Računalne simulacije smