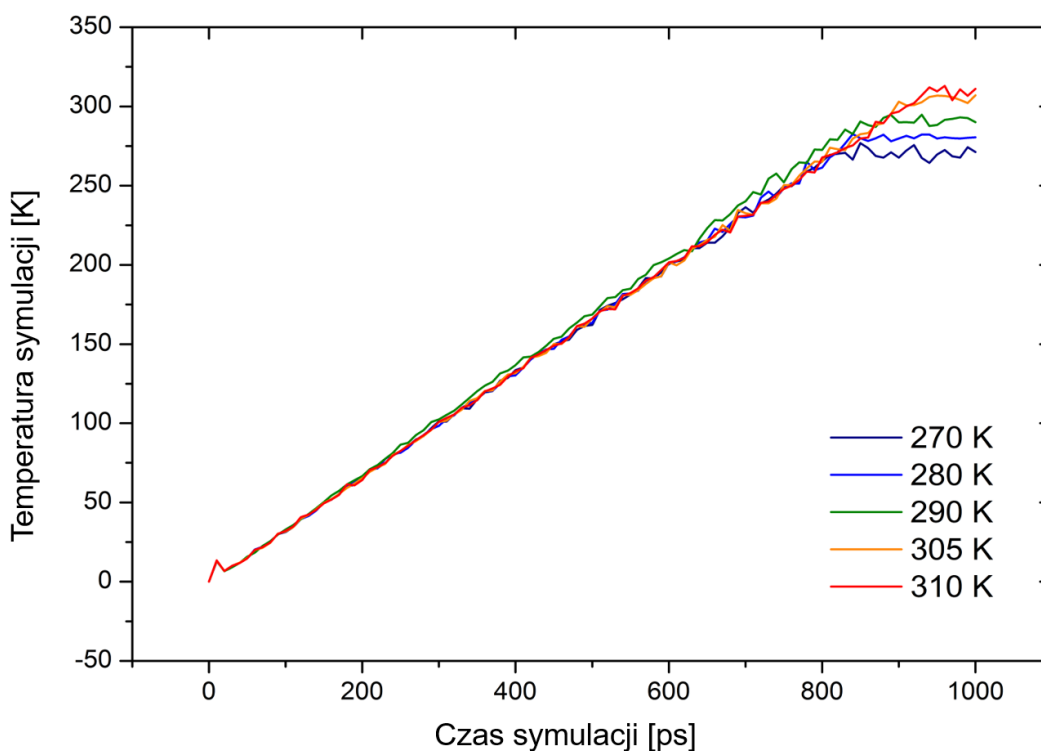
Rysunek 4.11. Przebieg energii całkowitej podczas optymalizacji geometrii peptydu *in vacuo* (100 kroków obliczeniowych) oraz peptydu w wodzie (5000 kroków obliczeniowych).



Rysunek 4.12. Przebieg temperatury (czerwona krzywa) oraz energii całkowitej układu (niebieska krzywa) podczas symulacji podgrzewania peptydu (1 000 000 kroków co odpowiada 1 000 ps) i wygrzewającej dynamiki molekularnej (2 000 000 kroków co odpowiada 2 000 ps) dla docelowej temperatury $T = 300$ K.

Rysunek 4.12 przedstawia zachowanie się energii modelu podczas optymalizacji peptydu *in vacuo* oraz po umieszczeniu w środowisku wodnym. Podczas optymalizacji cały układ osiągnął widoczne *plateau*, osiągając poziom energii całkowitej bliski $-40\ 000\ \text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Po podgrzewaniu i podczas symulacji wygrzewania dynamiki molekularnej dla temperatury docelowej $T = 300\ \text{K}$ energia całkowita oraz temperatura układu zachowywały się stabilnie, osiągając $E_{\text{TOTAL}} = (-22\ 290 \pm 110)\ \text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ oraz $T = (298,1 \pm 2,6)\ \text{K}$. Rysunek 4.13 przedstawia krzywe podgrzewania dla temperatur, $T = 270, 280, 290, 300, 305$ i $310\ \text{K}$. Dla temperatur:

- $T = 270\ \text{K}$ – czas wygrzewania 810 ps, symulacja MD 190 ps,
- $T = 280\ \text{K}$ – czas wygrzewania 840 ps, symulacja MD 160 ps,
- $T = 290\ \text{K}$ – czas wygrzewania 870 ps, symulacja MD 130 ps,
- $T = 300\ \text{K}$ – czas wygrzewania 900 ps, symulacja MD 100 ps,
- $T = 305\ \text{K}$ – czas wygrzewania 915 ps, symulacja MD 85 ps,
- $T = 310\ \text{K}$ – czas wygrzewania 930 ps, symulacja MD 70 ps.



Rysunek 4.13. Przebieg krzywych temperatury układu podczas symulacji podgrzewającej (0.333 K na 1 ps) i krótkiej symulacji wygrzewającej (dopełnienie do 1 ns) dla temperatur $T = 270, 280, 290, 305$ i $310\ \text{K}$.

Po osiągnięciu temperatury docelowej układ zachowywał się stabilnie osiągając następujące wartości energii całkowitej (wyznaczone z ostatnich 50 ps symulacji podgrzewania):

- temperatura docelowa $270\ \text{K}$ – średnia energia $(-24\ 500 \pm 120)\ \text{kcal/mol}$, średnia $T (270,7 \pm 2,5)\ \text{K}$,
- temperatura docelowa $280\ \text{K}$ – średnia energia $(-23\ 730 \pm 100)\ \text{kcal/mol}$, średnia $T (280,1 \pm 0,3)\ \text{K}$,

- temperatura docelowa 290 K – średnia energia ($-22\,940 \pm 290$) kcal/mol, średnia T ($291,3 \pm 1,8$) K,
- temperatura docelowa 300 K – średnia energia ($-22\,290 \pm 110$) kcal/mol, średnia T ($298,1 \pm 2,6$) K,
- temperatura docelowa 305 K – średnia energia ($-21\,700 \pm 110$) kcal/mol, średnia T ($305,4 \pm 1,9$) K,
- temperatura docelowa 310 K – średnia energia ($-21\,290 \pm 120$) kcal/mol, średnia T ($309,2 \pm 3,3$) K.

W celu analizy struktury uzyskanej po optymalizacji geometrii a przed dynamiką molekularną zmierzono wartości kątów torsyjnych oraz odległości pomiędzy atomami tworzącymi wiązanie wodorowe. Pomierzone wartości zamieszczono w tabelach 4.4 i 4.5.

Tabela 4.4. Wartości kątów torsyjnych dla każdego z aminokwasów po optymalizacji geometrii modelu AAKA(AEAAKA)₅AC

Aminokwas	ϕ [°]	ψ [°]
ALA1	0	-103,6
ALA2	68,29	67,77
LYS3	-64,82	-38,18
ALA4	-62,74	-41,62
ALA5	-63,72	-46,23
GLU6	-56,41	-39,11
ALA7	-63,46	-36
ALA8	-59,26	-46,86
LYS9	-78,99	-32,68
ALA10	-57,7	-50,97
ALA11	-58,54	-43,81
GLU12	-75,97	-33,71
ALA13	-73,7	-30,83
ALA14	-64,14	-45,15
LYS15	-57,84	-43,45
ALA16	-50,46	-53,02
ALA17	-60,88	-43,17
GLU18	-65,05	-37,82
ALA19	-57,17	-43,45
ALA20	-56,99	-38,67
LYS21	-64,81	-33,1
ALA22	-88,75	-31,98
ALA23	-57,57	-45,43
GLU24	-58,37	-46,06
ALA25	-72,38	-27,44
ALA26	-71,01	-40,04
LYS27	-65,98	-40,95
ALA28	-60,6	-38,07
ALA29	-62,48	-41,9
GLU30	-57,62	-44,88
ALA31	-62,19	-36,54
ALA32	-68,01	-42,56
LYS33	-65,97	-36,67
ALA34	-64,99	-31,7
ALA35	-88,11	-1,517
CYS36	-65,78	0

Wartości kątów torsyjnych dla aminokwasów 1, 2, 35 i 36 odbiegają od struktury α -helikalnej. Średnie wartości kątów torsyjnych dla aminokwasów 3 – 34 wynoszą odpowiednio $\phi = (-64,0 \pm 7,7)^\circ$, $\psi = (-40 \pm 6)^\circ$ i są zbliżone do predefiniowanych wartości kątów ($\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$).

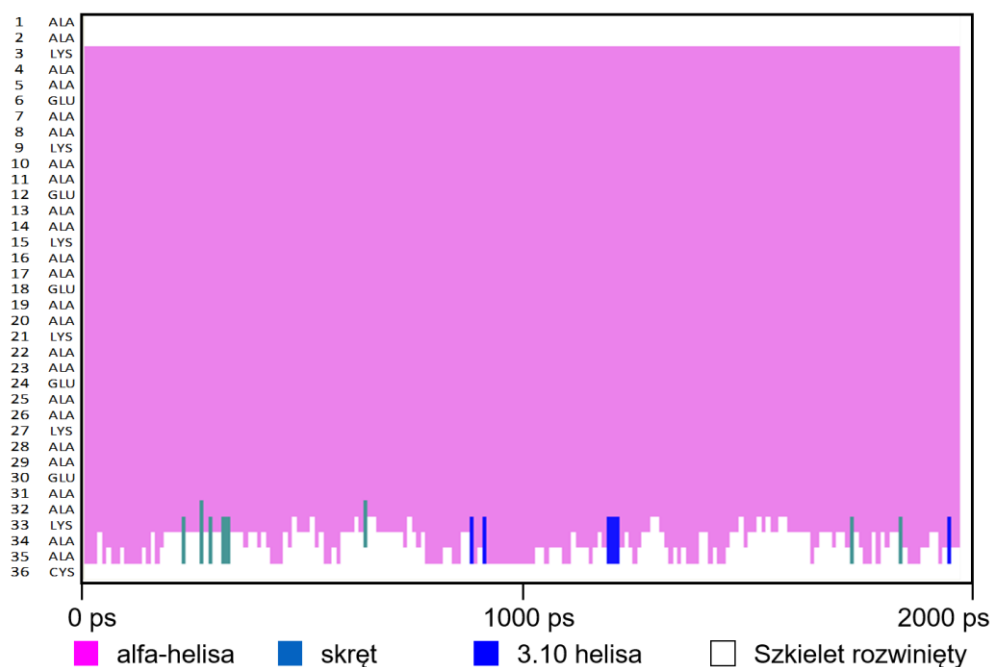
Tabela 4.5. Wartości odległości donor – akceptor wiązania wodorowego po optymalizacji geometrii modelu AAKA(AEAAKA)₅AC

Donor HB	Akceptor HB	Długość HB [Å]
ALA1	ALA5	6,761
ALA2	GLU6	2,933
LYS3	ALA7	2,833
ALA4	ALA8	3,166
ALA5	LYS9	3,094
GLU6	ALA10	2,816
ALA7	ALA11	3,145
ALA8	GLU12	3,269
LYS9	ALA13	2,697
ALA10	ALA14	3,048
ALA11	LYS15	3,372
GLU12	ALA16	3,122
ALA13	ALA17	2,734
ALA14	GLU18	3,173
LYS15	ALA19	3,031
ALA16	ALA20	3,270
ALA17	LYS21	3,893
GLU18	ALA22	3,374
ALA19	ALA23	2,728
ALA20	GLU24	2,805
LYS21	ALA25	3,135
ALA22	ALA26	3,026
ALA23	LYS27	3,032
GLU24	ALA28	2,875
ALA25	ALA29	3,140
ALA26	GLU30	2,807
LYS27	ALA31	2,842
ALA28	ALA32	2,910
ALA29	LYS33	3,179
GLU30	ALA34	3,062
ALA31	ALA35	3,072
ALA32	CYS36	3,128

Średnia odległość pomiędzy donorem a akceptorem dla uzyskanej geometrii wynosi $(3,2 \pm 0,7)$ Å. Uzyskana wartość jest akceptowalna i mieści się w przyjętym przedziale długości wiązań wodorowych.

W dalszej części obliczeń przeprowadzono symulacje wygrzewające dynamiki molekularnej o czasie trwania 2 ns dla każdej z docelowych temperatur (270, 280, 290, 300, 305 i 310 K). W celu dokładnej identyfikacji struktury drugorzędowej dla symulacji w $T = 300$ K zastosowano algorytm STRIDE (rysunek 4.14). W całym przedziale obliczeń aminokwasy 3 – 33 zostały zidentyfikowane jako α -helikalne. Natomiast aminokwasy 1, 2 i 36 są całkowicie rozwinięte, podczas gdy aminokwasy 34 i 35 częściowo się rozwijają i zwijają podczas trwania symulacji, co jest sytuacją analogiczną do zmian geometrii początkowego i końcowego aminokwasu modelu dekaalaniny. Tutaj również

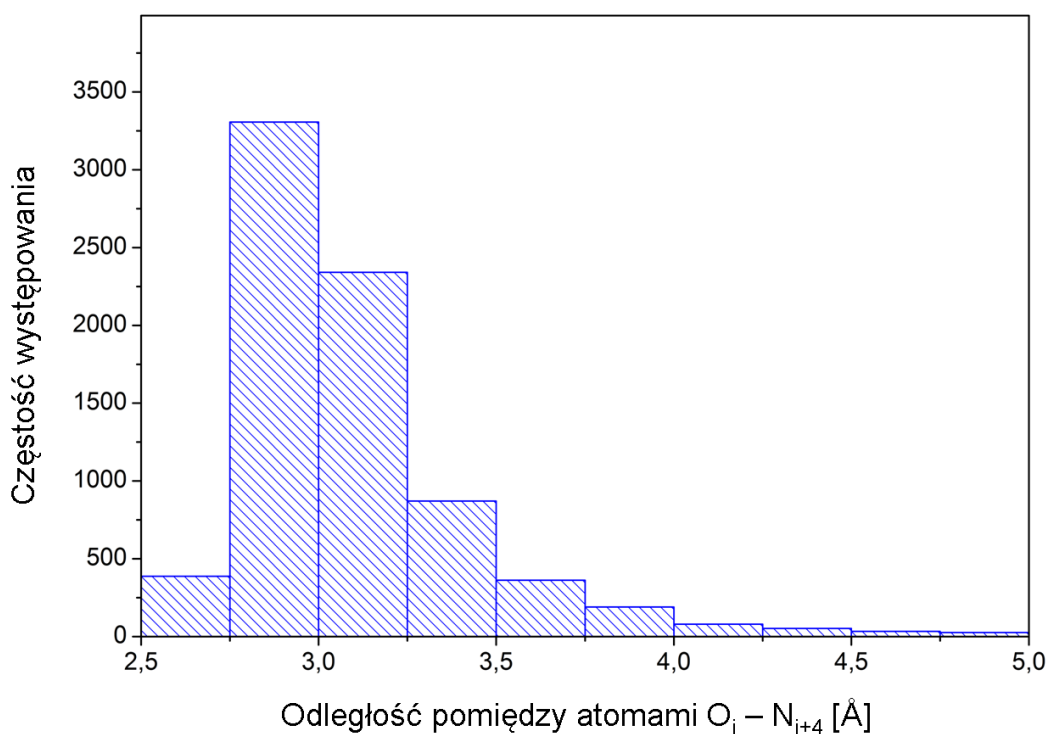
aminokwasy rozpoczynające i kończące łańcuch polipeptydowy wykazują się zawsze zwiększoną dynamiką – aminokwasy krańcowe nie posiadają partnera do utworzenia wiązania peptydowego umożliwiającego kontynuację struktury helikalnej. Aminokwasy 34 i 35 znajdując się na końcu peptydu mają większą skłonność do zmiany geometrii podczas symulacji.



Rysunek 4.14. Ilustracja identyfikacji drugo-rzędowej struktury geometrii uzyskanej podczas symulacji wygrzewającej MD (czas symulacji 2 ns) z użyciem algorytmu STRIDE.

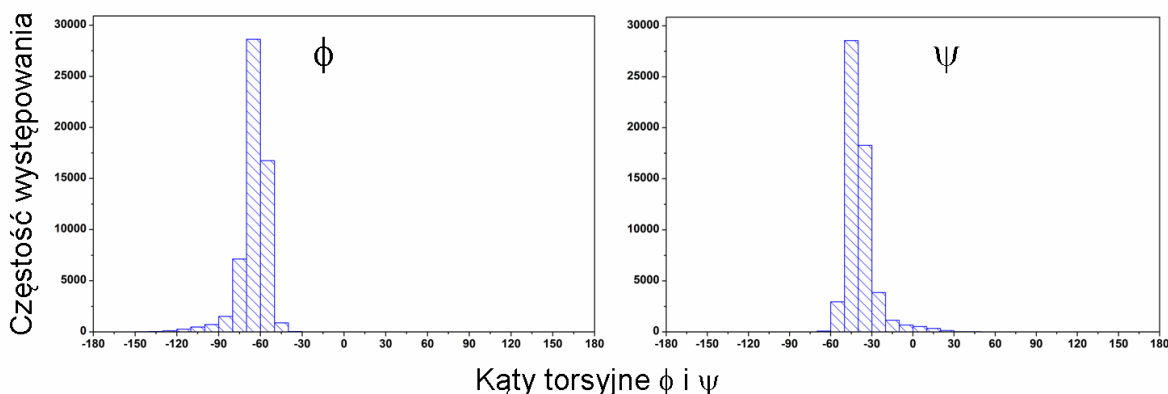
Podobnie jak w przypadku dekaalaniny, korzystając ze wzoru 3.1. obliczono z symulacji wygrzewającej w temperaturze $T = 300$ K parametr α -helikalności $A = 87,93\%$.

Dla przeprowadzonej symulacji wygrzewającej w $T = 300$ K wyznaczono średnią wartość odległości donor-akceptor dla wiązań HB. Dla wszystkich wiązań (uwzględniając aminokwasy 1, 2, 35 i 36) uzyskano wynik $(3,3 \pm 0,9)$ Å. Biorąc jednak pod uwagę aminokwasy tworzące α -helisę tj. 3 – 34 uzyskano $(3,1 \pm 0,3)$ Å. Powyższe wyniki wskazują na akceptowalną średnią długość wiązań wodorowych. Analiza długości wiązań wodorowych również wskazuje na rozwiniętą formę aminokwasów 1, 2, 36 i częściowo 35.



Rysunek 4.15. Histogram wartości odległości donor – akceptor w geometrii modelu AAKA(AEAAKA)₅AC uzyskanej podczas symulacji wygrzewającej MD. Analizowano wiązania wodorowe pomiędzy atomami tlenu aminokwasu *i* a atomami azotu aminokwasu *i+4* (patrz rysunek 2.3).

Podczas symulacji wygrzewającej pomierzono wartości kątów torsyjnych dla aminokwasów 2 – 34 (zgodnie z wynikami algorytmu STRIDE, są one α -helikalne podczas trwania symulacji wygrzewającej MD). Wartości średnie uzyskane podczas symulacji wynoszą $\phi = (-64,7 \pm 10,3)^\circ$, $\psi = (-39 \pm 11)^\circ$.



Rysunek 4.16. Rozkład częstości występowania kątów torsyjnych aminokwasów 3 – 34 modelowanej struktury dekaalaniny podczas symulacji wygrzewającej MD modelu AAKA(AEAAKA)₅AC

W uzyskanej końcowo symulacji większość aminokwasów posiada geometrię α -helikalną ($A = 87,93\%$). Odległości pomiędzy donorem a akceptorem wiązania wodorowego są w akceptowalnym przedziale. Po porównaniu ze strukturami referencyjnymi uzyskaną geometrię uznano za poprawnie reprezentującą α -helikalną strukturę drugorzędową.

4.4. Porównanie uzyskanych geometrii modeli z danymi krystalograficznymi

W celu weryfikacji geometrii uzyskanych modeli dekaalaniny oraz AAKA(AEAAKA)₅AC, oprócz zastosowania algorytmu STRIDE do identyfikacji struktury drugorzędowej, postanowiono porównać geometrię modeli z α -helikalnymi fragmentami białek o znanej strukturze wyznaczonej krystalograficznie:

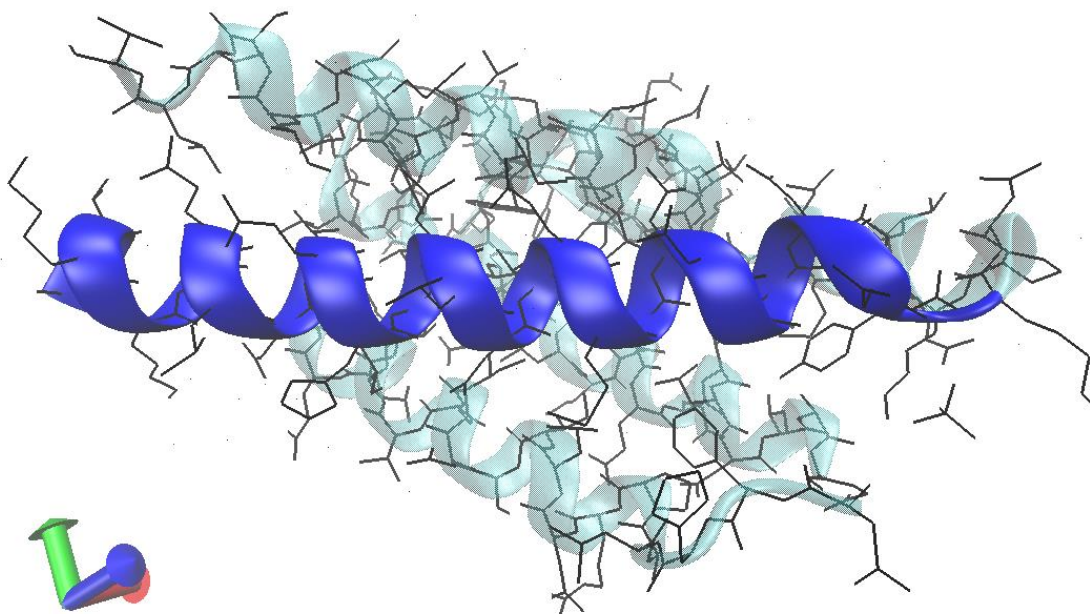
- 1m47 – ludzka interleukina-2, dla której struktura geometryczna została rozwiązana w wyniku badań krystalograficznych i udostępniona w PDB w 2002 roku [40]. Fragment α -helikalny złożony jest z sekwencji aminokwasów:

STKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN,

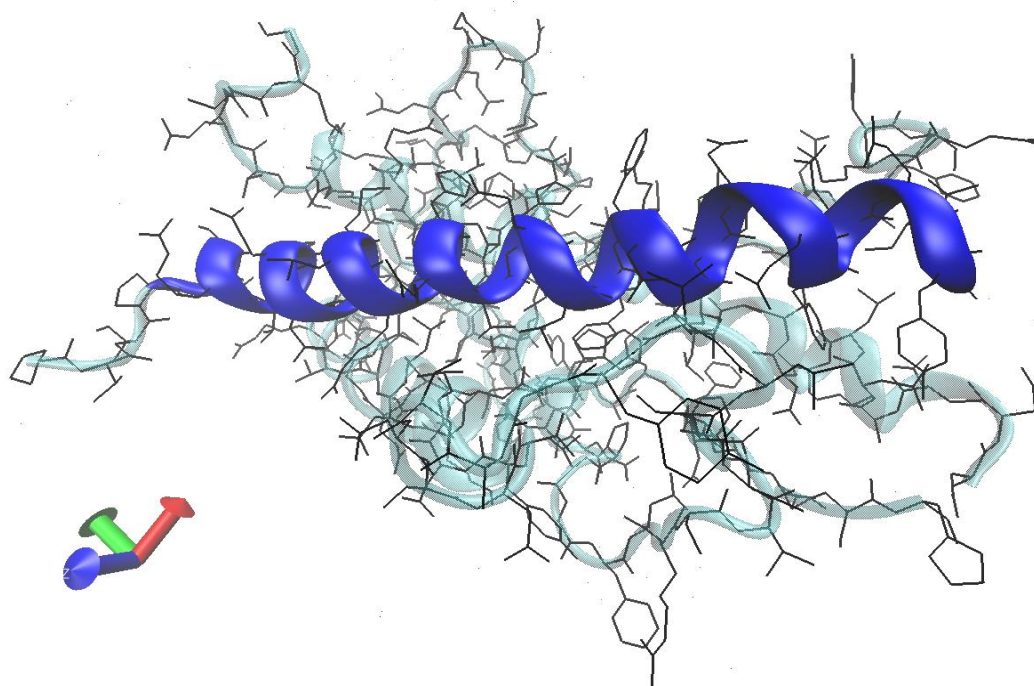
- 1hgu – ludzki hormon wzrostu, dla której struktura geometryczna została rozwiązana w wyniku badań krystalograficznych i udostępniona w PDB w 1995 roku [41]. Fragment α -helikalny złożony jest z sekwencji aminokwasów:

LSRLFQNAMLRAHRLHQLAFDTYEEFEEA.

Wybrane struktury referencyjne zawierają długi fragment α -helikalny, z którego obliczono średnie wartości kątów torsyjnych i średnie długości wiązań wodorowych. Niepewności pomiaru określono jako odchylenia standardowe. Uzyskane wartości porównano z pomierzonymi z geometrii modelowanych polipeptydów.



Rysunek 4.17. Wizualizacja struktury 1m47, z zaznaczonym referencyjnym fragmentem α -helikalnym (kolor niebieski).



Rysunek 4.18. Wizualizacja struktury 1hgu, z zaznaczonym referencyjnym fragmentem α -helikalnym (kolor niebieski).

Tabela 4.6. Wartości kątów torsyjnych dla każdego z aminokwasów α -helikalnych referencyjnych fragmentów struktur 1m47 i 1hgu

Aminokwas	1m47		Aminokwas	1hgu	
	ϕ [°]	ψ [°]		ϕ [°]	ψ [°]
SER	0	-42,4	LEU	-75,8	-24
THR	-66,0	-35,6	SER	-59,7	-38
LYS	-64,8	-40,5	ARG	-57,2	-19,5
LYS	-63,1	-39,5	LEU	-74,5	-55,7
THR	-66,7	-43,6	PHE	-51,7	-36,4
GLN	-60,8	-43,6	GLN	-63,1	-70,8
LEU	-63,42	-37,2	ASN	-39	-52,7
GLN	-65,4	-43,8	ALA	-61,7	-44,6
LEU	-63,5	-35,3	MET	-61,4	-52,9
GLU	-68,1	-38,7	LEU	-51,4	-58,1
HIS	-67,8	-38,4	ARG	-66,5	-27,9
LEU	-62,7	-44,5	ALA	-78,2	-26,2
LEU	-56,2	-49,9	HIS	-84,6	-30,9
LEU	-65,5	-37,2	ARG	-55,5	-23,4
ASP	-61	-45,2	LEU	-91,9	-34,7
LEU	-67,6	-38,9	HIS	-59	-40,6
GLN	-63,9	-36,8	GLN	-63,3	-35
MET	-63,1	-37,4	LEU	-82,1	-31,1
ILE	-66,8	-48,8	ALA	-71	-46,7
LEU	-59,8	-44,9	PHE	-71,2	-23,1
ASN	-62	-41,6	ASP	-58,7	-63,5
GLY	-62,4	-46,4	THR	-51,8	-39,3
ILE	-61,8	-42,2	TYR	-61,2	-55,1
ASN	-59,9	-21	GLU	-49,1	-55,8
ASB	-91,9	-1	GLU	-66,9	-42,5
			PHE	-54	-40,1
			GLU	-69,8	-39,9
			GLU	-66	-47,7
			ALA	-64,3	-2,7

Wartości średnie kątów torsyjnych dla referencyjnych struktur α -helikalnych to:

- $\phi_{1m47} = (-62,2 \pm 14,4)^\circ$, $\phi_{1hgu} = (-64,2 \pm 11,2)^\circ$,
- $\psi_{1m47} = (-39 \pm 10)^\circ$, $\psi_{1hgu} = (-40 \pm 15)^\circ$.

Tabela 4.7. Wartości odległości pomiędzy donorem a akceptorem wiązania wodorowego dla α -helikalnych referencyjnych fragmentów struktur 1m47 i 1hgu

1m47			1hgu		
Donor HB	Akceptor HB	Długość HB [Å]	Donor HB	Akceptor HB	Długość HB [Å]
SER	THR	3,272	LEU	PHE	3,652
THR	GLN	2,952	SER	GLN	2,820
LYS	LEU	2,994	ARG	ASN	2,784
LYS	GLN	3,132	LEU	ALA	3,095
THR	LEU	3,079	PHE	MET	2,950
GLN	GLU	2,928	GLN	LEU	2,893
LEU	HIS	3,033	ASN	ARG	3,052
GLN	LEU	2,983	ALA	ALA	2,592
LEU	LEU	2,859	MET	HIS	3,116
GLU	LEU	3,002	LEU	ARG	2,848
HIS	ASP	2,918	ARG	LEU	2,763
LEU	LEU	2,908	ALA	HIS	2,793
LEU	GLN	2,974	HIS	GLN	3,071
LEU	MET	2,941	ARG	LEU	3,825
ASP	ILE	3,318	LEU	ALA	3,460
LEU	LEU	3,088	HIS	PHE	2,836
GLN	ASN	2,749	GLN	ASP	2,765
MET	GLY	3,046	LEU	THR	3,118
ILE	ILE	2,900	ALA	TYR	2,731
LEU	ASN	2,933	PHE	GLU	3,059
ASN	ASB	3,317	ASP	GLU	3,360
			THR	PHE	3,359
			TYR	GLU	3,312
			GLU	GLU	3,843
			GLU	ALA	2,986

Wartości średnie odległości donor – akceptor dla referencyjnych struktur α -helikalnych to:

- $r_{1m47} = (3,0 \pm 0.1) \text{ \AA}$,
- $r_{1hgu} = (3,1 \pm 0.3) \text{ \AA}$.

Tabela 4.8. Porównanie parametrów geometrycznych modelowanych polipeptydów z α -helikalnymi referencyjnymi fragmentami struktur 1m47 i 1hgu

Struktura	ϕ [°]	ψ [°]	R_{D-A} [Å]
1m47	$-62,2 \pm 14,4$	-39 ± 10	$3,0 \pm 0,1$
1hgu	$-64,2 \pm 11,2$	-40 ± 15	$3,1 \pm 0,3$
dekaalanina ^{OG}	$-67,8 \pm 9,6$	$-39,4 \pm 8,6$	$3,3 \pm 0,9$
dekaalanina ^{MD}	-65 ± 10	-37 ± 13	$3,2 \pm 0,4$
AAKA(AEAAKA) ₅ AC ^{OG}	$-64,0 \pm 7,7$	-40 ± 6	$3,2 \pm 0,7$
AAKA(AEAAKA) ₅ AC ^{MD}	$-64,7 \pm 10,3$	-39 ± 11	$3,1 \pm 0,3$

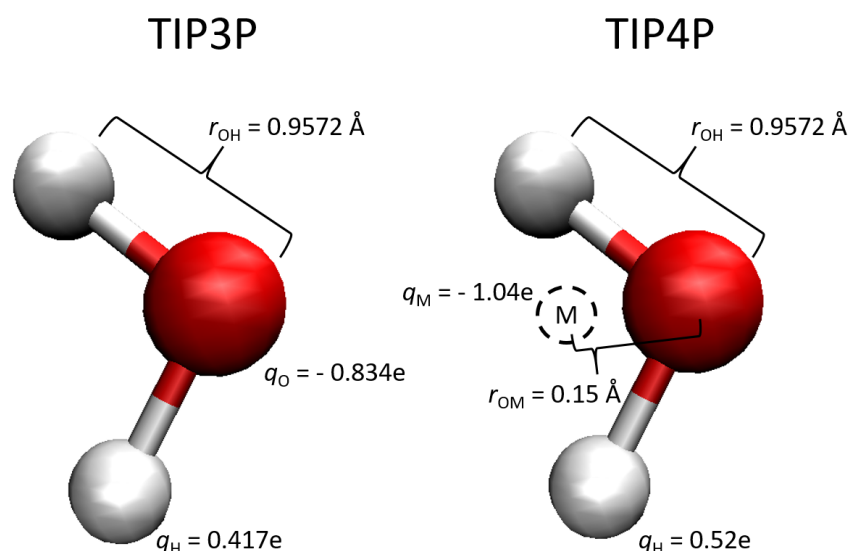
OG – wartości średnie uzyskane po optymalizacji geometrii, MD – wartości średnie uzyskane z symulacji wygrzewającej MD

Porównanie wyników pomiarów w Tabeli 4.8. przedstawia dużą zgodność geometrii modeli uzyskanych w rozprawie z α -helikalnymi fragmentami referencyjnymi wybranych struktur 1m47 i 1hgu. Odległości donor – akceptor wiązania wodorowego znajdują się dla wszystkich peptydów w akceptowalnym zakresie (2,5 Å – 3,5 Å). Kąty torsyjne są również zbliżone, jednakże dla dekaalaniny wartość ϕ jest najniższa. Różnice w kątach torsyjnych wynikają głównie z rodzaju i budowy poszczególnych aminokwasów – determinuje to upakowanie łańcucha polipeptydowego w przestrzeni, i tym samym wpływa na średnie wartości kątów w peptydzie. Średnia wartość kątów ϕ dla wszystkich alanin w peptydzie 1hgu wynosi $-(68,8 \pm 7,4)^\circ$, co jest wartością znacznie bliższą do wyznaczonej dla modelowanego peptydu dekaalaniny. Powyższe wskazuje, że uzyskane w wyniku modelowania molekularnego geometrie są zgodne z strukturami α -helikalnymi wyznaczonymi metodami krystalograficznymi.

4.5. Symulacje kontrolne

Celem wykonania symulacji kontrolnych, przeprowadzonych dla modelu peptydu AAKA(AEAAKA)₅AC, było określenie wpływu na wyniki symulacji następujących czynników: stosowanego modelu wody TIP3P, liczby powtórzeń symulacji SMD stosowanych w celach statystycznych oraz wartości zastosowanej stałej siłowej potencjału SMD.

Pole siłowe CHARMM zostało zoptymalizowane pod model wody TIP3P, niemniej możliwym jest przeprowadzenie symulacji w nowszym modelu wody TIP4P. Aby porównać parametry geometryczne przeprowadzono symulację wygrzewającą model peptydu w nowszym modelu wody, różniącym się od modelu TIP3P dodatkowym, wirtualnym atomem reprezentującym lepszy rozkład ładunku elektrostatycznego. Nowsze modele wody dają lepsze wyniki w przypadku symulacji ścian lub membran biomolekularnych, jednakże model TIP3P jest nadal szeroko stosowany w przypadku pojedynczych, niewielkich biomolekuł i jego zastosowanie powinno prowadzić do uzyskania poprawnej struktury peptydów [42]. W symulacji kontrolnej zastosowano tą samą temperaturę jak dla symulacji z użyciem modelu wody TIP3P $T = 300$ K, oraz czas symulacji $t = 2$ ns. Do kontroli temperatury użyto dynamikę Langevina. Jako strukturę wejściową użyto ponownie tą samą strukturę po optymalizacji geometrii, jak w przypadku symulacji modelu peptydu w środowisku wodnym reprezentowanym modelem TIP3P. Wielkość pudła periodycznego zastosowanego w symulacji ustalona została na identyczną jak uprzednio, tzn. $25 \cdot 165 \cdot 25.5$ Å³.



Rysunek 4.19. Schematyczna ilustracja różnicy pomiędzy modelami wody TIP3P i TIP4P. W modelu wody TIP4P stosuje się dodatkowy, wirtualny atom M, dla którego przypisuje się ładunek $-1,04 e$, odległy od atomu tlenu o $0,15 \text{ \AA}$. Modyfikacji ulegają w tym modelu w stosunku do TIP3P ładunki cząstkowe przy atomach wodoru oraz parametry Lennarda-Jonesa dla pary O-H.

Tabela 4.9. Porównanie parametrów geometrycznych modelowanych polipeptydów w modelu wody TIP3P i TIP4P

Model wody	Średnia odległość Akceptor – H [Å]	Średnia odległość Donor – Akceptor [Å]
TIP3P	$2,22 \pm 0,41$	$3,13 \pm 0,34$
TIP4P	$2,27 \pm 0,44$	$3,17 \pm 0,36$

Wyniki wskazują na nieznaczne różnice pomiędzy wyznaczonymi średnimi długościami wiązań wodorowych: $3,13 \text{ \AA}$ dla modelu TIP3P i $3,17 \text{ \AA}$ dla modelu TIP4P. Różnica wynosząca $0,04 \text{ \AA}$ jest niewielka, stanowi tylko $1,4\%$ wartości średniej długości wiązania wodorowego dla modelu TIP3P. Ponieważ różnice pomiędzy starszym modelem wody a nowszym są nieznaczne, a pole siłowe CHARMM zoptymalizowane zostało pod model starszy, w prezentowanych badaniach zdecydowano się na dalsze stosowanie modelu TIP3P jako poprawnie opisującego parametry geometryczne wiązań wodorowych.

W badaniach zastosowano 10 powtórzeń symulacji SMD w celu wyznaczenia średniej siły zrywającej wiązanie wodorowe i określenia błędu standardowego. Przeprowadzono serię krótkich, testowych 50 symulacji dla $v_{\text{SMD}} = 200 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ i długości $100\,000$ kroków MD (liczba wystarczająca do zarejestrowania piku siły rozwijającej; średni czas trwania 1 symulacji 1340 sekund) w tych samych warunkach (porównaj rozdział 6) i porównano wyniki w celu oceny wielkości obliczonej niepewności (tabela 4.10).

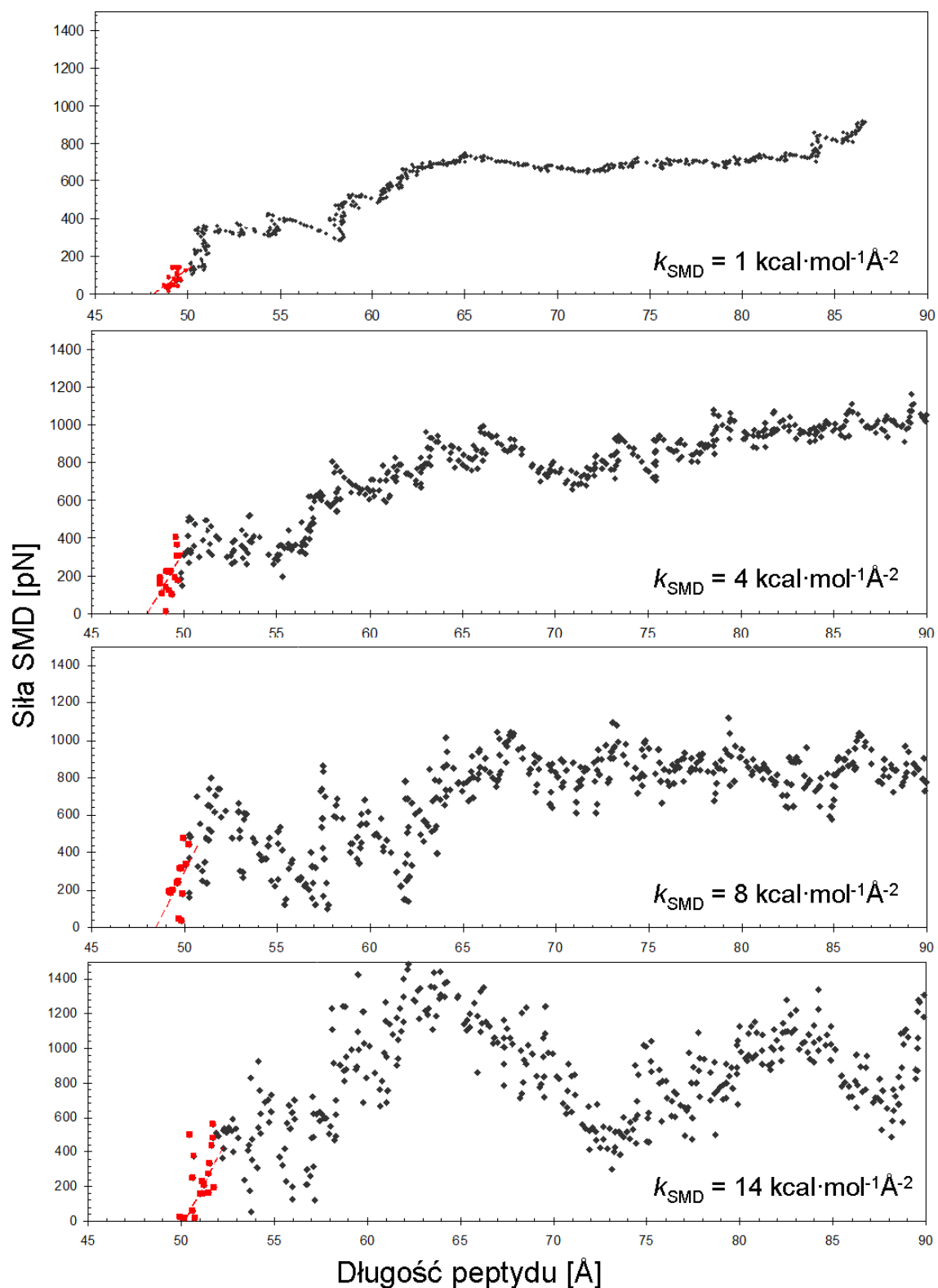
Tabela 4.10. Porównanie wyznaczonej siły zrywającej wiązanie dla serii 10 i 50 symulacji SMD dla przykładowej prędkości $v_{\text{SMD}} = 200 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$

Liczba symulacji	Wartość siły zrywającej [pN]	Łączny czas symulacji* [h]
10	480 ± 61	3.8
50	460 ± 15	19

*serie symulacji prowadzone na 5 procesorach stacji roboczej Dell T3600 16GB RAM, XEON E5-2620

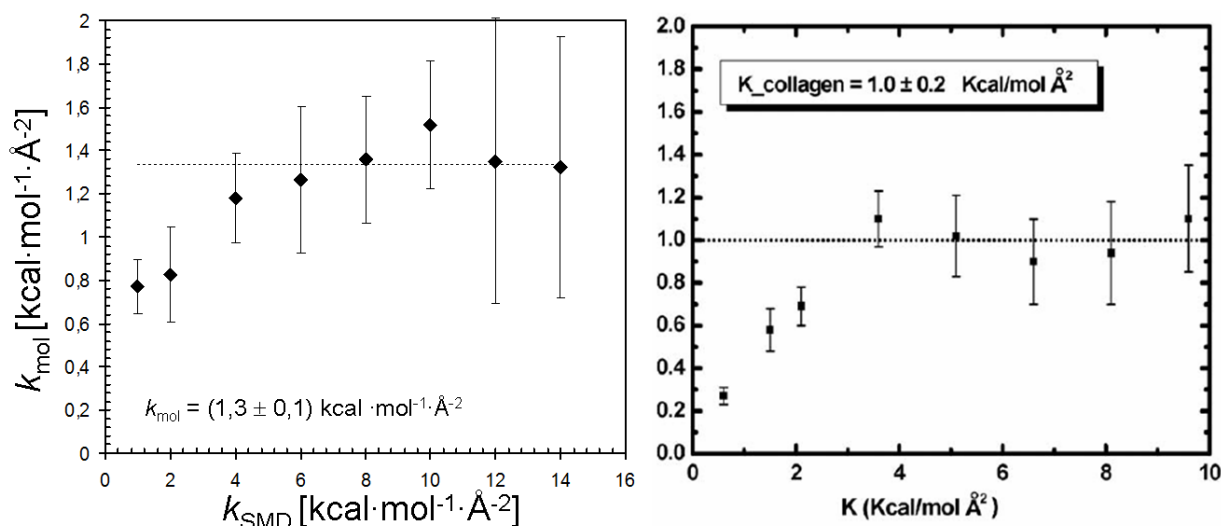
Wartość średnia siły zrywającej uzyskanej w testowej serii pomiarowej 10 symulacji nieznacznie różni się od wartości siły uzyskanej dla testowej serii pomiarowej 50 symulacji, jej różnica (20 pN) stanowi ok. 4% wartości uzyskanej średniej dla 10 symulacji. Odchylenie standardowe jest mniejsze dla serii 50 symulacji, niemniej koszt czasu prowadzenia symulacji wzrasta pięciokrotnie. W przypadku pełnych symulacji (ponad 100% rozciągnięcia peptydu) z prędkościami rozciągania niższymi już o rząd wielkości od testowej, zwiększenie liczby symulacji SMD spowoduje kilkukrotne zwiększenie czasu trwania symulacji przy różnicy kilku procent wartości wyznaczonej średniej siły zerwania. Z uwagi na powyższe, w celu skrócenia czasu prowadzenia obliczeń postanowiono pozostać przy 10 symulacjach o tych samych parametrach, jako liczbie wystarczającej do obliczeń średniej i oszacowania błędu wyznaczanych wartości.

Stosowana stała siłowa powinna być na tyle duża, aby za pomocą potencjału SMD peptyd był w stanie pokonać lokalne bariery podczas rozwijania się, nie powinna być jednak zbyt duża, gdyż wtedy siła działająca na peptyd będzie bardziej podatna na fluktuacje termiczne. Podobna amplituda oscylacji termicznych będzie powodować większą zmienność siły. W celu wyznaczenia zakresu wartości stałych siłowych w prowadzonym eksperymencie obliczeniowym, przeprowadzone zostały serie symulacji SMD z różnymi wartościami stałych siłowych: $k_{\text{SMD}} = 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12$ i $14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$. Dla każdej stałej siłowej wykonano serię 10 symulacji rozciągania peptydu z prędkością $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, w temperaturze 300 K o długości 100 ps (rysunek 4.20).



Rysunek 4.20. Przykładowe profile rejestrowanej siły SMD w funkcji wydłużenia badanego peptydu AAKA(AEAAKA)₅AC dla symulacji SMD z $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ i czterech różnych stałych siłowych k_{SMD} . Kolorem czerwonym zaznaczono punkty pomiarowe dotyczące wartości siły SMD w zakresie wydłużenia do 1 Å, linią przerywaną przedstawiono regresję liniową wykonaną na podstawie tego zakresu danych.

Z każdej symulacji, z zależności siły SMD od wydłużenia peptydu wyznaczona została za pomocą regresji liniowej stała sprężystości peptydu k_{mol} (wartość wyznaczono z 1 Å wydłużenia peptydu). Niepewność pomiarową oszacowano na podstawie błędów standardowych dla każdej z serii symulacji. Wyniki symulacji zostały porównane z analogicznymi obliczeniowymi dla modelu kolagenu zaprezentowanymi przez A. C. Lorenzo *et all* [43]. Podobnie jak w przypadku kolagenu (rysunek 4.21), wartości stałych siłowych potencjału SMD mniejsze niż 4 kcal·mol⁻¹Å⁻² okazały się niewystarczające, aby pokonać lokalne bariery potencjału i spowodować widoczne zerwanie wiązań wodorowych. Stałe siłowe SMD począwszy od 4 kcal·mol⁻¹Å⁻² pozwalają na widoczne stopniowe zrywanie wiązań wodorowych i pokonywanie lokalnych barier potencjału, co prezentują wyraźne piki siły występujące w profilach zależności siły SMD od wydłużenia molekuly. Stosowanie stałych siłowych większych niż 10 kcal·mol⁻¹Å⁻² powodują wzrost szumu w sygnale, przez co wyznaczone wartości stałych sprężystości molekuly obciążone są większym błędem. Podobnie jak dla kolagenu, w przypadku badanego peptydu zakresem stosowalności stałych siłowych potencjału SMD pozwalającym na pokonywanie lokalnych barier i uzyskiwaniu niskiego poziomu szumu w sygnale jest zakres od 4 do 10 kcal·mol⁻¹Å⁻², dla którego średnia wartość $k_{\text{mol}} = (1,3 \pm 0,1)$ kcal·mol⁻¹Å⁻².



Rysunek 4.21. Zależność wyznaczonej stałej sprężystości badanego peptydu AAKA(AEAAKA)₅AC (lewy wykres) oraz kolagenu [43] (prawy wykres) w funkcji zastosowanej stałej siłowej potencjału SMD w symulacjach.

5. Wpływ sieci wiązań wodorowych na sztywność i stabilność α -helisy

W poniższym rozdziale zawarto wyniki dwóch typów symulacji – metodą dynamiki molekularnej oraz metodą sterowanej dynamiki molekularnej, zarówno dla modelu dekaalaniny z pełnym opisem elektrostatycznym wiązań wodorowych, jak i dla modelu ze zredukowanymi wiązaniami wodorowymi. Porównanie wyników obu serii symulacji umożliwiło pokazanie wpływu sieci wiązań wodorowych na stabilność struktury drugorzędowej α -helikalnego peptydu oraz na oszacowanie udziału wiązań wodorowych w sztywności modelowanego peptydu.

5.1. Sieć wiązań wodorowych w dekaalaninie

Zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale czwartym modelowana dekaalanina posiada α -helikalną strukturę, możliwą dzięki istnieniu sześciu wiązań wodorowych pomiędzy aminokwasami. Symulacja wygrzewająca dekaalaniny w temperaturze $T = 300$ K o czasie trwania $t = 500$ ps pozwoliła określić własności sieci tych wiązań. Sieć ta może być zobrazowana za pomocą schematu przedstawionego na rysunku 5.1.

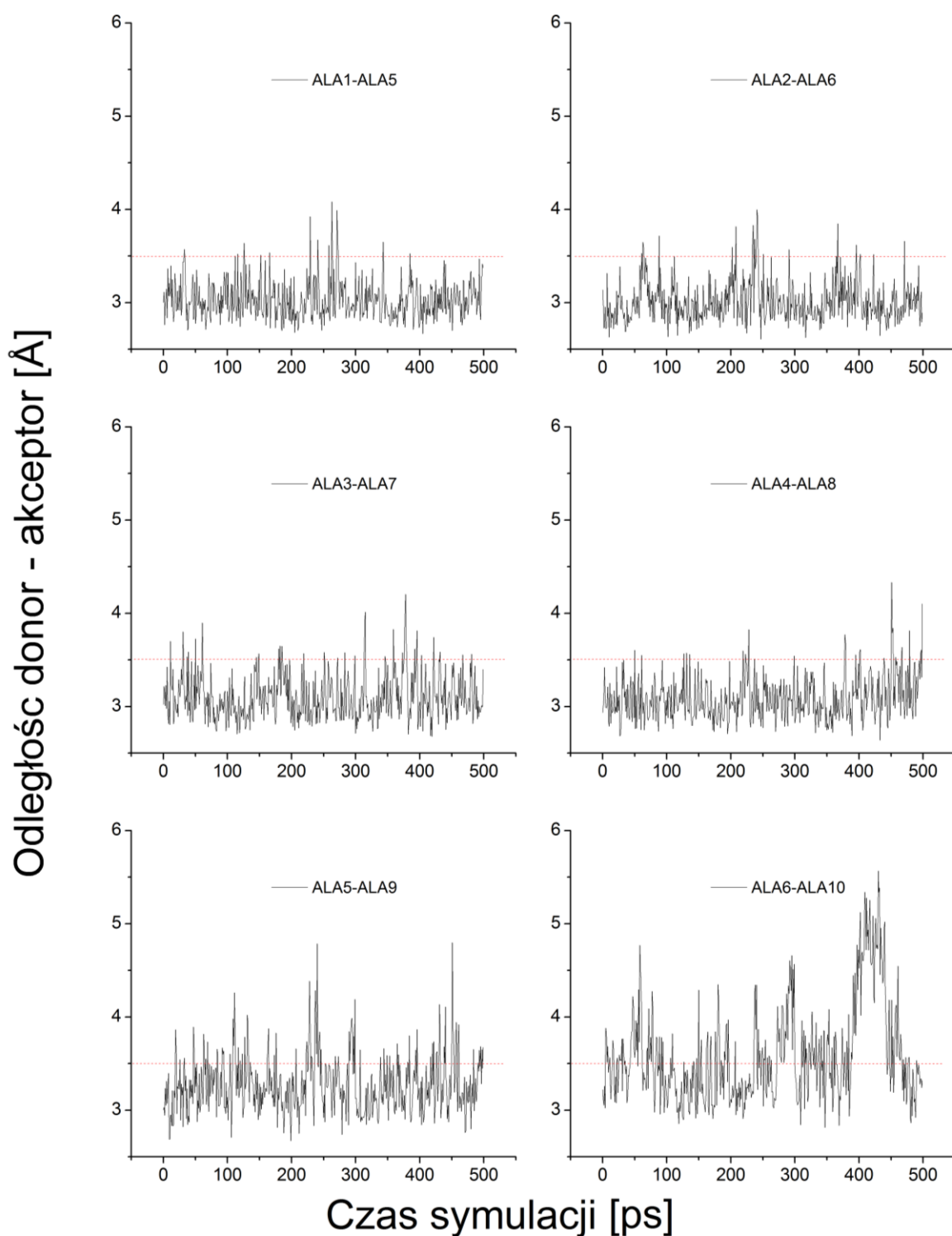


Rysunek 5.1. Schemat sieci wiązań wodorowych pomiędzy poszczególnymi aminokwasami modelowanej dekaalaniny.

Tabela 5.1. Długości wiązań wodorowych w modelu dekaalaniny uzyskane z symulacji wygrzewającej dynamiki molekularnej. O oznacza atom tlenu, N atom azotu, ALA – aminokwas alaninę

Wiązanie	Akceptor	Donor	Średnia długość wiązania [Å]
1	ALA1 – O	ALA5 – N	$3,03 \pm 0,21$
2	ALA2 – O	ALA6 – N	$3,01 \pm 0,22$
3	ALA3 – O	ALA7 – N	$3,11 \pm 0,25$
4	ALA4 – O	ALA8 – N	$3,09 \pm 0,23$
5	ALA5 – O	ALA9 – N	$3,27 \pm 0,31$
6	ALA6 – O	ALA10 – N	$3,59 \pm 0,53$

Średnia długość wiązań wodorowych w symulacji wygrzewającej wynosi $(3,2 \pm 0,4)$ Å. Średnia długość wiązań 1–5 podczas symulacji nie przekroczyła 3,5 Å, natomiast dynamicznie okazało się wiązanie 6, którego średnia długość przekroczyła umowną granicę. Wynik ten jest zgodny z przedstawionymi obliczeniami w rozdziale 4.1.

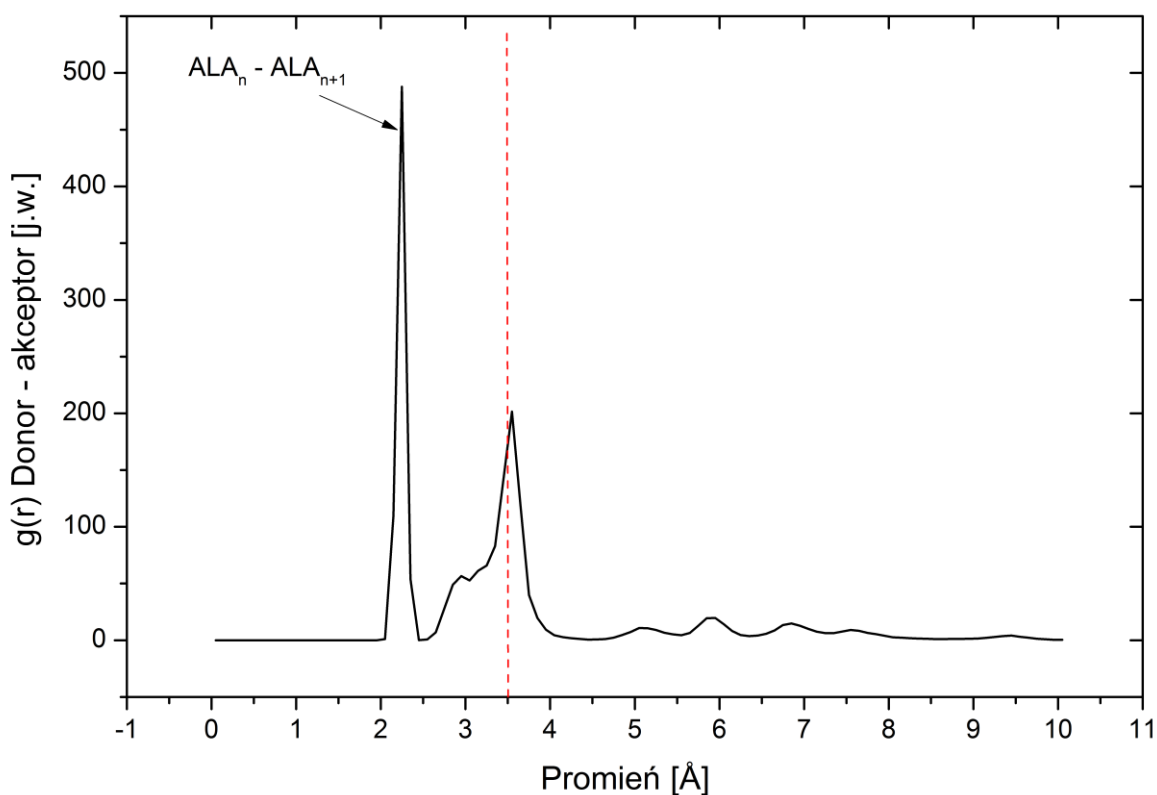


Rysunek 5.2. Odległości donor – akceptor pomiędzy aminokwasem i a $i+4$ dla sześciu wiązań wodorowych w funkcji czasu trwania symulacji wygrzewającej MD. Linia czerwoną zaznaczono umowną granicę długości wiązania wodorowego.

Rysunek 5.2 przedstawia zmiany długości wszystkich sześciu wiązań w funkcji czasu trwania symulacji wygrzewającej. Wiązania wodorowe 1 – 4 przez większość symulacji mają długość poniżej granicznej, wiązania 5 i 6 są bardziej dynamiczne. Dla wszystkich wiązań można zaobserwować

zjawisko zerwania się wiązania i ponowne wiązanie (ang. *rebinding*) – zjawisko to jest powszechne i charakterystyczne dla wiązań wodorowych w peptydach, które są układami dynamicznymi w realnych warunkach. W większości przypadków zerwanie wiązania trwało kilka – kilkanaście pikosekund, z wyjątkiem wiązania 6, dla którego czas zerwania wynosił nawet kilkadziesiąt pikosekund.

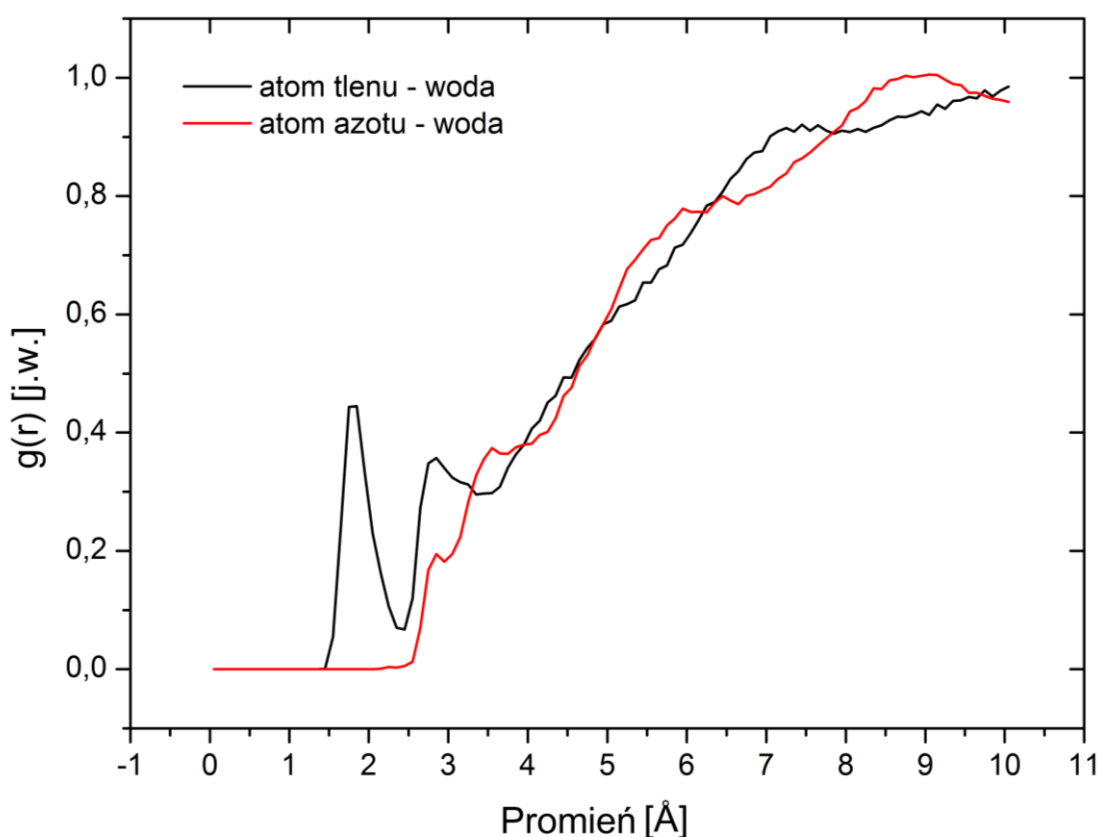
Rozkład odległości pomiędzy wybranymi atomami w cząsteczce zobrazować można również za pomocą funkcji radialnej dystrybucji par $g(r)$ (ang. *Radial distribution function* lub *pair correlation function*), która opisuje zmianę gęstości w funkcji odległości od referencyjnej cząsteczki lub atomu. Rysunek 5.3 przedstawia funkcję $g(r)$ pomiędzy atomami tlenu i azotu modelowanej dekaalaniny wykonanej w zakresie odległości od 0 do 10 Å z krokiem 0,05 Å.



Rysunek 5.3. Funkcja radialnej dystrybucji par dla odległości donor – akceptor wiązań wodorowych dla trajektorii uzyskanej z symulacji MD dekaalaniny. Linia czerwona zaznaczono umowną granicę długości wiązania wodorowego.

Funkcja $g(r)$ wskazuje na dwa wyraźne maksima w funkcji odległości – maksimum dla $r = 2,25$ Å oraz $r = 3,55$ Å. Pierwsze maksimum związane jest z obecnością w molekuły wiązania peptydowego – atom tlenu w alaninie n znajduje się w odległości ok. 2,25 Å od atomu azotu w alaninie $n+1$. Drugie maksimum znajduje się blisko umownej granicy długości wiązania wodorowego, 3,5 Å. Funkcja gęstości wyraźnie rośnie w przedziale od $r = 2,5$ Å do $r = 3,5$ Å, a następnie maleje do $r = 4$ Å. Występowanie większej gęstości w tym zakresie odległości pomiędzy donorem a akceptorem wskazuje między innymi na istnienie wiązań wodorowych pomiędzy odpowiednimi atomami azotu i tlenu.

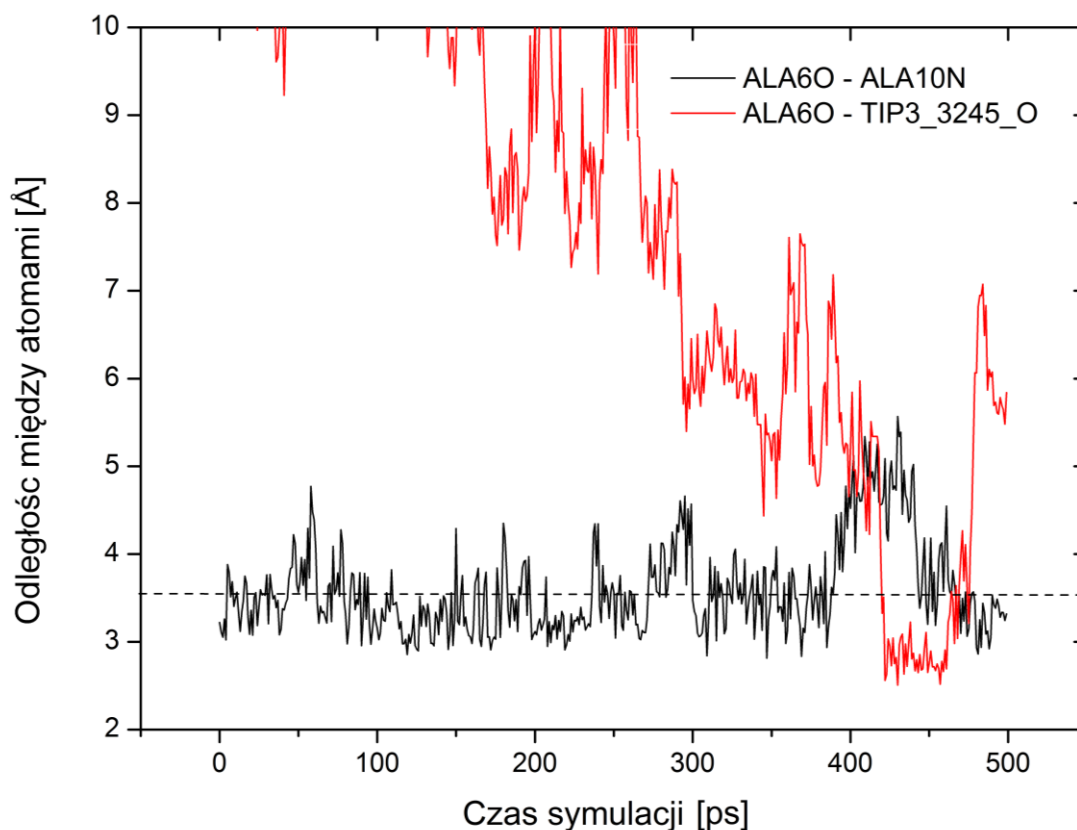
Pamiętając o zjawisku zrywania się wiązania wodorowego i ponownego odtwarzania warto posłużyć się funkcją radialnej dystrybucji par, aby stwierdzić czy możliwym jest utworzenie wiązania wodorowego z molekułami wody – rozpuszczalnika, który otacza modelowany peptyd. Woda jako rozpuszczalnik tworzy sieć wiązań wodorowych pomiędzy sobą, i podobnie jak w peptydach, sieć ta podlega ciągłym zdarzeniom zrywania i odtwarzania wiązań wodorowych. Chwilowe oddziaływanie molekuly wody z peptydem może dodatkowo stabilizować jego strukturę drugorzędową poprzez utrzymywanie peptydu w pewnej quasi-stałej konformacji poprzez oddziaływania z molekułami rozpuszczalnika. Na rysunku 5.4. przedstawiono funkcję radialnej dystrybucji par dla odległości woda (środek masy molekuly wody) – atom tlenu i azotu, wyznaczoną z trajektorii uzyskanej z symulacji wygrzewającej dekaalaniny. Analiza funkcji gęstości $g(r)$ wskazuje na istnienie maksimum w odległości $r = 1,80 \text{ \AA}$ dla par molekula wody – atom tlenu. Wskazuje to wyraźnie na możliwość pojawienia się wiązania wodorowego pomiędzy jedną z cząsteczek wody a atomem tlenu w peptydzie.



Rysunek 5.4. Funkcja radialnej dystrybucji par dla odległości woda – atom tlenu (czarny) i azotu (czerwony) dla trajektorii uzyskanej z symulacji MD dekaalaniny.

Analiza symulacji wygrzewającej wskazuje, że faktycznie dochodzi do sytuacji, w której atom tlenu nieuczestniczący w wiązaniu wodorowym w peptydzie wiąże się za pomocą tego typu oddziaływania z molekułą wody. Przykładowe zdarzenie tego typu zobrazowano na rysunku 5.5, kiedy atom tlenu z alaniny szóstej (ALA6) oddziałuje z molekułą wody tworząc chwilowe wiązanie wodorowe. Na rysunku zobrazowano odległości między donorami a akceptorami – odległość pomiędzy

nimi spada do 2,6 Å w czasie, w którym atom tlenu z szóstej alaniny nie jest związany wiązaniem wodorowym z alaniną numer dziesięć (odległość między tlenem ALA6O a azotem ALA10N wzrasta do ok. 4 – 5 Å w czasie 425 – 475 ps). W przypadku tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy atomem donora w peptydzie a atomem akceptora w wodzie widać wyraźnie, że taka sytuacja jest bardzo mało prawdopodobna, co też jest uzasadnione budową molekuł wody.



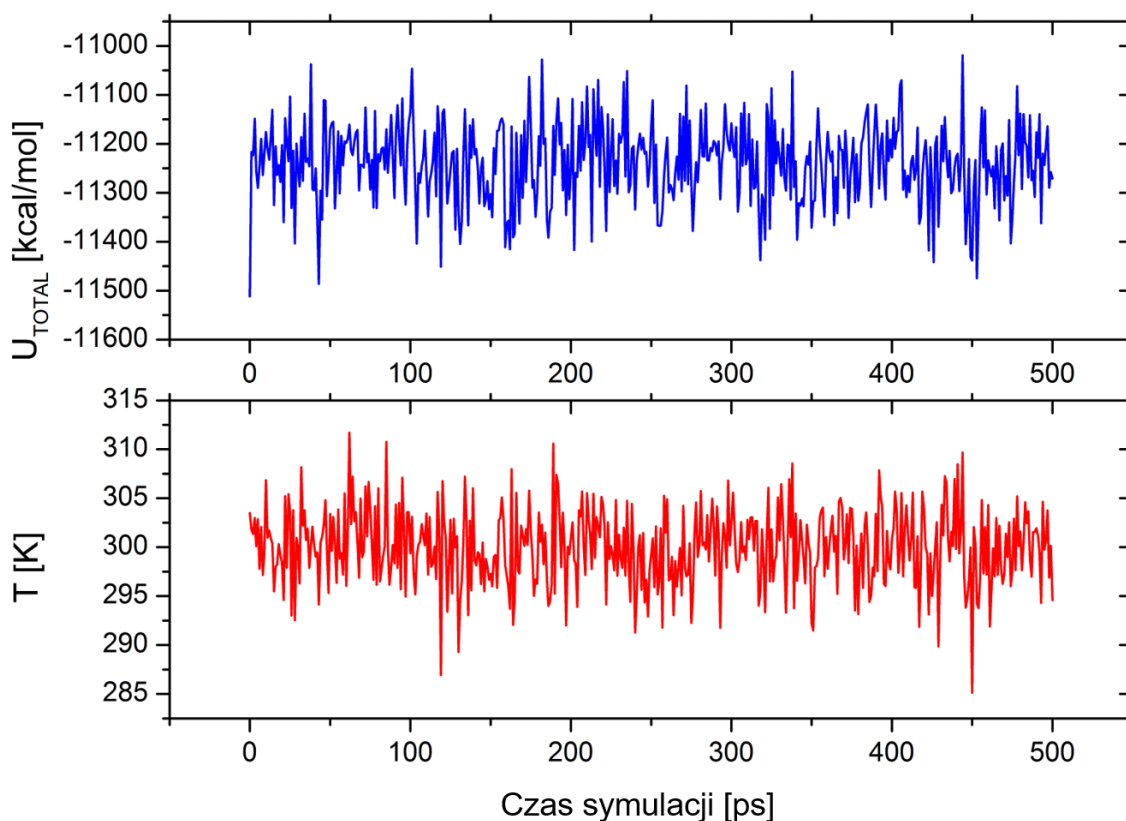
Rysunek 5.5. Odległości pomiędzy donorem a akceptorem szóstego wiązania wodorowego w dekaalaninie (tlen w alaninie 6 i azot w alaninie 10) oraz pomiędzy atomami tlenu w alaninie 6 i sąsiedniej molekułce wody, tworzącej krótkotrwałe wiązanie wodorowe z peptydem. Linia przerywana zaznacza umowną granicę długości wiązania wodorowego.

5.2. Symulacje dynamiki molekularnej modeli dekaalaniny z i bez sieci wiązań wodorowych

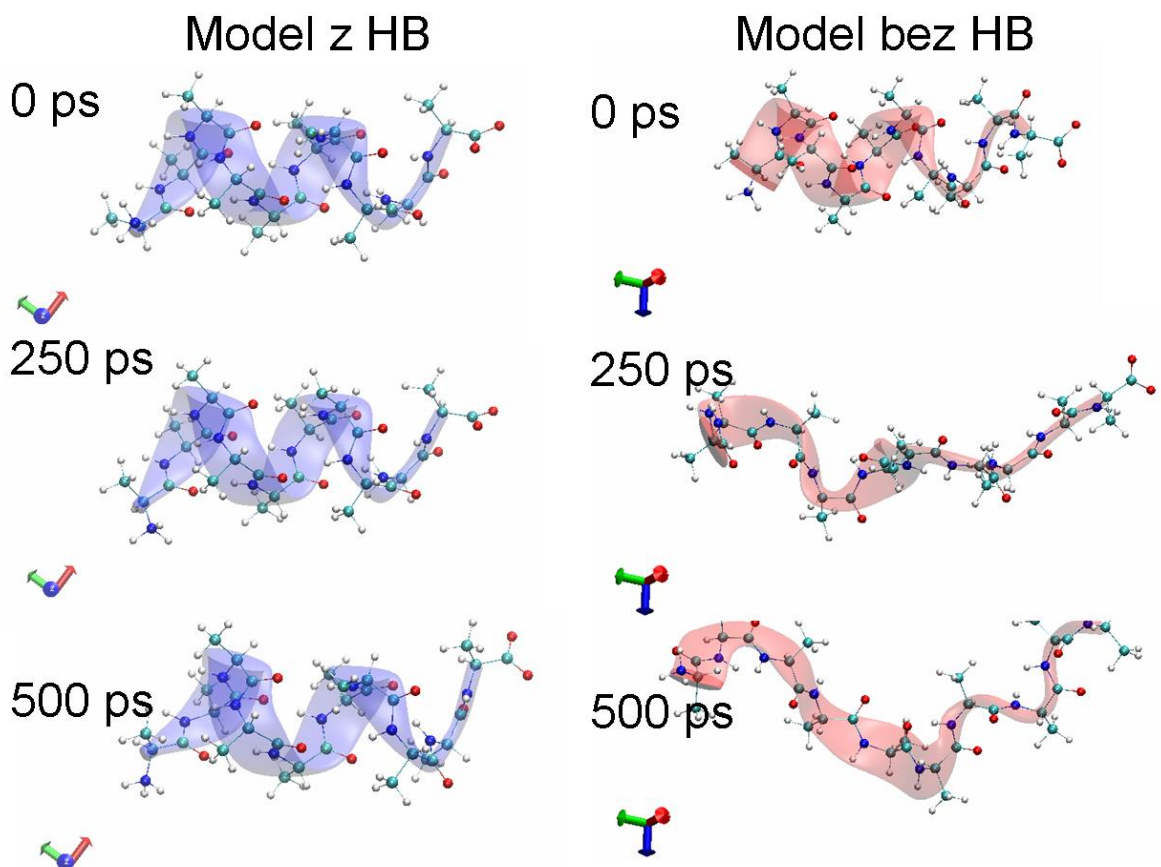
W celu oceny roli wiązań wodorowych w stabilności α -helisy wykonano symulacje dynamiki molekularnej dekaalaniny z modelem zredukowanych wiązań wodorowych (rozdział 4.2) i porównano ją z symulacją dynamiki molekularnej dekaalaniny bez zredukowanych wiązań wodorowych. Symulacje prowadzone były w tych samych warunkach tj. temperaturze symulacji $T = 300$ K i periodycznym pudle wypełnionym molekułkami wody. Jako początkową geometrię przyjęto tę samą strukturę początkową (te same położenia atomów peptydu i wody), jaką użyto do symulacji wygrzewającej modelu dekaalaniny po optymalizacji geometrii. Czas symulacji był taki sam jak dla MD wygrzewającej dekaalaniny $t = 500$

ps. Symulacje porównano starając się pokazać i określić różnice w zmianach strukturalnych zachodzących dla modelu bez zredukowanych wiązań (model z HB) oraz dla modelu ze zredukowanymi wiązaniami wodorowymi (model bez HB) za pomocą wizualizacji zmian w strukturze, algorytmu STRIDE, analizy długości wiązań wodorowych i parametru RMSD.

W celu weryfikacji poprawności zachowania się modelu bez HB podczas symulacji monitorowano stabilność energii całkowitej układu i temperatury (rysunek 5.6). Średnia temperatura podczas symulacji wynosiła (300 ± 4) K i nie odbiegała od ustalonej wartości. Natomiast średnia energia całkowita układu wynosiła $-11\,240$ kcal·mol⁻¹ i była wyższa od średniej energii całkowitej uzyskanej w analogicznej symulacji MD dla modelu z HB ($-11\,500$ kcal·mol⁻¹, rozdział 3.1). Wyższa energia sugeruje, że symulowany układ z modelem bez HB powinien być mniej stabilny niż model z HB, co też zostało pokazane w dalszej części rozdziału.



Rysunek 5.6. Przebieg temperatury (czerwona krzywa) oraz energii całkowitej układu (niebieska krzywa) dla modelu bez wiązań wodorowych w symulacji MD o czasie trwania 500 ps.

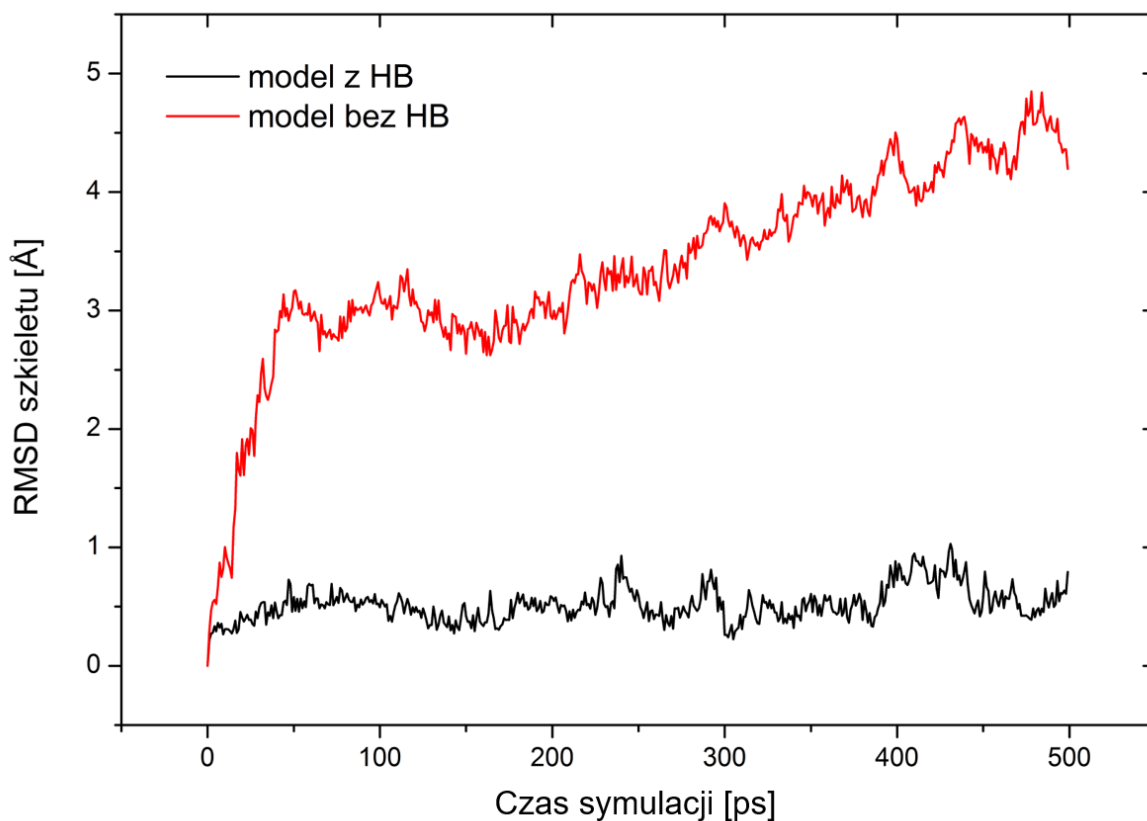


Rysunek 5.7. Wizualizacja zmian strukturalnych zachodzących podczas trwania symulacji MD modelu dekaalaniny z pełnym uwzględnieniem wiązań wodorowych (model z HB, niebieska wstęga) i ze zredukowanymi wiązaniami wodorowymi (model bez HB, czerwona wstęga). Widoczny jest proces rozwijania się α -helisy dla modelu bez HB, podczas gdy struktura modelu z HB jest stabilna w trakcie trwania symulacji.

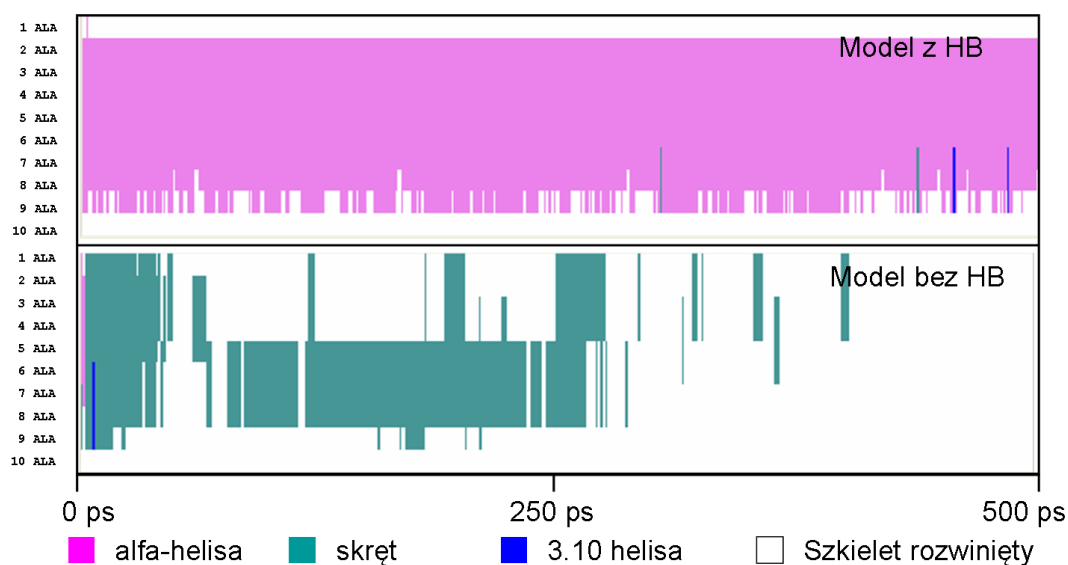
Modelowany brak wiązań wodorowych powoduje utratę stabilności i rozwijanie się struktury, co również widoczne jest podczas monitorowania RMSD szkieletu peptydu, będącego w tym przypadku miarą średniego odchylenia położenia atomów od swojej średniej pozycji w przestrzeni:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2} \quad 5.1$$

gdzie N – liczba atomów w molekuale, δ – odległość pomiędzy atomem i w danej ramce symulacji a atomem i w strukturze referencyjnej (początkowej). W przypadku analizy parametru RMSD strukturą referencyjną jest struktura wejściowa do symulacji modelu bez HB. RMSD dla modelu z HB oscyluje wokół poziomu 0,5 Å, co jest związane z drganiami termicznymi peptydu. RMSD modelu bez HB wyraźnie wzrasta w czasie pierwszych 50 ps symulacji do 3 Å, co wskazuje na gwałtowną utratę stabilności i zanikanie konformacji α -helikalnej. W dalszej części symulacji RMSD powoli wzrasta, wskazując na dalsze rozwijanie się peptydu, na co również wskazują wyniki uzyskane za pomocą algorytmu STRIDE (rysunek 5.9).



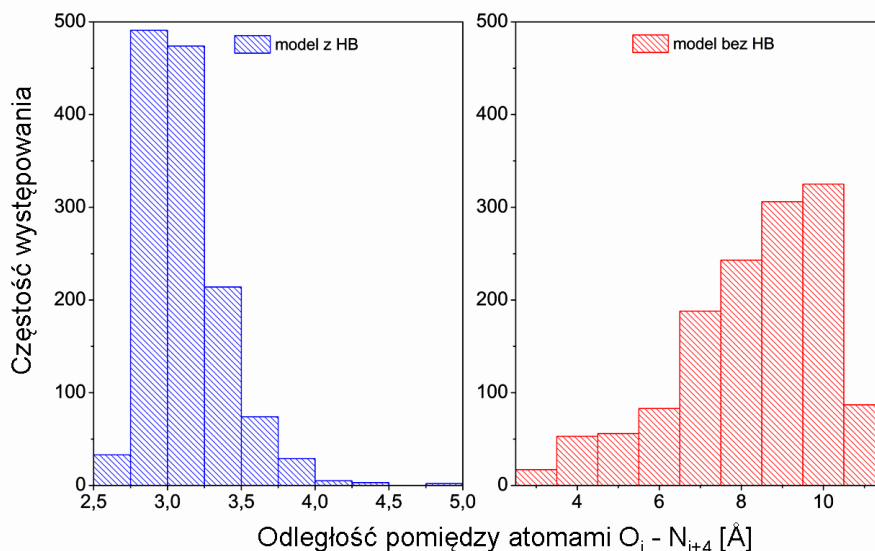
Rysunek 5.8. Porównanie RMSD dla atomów szkieletu peptydu dla modelu z HB (czarny) i bez HB (czerwony) podczas symulacji MD.



Rysunek 5.9. Ilustracja identyfikacji drugorzędowej struktury uzyskanej dla modelu z HB (górną mapą) oraz modelu bez HB (dolną mapą) podczas 500 ps symulacji MD w stałej temperaturze $T = 300$ K.

Podobnie jak w przypadku RMSD, algorytm STRIDE pokazuje szybkie rozwijanie się peptydu ze zredukowanymi wiązaniami wodorowymi. Brak oddziaływań przyciągających powoduje rozwinięcie się α -helisy do struktury drugorzędowej typu skręt w przeciągu kilku pikosekund (kolor zielony),

a następnie do całkowitego rozwinięcia (kolor biały). Podczas trwania symulacji pojawiają się bloki peptydu (4 – 5 aminokwasów) utrzymujących geometrię typu skręt, jednakże po 300 ps struktura wyraźnie się rozwija i traci strukturę drugorzędową. Wskazuje na to także zupełnie odmienny rozkład odległości pomiędzy tlenem z aminokwasu i a azotem z aminokwasu ($i+4$) wchodzącymi w skład par atomów zdolnych do utworzenia wiązań wodorowych (rysunek 5.10).



Rysunek 5.10.. Histogram wartości odległości donor – akceptor w uzyskanej geometrii modelu z HB (kolor niebieski) i bez HB (kolor czerwony) podczas 500 ps symulacji wygrzewającej MD. Analizowano wiązania wodorowe pomiędzy atomami tlenu O aminokwasu i a atomami azotu N aminokwasu $i+4$.

Dla modelu z HB najczęściej występujące wartości długości wiązania wodorowego występują w okolicy 3 Å (średnia długość dla 500 ps symulacji wygrzewającej 3,1 Å; patrz rozdział 3.1). Histogram dla modelu bez HB znacznie odbiega od powyższych danych. Ponieważ peptyd cały czas rozwijał się podczas symulacji, odległości pomiędzy atomami tlenu z aminokwasu i a azotu z aminokwasu $i+4$ rosły, osiągając po 500 ps symulacji najczęstsze wartości ok. 10 Å, wskazując na rozwinięcie się peptydu. Powyższe wyniki zgadzają się z danymi uzyskanymi z algorytmu STRIDE.

Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują, że wiązania wodorowe mają decydujący wpływ na stabilność struktury drugorzędowej. Model bez HB już po kilku ps symulacji traci α -helikalną strukturę drugorzędową, co zostało potwierdzone za pomocą algorytmu STRIDE. Wzrasta kilkukrotnie dynamika szkieletu peptydu, co obrazuje RMSD. Energia symulowanego układu zawierającego model bez HB jest wyższa, niż dla modelu z HB. Przedstawione dane wskazują jednoznacznie, że bez obecności wiązań wodorowych, modelowanych w zastosowanym polu siłowym głównie za pomocą oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy odpowiednimi atomami, nie jest możliwe istnienie stabilnej struktury α -helikalnej.

5.3. Symulacje sterowanej dynamiki molekularnej modeli dekaalaniny z i bez sieci wiązań wodorowych

W celu wyznaczenia wpływu wiązań wodorowych na sztywność α -helikalnej struktury drugorzędowej wykonano szereg symulacji SMD dla modelu dekaalaniny z siecią HB i dla modelu bez HB, dla różnych prędkości rozciągania peptydu tj. 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 i 400 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. W symulacjach użyto temperatury $T = 300\text{ K}$ oraz stałej siłowej potencjału SMD $4\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$. Jako struktury wejściowe do obliczeń posłużyło 10 wybranych struktur dekaalaniny z ostatnich 100 ps symulacji wygrzewającej w temperaturze 300 K. Dla każdej z prędkości wykonano 20 symulacji SMD – 10 dla modelu z HB i 10 dla modelu bez HB. Dodatkowo, w celu weryfikacji wyników symulacji w stałej temperaturze wykonano jedną serię 10 symulacji z prędkością rozciągania 100 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ w stałej temperaturze i pod stałym ciśnieniem 1 bara, również z wykorzystaniem analizowanego modelu dekaalaniny.

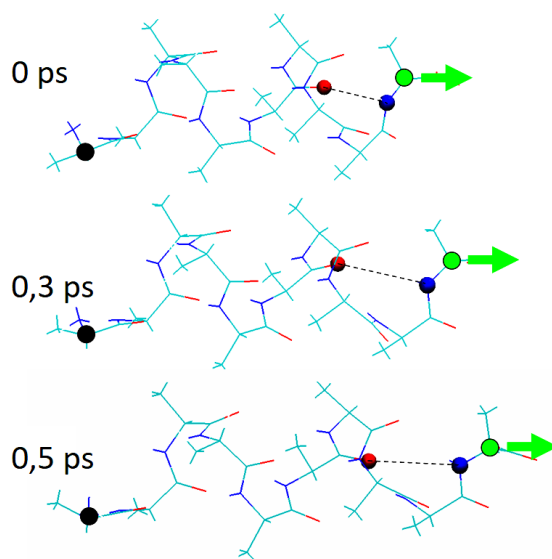
Tabela 5.2. Parametry symulacji SMD dla modelu z HB i bez HB w zależności od prędkości v_{SMD} dla symulacji rozciągania w stałej temperaturze $T = 300\text{ K}$

Prędkość SMD [m/s]	Czas symulacji [ps]	Wydłużenie molekuly [\AA]	
		Model z HB	Model bez HB
5	5	8	8,5
10	0,5	5	6
50	2	13,5	14,1
100	0,5	3	3,6
150	0,5	4,6	5,6
200	0,25	2,1	2,8
250	0,25	2,8	3,6
300	1,5	4,6	5,6
350	1,5	5,5	6,6
400	1,2	4,6	5,5

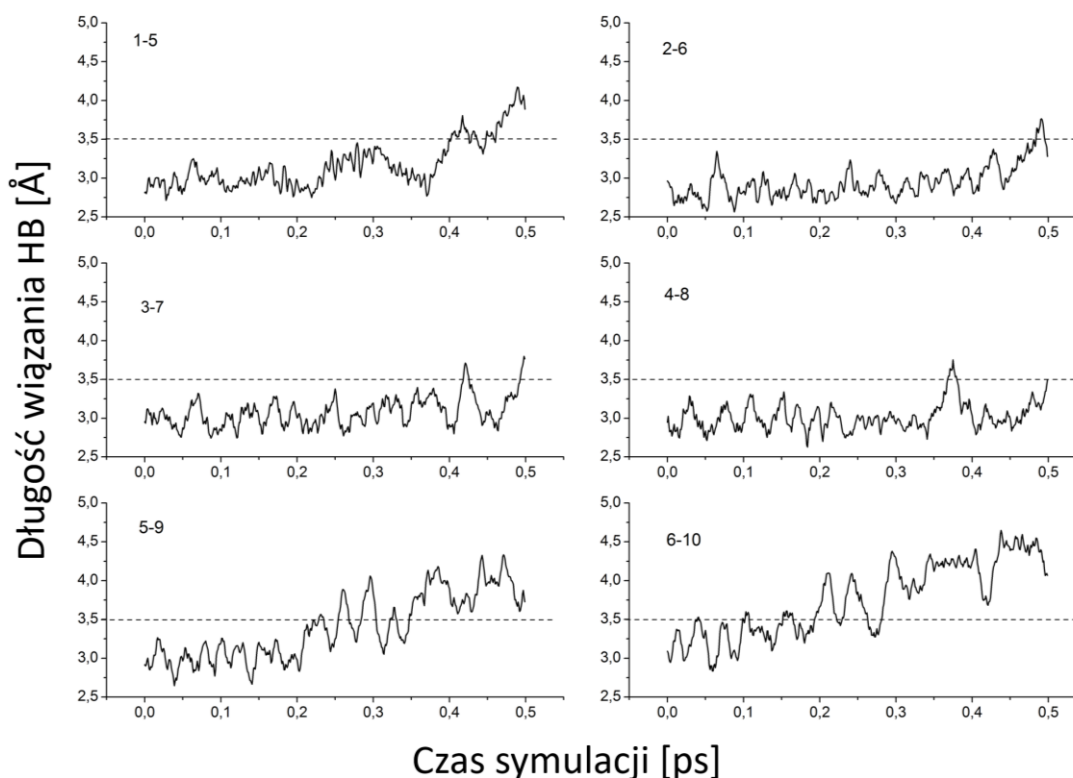
Parametry symulacji dobrano tak, aby rozciągnąć modele o minimum 2 \AA . W przypadku prowadzonego eksperymentu nie było potrzeby prowadzenia obliczeń do momentu całkowitego rozciągnięcia, co pozwoliło ograniczyć czas obliczeniowy. Dla każdej z uzyskanych trajektorii wyznaczono wydłużenie peptydu i siłę SMD rejestrowaną podczas symulacji rozciągania peptydu. Za pomocą regresji liniowej wyznaczono sztywność peptydu zakładając, że podczas rozciągania w zakresie 1 \AA α -helikalny peptyd zachowuje się zgodnie z prawem Hooke'a. Dokonano porównania średnich sztywności dla modelu z HB i modelu bez HB dla wszystkich prędkości SMD, przy czym chcąc określić wpływ wiązań wodorowych na sztywność podczas braku rozciągania czy naprężenia zewnętrznego ($v_{\text{SMD}} = 0\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) zastosowano metodę regresji liniowej dla uzyskanych średnich sztywności. Punkty przecięcia prostych dla modelu z HB i modelu bez HB posłużyły do wyznaczenia wpływu wiązań wodorowych na sztywność α -helisy zdefiniowanej jako:

$$C [\%] = \frac{k_{\text{HB}} - k_{\text{no HB}}}{k_{\text{HB}}} \cdot 100 \% \quad 5.2$$

gdzie k_{HB} oznacza stałą sprężystości modelu z HB, $k_{\text{no HB}}$ oznacza stałą sprężystości modelu bez HB. Symulacje SMD (rozdział 2.3) pozwalają na dokonanie wirtualnego eksperymentu polegającego na rozciąganiu badanej molekuly ze stałą, ustaloną prędkością. W przypadku dekaalaniny, zgodnie ze schematem postępowania w tego typu symulacjach, wybrano jeden z końcowych atomów modelu jako nieruchomy w przestrzeni (atom C_{α} aminokwasu 1), a następnie kolejny jako atom, do którego został przyłożony potencjał SMD (atom C_{α} aminokwasu 10). W ten sposób, atom C_{α} aminokwasu 10 przemieszczał się w przestrzeni zgodnie z działającym na niego potencjałem SMD, który przyłożony był pomiędzy wspomnianym atomem a wirtualnym atomem poruszającym się z zadaną prędkością v_{SMD} . Wybór atomów szkieletu peptydu C_{α} podyktowany był potrzebą bezpośredniego działania potencjału SMD na szkielet peptydu, którego kąty torsyjne odpowiadają za strukturę α -helikalną. Podczas rozciągania w takiej sytuacji zachodzi nie tylko rozciąganie wiązań, ale przede wszystkim zmiany w kątach torsyjnych, co obrazuje proces stopniowego rozwijania się peptydu. Rysunek 5.11 obrazuje przykładowy wynik jednej z 10 symulacji rozciągania modelu z HB dla prędkości rozciągania $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.



Rysunek 5.11. Wizualizacja symulacji rozciągania dekaalaniny, modelu z HB dla trzech wybranych momentów symulacji, tj. 0 ps, 0,3 ps i 0,5 ps. Kolory atomów oznaczają: czarny – atom C_{α} aminokwasu 1, unieruchomiony w przestrzeni, zielony – atom C_{α} aminokwasu 10, do którego przyłożony jest potencjał SMD, czerwony – atom tlenu O aminokwasu 6, niebieski – atom azotu N aminokwasu 10. Linia przerywaną zaznaczono wiązanie wodorowe pomiędzy atomem ALA6O a ALA10N. Ilustracja wykonana dla przykładowej, jednej z 10 symulacji SMD dla modelu z HB dla prędkości $V_{\text{SMD}} = 100 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

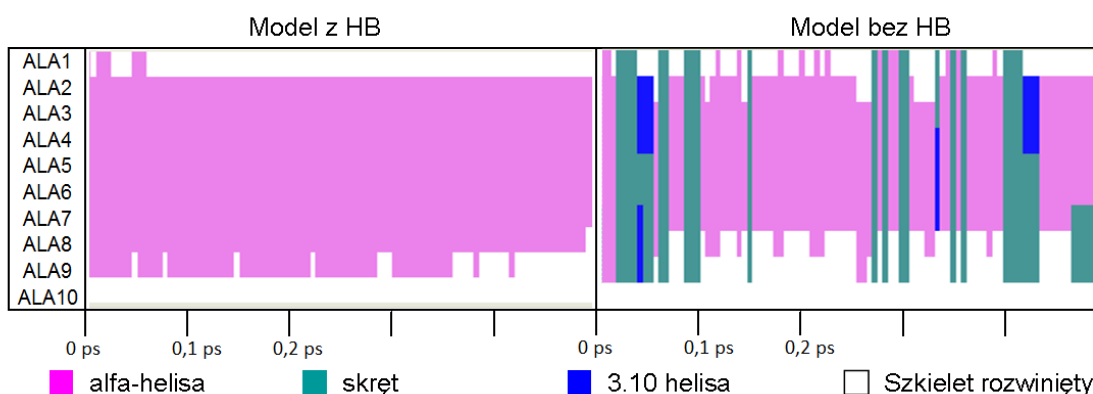


Rysunek 5.12. Zmiany odległości pomiędzy atomami tlenu z aminokwasu i a azotu z aminokwasu $(i+4)$. Wyniki z przykładowej, jednej z 10 symulacji SMD dla modelu z HB dla prędkości $V_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Rysunek 5.11 i 5.12 obrazują stopniowe rozciąganie się modelu dekaalaniny dla jednej z symulacji SMD. We wszystkich symulacjach w badanym zakresie prędkości SMD zauważalny jest podobny proces, mianowicie rozwijanie się modelu peptydu od jego końców podczas rozciągania. Zmiany odległości pomiędzy atomami tlenu z aminokwasu i a azotu z aminokwasu $(i+4)$ pokazują, że zerwane jako pierwsze jest ostatnie wiązanie wodorowe, pomiędzy aminokwasami 6 a 10 – długość wiązania wodorowego przekroczyła umowną granicę $3,5 \text{ \AA}$ po raz pierwszy po $0,05 \text{ ps}$ symulacji. Następnym wiązaniem, które ulega zerwaniu jest wiązanie przedostatnie pomiędzy aminokwasami 5 a 9, które przekracza umowną granicę długości po ok. $0,2 \text{ ps}$. Widać zatem że model peptydu rozwijany jest stopniowo od końca peptydu, do którego przyłożono potencjał SMD, z tym, że dla obu wiązań wodorowych zanim zostaną trwale zerwane zachodzi zjawisko odtwarzania zerwanych wiązań wodorowych. Przykładowe wyniki dla jednej z dziesięciu symulacji dla prędkości $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (rysunek 5.12) pokazują oscylacje wokół umownej granicy długości wiązania $3,5 \text{ \AA}$:

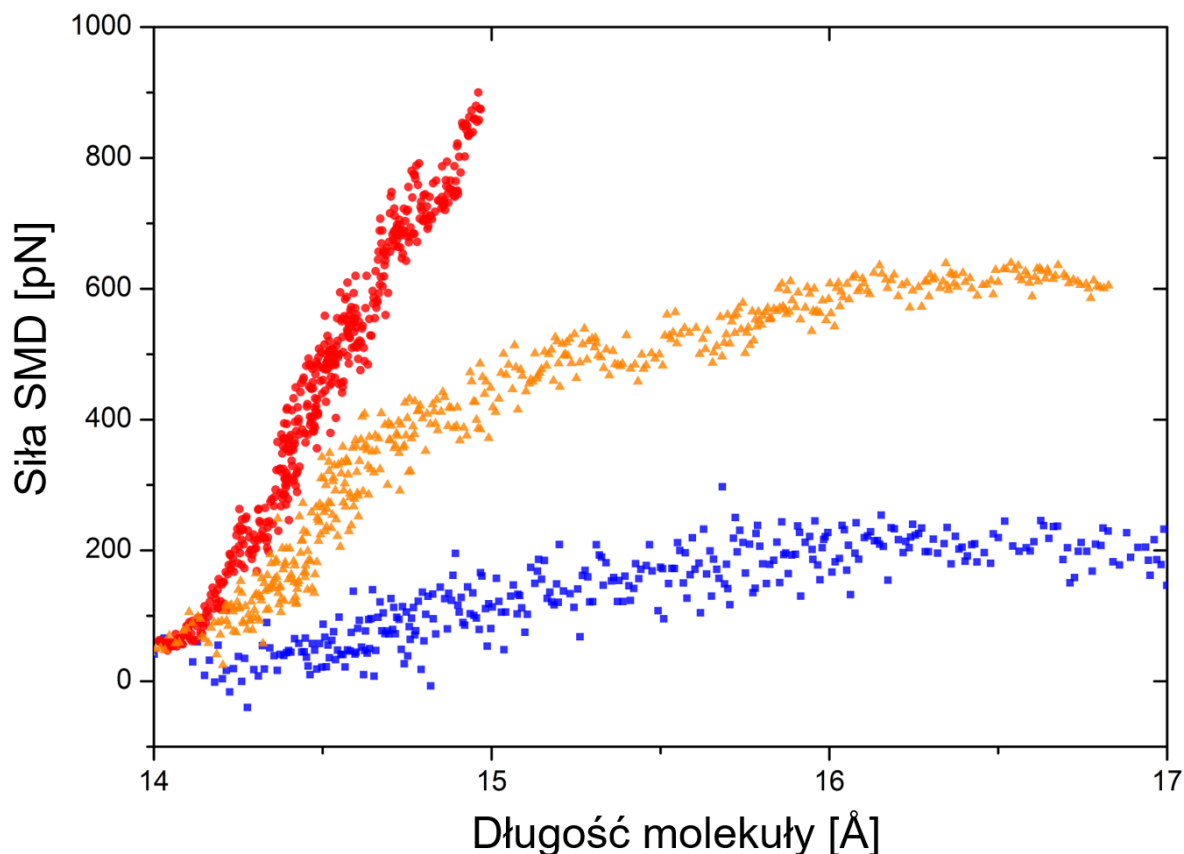
- dla wiązania 6 – 10 do $0,3 \text{ ps}$, po których wiązanie jest trwale zerwane;
- dla wiązania 5 – 9 od $0,2 \text{ ps}$ do $0,35 \text{ ps}$, po których wiązanie jest trwale zerwane;
- pozostałe wiązania przekraczają umowną granicę $3,5 \text{ \AA}$ w okolicy $0,4 \text{ ps}$, niemniej wiązania wodorowe 2 – 6, 3 – 7 i 4 – 8 po przekroczeniu tej długości wykazują tendencję do utworzenia ponownie wiązania wodorowego.

Podobne zachowanie się wiązań wodorowych występuje w pozostałych symulacjach, tj. zrywanie się wiązań wodorowych od końca modelu. Wyróżnić można zakresy, w których występuje zjawisko odtwarzania zerwanych wiązań, zwłaszcza dla wiązań 6 – 10 i 5 – 9 dla najniższych prędkości v_{SMD} . Im niższa prędkość SMD, tym wolniej peptyd jest rozciągany i tym większa szansa na zerwanie i ponowne zawiązanie się wiązania wodorowego – peptyd ma więcej czasu na zmianę konformacji i zminimalizowanie energii szkieletu peptydu poprzez utworzenie wiązania wodorowego. Podobne wnioski można wyciągnąć analizując wyniki uzyskane za pomocą algorytmu STRIDE (rysunek 5.13), który obrazuje zmiany konformacji w rozciągającym peptydzie. Dla modelu z HB i przykładowej symulacji widać stopniowe zanikanie α -helikalnej struktury dla aminokwasu dziewiątego.



Rysunek 5.13. Zmiany struktury drugorzędowej podczas symulacji rozciągania modelu z i bez HB. Wyniki uzyskane z przykładowej, jednej z 10 symulacji SMD dla modelu z HB dla prędkości $V_{SMD} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

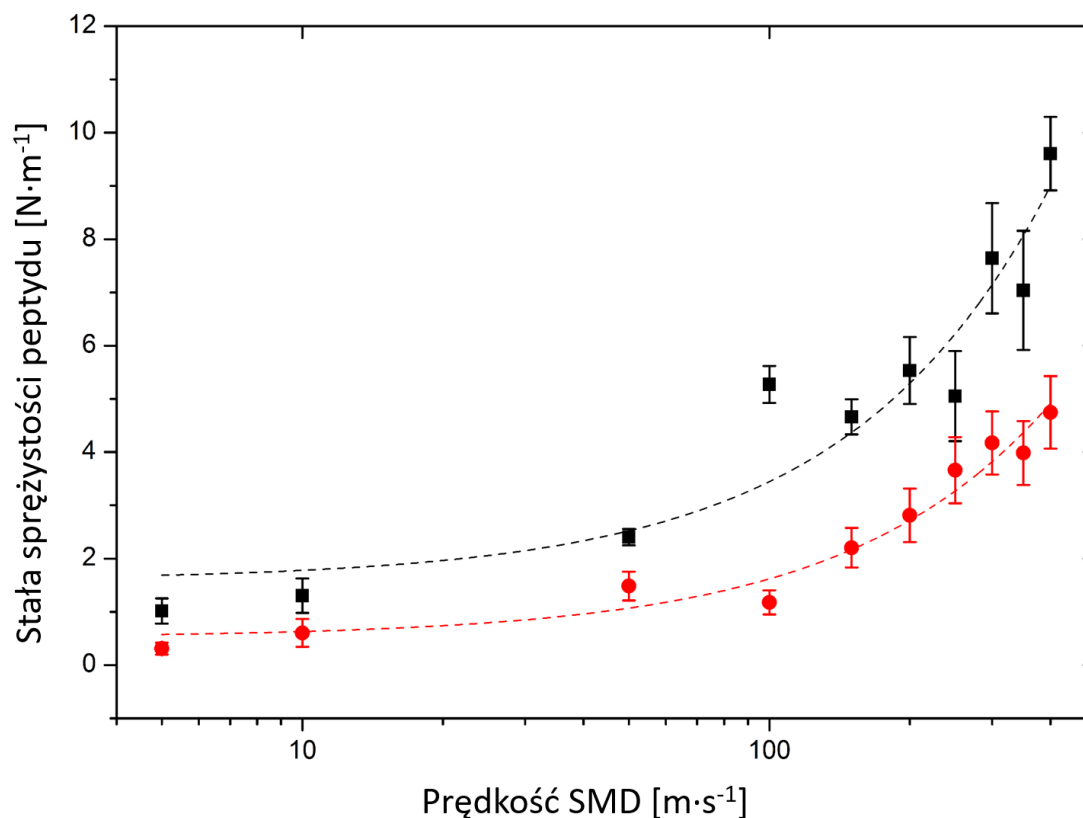
Porównanie zmian strukturalnych w modelu z HB i bez HB pokazuje, że modelowane redukowanie wiązań wodorowych, podobnie jak dla symulacji dynamiki molekularnej daje podobne efekty tj. samoistne rozwijanie się struktury α -helikalnej i to w bardzo krótkich czasach. Rysunek 5.13 przedstawia dynamiczne zmiany w strukturze drugorzędowej takiego peptydu, który z początkowej α -helikalnej struktury potrafi zmienić konformację na typ skręt, lub 3.10 helisy w przeciągu zaledwie 0,1 ps. Tutaj proces rozciągania peptydu i jego rozwijania jest znacznie bardziej chaotyczny i losowy, przy czym zaczyna się również od końców modelu. Dla każdej z symulacji modelu z HB i bez HB rejestrowana była siła SMD oraz wydłużenie się modelu peptydu podczas rozciągania. Rysunek 5.14 przedstawia uśrednione dane zależności siły w funkcji wydłużenia dla trzech przykładowych prędkości SMD: $v_{SMD} = 10, 100 \text{ i } 400 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.



Rysunek 5.14. Średnie wartości siły SMD z 10 symulacji SMD dla modelu z HB dla trzech przykładowych prędkości SMD: $V_{\text{SMD}} = 10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (niebieskie kwadraty), $V_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (pomarańczowe trójkąty) i $V_{\text{SMD}} = 400 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwone koła).

Wartość siły zależna jest od prędkości SMD, im wyższa prędkość rozciągania peptydu tym wyższe wartości siły obserwujemy w komputerowym eksperymencie. Wyniki te są zgodne z obserwowanymi eksperymentalnie zależnościami siły adhezji lub siły oddziaływań białko – ligand w funkcji szybkości – odpowiednio – separacji ostrza AFM od badanej powierzchni lub separacji molekuł, co też zostanie dokładniej opisane w rozdziale 6 [23,24,31].

Dla początkowego zakresu 14–15 Å zależność wzrostu siły od wydłużenia jest w dużej mierze liniowa, dlatego też dla każdej z 10 symulacji dla wybranej prędkości dla modelu z HB lub bez HB wyznaczono współczynnik kierunkowy prostej z regresji liniowej, odpowiadający za stałą sprężystości molekuly. Dane z 10 symulacji pozwoliły na wyznaczenie średniej stałej sprężystości dla danej prędkości SMD, dla modelu z i bez HB (rysunek 5.15).



Rysunek 5.15. Zależność średnich stałych sprężystości dla modelu z HB (kolor czarny) i bez HB (kolor czerwony) od prędkości rozciągania v_{SMD} . Liniami przerywanymi zaprezentowano regresję liniową, służącą do wyznaczenia ekstrapolowanych wartości stałych sprężystości dla $v_{\text{SMD}} = 0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Niepewności pomiarowe zostały określone jako błąd standardowy.

Wraz ze wzrostem prędkości SMD, wartość wyznaczonej średniej stałej sprężystości rośnie, co widoczne było już przy analizie średnich profili zależności siły od wydłużenia modelowanych peptydów. Co ważniejsze, średnie stałe sprężystości dla modelu z HB są wyższe od średnich stałych sprężystości dla modelu bez HB w całym zakresie badanych prędkości. Chcąc opisać wpływ wiązań wodorowych na stałą sprężystości dekaalaniny w sytuacji stacjonarnej, w której peptyd nie jest rozciągany i poddawany zewnętrznym naprężeniom, wykorzystano metodę regresji liniowej do danych eksperymentalnych i za jej pomocą wyznaczono ekstrapolowane wartości stałych sprężystości dla $v_{\text{SMD}} = 0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, czyli dla przypadku, kiedy na modelowany peptyd nie działa siła zewnętrzna. Parametry regresji liniowej przedstawione zostały w tabeli 5.3.

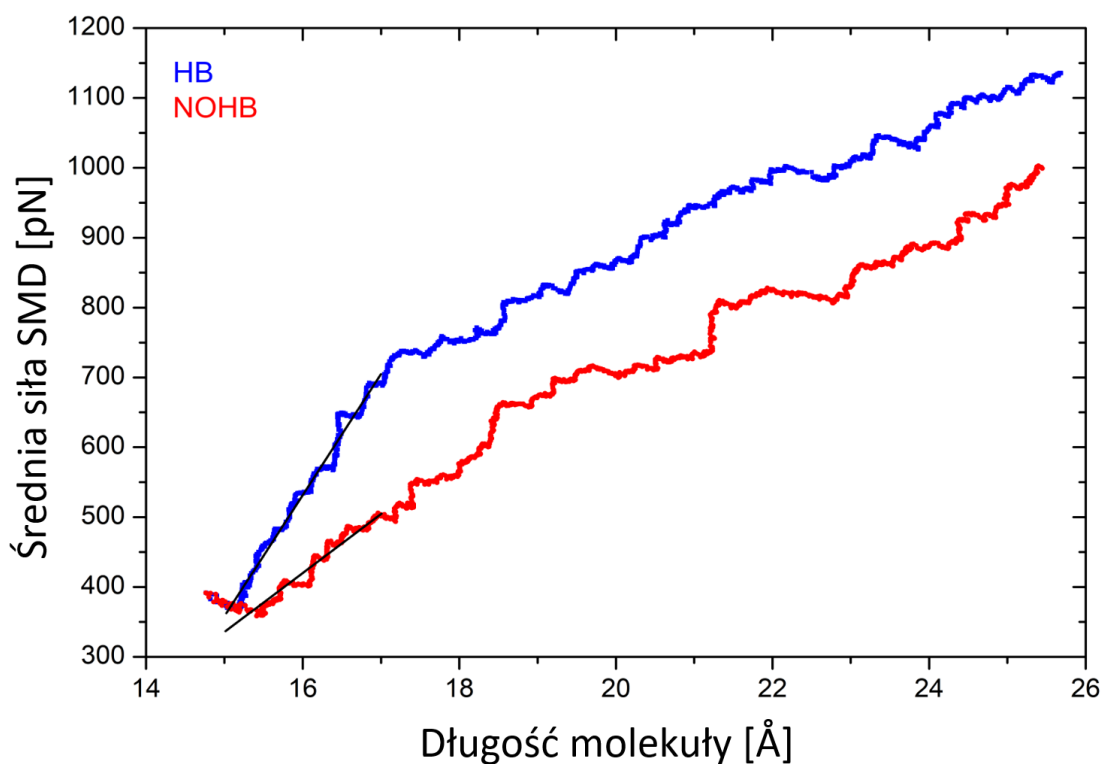
Tabela 5.3. Parametry regresji liniowej średnich stałych sprężystości w funkcji prędkości rozciągania v_{SMD} dla modelu z HB i bez HB

Model	Punkt przecięcia b	Błąd standardowy δb	Wsp. kierunkowy a	Błąd standardowy δa	R^2
z HB	1,594	0,505	0,019	0,002	0,946
bez HB	0,520	0,179	0,011	0,008	0,980

Stała sprężystości modelu z HB w stanie stacjonarnym (bez zewnętrznej siły działającej na peptyd) wynosi $k_{\text{HB}} = (1,6 \pm 0,5) \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, natomiast dla modelu ze zredukowanymi wiązaniami wodorowymi $k_{\text{noHB}} = (0,52 \pm 0,18) \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. Współczynniki dopasowania R^2 prostej do danych eksperymentalnych są wysokie, wskazując że wyniki uzyskane z dopasowania funkcją liniową można traktować wiarygodnie. W dalszej części obliczeń wykorzystano zaproponowaną metodę obliczeniową (wzór 5.2) w celu wyznaczenia udziału wiązań wodorowych w sztywności badanego modelu peptydu. Średnia wartość udziału wyniosła $C \approx 67\%$ dla temperatury 300 K zastosowanej w symulacjach SMD. Należy pamiętać, że udział wiązań wodorowych w sztywności α -helisy jest szacunkowy i w realnych warunkach będzie zależny nie tylko od temperatury, ale również od otoczenia molekuly, np. pH ośrodka czy obecności jonów lub cząsteczek mogących wpływać na wiązania wodorowe. Prezentowane wyniki wskazują jednak, że wiązania wodorowe stanowią istotny, a nawet dominujący, wkład w sztywność i stabilność α -helikalnego polipeptydu.

W celu weryfikacji wyników symulacji SMD przeprowadzonych w warunkach izotermicznych bez utrzymywania stałego ciśnienia (czyli bez zastosowania barostatu), wykonano jedną serię symulacji w stałej temperaturze oraz stałym ciśnieniu (z zastosowaniem barostatu), również z wykorzystaniem komórki PBC oraz zaproponowanego modelu z i bez HB. Podobnie jak w przypadku symulacji bez barostatu, wykonano najpierw optymalizację geometrii, podgrzewanie układu, następnie dynamikę molekularną ($T = 300 \text{ K}$, $p = 1 \text{ bar}$) i symulacje SMD ($10 \times v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, $T = 300 \text{ K}$, $p = 1 \text{ bar}$) dla modelu z i bez HB. RMSD modelu bez sieci wiązań wodorowych wzrasta do prawie 3 \AA po czasie 100 ps symulacji MD, przewyższając około pięciokrotnie dynamikę łańcucha głównego peptydu z obecnością sieci wiązań wodorowych. Wskazuje to na szybką destabilizację struktury drugorzędowej, podobnie jak w przypadku symulacji bez barostatu. W tym przypadku również wyznaczono profile średniej siły w funkcji wydłużenia peptydu z 10 symulacji SMD. Następnie, dla każdego profilu dla modelu z HB oraz modelu bez HB wyznaczono współczynnik kierunkowy prostej z regresji liniowej, odzwierciedlający stałą sprężystości molekuly (rysunek 5.16). Podobnie jak w symulacjach bez barostatu, początkowy zakres rozciągania ($1 - 2 \text{ \AA}$) ma charakter liniowy, a kąt nachylenia prostej dla serii bez HB jest niższy niż dla serii z HB. Wyznaczona stała sprężystości modelu z HB wynosi $k_{\text{HB}} = (1,74 \pm 0,01) \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, natomiast dla modelu bez HB $k_{\text{noHB}} = (0,84 \pm 0,01) \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. Współczynniki dopasowania R^2 prostej do danych eksperymentalnych są wysokie (0.99 i 0.97 dla odpowiednio krzywych średniej siły SMD w funkcji wydłużenia peptydu z i bez HB), wskazując że wyniki uzyskane z dopasowania funkcją liniową można traktować wiarygodnie. Podobnie jak dla symulacji bez barostatu wykorzystano zaproponowaną metodę obliczeniową (wzór 5.2), w celu wyznaczenia i oceny udziału wiązań wodorowych w sztywności badanego modelu peptydu. Dla powyższych danych dla prędkości rozciągania $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ $C \approx 51\%$. Prezentowane wyniki są zbieżne z poprzednimi symulacjami SMD wykonanymi w warunkach nie-izobarycznych i potwierdzają,

że wiązania wodorowe stanowią istotny wkład w sztywność i stabilność α -helikalnego polipeptydu. Należy pamiętać, że zastosowanie barostatu wiąże się ze skalowaniem wielkości komórki elementarnej poprzez zmianę pozycji atomów znajdujących się w komórce, dlatego też główna seria pomiarowa (tylko z użyciem termostatu) wykonana została bez użycia barostatu tak, aby wyeliminować wpływ barostatu na zmianę pozycji atomów biorących udział w wiązaniach wodorowych.



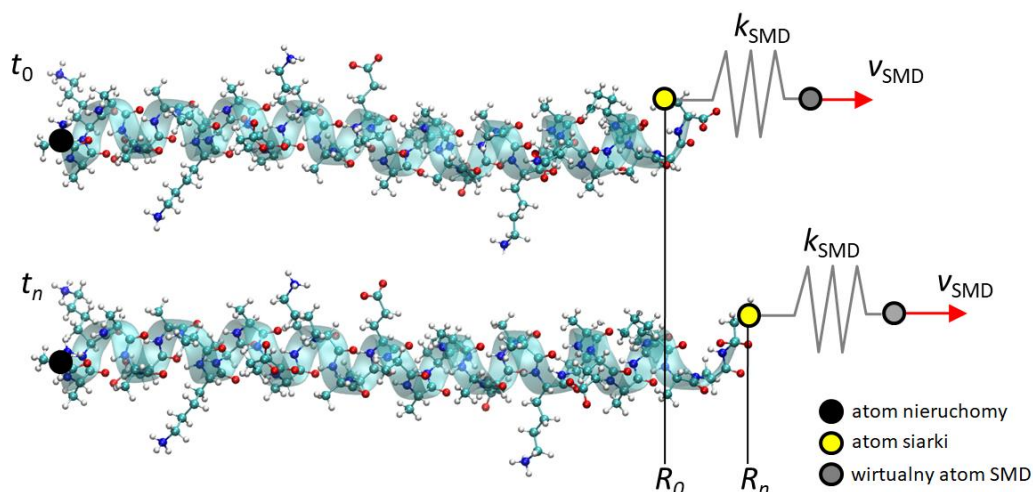
Rysunek 5.16. Średnia siła obliczona z wyników 10 symulacji SMD w funkcji wydłużenia peptydu dla modelu z (HB, niebieski) i bez (NOHB, czerwony) sieci wiązań wodorowych. Dane dla symulacji w stałej temperaturze i ciśnieniu ($T = 300 \text{ K}$, $p = 1 \text{ bar}$, $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$)

6. Parametry kinetyczne i termodynamiczne pojedynczego wiązania wodorowego

W poniższym rozdziale przedstawiono wyniki dwóch serii symulacji metodą sterowanej dynamiki molekularnej dla modelu α -helikalnego peptydu złożonego z sekwencji aminokwasów AAKA(AEAAKA)₅AC. Każda z serii symulacji wykonana została dla szeregu wartości prędkości rozciągania v_{SMD} , następnie z wyznaczonych danych wyznaczono średnią siłę zerwania wiązania wodorowego. Dla tych danych zastosowano modele teoretyczne termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału, aby uzyskać parametry termodynamiczne pojedynczego wiązania wodorowego.

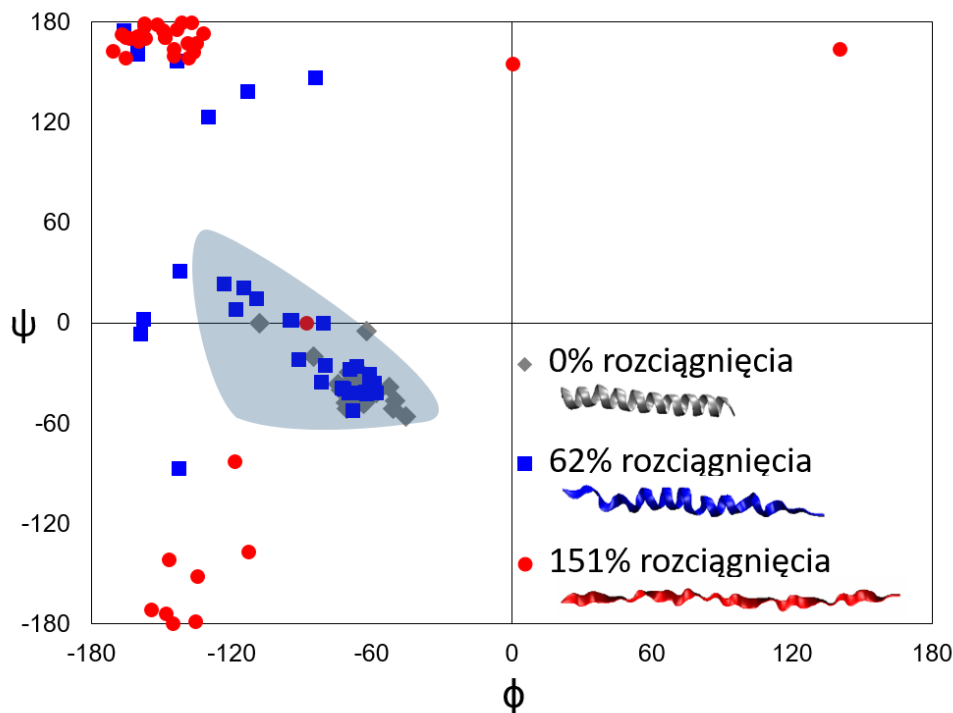
6.1. Zastosowanie modeli wymuszonego siłą zerwania wiązania

W celu wyznaczenia parametrów energetycznych α -helikalnej struktury drugorzędowej wykonano szereg symulacji SMD dla szerokiego zakresu prędkości rozciągania peptydu tj. 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 750 i 1000 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Symulacje przeprowadzono dla temperatury 300 K stosując stałą siłową potencjału SMD $7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$. Jako struktury wejściowe do obliczeń posłużyło 10 wybranych struktur z ostatnich 100 ps symulacji wygrzewającej w temperaturze 300 K. Dla każdej z prędkości wykonano 10 symulacji SMD. Jeden z końcowych atomów modelu AAKA(AEAAKA)₅AC, a mianowicie atom C_{α} aminokwasu 1, został unieruchomiony w przestrzeni. Jako atom, do którego przyłożony został potencjał SMD, wybrano atom siarki w aminokwasie 36 – cysteinie (rysunek 6.1). Taki wybór punktów przyłożenia siły, nie tylko zapewnił osiowe rozciąganie peptydu, ale również dobrze odzwierciedla wcześniejsze eksperymenty AFM [5,6,49]. Symulacje prowadzone były dla wszystkich prędkości na tyle długo, aby rozciągnąć peptyd całkowicie tj. do 130 \AA długości szkieletu.



Rysunek 6.1. Schemat symulacji SMD modelu AAKA(AEAAKA)₅AC. Atom nieruchomy w przestrzeni to węgiel C_{α} w aminokwasie 1, natomiast atom siarki w cysteinie został wybrany jako atom, do którego przyłożony jest potencjał SMD.

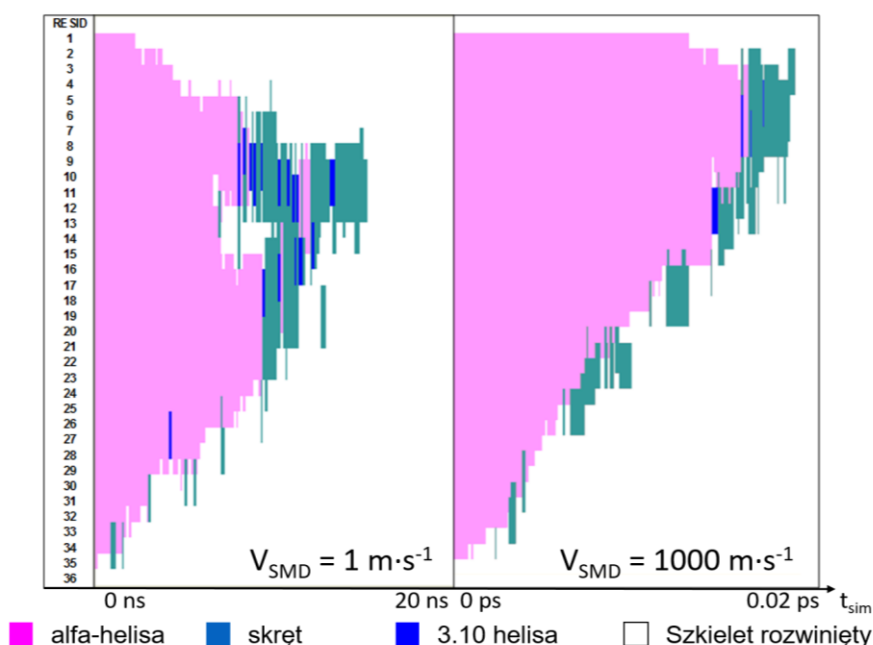
Analogicznie jak w przypadku symulacji SMD dla dekaalaniny, pod wpływem przyłożonej siły peptyd stopniowo rozwija się, tracąc swoją strukturę α -helikalną. Obserwować można zmiany kątów torsyjnych szkieletu peptydu, co świadczy o stopniowej utracie struktury drugorzędowej.



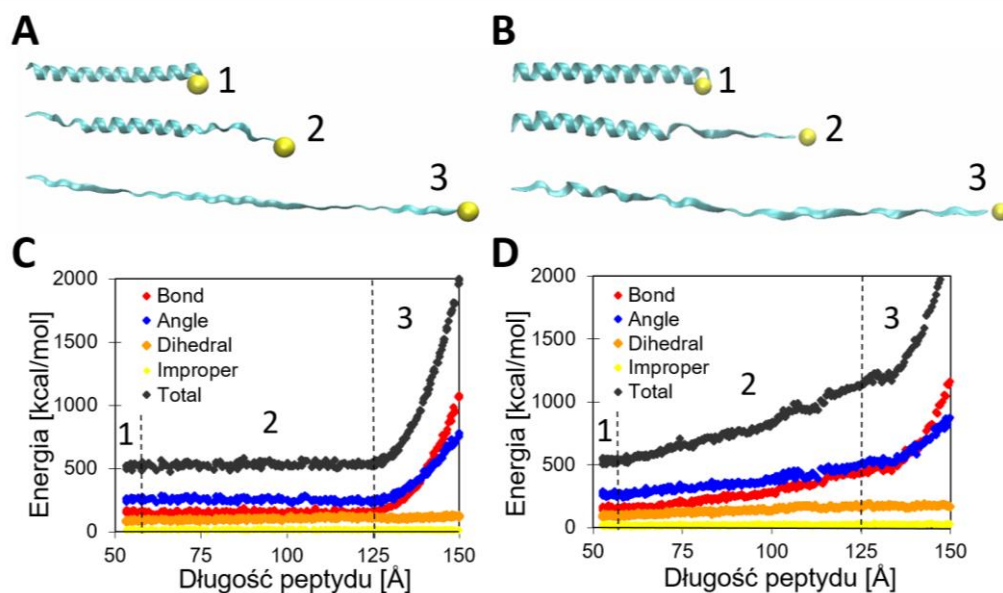
Rysunek 6.2. Mapa Ramachandrana dla rozciąganej sekwencji AAKA(AEAACA)₅AC dla przykładowej symulacji SMD. Na mapie zaznaczono wartości kątów torsyjnych dla geometrii początkowej (szary), podczas 62% rozciągnięcia (niebieski) i podczas 151% rozciągnięcia (czerwony) w stosunku do długości początkowej peptydu.

Podobnie jak dla dekaalaniny, peptyd rozwija się od końców molekule, przy czym warto zauważyć, że dla wysokich prędkości rozwijanie zaczyna się od końca molekule, do którego przyłożony został potencjał SMD. Dla bardzo wolnych prędkości peptyd rozwija się od obu końców. Analiza danych pozwala stwierdzić, że powyżej $5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ proces rozwijania się peptydu jest sekwencyjny, rozwijany jest aminokwas po aminokwasie. Przy niskich prędkościach tj. 1 i $5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ proces zachodzi widocznie od obu końców, i wydaje się być losowy. Pojawienie się struktur α -helikalnych bądź typu 3.10-helikalnych (rysunek 6.3) świadczy o tym, że pojawia się zjawisko odtwarzania zerwanych wiązań wodorowych. Podczas niskich prędkości rozciągania peptyd ma więcej czasu na relaksację oraz na rozłożenie się naprężenia spowodowanego potencjałem SMD po całej molekule. W przypadku prędkości bardzo wysokich, deformacji ulegają aminokwasy najbliższe atomowi siarki, do którego przyłożony został potencjał rozciągający peptyd. Duże prędkości powodują wzrost wartości energii w jednostce czasu wskutek braku czasu na relaksację. Obrazują to dobrze wykresy energii potencjalnych pola siłowego dla porównywanych dwóch skrajnych prędkości rozciągania (rysunek 6.4). Wartości energii są stałe do momentu całkowitego rozciągnięcia dla $v_{\text{SMD}} = 1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, podczas gdy dla wyższej

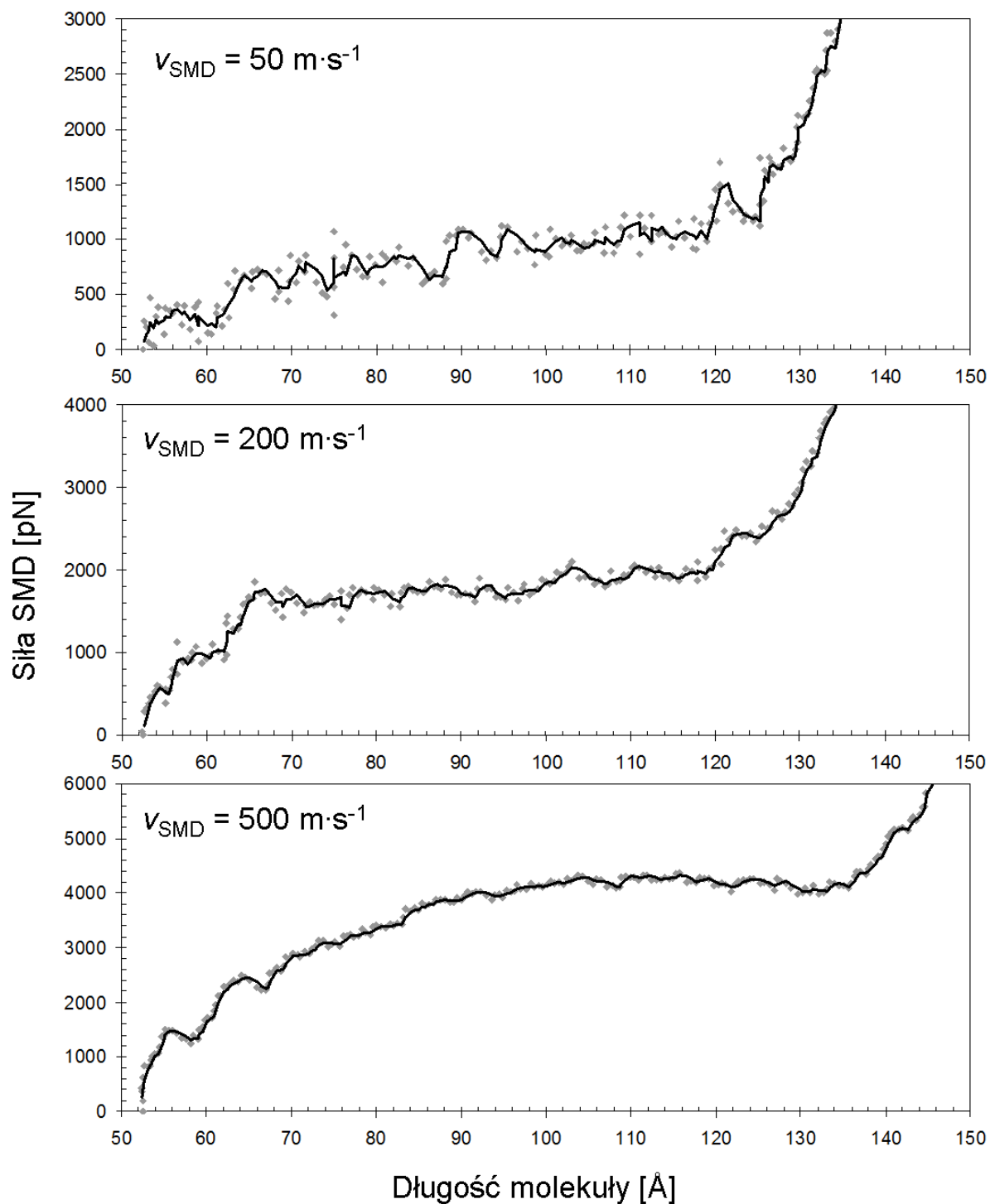
prędkości $v_{\text{SMD}} = 1000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ rosną. Ponadto, w przypadku małych prędkości rozciągania, zerwane wiązania wodorowe mają znacznie większą szansę na odtworzenie [24]. Dla każdej z symulacji rejestrowana była siła SMD oraz wydłużenie się modelu peptydu podczas rozciągania (rysunek 6.5). Symulacje były prowadzone do momentu pełnego rozciągnięcia peptydu (zakres długości powyżej 125 Å).



Rysunek 6.3. Zmiany konformacji w czasie obrazowane za pomocą algorytmu STRIDE dla przykładowych symulacji dwóch skrajnych symulowanych prędkości rozciągania $v_{\text{SMD}} = 1$ i $1000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

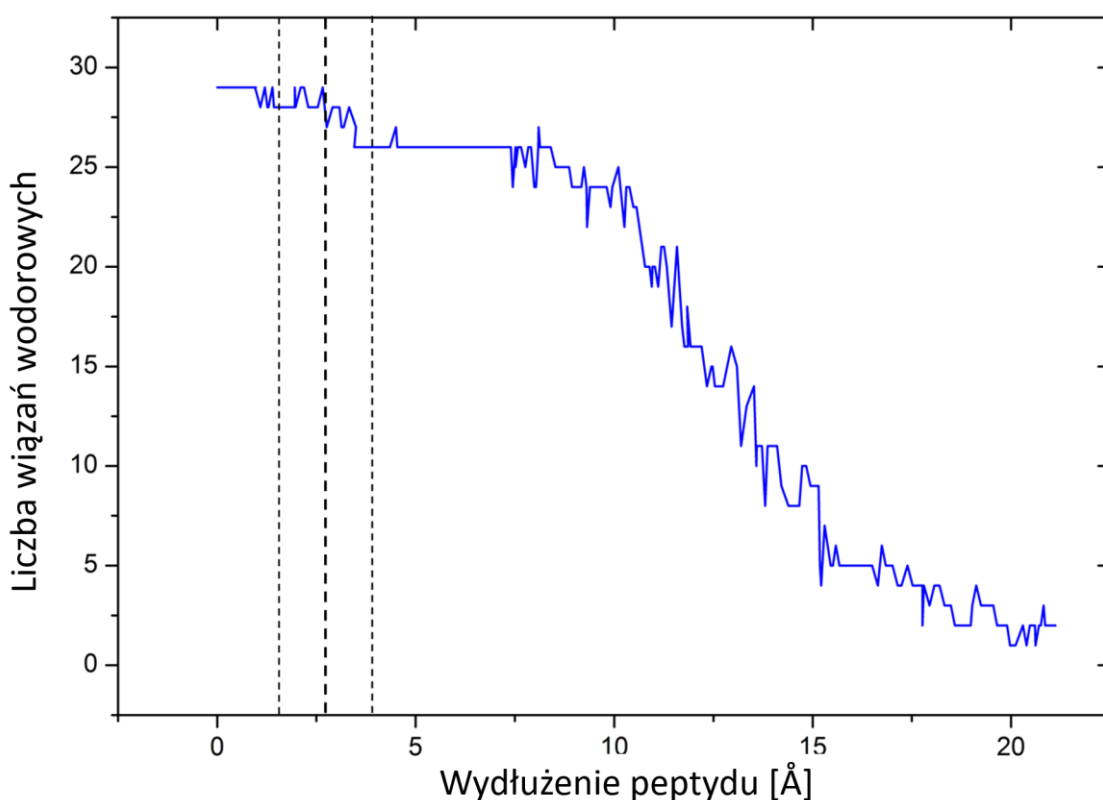


Rysunek 6.4. Zmiany konformacji i energii dla przykładowych symulacji dwóch skrajnych symulowanych prędkości rozciągania $v_{\text{SMD}} = 1$ (A i C) i 1000 (B i D) $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Żółta sfera reprezentuje atom siarki, cyfry reprezentują peptyd na początku rozciągania (1), częściowo rozwinięty (2) oraz całkowicie rozwinięty (3).



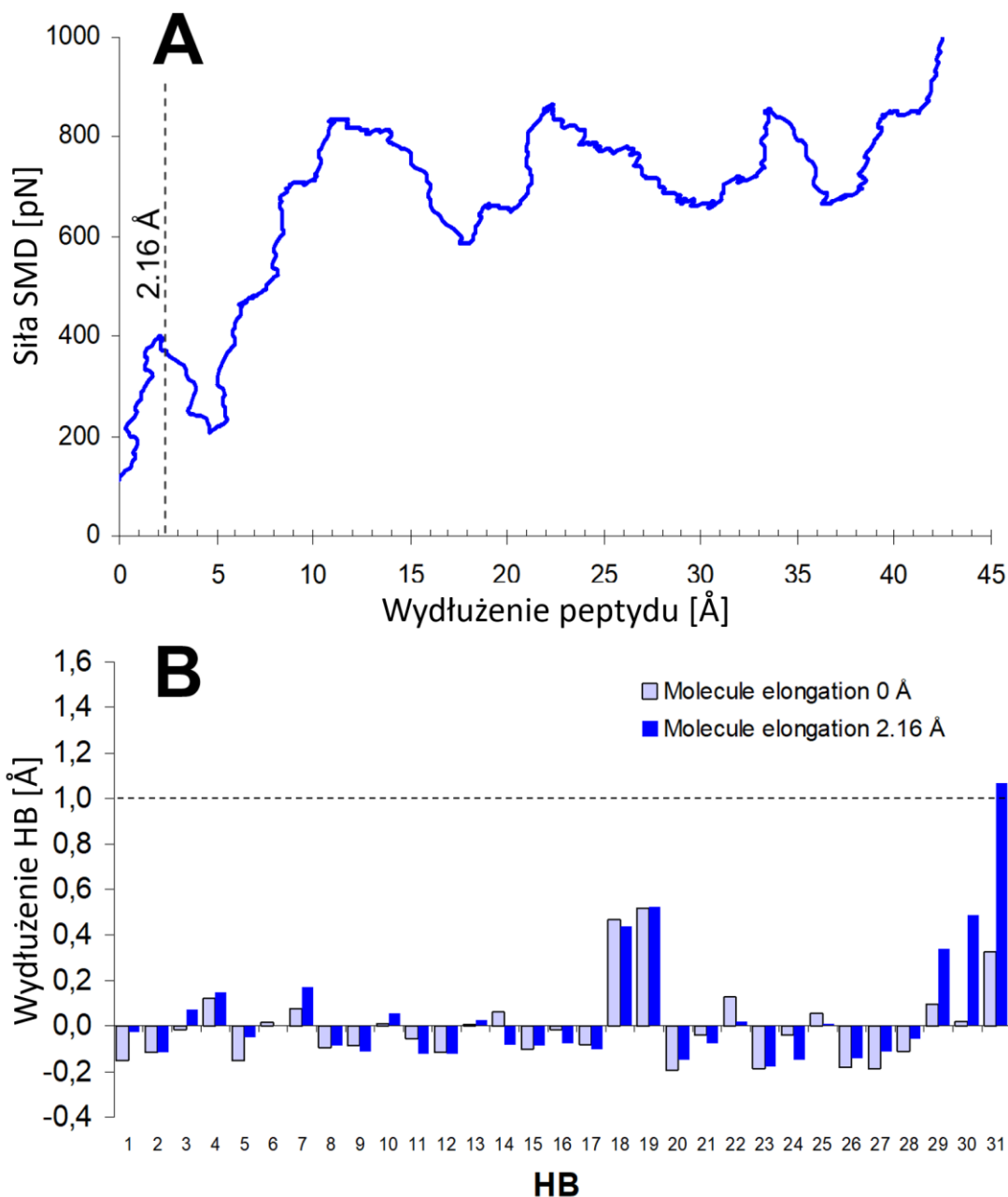
Rysunek 6.5. Przykładowe profile siły SMD dla całego zakresu rozciągania peptydu dla trzech przykładowych symulacji z prędkościami rozciągania $v_{\text{SMD}} = 50, 200$ i $500 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Szare punkty oznaczają dane pomiarowe, czarna linia oznacza profil siły uzyskany za pomocą funkcji wygładzającej.

Przykładowe profile siły SMD przedstawione na rysunku 6.5 wskazują na pojawianie się pików w rejestrowanej sile. Wystąpienie pików (wyraźnie przewyższających wartość szumu sygnału) powinno wynikać z pokonania barier potencjałów, które opisują oddziaływania w peptydzie. Ponieważ dynamika molekularna i stosowane pole siłowe nie pozwalają na zrywanie wiązań kowalencyjnych, główną przyczyną wystąpienia lokalnych maksimów siły powinny być zrywane wiązanie wodorowe. Dokładna analiza średniej liczby wiązań wodorowych w modelowanym peptydzie w funkcji rozciągania peptydu z prędkością $100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ pokazuje, że dla średniego wydłużenia peptydu ($2,7 \pm 1,1$) Å, przy którym występuje pierwszy pik siły, zerwane jest przynajmniej jedno wiązanie wodorowe (rysunek 6.6).



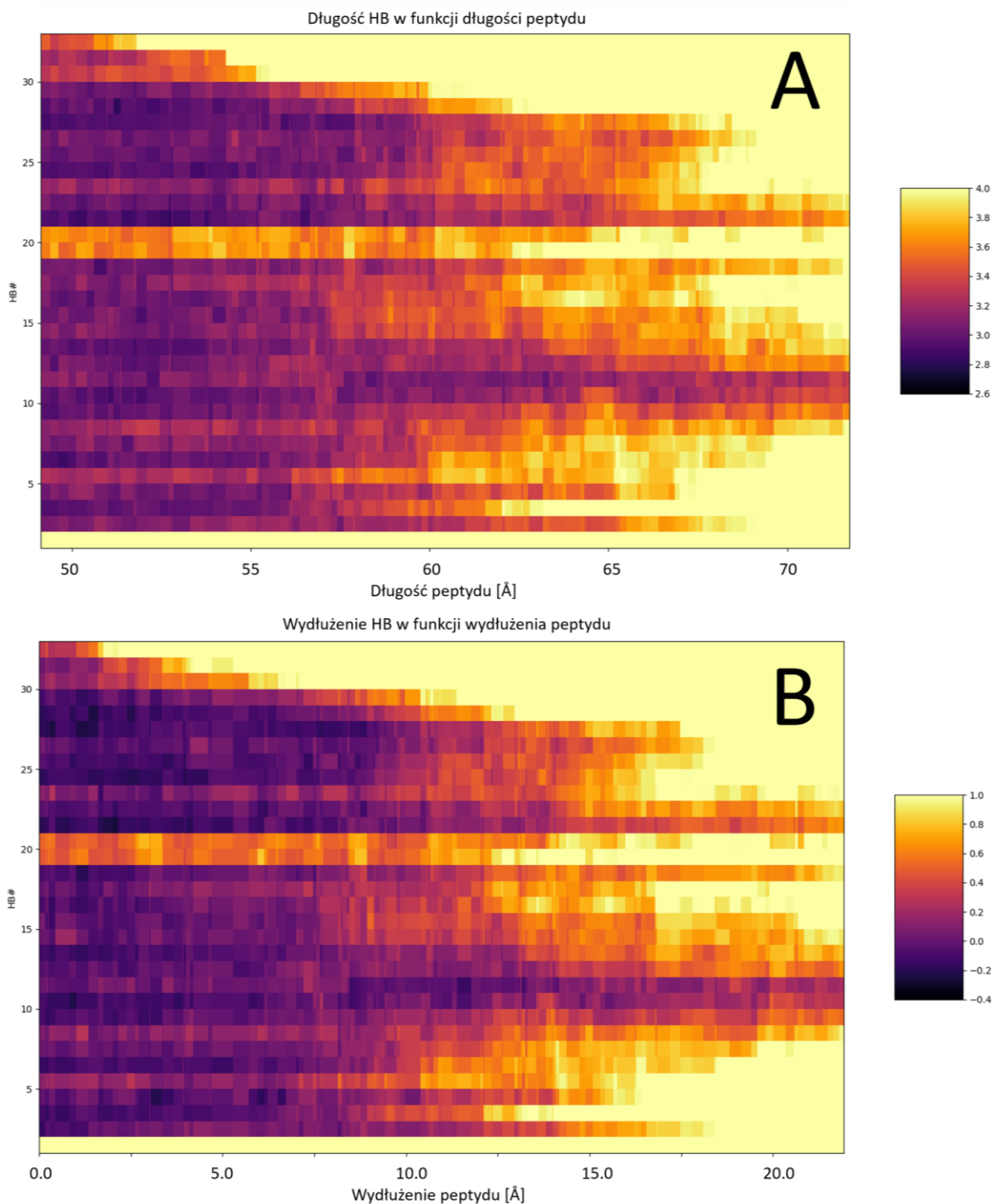
Rysunek 6.6. Średnia liczba wiązań wodorowych wyznaczona z serii 10 symulacji dla $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Czarną grubą przerywaną linią oznaczono wydłużenie peptydu, przy którym średnio występuje pik siły SMD, czarne cienkie linie oznaczają zakresy – błąd standardowy średniej. Kryterium istnienia wiązania wodorowego przyjęto jako odległość donor – akceptor mniejsza niż 3,5 Å.

Rysunek 6.7 przedstawia przykładowe porównanie wydłużeń wiązań wodorowych od ich średniej długości początkowej dla wybranej prędkości $100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. W przypadku tej konkretnej symulacji, znacznie wydłużone (ponad 1 Å) zostało 31 wiązanie wodorowe dla rozciągnięcia peptydu $dx = 2,16 \text{ Å}$.



Rysunek 6.7. Porównanie profilu siły SMD w funkcji wydłużenia peptydu (A) z wydłużeniami wiązań wodorowych (B) dla wydłużenia peptydu 0 Å (jasny niebieski) i 2,16 Å (ciemny niebieski). Na profilu zależności siły SMD od wydłużenia peptydu zaznaczono odległość 2,16 Å, dla której występuje pierwszy pik siły.

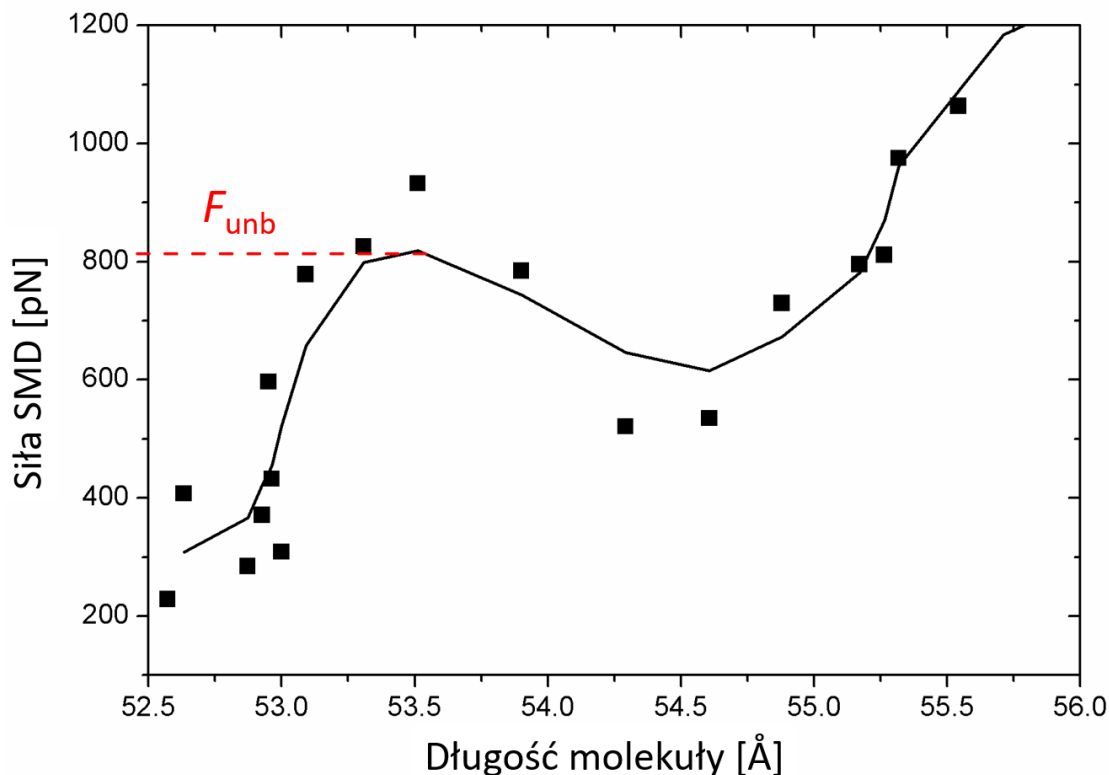
Podobnie jak w przypadku analizy struktury II-rzędowej za pomocą algorytmu STRIDE (rysunek 6.3), potwierdza się schemat pęknięcia wiązań wodorowych: dla dużych prędkości SMD – pękają od jednego końca peptydu (ciągniętego), dla małych prędkości SMD – od dwóch końców peptydu. Rysunek 6.8 przedstawia długości i wydłużenia poszczególnych wiązań wodorowych dla prędkości pośredniej $100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Zauważalne jest „pęknięcie” wiązań od końca peptydu, do którego przyłożona jest siła SMD, z równoczesnym wzrostem długości wiązań wodorowych w środkowej części peptydu. Doprowadza to do pęknięcia kolejnych wiązań i zniszczenia struktury drugorzędowej po 12 Å rozciągnięcia peptydu.



Rysunek 6.8. Pełna mapa długości (A) i wydłużeń (B) wiązań wodorowych, przedstawiona w Å dla 22 Å wydłużenia peptydu z symulacji przedstawionej na rysunku 6.7. Wyraźne pęknięcie wiązań wodorowych od końca peptydu, do którego przyłożona jest siła SMD (wiązania od 32 do 23), oraz rozwijanie i pęknięcie wiązań w środkowej części peptydu (19 i 20 wiązanie) powodujące niszczenie drugorzędowej struktury.

Dla każdej z serii danych wyznaczona została siła zrywająca wiązanie wodorowe F_{unb} , czyli teoretyczna siła, przy której następuje zerwanie pierwszego wiązania wodorowego. Aby wyznaczyć tę siłę, dla każdej symulacji dla danej prędkości zastosowano funkcję wygładzającą dane (filtr FFT),

a następnie wyznaczono wartość siły zrywającej (jako wartość pierwszego pik w wygładzonej krzywej), wydłużenie i czas, po którym zarejestrowano pik (rysunek 6.9).

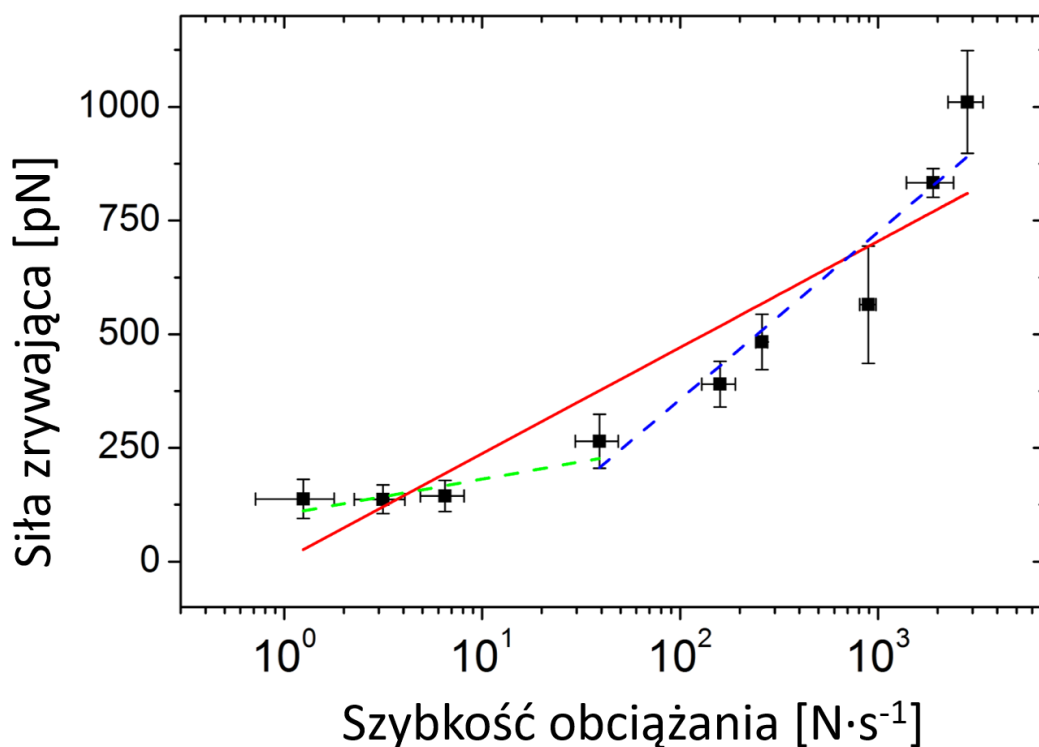


Rysunek 6.9. Przykładowe dane siły SMD dla pierwszych 5 Å rozciągnięcia rozciąganej peptydu dla $v_{\text{SMD}} = 500 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Czerwoną przerywaną linią oznaczono poziom siły zrywającej pierwsze wiązanie wodorowe F_{unb} .

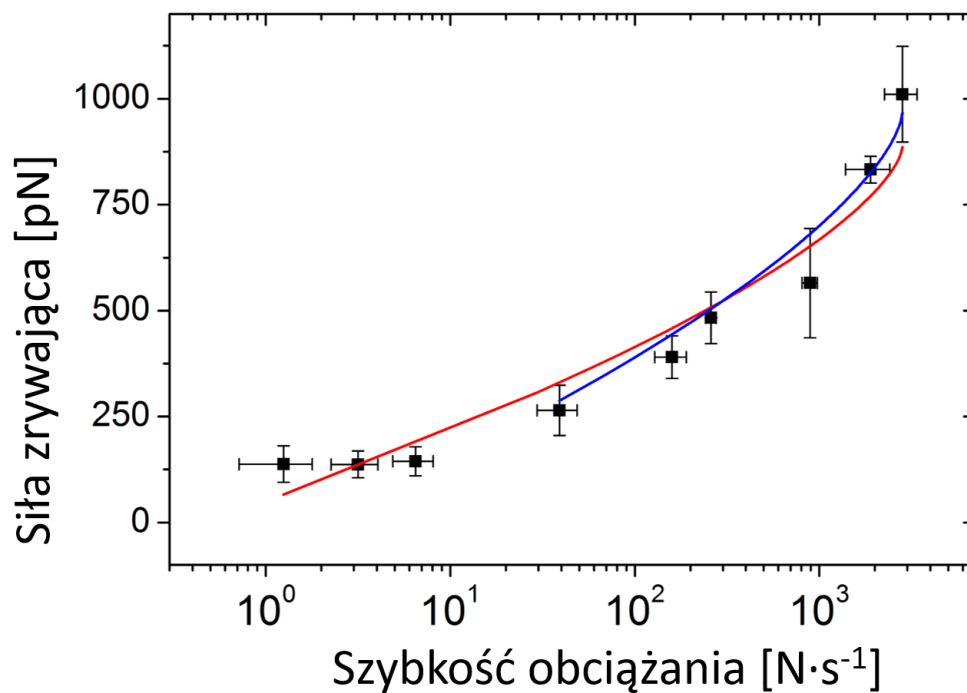
Dla każdej z symulowanych prędkości wyznaczono w ten sposób średnią siłę zrywającą jako średnią arytmetyczną z 10 symulacji. Niepewność pomiarową (obliczeniową) określono jako błąd standardowy. Dodatkowo, aby móc zastosować modele aktywowanego siłą zerwania wiązania, znając czas, po którym wystąpiła siła F_{unb} , wyznaczono stałą szybkości obciążania (ang. *loading rate*) r_F jako iloczyn siły zrywającej wiązanie i czasu wystąpienia siły F_{unb} . Zakres obliczonych sił zrywających wiązanie wodorowe obejmuje od 140 pN dla trzech najmniejszych prędkości rozciągania do 1000 pN dla największej $v_{\text{SMD}} = 1000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Zakres szybkości obciążania wiązania obejmuje wartości od $1 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ do prawie $3000 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$. W analogicznych eksperymentach DFS metodą spektroskopii sił atomowych za pomocą AFM, zakresy sił jakie można mierzyć są porównywalne do wyników uzyskiwanych w symulacjach SMD. Główną różnicą jest zakres szybkości obciążania wiązania w symulacjach SMD a eksperymentach za pomocą AFM wynosi 6 rzędów wielkości. Obniżenie szybkości obciążania w symulacjach komputerowych MD do wielkości podobnych do eksperymentów AFM na dzień dzisiejszy jest bardzo problematyczne – symulacje wymagałyby znacznie dłuższych czasów trwania (miesiące) i znacznych mocy obliczeniowych. Dodatkowo, należałoby podjąć dodatkowe działania

implementacyjne w oprogramowaniu służącym symulacjom komputerowym, aby zapewnić poprawność działania i stabilność algorytmom całkującym przy czasach symulacji rzędu setek nanosekund, a nawet mikrosekund, ze względu na olbrzymie liczby kroków obliczeniowych. Nie mniej obecnie podejmowane są próby prowadzenia symulacji komputerowych wykorzystujących SMD oraz metody przybliżeń gruboziarnistych (CG, ang. *coarse-grained*) które umożliwiają przeprowadzenie wirtualnego eksperymentu spektroskopii sił w szerokim zakresie prędkości obciążania [50].

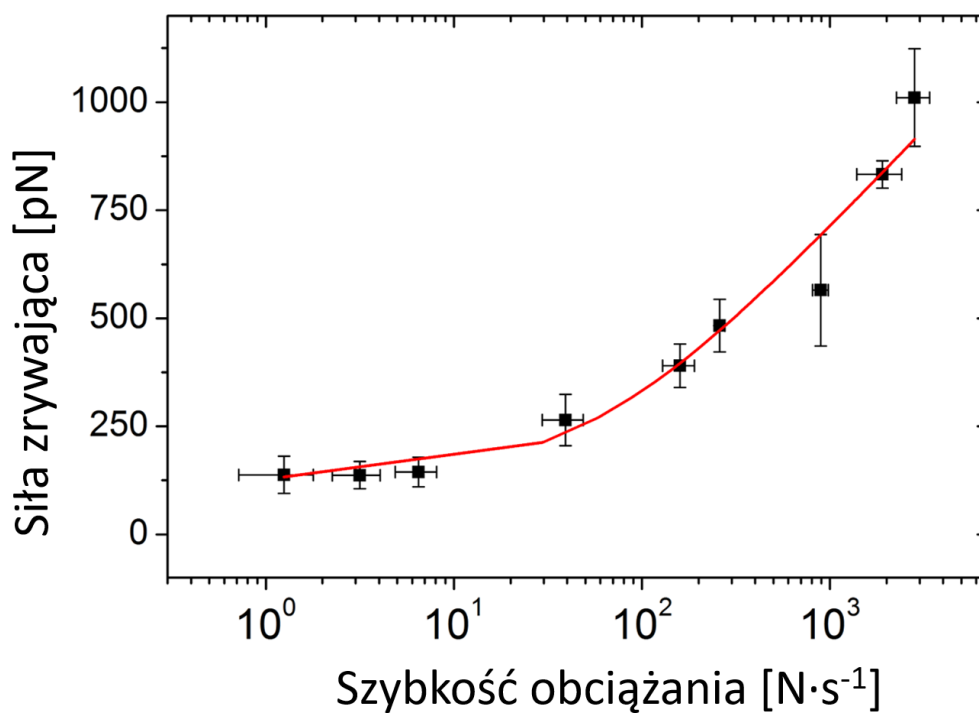
Dane uzyskane z symulacji SMD zostały wykorzystane do dopasowania trzech przedstawionych uprzednio modeli aktywowanego siłą zerwania wiązania BE (Bella-Evansa), DHS (Dudko-Hummera-Szabo) oraz FNDY (Friddle'a-Noya-De Yoreo). Dopasowanie wykonane zostało w oprogramowaniu Origin 8.6 (OriginLab Corporation). W obliczeniach r_F było zmienną, F_{unb} wartością funkcji, natomiast parametry wyznaczone były iteracyjnie dzięki odpowiedniemu zdefiniowaniu modeli teoretycznych w programie Origin.



Rysunek 6.10. Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{unb} od szybkości obciążania z dopasowaniem modelem BE dla trzech zakresów szybkości obciążania: 1 – 2820 $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwony), 39 – 2820 $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$ (niebieski) i 1 – 39 $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$ (zielony). Niepewności pomiarowe zostały określone jako błąd standardowy.



Rysunek 6.11. Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{umb} od szybkości obciążania z dopasowaniem modelem DHS dla dwóch zakresów szybkości obciążania: 1 – 2820 $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwony) i 39 – 2820 $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$ (niebieski). Niepewności pomiarowe zostały określone jako błąd standardowy.



Rysunek 6.12. Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{umb} od szybkości obciążania z dopasowaniem modelem FNDY dla całego zakresu szybkości obciążania, 1 – 2820 $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwony). Niepewności pomiarowe zostały określone jako błąd standardowy.

Dzięki dopasowaniu modeli do danych eksperymentalnych można było wyznaczyć parametry kinetyczne i energetyczne dla zerwanego pojedynczego wiązania wodorowego. Tabela 6.2 przedstawia obliczone wartości k_{off} (dla BE i DHS to stała dysocjacji bez obecności siły, dla FNDY stała dysocjacji przy przyłożonej sile równowagowej), x_{β} to odległość pomiędzy minimum jamy potencjału a maksimum bariery, ΔG_{β} to energia swobodna zerwania wiązania wodorowego (różnica poziomów maksimum bariery a minimum jamy potencjału, rozdział 2.3, rysunek 2.9), F_{eq} to siła równowagowa, czyli siła zerwania wiązania wodorowego, gdy układ przebywa w równowadze, a zatem ma czas na relaksację. F_{eq} uwzględnia możliwość odtwarzania zerwanych wiązań wodorowych. W celu porównania wyników dla różnych modeli, mających różną liczbę parametrów zastosowano dopasowany współczynnik korelacji (ang. *adjusted coefficient of determination*) R^2_{adj} jako parametr opisujący korelację między dopasowanymi krzywymi a danymi symulacji. Niepewności obliczonych wartości wyznaczone zostały jako błąd standardowy.

Tabela 6.1. Parametry uzyskane z modeli BE, DHS oraz FNDY z zależności siły zrywającej HB od szybkości obciążenia

Model	r_{F} [N·s ⁻¹]	R^2_{adj}	k_{off} [10 ¹⁰ s ⁻¹]	x_{β} [Å]	ΔG_{β} [kcal·mol ⁻¹]	F_{eq} [pN]
BE	1–2820	0,913	0,95 ± 0,39	0,406 ± 0,044	-	-
	1–39	0,535	0,13 ± 0,23	1,23 ± 0,59	-	-
	39–2820	0,956	6,7 ± 2,1	0,257 ± 0,025	-	-
DHS	1–2820	0,954	0,40 ± 0,14	0,611 ± 0,061	5,13 ± 1,11	-
	39–2820	0,966	1,22 ± 0,38	0,471 ± 0,001	4,33 ± 0,93	-
FNDY	1–2820	0,993	16,0 ± 4,1	0,208 ± 0,020	-	129 ± 13*

*dla wyznaczonej siły F_{eq} wyznaczono wg. wzoru 2.7 $\Delta G_{\text{bu}} = (1,59 \pm 0,51)$ kcal·mol⁻¹

Spośród trzech stosowanych w pracy modeli, dopasowanie modelu BE do danych eksperymentalnych jest najniższej jakości. Zależność siły zrywającej F_{unb} od szybkości obciążania nie jest logarytmiczna, jak przewiduje to model. Powszechną praktyką w takim przypadku jest podzielenie danych na zakresy i zinterpretowanie zależności siły zrywającej F_{unb} oddzielnie dla każdego z zakresów przyjmując, że powodem takiego stanu rzeczy jest występowanie lokalnych barier aktywacji w potencjale energii swobodnej. Stosując powyższe podejście dokonano dopasowania modelu BE do dwóch zakresów szybkości obciążania r_{F} – „wolnego”, 1 – 39 N·s⁻¹, i „szybkiego”, 39 – 2820 N·s⁻¹ (rysunek 6.10). Dla zakresu „wolnego” wyznaczona z modelu x_{β} jest znacznie większa niż dla zakresu szybszego, jednakże współczynnik dopasowania R^2 jest niski (tabela 6.2). Niska jakość dopasowania zarówno dla „wolnego” regionu jak i dla całego regionu szybkości obciążania sugeruje, że istnieje inne wyjaśnienie zależności $F_{\text{unb}}(r_{\text{F}})$ w tym zakresie. Chociaż interpretacja „dwóch barier” jest powszechnie stosowana do specyficznych wiązań receptor-ligand [44] jej zastosowanie do wiązań wodorowych wydaje się nie być uzasadnione. W przypadku oddziaływań białko-ligand wiązania składają się z kilku

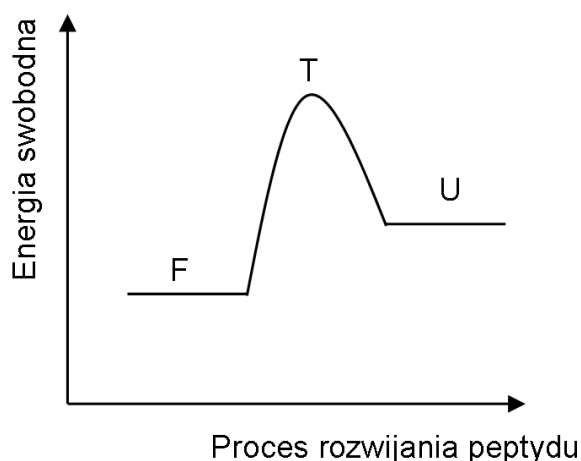
rodzajów oddziaływań (m.in. elektrostatycznych, van der Waalsa, hydrofobowych itp.) i są w stanie tworzyć stany przejściowe tworzące w potencjale energii swobodnej dwie lub więcej barier potencjału. W przypadku wiązania wodorowego, opisanego w zastosowanym polu siłowym przez potencjał typu Lennarda-Jonesa oraz elektrostatyczny, oddziaływania te nie wykazują żadnych stanów przejściowych. Pojawia się pojedyncza bariera, ale w wyniku naprężenia wywołanego siłą zewnętrzną podczas procesu zrywania. Z tego powodu model Bella-Evansa nie wydaje się być odpowiednim do właściwego opisu zrywania pojedynczego wiązania wodorowego. Lepszą jakość dopasowania dla całego zakresu szybkości obciążenia uzyskano dla modelu DHS (rysunek 6.11, tabela 6.2). O ile przebieg modelu odpowiada zależności $F_{\text{unb}}(r_F)$ dla wysokich wartości szybkości obciążania, model wydaje się zawodzić w przypadku opisywania zależności dla niskich wartości szybkości obciążania. Porównanie współczynnika dopasowania R^2_{adj} dla zakresu „szybkiego” i dla całego zakresu wskazuje, że im niższa prędkość obciążania, tym gorsze wyniki modelu, co wskazuje, że dla najniższych wartości r_F założenia modelu nie opisują poprawnie zależności siły zrywającej od szybkości obciążania w przypadku wiązań wodorowych. Model FNDY opracowany przy uwzględnieniu wkładu odtwarzania zerwanych wiązań jest najlepiej dopasowanym modelem do danych (rysunek 6.12, tabela 6.2) w całym zakresie prowadzonych obliczeń. Wskazuje to bezpośrednio na fakt, że zrywanie i ponowne wiązanie wiązań wodorowych ma wpływ na parametry energetyczne pojedynczego wiązania wodorowego w α -helisie. Odtwarzanie się zerwanych wiązań wodorowych widoczne również było przy analizie danych uzyskanych za pomocą algorytmu STRIDE (rysunek 6.3), gdzie dla niskiej prędkości rozciągania po częściowym rozwinięciu się struktury drugorzędowej możliwym było ponowne, chwilowe odtworzenie α -helikalnej struktury w środkowej części peptydu. Wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem szybkości obciążania, maleje prawdopodobieństwo zajścia odtworzenia zerwanego wiązania wodorowego, tym samym wraz ze wzrostem r_F proces rozwijania staje się bardziej sekwencyjny.

Energię swobodną wiązania wodorowego, zdefiniowaną jako różnicę energii swobodnej stanu niezwiązanego i stanu związanego (ΔG_{bu} , rysunek 2.9), można obliczyć korzystając z siły równowagowej F_{eq} wyznaczonej dzięki dopasowaniu modelu FNDY do danych $F_{\text{unb}}(r_F)$. Po przekształceniu równania 2.7 i podstawieniu średniej efektywnej stałej sprężystości układu składającego się z α -helisy i sprężyny SMD wyznaczonej dla trzech najniższych prędkości rozciągania $v_{\text{SMD}} = 1, 5$ i $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{\text{eff}} = (0,750 \pm 0,084) \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, otrzymujemy wartość energii swobodnej wiązania wodorowego $\Delta G_{\text{bu}} = (1,59 \pm 0,51) \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Niepewność pomiaru obliczono metodą różniczki zupełnej. Otrzymana wartość energii pojedynczego wiązania wodorowego w peptydzie zgadza się z wartościami podanymi dla HB w białkach w wodzie ($0,5 - 4,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) [23] lub wartościami dla HB w helikalnych polipeptydach wyznaczonymi za pomocą metod dynamiki molekularnej ($1,93 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) [45,48]. Energia aktywacji wiązania wodorowego obliczona z wykorzystaniem modelu DHS dla dwóch zakresów szybkości obciążania analizowanej serii eksperymentalnej ΔG_{β} wyniosła odpowiednio $(5,13 \pm 1,11) \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ i $(4,33 \pm 0,93) \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ dla całego i „szybkiego” zakresu r_F . Wartości te są podobne

do danych przedstawionych przez Uribe *et. al.* [23] ($4,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Stałe dysocjacji z modeli DHS i FNDY pozwalają na wyznaczenie czasu życia wiązania wodorowego. Czas życia HB przy obecności siły równowagowej obliczono jako odwrotność wyznaczonej z modelu $k_{\text{off}}(F_{\text{eq}})$, $t_{\text{HB}}(F_{\text{eq}}) = (6,2 \pm 1,6)$ ps. Wartość ta powinna być niższa niż czas życia przy zerowej sile, charakteryzujący wiązanie nie poddane działaniu siły zrywającej. Natomiast taki czas życia można obliczyć ze stałej dysocjacji wyznaczonej z modelu DHS (k_{off}^0). W tym przypadku wartość $t_{\text{HB}}(0) = (82 \pm 25)$ ps i zgodnie z przewidywaniami jest większa niż $t_{\text{HB}}(F_{\text{eq}})$. Obliczona wartość jest zgodna z publikowanymi czasami życia wiązań wodorowych – wyznaczone czasy sięgają kilkudziesięciu pikosekund, co również pośrednio wskazuje na zjawisko zrywania się i wiązania na nowo wiązań wodorowych [45-47].

6.2. Wyznaczenie wkładu entalpowego i entropowego energii wiązania wodorowego

Łańcuch peptydowy jest tym bardziej stabilny, im niższą posiada energię swobodną. Zwinięte konformacje białek mają niższą energię swobodną niż rozwinięte (rysunek 6.13).



Rysunek 6.13. Schemat energetyczny procesu rozwijania peptydu od stanu zwiniętego (F, *ang. folded state*), poprzez stan przejściowy (T, *ang. transition state*), do stanu rozwiniętego (U, *ang. unfolded state*).

Korzystając z definicji energii swobodnej Gibbsa można zdefiniować ΔG jako:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad 6.2$$

gdzie ΔH jest zmianą entalpii, a ΔS obrazuje zmiany entropii. W warunkach stałego ciśnienia i temperatury zmiana energii swobodnej Gibbsa jest proporcjonalna do całkowitej zmiany entropii układu i otoczenia. Pojęcie ΔG pomaga w określeniu spontaniczności danego procesu: gdy ΔG ma wartości ujemne, to dany proces jest spontaniczny, natomiast gdy dodatnie – dany proces nie zachodzi samoczynnie. Zazwyczaj różnica energii swobodnej pomiędzy stanem zwiniętym a rozwiniętym polipeptydu wynosi kilka $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (około $20 - 30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) [22]. Kolejnym parametrem jest też stabilność kinetyczna, mówiąca o tym, jak szybko zachodzi proces zwijania lub rozwijania białka.

Zależna jest ona od energii aktywacji reakcji rozwijania się struktury białka, czyli różnicy energii swobodnej pomiędzy stanem zwiniętym a stanem przejściowym (rysunek 6.13). Na stabilność struktury białek wpływ mają czynniki takie jak oddziaływania międzycząsteczkowe z innymi molekułami (np. rozpuszczalnika – wody, poprzez tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy grupami bocznymi aminokwasów a molekułami wody) czy interakcje hydrofobowe.

Wkład entalpowy oraz entropowy do energii swobodnej Gibbsa można wyznaczyć nawet dla pojedynczego wiązania wodorowego, co było celem tej części rozprawy. Pomysł podstawienia wzoru 6.2 do modelu opisującego wymuszone siłą zerwanie został wykorzystany przez Zepedę *et al.* [26]. Autorzy wykorzystali model BE dla analizy oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy Si_3N_4 a miką oraz pomiędzy monowarstwami z grupami $-\text{COOH}$ w etanolu. W niniejszej pracy postanowiono zastosować bardziej złożony model poprawniejszy opisujący zależność siły zrywającej F_{unb} od szybkości obciążania r_F , a mianowicie model DHS. W tym przypadku konieczna była modyfikacja modelu DHS oraz dwuetapowe działanie w celu wyznaczenia energii aktywacji oraz zmian entalpii i entropii (rysunek 6.14):

- (i) z zależności siły zerwania od szybkości obciążania za pomocą modelu DHS wyznaczono parametry k_{off}^0 , x_β oraz ΔG_β ;
- (ii) z zależności siły zerwania od temperatury za pomocą zmodyfikowanego modelu DHS ($\Delta G_\beta = \Delta H - T\Delta S$), posiadając k_{off}^0 , x_β z poprzedniego kroku wyznaczono parametr τ_D oraz zmianę entalpii ΔH i entropii ΔS .

Modyfikacja modelu polega na wykorzystaniu formuły matematycznej modelu dla najbardziej prawdopodobnej siły:

$$F_{\text{unb}} = \frac{\Delta G_\beta}{\gamma x_\beta} \left\{ 1 - \left[\frac{k_{\text{B}}T}{\Delta G_\beta} \ln \frac{k_{\text{off}}^0 k_{\text{B}}T \exp\left(\frac{\Delta G_\beta}{k_{\text{B}}T}\right)}{x_\beta r_F} \right]^\gamma \right\} \quad 6.3$$

W wyrażeniu tym oprócz k_{off}^0 i x_β występuje energia swobodna aktywacji wiązania, ΔG_β . Podstawiając do powyższego modelu zależność 6.4 wiążącą parametr k_{off}^0 z czasem dysocjacji τ_D :

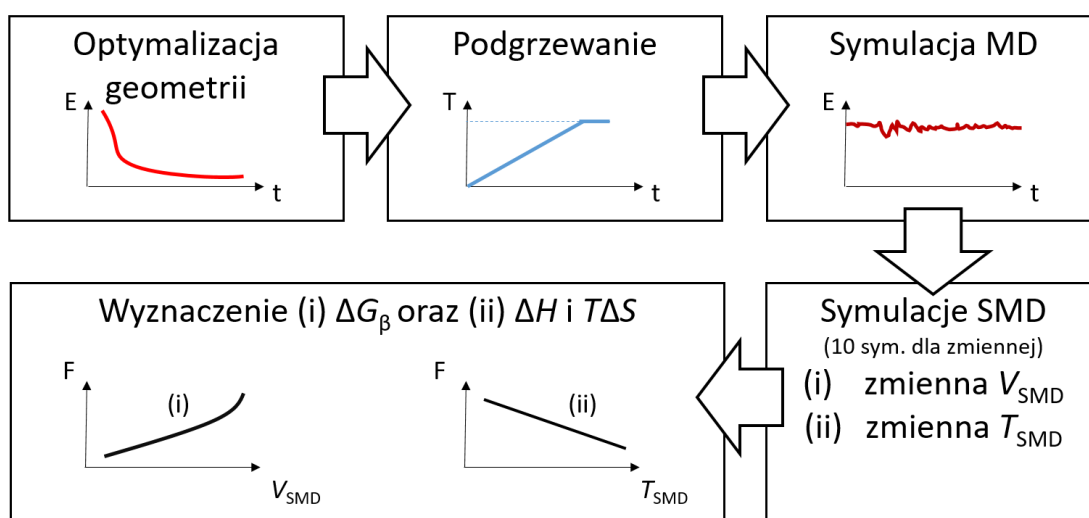
$$k_{\text{off}}^0 = \frac{1}{\tau_D} \exp\left(-\frac{\Delta G_\beta}{k_{\text{B}}T}\right) \quad 6.4$$

Oraz stosując wzór 6.2 uzyskać można postać modelu ze składnikiem entalpowym i entropowym:

$$F_{\text{unb}}(T) = \frac{\Delta H - T\Delta S}{v x_\beta} \left\{ 1 - \left[\frac{k_{\text{B}}T}{\Delta H - T\Delta S} \ln \left(\frac{k_{\text{B}}T}{x_\beta \tau_D r_F} \right) \right]^\gamma \right\} \quad 6.5$$

Dzięki dwuetapowemu podejściu możliwym stało się wyznaczenie wkładów entalpowego i entropowego bez konieczności dopasowywania modelu DHS do danych szukając jednocześnie aż czterech parametrów modelu (ΔH , $T\Delta S$, x_β i k_{off}^0 lub τ_D). Tak duża liczba parametrów do wyznaczenia

w modelu uniemożliwiła jednoznaczne znalezienie rozwiązania przez stosowane algorytmy dopasowania w oprogramowaniu Origin (zbyt duża liczba możliwych rozwiązań).

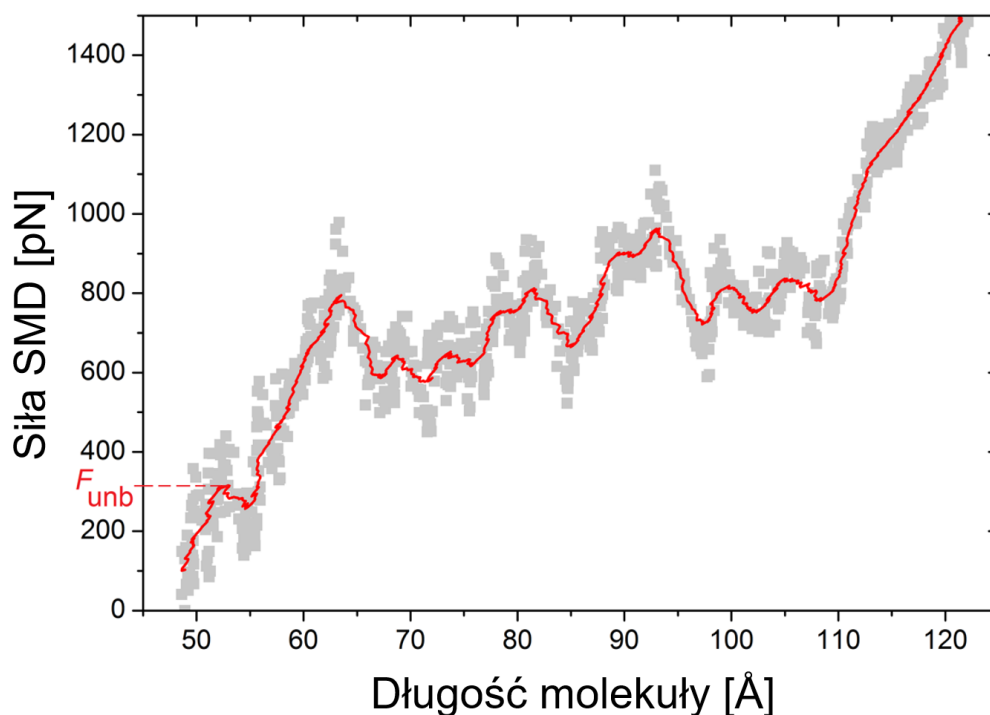


Rysunek 6.14. Schemat eksperymentu obliczeniowego wykorzystującego zmodyfikowany model DHS w celu wyznaczenia wkładów entalpowych i entropowych energii aktywacji wiązania wodorowego.

Zgodnie z zaproponowanym schematem postępowania, w celu wyznaczenia energii aktywacji ΔG_{β} oraz jej wkładu entalpowego i entropowego, dla wiązania wodorowego w α -helikalnej strukturze drugorzędowej, wykonano szereg symulacji SMD dla modelu peptydu AAKA(AEAACA)₅AC:

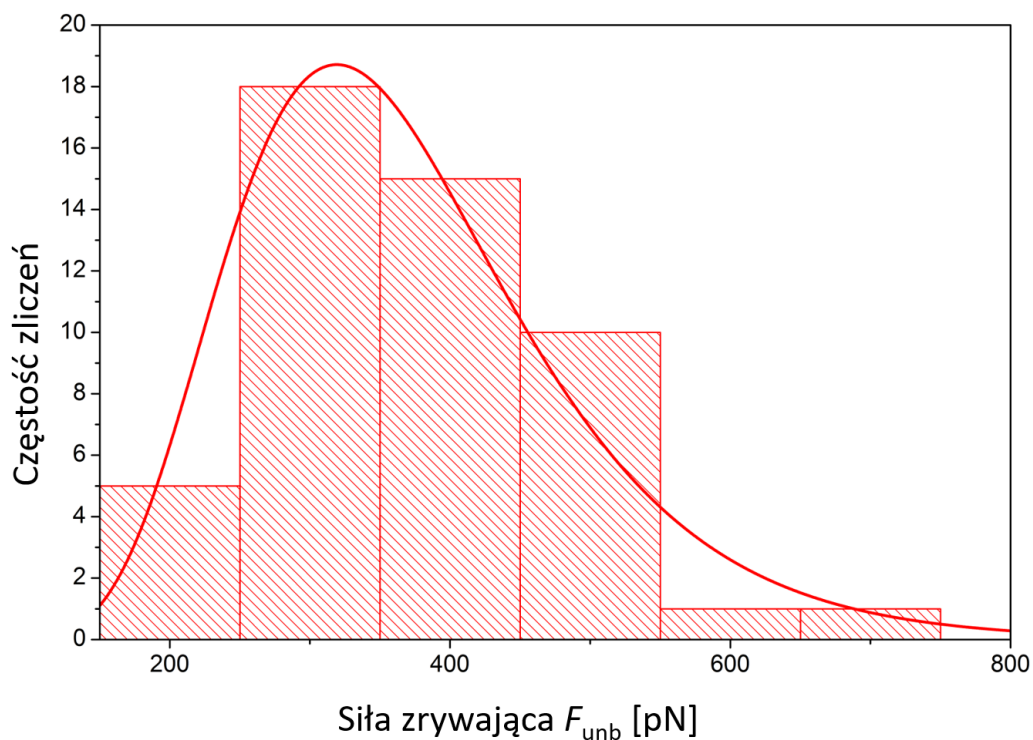
- (i) pierwsza seria „zmiennie-prędkościowa” dla 8 prędkości rozciągania peptydu tj. 30, 50, 75, 100, 150, 200, 400, 500 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, w stałej temperaturze 300 K,
- (ii) druga seria „zmiennie-temperaturowa” dla 9 temperatur $T = 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305$ i 310 K, ze stałą prędkością $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dla każdej z serii zastosowano stałą siłową potencjału SMD $4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$. Struktury początkowe służące do symulacji były identyczne jak w przypadku struktur z serii symulacji opisywanych w rozdziale 6.1. W celu zebrania statystyki i wyznaczenia błędów standardowych dla każdej zmiennej prędkości lub temperatury wykonano po 10 symulacji. Zarówno dla serii „zmiennie-prędkościowej” jak i serii „zmiennie-temperaturowej” rejestrowane wydłużenie peptydu oraz siłę SMD. Z każdego profilu siły SMD w funkcji długości rozciąganej molekuly wyznaczono siłę zrywającą wiązanie wodorowe F_{unb} . Aby wyznaczyć tę siłę, dla każdej symulacji dla danej zmiennej prędkości lub temperatury zastosowano funkcję wygładzającą dane (filtr FFT), a następnie wyznaczono wartość siły zrywającej (jako pierwszy pik w wygładzonej krzywej), wydłużenie i czas, po którym zarejestrowano pik (rysunek 6.15).

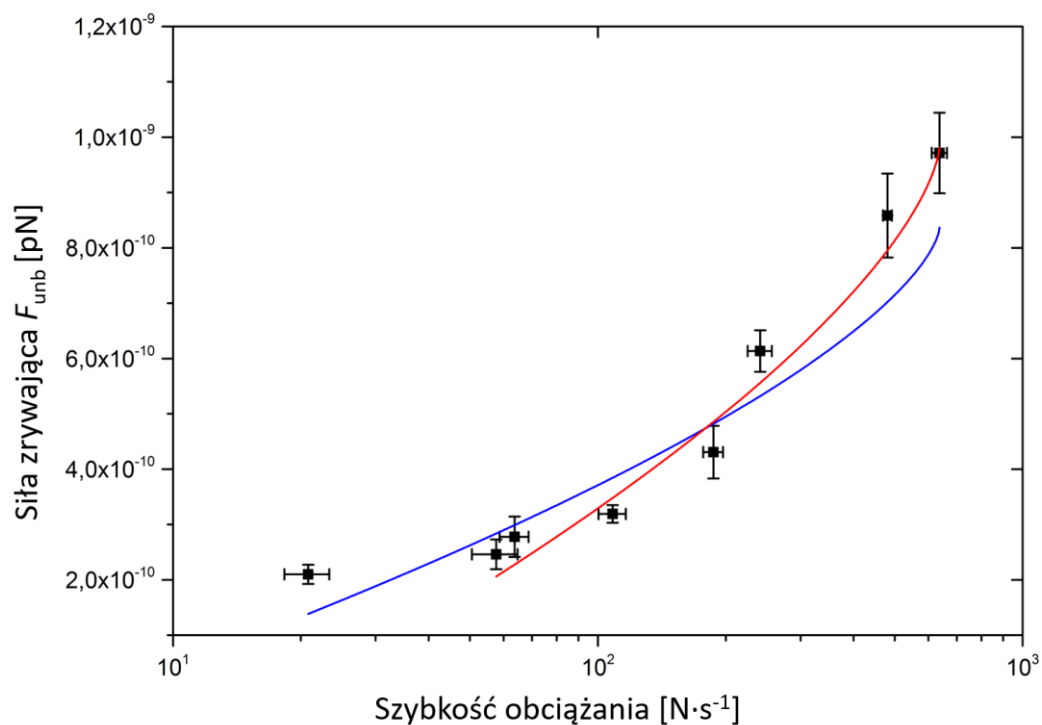


Rysunek 6.15. Przykładowy przebieg siły SMD dla 120 Å rozciągnięcia modelowanego peptydu dla $v_{\text{SMD}} = 75 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Punkty pomiarowe oznaczono szarymi kwadratami, czerwona ciągła linia prezentuje funkcję wygładzającą. Czerwoną przerywaną linią oznaczono poziom siły zrywającej pierwsze wiązanie wodorowe F_{unb} .

Z każdej serii pomiarowej wykonano histogramy wyznaczając najbardziej prawdopodobną siłę zrywającą F_{unb} dzięki zastosowaniu rozkładu log-normalnego. Rozkład log-normalny siły zrywającej pojedyncze wiązanie wodorowe został potwierdzony na podstawie weryfikacyjnej serii 50 symulacji SMD dla $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (rysunek 6.16).



Rysunek 6.16. Rozkład występowania sił zrywających pojedyncze wiązanie wodorowe dla serii 50 symulacji SMD z $v_{\text{SMD}} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Rozkład opisywany jest funkcją log-normalną, wskazującą na występowanie najbardziej prawdopodobnej siły zrywającej F_{unb} .



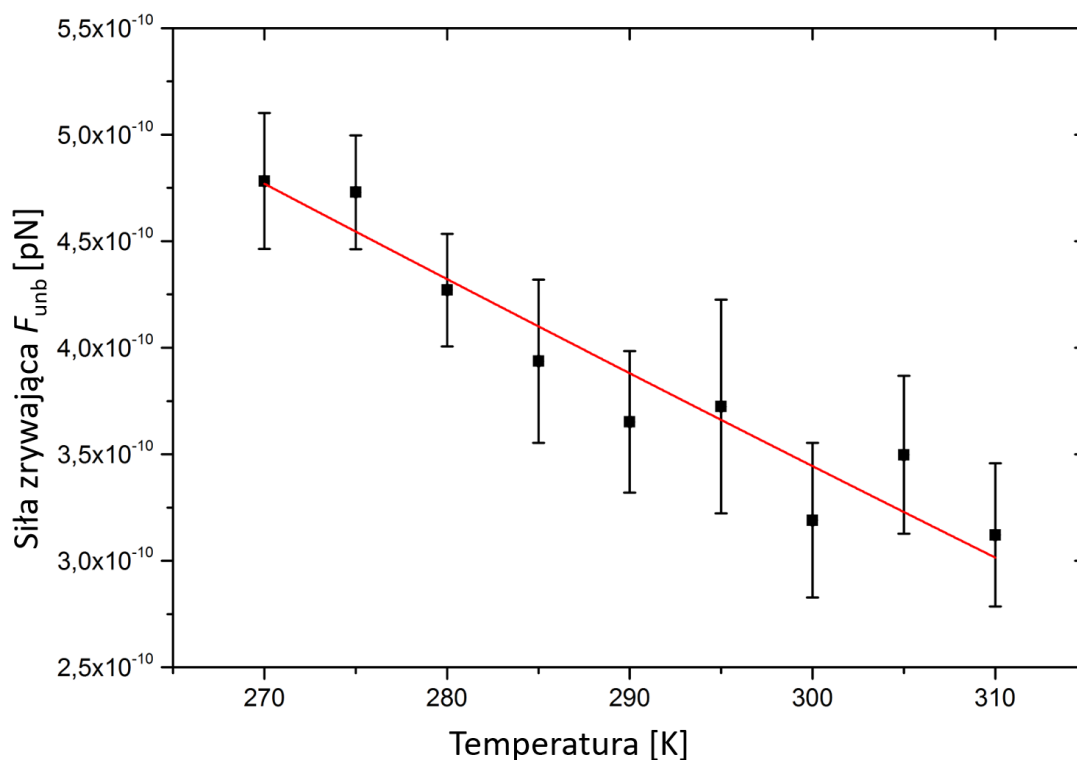
Rysunek 6.17. Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{unb} od szybkości obciążania z dopasowaniem modelem DHS dla dwóch zakresów danych szybkości obciążenia: 21 – 626 $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$ (niebieski) i 57 – 626 $\text{N}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwony). Niepewności pomiarowe zostały określone jako błąd standardowy.

Rysunek 6.17 przedstawia serię „zmiennie-prędkościową” (i). W tym przypadku zmienną była szybkość obciążania r_F , wyznaczona dla każdej prędkości v_{SMD} . Wartością funkcji była najbardziej prawdopodobna siła zrywająca, wyznaczona na podstawie rozkładu log-normalnego sił. Dokonano dopasowania modelu DHS dla dwóch zakresów szybkości obciążania: szerszego 21 – 626 N·s⁻¹ oraz węższego 57 – 626 N·s⁻¹. Dane uzyskane z dopasowania przedstawiono w Tabeli 6.2.

Tabela 6.2. Parametry uzyskane z modelu DHS z zależności siły zrywającej HB od szybkości obciążania

Model	r_F [N·s ⁻¹]	R^2_{adj}	k_{off}^0 [ps ⁻¹]	x_β [Å]	ΔG_β [kcal·mol ⁻¹]
DHS	21 – 626	0,75	6,1 ± 1,6	0,33 ± 0,06	2,6 ± 1,1
	57 – 626	0,92	10,9 ± 1,5	0,22 ± 0,04	2,04 ± 0,21

Energia aktywacji dla węższego zakresu szybkości obciążania wynosi odpowiednio (2,6 ± 1,1) i (2,04 ± 0,21) kcal·mol⁻¹, i jest mniejsza niż wartość uzyskana w poprzednim eksperymencie obliczeniowym (rozdz. 6.1). Wynika to z węższego zakresu dopasowania, który nie obejmuje punktów dotyczących szybkości obciążania w zakresie kilku N·s⁻¹, dla których zachodzi zjawisko odtwarzania zerwanych wiązań niewzględnie przez model DHS. Dodatkowo bardzo wysokie prędkości rozciągania v_{SMD} rzędu 500 – 1000 m·s⁻¹ (r_F od 1000 do 3000 N·s⁻¹) nie zapewniają czasu na relaksację modelu peptydu, co widać było przy analizie energii wewnętrznej peptydu podczas symulacji SMD (rysunek 6.4). Z tego powodu postanowiono wybrać środkowy zakres szybkości obciążania (10 – 1000 N·s⁻¹) jako zapewniający najbardziej wiarygodne wyniki. Dopasowanie zastosowanego modelu DHS do danych w zakresie 57 – 626 N·s⁻¹ jest dokładniejsze niż dla zakresu 21 – 626 N·s⁻¹ ($R^2_{adj} = 0,92$ vs 0,75), dlatego w celu wyznaczenia zmiany entalpii i entropii postanowiono wykorzystać parametry uzyskane z tego zakresu szybkości obciążania. Stosując przekształcony wzór 6.4 wyznaczono czas dysocjacji wiązania $\tau_D = 0,302$ ps, oraz wykorzystano obliczony parametr x_β jako parametry wejściowe do zmodyfikowanego modelu DHS (wzór 6.5). W celu wyznaczenia zmian entalpii i entropii, wykonano serię „zmiennie-temperaturową” (ii), postępując analogicznie jak w przypadku serii (i) – wyznaczono najbardziej prawdopodobną siłę zrywającą wiązanie wodorowe z rozkładu 10 wartości sił zrywających, wyznaczonych z profili sił SMD w funkcji wydłużenia. Rysunek 6.18 przedstawia wyniki oraz dopasowanie zmodyfikowanego modelu DHS do danych z serii (ii).



Rysunek 6.18. Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{unb} od temperatury z dopasowaniem zmodyfikowanym modelem DHS. Niepewności pomiarowe zostały określone jako błąd standardowy.

W tabeli 6.3 przedstawiono wartości ΔH oraz $T\Delta S$ dla 300 K, uzyskane z dopasowania. Różnica między wyznaczonymi energiami $\Delta H - T\Delta S$ wynosi $2,05 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ i jest zgodna z wartością ΔG_{β} uzyskaną z dopasowania modelu DHS z serii (i).

Tabela 6.3. Parametry uzyskane z zmodyfikowanego modelu DHS z zależności siły zrywającej HB od temperatury

Model	$\Delta H - T\Delta S$ [kcal·mol ⁻¹]	ΔH [kcal·mol ⁻¹]	$T\Delta S$ dla 300 K [kcal·mol ⁻¹]	R^2_{adj}
Zmodyfikowany DHS	2,05	$3,69 \pm 0,36$	$1,64 \pm 0,38$	0,91

Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe w badanym zakresie temperatur 270 K– 310 K ($-3^\circ - 37^\circ$) jest widocznie malejąca, od 500 pN do 300 pN. Uzyskana wartość siły zrywającej wiązanie wodorowe dla 300 K jest zgodna z poprzednią serią symulacji (i) dla $v_{\text{SMD}}=100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Analizowanie szerszego zakresu temperatur nie miałoby sensu – powyżej 310 K struktura α -helikalna jest niestabilna i szybko ulega denaturacji tj. utracie drugorzędowej struktury, natomiast poniżej 270 K wyniki byłyby mało wiarygodne z uwagi na zastosowany model wody TIP3P, który nie został stworzony do poprawnej reprezentacji struktury lodu wodnego. Zgodnie z intuicją, wraz ze wzrostem temperatury siła potrzebna

na zerwanie wiązania wodorowego maleje – spowodowane jest to wzrostem energii kinetycznej układu wraz ze wzrostem temperatury. Dostarczenie do układu energii kinetycznej zwiększa prawdopodobieństwo zerwania wiązania i ułatwia pokonanie bariery potencjału, stąd też dla wyższych temperatur obserwowane niższe wartości siły zrywającej wiązanie. Zmiana entalpii wyznaczona w proponowanej metodyce dla badanego peptydu wyniosła $\Delta H = (3,69 \pm 0,36)$ kcal·mol⁻¹, zmiana wkładu entropowego obliczona dla 300 K wynosi $T\Delta S = (1,64 \pm 0,38)$ kcal·mol⁻¹. Składnik entropowy obniża barierę aktywacji, a uzyskana wielkość jest zgodna z obliczoną dla pojedynczego aminokwasu podczas rozwijania ubikwityny na podstawie analizy danych z eksperymentów NMR 1,4 kcal·mol⁻¹ [47]. Uzyskana wartość energii aktywacji jest zgodna z wartościami uzyskanymi dla α -helisy w wodzie przez Sheu *et. all* [45,48].

7. Podsumowanie i wnioski

W rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki badań teoretycznych i obliczeniowych związane ze stabilnością struktury α -helikalnych peptydów: dekaalaniny oraz peptydu o sekwencji AAKA(AEAAKA)₅AC. Bardzo ważną rolę w stabilizacji tej struktury pełnią wiązania wodorowe, stąd też głównym celem pracy było określenie ich wpływu na stabilność struktury oraz wyznaczenie ich własności kinetycznych i energetycznych.

Za pomocą metod dynamiki molekularnej i sterowanej dynamiki molekularnej, opartych na polu siłowym, dokonano szeregu symulacji mających na celu pokazanie znaczenia sieci wiązań wodorowych poprzez zamodelowanie ich braku w dekaalaninie. Dodatkowo, korzystając z trzech modeli termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału (BE, DHS, FNDY), wyznaczono parametry kinetyczne i energetyczne pojedynczego wiązania wodorowego. Dzięki modyfikacji modelu DHS opracowano metodykę wyznaczania dodatkowych parametrów energetycznych – składowych zmian energii swobodnej Gibbsa: entalpowej i entropowej.

Symulowanie procesów fizycznych oraz modelowanie struktur biologicznych często opiera się na pewnych założeniach oraz przybliżeniach. Ze względu na dużą czasochłonność obliczeń kwantowomechanicznych *ab-initio* oraz złożoność układów biologicznych (nawet dziesiątki lub setki tysięcy atomów) badacze wykorzystują metody obliczeniowe oparte na polach siłowych, takich jak klasyczna MD. Aby uzyskać wiarygodne wyniki, podstawowym punktem wyjścia jest ocena poprawności uzyskanych geometrii molekuł, co też zostało w niniejszej pracy przedstawione – modelowane struktury zweryfikowane zostały za pomocą algorytmu STRIDE pod kątem posiadania α -helikalnej struktury (dekaalanina 75,56 % helikalności, AAKA(AEAAKA)₅AC 87,93 % helikalności). Dodatkowo, porównanie kątów torsyjnych oraz długości wiązań wodorowych z dwoma wybranymi fragmentami α -helikalnymi geometrii białek uzyskanej z badań XRD potwierdziły poprawność struktur.

Zastosowane pole siłowe CHARMM36 posiada bogaty zestaw parametrów opisujących oddziaływania pomiędzy atomami w molekule. Ponieważ parametry te są edytowalne oraz istnieje możliwość dodawania nowych typów atomów nie dziwi fakt, że część z badaczy korzysta z tego faktu i modyfikuje pola siłowe. W przedstawionej pracy dokonano takiej modyfikacji, aby zasymulować brak sieci wiązań wodorowych w dekaalaninie. Wykorzystując tę modyfikację łatwo pokazać, że peptyd bez wiązań wodorowych ma niestabilną strukturę. Na podstawie porównania wyników symulacji metodą dynamiki molekularnej, w szczególności parametru RMSD szkieletu peptydu z i bez sieci wiązań wodorowych, można oszacować, że struktura modelu bez wiązań wodorowych jest około 6 razy mniej stabilna już po 50 ps symulacji. Warto zauważyć, że peptyd traci strukturę α -helikalną już w pierwszych pikosekundach symulacji.

Zastosowanie metody sterowanej dynamiki molekularnej i prowadzenie symulacji rozciągania peptydu dla różnych prędkości rozciągania umożliwiło wyznaczenie stałej sztywności peptydu z i bez sieci wiązań wodorowych przy założeniu, że w początkowej fazie rozciągania zależność rejestrowanej siły od wydłużenia zachowuje się zgodnie z prawem Hooke'a. Porównanie stałych sztywności modelu z i bez wiązań wodorowych pozwoliło na oszacowanie udziału wiązań wodorowych w sztywności peptydu na poziomie $C \approx 67\%$.

Symulacje metodą dynamiki molekularnej i sterowanej dynamiki molekularnej kolejnego peptydu, AAKA(AEAAKA)₅AC, przeprowadzone dla różnych prędkości rozciągania i różnych temperatur, w których wykonywano symulacje, pozwoliły na wykonanie eksperymentu dynamicznej spektroskopii sił, w którym mierzono siłę zrywającą wiązanie wodorowe. Za pomocą modeli termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału (BE, DHS i FNDY) wyznaczono parametry energetyczne pojedynczego wiązania wodorowego, w tym energię aktywacji ΔG_{β} oraz energię wiązania ΔG_{bu} . Energia swobodna aktywacji wiązania wodorowego ΔG_{β} wyniosła odpowiednio $(5,1 \pm 1,1)$ kcal·mol⁻¹ i $(4,33 \pm 0,93)$ kcal·mol⁻¹ dla zakresów szybkości obciążania r_F 1 – 2820 N·s⁻¹ i 39 – 2820 N·s⁻¹. Obliczona energia pojedynczego wiązania wodorowego ΔG_{bu} wyniosła $(1,59 \pm 0,51)$ kcal·mol⁻¹. Jak pokazano w pracy, wartości uzyskane za pomocą sterowanej dynamiki molekularnej są zgodne z wartościami literaturowymi, niemniej należy poczynić uwagę, że uzyskane metodą sterowanej dynamiki molekularnej wartości są zależne od stosowanego modelu i założeń, na których model się opiera, np. DHS nie uwzględnia odtwarzania zerwanych wiązań tak jak FNDY, dlatego też zawodzi dla niskich wartości szybkości obciążania tj. poniżej 10 N·s⁻¹. Dodatkowo prędkości rozciągania wyższe niż 1000 N·s⁻¹ nie pozwalają na pełną relaksację modelu peptydu, co również zostało pokazane. Analiza powyższego pozwoliła na zawężenie obszaru stosowalności modelu DHS w SMD, co też zostało wykorzystane przy prowadzeniu kolejnych symulacji z użyciem zmodyfikowanego modelu DHS. Na potrzeby wyznaczenia składowych energetycznych energii swobodnej Gibbsa zmodyfikowano model DHS, i zaproponowano procedurę prowadzenia dwóch serii symulacji: zmiennie-prędkościowej, a następnie zmiennie-temperaturowej. Dzięki tej procedurze możliwym było wyznaczenie składów entalpowego i entropowego w zmianie energii swobodnej Gibbsa. Podejście dwuetapowe zastosowano z uwagi na fakt ograniczenia liczby szukanych parametrów w modelu do maksymalnie trzech w pierwszym kroku i dwóch w kolejnym. Należy pamiętać, że algorytmy dopasowania krzywej do danych działają tym dokładniej, im mniej parametrów muszą wyznaczyć, duża liczba parametrów szukanych powoduje błędzenie algorytmu lub wręcz brak możliwości wyznaczenia parametrów dla zadanych kryteriów zbieżności. Dla badanego zakresu szybkości obciążania r_F 57 – 626 N·s⁻¹ energia aktywacji pojedynczego wiązania wodorowego wyniosła $\Delta G_{\beta} = (2,04 \pm 0,21)$ kcal·mol⁻¹. Zmiana entalpii wyniosła $\Delta H = (3,69 \pm 0,36)$ kcal·mol⁻¹, zmiana entropii obliczona dla 300 K wynosi $T\Delta S = (1,64 \pm 0,38)$ kcal·mol⁻¹. Powyższe wyniki oraz wnioski zostały opublikowane w dwóch publikacjach [24,25].

Niniejsza praca, oprócz stosownej analizy opisującej wiązania wodorowe z wykorzystaniem dynamiki molekularnej, zawiera propozycję modelowania braku sieci wiązań wodorowych w peptydach oraz przedstawia propozycję modyfikacji jednego z modeli termicznie aktywowanej ucieczki z jamy potencjału (DHS) pozwalającej na wyznaczenie wkładu entalpowego i entropowego w energię swobodną pojedynczego wiązania wodorowego. Schemat eksperymentu obliczeniowego przedstawionego w niniejszej pracy można wykorzystać w badaniach teoretycznych innych specyficznych oddziaływań międzymolekularnych np. białko–ligand, dzięki czemu badacze mogą uzyskać więcej dodatkowych informacji o energetyce oddziaływania niż podczas stosowania standardowego modelu DHS. Nowe metody obliczeniowe oraz rozwinięcia aktualnie stosowanych modeli matematycznych są szczególnie pożądane, zwłaszcza w kontekście wyznaczania parametrów oddziaływania kompleksu białko–ligand, co może być pomocne przy wyznaczaniu skuteczności projektowanych leków. Dodatkowo, stosowanie zarówno metod eksperymentalnych, jak i różnych obliczeniowych, pozwala na przeprowadzenie eksperymentu spektroskopii sił pojedynczych molekuł w szerokim zakresie szybkości obciążania, co prowadzi do lepszego zrozumienia zjawisk fizycznych zachodzących w badanych układach i jest ważnym krokiem w kierunku projektowania leków, w tym tzw. celowanych (*ang. targeted drugs*) [50,51].

8. Bibliografia

- [1] A. M. Ali, J. Atmaj, N. van Oosterwijk, M. R. Groves, A. Domling, *Stapled Peptides Inhibitors: A New Window for Target Drug Discovery*, Computational Structural Biotechnology Journal, 2019, 17:263-281.
- [2] S. Roy, P. Ghosh, I. Ahmed, M. Chakraborty, G. Naiya, B. Ghosh, *Constrained α -Helical Peptides as Inhibitors of Protein-Protein and Protein-DNA Interactions*, Biomedicines 2018, 6(4): 118.
- [3] V. L. Davidson, D. B. Sittman, *Biochemia*, Wrocław: Urban & Partner, 2002.
- [4] M. J. Buehler, S. Keten, T. Ackbarow, *Theoretical and computational hierarchical nanomechanics of protein materials: Deformation and fracture*, Progress in Materials Science, 2008, 58: 1101-1241.
- [5] A. Ptak, S. Takeda, C. Nakamura, J. Miyake, M. Kageshima, S. P. Jarvis, H. Tokumoto, *Modified atomic force microscope applied to the measurement of elastic modulus for a single peptide molecule*, Journal of Applied Physics, 2001, 90, 3095–3099.
- [6] M. Kageshima, M. A. Lantz, S. P. Jarvis, H. Tokumoto, S. Takeda, A. Ptak, C. Nakamura, J. Miyake, *Insight into conformational changes of a single α -helix peptide molecule through stiffness measurements*, Chemical Physics Letters, 2001, 343, 77–82.
- [7] J. A. McCammon, B. R. Gelin, M. Karplus, *Dynamics of a folded proteins*, Nature, 267 (1977) 585.
- [8] R. Pablo, R. Arantes, *Fighting COVID-19 Using Molecular Dynamics Simulations*, ACS Central Science, 2020, 6, 10, 1654–1656.
- [9] H. A. Kramers, *Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions*, Physica, 1940, 7, 284-304.
- [10] G. I. Bell, *Models for specific adhesion of cells to cells*, Science, 1978, 200, 618–627.
- [11] E. Evans and K. Ritchie, *Dynamic strength of molecular adhesion bonds*, Biophysic Journal, 1997, 72, 1541–1555.
- [12] O. Dudko, G. Hummer, A. Szabo, *Intrinsic rates and activation free energies from single-molecule pulling experiments*, Physical Review Letters, 2006, 96, 108101.
- [13] R. W. Friddle, A. Noy, J. J. De Yoreo, *Interpreting the widespread nonlinear force spectra of intermolecular bonds*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109, 13573–13578.
- [14] J. Groszkowski, F. Misztal, D. Smoleński (red) *Encyklopedia Techniki. Chemia*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1972.
- [15] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Abbreviations and Symbols for the Description of the Conformation of Polypeptide Chains, Tentative Rules* (1969), Biochemistry, 1970, 9/18.
- [16] Ramachandran et all, *Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations*, Journal of Molecular Biology, 1963 (7), 95-99.
- [17] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1951 (37), 205-211.

- [18] R. L. Baldwin, *α -Helix formation by peptides of defined sequence*, Biophysical Chemistry, 1995, 55, 127–135.
- [19] H. Umeyama, K. Morokuma, *The Origin of Hydrogen Bonding, An Energy Decomposition Study*, Journal of the American Chemical Society, 1997, 99:5.
- [20] B. Jeziorski, M. van Hemert, *Variation-perturbation treatment of the hydrogen bond between water molecules*, Molecular Physics, 1976, 31, 713.
- [21] R. E. Hubbard, M. K. Haider, *Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength*, Encyclopedia of Life Sciences, 2010.
- [22] Z. Liu, G. Wang, Z. Li, R. Wang, *Geometrical Preferences of the Hydrogen Bonds on Protein-Ligand Binding Interface Derived from Statistical Surveys and Quantum Mechanics Calculations*, Journal of Chemical Theory and Computation, 2008, 4, 1959-1973.
- [23] L. Uribe, S. Jaschonek, J. Gauss, G. Diezemann, *Mechanical unfolding pathway of a model β -peptide foldamer*, Journal of Chemical Physics, 2015, 142, 204901-1–204901-9.
- [24] J. Dąbrowski, W. Nowak, A. Ptak, *How strong are hydrogen bonds in the peptide model?*, Physical Chemistry Chemical Physics, 2020, 22, 1392-1399.
- [25] J. Dąbrowski, W. Nowak, A. Ptak, *Enthalpic and entropic contributions to the activation free energy of single noncovalent bonds in molecular systems: A computational methodology*, Physical Review A, 2022, 106.
- [26] S. Zepeda, Y. Yeh, A. Noy, *Determination of Energy Barriers for Intermolecular Interactions by Variable Temperature Dynamics Force Spectroscopy*, Langumir, 2003, 19, 1457-1461.
- [27] U. B. Gawas, V. K. Mandrekar, M. S. Majik, *Advances in Biological Science Research*, Elsevier 2019, Chapter 5.
- [28] A. Oleś, *Metody doświadczalne fizyki ciała stałego*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1998.
- [29] N. J. Greenfield, *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*, Nature Protocols, 2006, vol. 1 no. 6.
- [30] F. Rico, A. Russek, L. Gonzalez, H. Grubmuller, S. Scheuring, *Heterogenous and rate-dependent streptavidin-biotin unbinding revealed by high-speed force spectroscopy and molecular dynamics simulations*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, April 2, 2019 116 (14) 6594-6601.
- [31] K. Herman, M. Weiss, M. Lekka, A. Ptak, *How Complex Is the Concanavalin A-Carboxypeptidase Y Interaction*, ACS Chemical Biology, 2019, 14, 1611-1618.
- [32] L. Piela, *Idee chemii kwantowej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
- [33] A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr., J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer; J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, M. Karplus, *All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics Studies of proteins*, The Journal of Physical Chemistry B, 1998, 102, 3586-3616.

- [34] J. Rydzewski, R. Jakubowski, W. Nowak, *Communication: Entropic measure to prevent energy over-minimization in molecular dynamics simulations*, The Journal of Chemical Physics, 2015, 143, 171103.
- [35] M. Matyka, *Symulacje komputerowe w fizyce*, HELION, Gliwice 2002.
- [36] H. Grubmueller, B. Heymann, P. Tavan, *Ligand binding: Molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotinrupture force*, Science, 1996, 271, 997–999.
- [37] D. Frishman, P. Argos, *Knowledge-Based Protein Secondary Structure Assignment*, Proteins 1995, 23(4):566-79.
- [38] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *VMD – Visual Molecular Dynamics*, Journal of Molecular Graphics and Modelling, 1996, vol, 14, pp, 33-38.
- [39] C. James, D. J. Phillips, J. D. Hardy, J. D. C. Maia, J. E. Stone, J. V. Ribeiro, R. C. Bernardi, R. Buch, G. Fiorin, J. Henin, W. Jiang, R. McGreevy, M. C. R. Melo, B. K. Radak, R. D. Skeel, A. Singharoy, Y. Wang, B. Roux, A. Aksimentiev, Z. Luthey-Schulten, L. V. Kale, K. Schulten, C. Chipot, E. Tajkhorshid, *Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD*, The Journal of Chemical Physics, 53:044130, 2020.
- [40] M. A. Arkin, M. Randal, W. L. DeLano, J. Hyde, T. N. Luong, J. D. Oslob, D. R. Raphael, L. Taylor, J. Wang, J. A. Wells, R. S. McDowell, A. C. Braisted, 1M47, 2002-07-31 RCSB Protein Data Bank.
- [41] L. Chantalat, N. Jones, F. Korber, J. Navaza, A. G. Pavlovsky, 1HGU, 1995-12-07, RCSB Protein Data Bank.
- [42] M. F. Harrach, B. Drossel, *Structure and dynamics of TIP3P, TIP4P and TIP5P water near smooth and atomistic walls of different hydroaffinity*, The Journal of Chemical Physics, 140, 2014.
- [43] A. C. Lorenzo, E. R. Caffarena, *Elastic properties, Young's modulus determination and structural stability of the tropocollagen molecule: a computational study by steered molecular dynamics*, Journal of Biomechanics 38, 1527-1533, 2005.
- [44] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, *Energy Landscapes of receptor ligand bonds explored with dynamics force spectroscopy*, Nature, 1999, 397, 50-53.
- [45] S. Sheu, D. Yang, H. L. Selzle, E.W. Schlag, *Energetics of hydrogen bond in peptides*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100, 12683-12687.
- [46] R. B. Sessions, N. Gibbs, C.E. Dempsey, *Hydrogen bonding in helical polypeptides from molecular dynamics simulations and amide hydrogen exchange analysis: Alamethicin and melittin in methanol*, Biophysical Journal, 1998, 74, 138-152.
- [47] M. C. Baxa, E. J. Haddadian, J. M. Jumper, K. F. Freed, T. R. Sosnick, *Loss of Conformational Entropy in Protein Folding Calculated Using Realistic Ensembles and Its Implications for NMR-Based Calculations*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111 (43).
- [48] S. Sheu, E.W. Schlag, H. L. Selzle, D. Yang, *Hydrogen Bonds in Membrane Proteins*, The Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113, 5318-5326.
- [49] S. Takeda, A. Ptak, M. Kageshima, H. Tokumoto, C. Nakamura, J. Miyake, *Unfolding process of a single peptide molecule on a substrate was investigated by atomic force microscope*, Surface Science 532: 244-248, 2003.

- [50] D.E.B. Gomes, M. C. R. Melo, P.S.F.C. Gomes, R.C. Bernardi, *Bridging the gap between in vitro and in silico single-molecule force spectroscopy*, preprint bioRxiv, July 2022
- [51] F. Sohraby, A. Nunes-Alves, *Advances in computational methods for ligand binding kinetics*, Trends in Biochemical Sciences, 2023, vol 48, 437-449

Spis rysunków

Numer	Skrócony podpis rysunku	Strona
1.1.	Schemat porównawczy eksperymentu wykonywanego za pomocą AFM (a) oraz eksperymentu komputerowego przeprowadzanego metodą SMD (b). W obu przypadkach otrzymać można zależność siły działającej na cząsteczkę od wydłużenia badanego peptydu (c)	12
2.1.	Kąty torsyjne ϕ i ψ definiujące drugorzędową strukturę peptydów i białek. Przedstawiony peptyd to di-alanina w konformacji α -helikalnej.	16
2.2.	Model wiązania wodorowego.	17
2.3.	Model prezentujący α -helikalny peptyd, dekaalaninę z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi charakterystycznymi dla α -helisy ($i - i+4$, czerwony, kreskowane linie) oraz schemat sieci tych wiązań.	19
2.4.	Model prezentujący α -helikalną strukturę dekaalaniny wzdłuż osi polipeptydu (niebieska wstęga) oraz rzut prostopadły do osi polipeptydu.	19
2.5.	Schemat rozpraszania promieniowania X na płaszczyznach kryształu.	20
2.6.	Potencjał typu Lennarda-Jonesa z zaznaczonymi strefami zasięgu oddziaływań wykorzystywanych w trzech podstawowych trybach pracy AFM.	22
2.7.	Przykładowy profil siły w funkcji przesunięcia skanera (tzw. krzywa siły) dla oddziaływania białko-ligand w eksperymencie spektroskopii sił [31] (a) oraz teoretyczna zależność rejestrowanej siły zrywającej od szybkości obciążania (b).	23
2.8.	Schemat energii swobodnej oddziaływania pomiędzy dwoma ciałami prezentujący przebieg energii bez przyłożonej siły (linia ciągła) oraz po przyłożeniu siły deformującej oddziaływanie (linia przerywana)	24
3.1.	Ideowy schemat energii wewnętrznej cząsteczki H_2 opisanej funkcją Lennarda-Jonesa w funkcji odległości między jądrami atomów wodoru.	30
3.2.	Schemat symulacji SMD. Pomędzy wirtualnym atomem poruszającym się z prędkością V_{SMD} a wybranym atomem molekuly przyłożono dodatkowy potencjał SMD, opisany stałą siłową k_{SMD} . Podczas trwania symulacji molekula rozciągana jest zgodnie z kierunkiem poruszania się wirtualnego atomu.	36
3.3.	Ideowy schemat mapy Ramachandrana z zaznaczonymi obszarami struktury typu α -helisy prawoskrętnej (α_R), lewoskrętnej (α_L), helisy 3-10 (3_{10}) oraz beta-harmonijki (β).	37
4.1.	Model dekaalaniny przed optymalizacją geometrii.	40
4.2.	Model dekaalaniny w pudle periodycznym wypełnionym molekułami wody po optymalizacji geometrii i podgrzewaniu do temperatury 300 K.	40
4.3.	Przebieg energii całkowitej podczas optymalizacji geometrii peptydu <i>in vacuo</i> (100 kroków obliczeniowych) oraz peptydu w wodzie (5000 kroków obliczeniowych).	41
4.4.	Przebieg temperatury (czerwona krzywa) oraz energii całkowitej układu (niebieska krzywa) podczas symulacji podgrzewania peptydu (450 000 kroków co odpowiada 450 ps) i wygrzewającej dynamiki molekularnej (500 000 kroków co odpowiada 500 ps).	41
4.5.	Ilustracja identyfikacji drugorzędowej struktury uzyskanej geometrii podczas dynamiki molekularnej w $T = 300$ K przez 500 ps z użyciem algorytmu STRIDE.	43
4.6.	Rozkład częstości występowania odległości donor – akceptor w uzyskanej geometrii podczas symulacji wygrzewania MD.	44
4.7.	Rozkład częstości występowania kątów torsyjnych wszystkich aminokwasów modelowanej struktury dekaalaniny podczas symulacji wygrzewającej MD	44
4.8.	Modyfikacja parametrów pola siłowego pozwalająca modelować redukcję wiązań wodorowych.	46
4.9.	Model AAKA(AEAAKA) ₅ AC przed optymalizacją geometrii.	47
4.10.	Zbudowany model AAKA(AEAAKA) ₅ AC w pudle periodycznym wypełnionym molekułami wody po optymalizacji geometrii i podgrzewaniu do temperatury 300 K.	47
4.11.	Przebieg energii całkowitej podczas optymalizacji geometrii peptydu <i>in vacuo</i> (100 kroków obliczeniowych) oraz peptydu w wodzie (5000 kroków obliczeniowych).	48
4.12.	Przebieg temperatury (czerwona krzywa) oraz energii całkowitej układu (niebieska krzywa) podczas symulacji podgrzewania peptydu (1 000 000 kroków co odpowiada 1 000 ps) i wygrzewającej dynamiki molekularnej (2 000 000 kroków co odpowiada 2 000 ps) dla docelowej temperatury $T = 300$ K.	48

Numer	Skrócony podpis rysunku	Strona
4.13.	Przebieg krzywych temperatury układu podczas symulacji podgrzewającej (0.333 K na 1 ps) i krótkiej symulacji wygrzewającej (dopełnienie do 1 ns) dla temperatur $T = 270, 280, 290, 305$ i 310 K.	49
4.14.	Ilustracja identyfikacji drugo-rzędowej struktury geometrii uzyskanej podczas symulacji wygrzewającej MD (czas symulacji 2 ns) z użyciem algorytmu STRIDE.	53
4.15.	Histogram wartości odległości donor – akceptor w geometrii modelu AAKA(AEAAKA) ₅ AC uzyskanej podczas symulacji wygrzewającej MD.	54
4.16.	Rozkład częstości występowania kątów torsyjnych aminokwasów 3 – 34 modelowanej struktury dekaalaniny podczas symulacji wygrzewającej MD modelu AAKA(AEAAKA) ₅ AC	54
4.17.	Wizualizacja struktury 1m47, z zaznaczonym referencyjnym fragmentem α -helikalnym (kolor niebieski).	56
4.18.	Wizualizacja struktury 1hgu, z zaznaczonym referencyjnym fragmentem α -helikalnym (kolor niebieski).	56
4.19.	Schematyczna ilustracja różnicy pomiędzy modelami wody TIP3P i TIP4P.	60
4.20.	Przykładowe profile rejestrowanej siły SMD w funkcji wydłużenia badanego peptydu AAKA(AEAAKA) ₅ AC dla symulacji SMD z $v_{SMD} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ i czterech różnych stałych siłowych k_{SMD} .	62
4.21.	Zależność wyznaczonej stałej sprężystości badanego peptydu AAKA(AEAAKA) ₅ AC (lewy wykres) oraz kolagenu [43] (prawy wykres) w funkcji zastosowanej stałej siłowej potencjału SMD w symulacjach.	63
5.1.	Schemat sieci wiązań wodorowych pomiędzy poszczególnymi aminokwasami modelowanej dekaalaniny.	64
5.2.	Odległości donor – akceptor pomiędzy aminokwasem i a $i+4$ dla sześciu wiązań wodorowych w funkcji czasu trwania symulacji wygrzewającej MD.	65
5.3.	Funkcja radialnej dystrybucji par dla odległości donor – akceptor wiązań wodorowych dla trajektorii uzyskanej z symulacji MD dekaalaniny.	66
5.4.	Funkcja radialnej dystrybucji par dla odległości woda – atom tlenu (czarny) i azotu (czerwony) dla trajektorii uzyskanej z symulacji MD dekaalaniny.	67
5.5.	Odległości pomiędzy donorem a akceptorem szóstego wiązania wodorowego w dekaalaninie (tlen w alaninie 6 i azot w alaninie 10) oraz pomiędzy atomami tlenu w alaninie 6 i sąsiedniej molekuły wody, tworzącej krótkotrwałe wiązanie wodorowe z peptydem.	68
5.6.	Przebieg temperatury (czerwona krzywa) oraz energii całkowitej układu (niebieska krzywa) dla modelu bez wiązań wodorowych w symulacji MD o czasie trwania 500 ps.	69
5.7.	Wizualizacja zmian strukturalnych zachodzących podczas trwania symulacji MD modelu dekaalaniny z pełnym uwzględnieniem wiązań wodorowych (model z HB, niebieska wstęga) i ze zredukowanymi wiązaniami wodorowymi (model bez HB, czerwona wstęga).	70
5.8.	Porównanie RMSD dla atomów szkieletu peptydu dla modelu z HB (czarny) i bez HB (czerwony) podczas symulacji MD.	71
5.9.	Ilustracja identyfikacji drugorzędowej struktury uzyskanej dla modelu z HB (górną mapą) oraz modelu bez HB (dolną mapą) podczas 500 ps symulacji MD w stałej temperaturze $T = 300$ K.	71
5.10.	Histogram wartości odległości donor – akceptor w uzyskanej geometrii modelu z HB (kolor niebieski) i bez HB (kolor czerwony) podczas 500 ps symulacji wygrzewającej MD.	72
5.11.	Wizualizacja symulacji rozciągania dekaalaniny, modelu z HB dla trzech wybranych momentów symulacji, tj. 0 ps, 0,3 ps i 0,5 ps.	74
5.12.	Zmiany odległości pomiędzy atomami tlenu z aminokwasu i a azotu z aminokwasu ($i+4$). Wyniki z przykładowej, jednej z 10 symulacji SMD dla modelu z HB dla prędkości $v_{SMD} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.	75
5.13.	Zmiany struktury drugorzędowej podczas symulacji rozciągania modelu z i bez HB. Wyniki uzyskane z przykładowej, jednej z 10 symulacji SMD dla modelu z HB dla prędkości $v_{SMD} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.	76
5.14.	Średnie wartości siły SMD z 10 symulacji SMD dla modelu z HB dla trzech przykładowych prędkości SMD: $v_{SMD} = 10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (niebieskie kwadraty), $v_{SMD} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (pomarańczowe trójkąty) i $v_{SMD} = 400 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwone koła).	77

Numer	Skrócony podpis rysunku	Strona
5.15.	Zależność średnich stałych sprężystości dla modelu z HB (kolor czarny) i bez HB (kolor czerwony) od prędkości rozciągania v_{SMD} .	78
5.16	Średnia siła obliczona z wyników 10 symulacji SMD w funkcji wydłużenia peptydu dla modelu z (HB, niebieski) i bez (NOHB, czerwony) sieci wiązań wodorowych.	80
6.1.	Schemat symulacji SMD modelu AAKA(AEAAKA) ₅ AC. Atom nieruchomy w przestrzeni to węgiel C α w aminokwasie I, natomiast atom siarki w cysteinie został wybrany jako atom, do którego przyłożony jest potencjał SMD.	81
6.2.	Mapa Ramachandrana dla rozciąganego peptydu AAKA(AEAAKA) ₅ AC dla przykładowej symulacji SMD.	82
6.3.	Zmiany konformacji w czasie obrazowane za pomocą algorytmu STRIDE dla przykładowych symulacji dwóch skrajnych symulowanych prędkości rozciągania $v_{SMD} = 1$ i $1000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.	83
6.4.	Zmiany konformacji i energii dla przykładowych symulacji dwóch skrajnych symulowanych prędkości rozciągania $v_{SMD} = 1$ (A i C) i 1000 (B i D) $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.	83
6.5.	Przykładowe profile siły SMD dla całego zakresu rozciągnięcia peptydu dla trzech przykładowych symulacji z prędkościami rozciągania $v_{SMD} = 50, 200$ i $500 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.	84
6.6.	Średnia liczba wiązań wodorowych wyznaczona z serii 10 symulacji dla $v_{SMD} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.	85
6.7.	Porównanie profilu siły SMD w funkcji wydłużenia peptydu (A) z wydłużeniami wiązań wodorowych (B) dla wydłużenia peptydu 0 \AA (jasny niebieski) i $2,16 \text{ \AA}$ (ciemny niebieski).	86
6.8.	Pełna mapa długości (A) i wydłużeń (B) wiązań wodorowych, przedstawiona w \AA dla 22 \AA wydłużenia peptydu z symulacji przedstawionej na rysunku 6.7.	87
6.9.	Przykładowe dane siły SMD dla pierwszych 5 \AA rozciągnięcia rozciąganego peptydu dla $v_{SMD} = 500 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.	88
6.10.	Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{unb} od szybkości obciążania z dopasowaniem modelem BE dla trzech zakresów szybkości obciążania: $1 - 2820 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwony), $39 - 2820 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ (niebieski) i $1 - 39 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ (zielony).	89
6.11.	Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{unb} od szybkości obciążania z dopasowaniem modelem DHS dla dwóch zakresów szybkości obciążania: $1 - 2820 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwony) i $39 - 2820 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ (niebieski).	90
6.12.	Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{unb} od szybkości obciążania z dopasowaniem modelem FNDY dla całego zakresu szybkości obciążania, $1 - 2820 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwony).	90
6.13.	Schemat energetyczny procesu rozwijania peptydu od stanu zwiniętego (F, <i>ang. folded state</i>), poprzez stan przejściowy (T, <i>ang. transition state</i>), do stanu rozwiniętego (U, <i>ang. unfolded state</i>).	93
6.14.	Schemat eksperymentu obliczeniowego wykorzystującego zmodyfikowany model DHS w celu wyznaczenia wkładów entalpowych i entropowych energii aktywacji wiązania wodorowego.	95
6.15.	Przykładowy przebieg siły SMD dla 120 \AA rozciągnięcia modelowanego peptydu dla $v_{SMD} = 75 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.	96
6.16.	Rozkład występowania sił zrywających pojedyncze wiązanie wodorowe dla serii 50 symulacji SMD z $v_{SMD} = 100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.	97
6.17.	Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{unb} od szybkości obciążania z dopasowaniem modelem DHS dla dwóch zakresów danych szybkości obciążania: $21 - 626 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ (niebieski) i $57 - 626 \text{ N}\cdot\text{s}^{-1}$ (czerwony).	97
6.18.	Zależność siły zrywającej wiązanie wodorowe F_{unb} od temperatury z dopasowaniem zmodyfikowanym modelem DHS.	99

Spis tabel

Numer	Podpis tabeli	Strona
2.1.	Składowe całkowitej energii wiązania wodorowego wyznaczone w ramach metody SAPT między dwiema molekułami wody [20]	18
3.1.	Składowe pola siłowego CHARMM w wersji 36 wraz z krótkim opisem [33]	29
4.1.	Wartości kątów torsyjnych dla każdego z aminokwasów dla uzyskanej po obliczeniach optymalizacji geometrii dekaalaniny w wodzie	42
4.2.	Wartości odległości donor – akceptor wiązania wodorowego (HB) uzyskane po obliczeniach optymalizacji geometrii dekaalaniny w wodzie	42
4.3.	Porównanie udziału energii elektrostatycznej w całkowitej energii wiązania wodorowego w funkcji odległości R donora od akceptora [20]	45
4.4.	Wartości kątów torsyjnych dla każdego z aminokwasów dla uzyskanej po obliczeniach optymalizacji geometrii modelu AAKA(AEAAKA) ₅ AC	51
4.5.	Wartości odległości donor – akceptor wiązania wodorowego uzyskanej po obliczeniach optymalizacji geometrii modelu AAKA(AEAAKA) ₅ AC	52
4.6.	Wartości kątów torsyjnych dla każdego z aminokwasów α -helikalnych referencyjnych fragmentów struktur 1m47 i 1hgu	57
4.7.	Wartości odległości pomiędzy donorem a akceptorem wiązania wodorowego dla α -helikalnych referencyjnych fragmentów struktur 1m47 i 1hgu	58
4.8.	Porównanie parametrów geometrycznych modelowanych polipeptydów z α -helikalnymi referencyjnymi fragmentami struktur 1m47 i 1hgu	58
4.9.	Porównanie parametrów geometrycznych modelowanych polipeptydów w modelu wody TIP3P i TIP4P	60
4.10.	Porównanie wyznaczonej siły zrywającej wiązanie dla serii 10 i 50 symulacji SMD dla przykładowej prędkości $v_{SMD} = 200 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	61
5.1.	Długości wiązań wodorowych w modelu dekaalaniny uzyskane z symulacji wygrzewającej dynamiki molekularnej. O oznacza atom tlenu, N atom azotu, ALA – aminokwas alaninę	64
5.2.	Parametry symulacji SMD dla modelu z HB i bez HB w zależności od prędkości v_{SMD}	73
5.3.	Parametry regresji liniowej średnich stałych sprężystości w funkcji prędkości rozciągania v_{SMD} dla modelu z HB i bez HB	78
6.1.	Parametry uzyskane z modeli BE, DHS oraz FNDY z zależności siły zrywającej HB od szybkości obciążenia	91
6.2.	Parametry uzyskane z modelu DHS z zależności siły zrywającej HB od szybkości obciążania	98
6.3.	Parametry uzyskane z zmodyfikowanego modelu DHS z zależności siły zrywającej HB od temperatury	99

Wykaz osiągnięć naukowych

1. Publikacje naukowe z listy JCR związane bezpośrednio z tematem rozprawy doktorskiej

- 1) J. Dąbrowski, W. Nowak, A. Ptak, *How strong are hydrogen bonds in the peptide model?*, Physical Chemistry Chemical Physics 22, 1392-1399 (2020).
- 2) J. Dąbrowski, W. Nowak, A. Ptak, *Enthalpic and entropic contributions to the activation free energy of single noncovalent bonds in molecular systems: A computational methodology*, Physical Review A 106, 062803 (2022).

2. Manuskrypty w przygotowaniu

- 1) J. Dąbrowski, M. Hermanowicz, A. Ptak, *The role of hydrogen bonds in the stability and the stiffness of α -helical deca-alanine*

3. Publikacje naukowe z listy JCR niezwiązane z tematem rozprawy doktorskiej

- 1) M. Bazarnik, J. Dąbrowski, R. Czajka, *MFM Investigations of [NiFe/Au/Co/Au]_N Multilayers*, Acta Physica Polonica A, vol. 115 (2009)

4. Wystąpienia konferencyjne – prezentacje własne

- 1) J. Dąbrowski, A. Ptak, *Contribution of Hydrogen Bonds to the α -helix Stiffness*, III International Interdisciplinary Technical Conference of Young Scientists InterTech 2010 – referat
- 2) J. Dąbrowski, A. Ptak, *Udział wiązań wodorowych w sztywności α -helisy polipeptydu*, IV Krajowa Konferencja Nanotechnologii NANO2010 – referat
- 3) J. Dąbrowski, A. Ptak, *Zależność stałej sprężystości pojedynczej α -helisy od prędkości rozciągania*, V Krajowa Konferencja Nanotechnologii NANO2011 – referat
- 4) J. Dąbrowski, A. Ptak, *Influence of stretching rate on the elasticity of a single α -helix*, III National Conference of Nano and Micromechanics 2012 – referat
- 5) J. Dąbrowski, A. Ptak, *Zależność efektywnej stałej sprężystości pojedynczej α -helisy od prędkości rozciągania*, XLII Zjazd Fizyków Polskich 2013 – referat
- 6) J. Dąbrowski, A. Ptak, *Effective spring constant of α -helix in function of stretching velocity*, 7th International Conference on Scanning Probe Spectroscopy and related Methods (SPS'15) – referat
- 7) J. Dąbrowski, A. Ptak, W. Nowak, *Enthalpic and entropic contributions to the activation free energy of single noncovalent bonds in molecular systems: A computational methodology*, NanoTech Poland 2022 - referat

5. Wystąpienia konferencyjne – współudział

- 1) M. Bazarnik, J. Dąbrowski, R. Czajka, *MFM Investigations of [NiFe/Au/Co/Au]_N Multilayers*, European Conference „Physics of Magnetism” (PM'08) – poster
- 2) A. Ptak, H. Gojżewski, M. Makowski, J. Dąbrowski, *Dynamiczna spektroskopia sił – czas na zmiany*, VII Seminarium "Badania prowadzone metodami skaningowej mikroskopii bliskich oddziaływań STM/AFM 2012" – referat

- 3) A. Ptak, M. Weiss, J. Dąbrowski, K. Herman, M. Lekka, *Analiza oddziaływań białko-ligand z zastosowaniem różnych modeli termicznie aktywowanego zerwania*, XLIII Zjazd Fizyków Polskich 2015, referat
- 4) A. Ptak, J. Dąbrowski, K. Herman, M. Weiss, *Exploring single biomolecular interactions with dynamic force spectroscopy*, Nanotech Poland – International Conference & Exhibition 2018, referat

6. Szkolenia, warsztaty i inne działalności

- I Warsztaty Obliczeniowe NANO, 25-28.06.2010, Poznań (PP/PCSS)
- Szkolenie PCSS PL-GRID, 10.06.2010, Poznań (PCSS)
- współpraca z PCSS w zakresie opracowania i testowania scenariuszy tworzenia symulacji komputerowych z wykorzystaniem dynamiki molekularnej (pakiet NAMD) oraz obliczeń semi-empirycznych (pakiet MOPAC) z wykorzystaniem PL-GRID PCSS, 2010-2012
- PCSS Future Internet Week – przygotowanie symulacji i renderingu biomolekuł, Poznań 24-28.11.2011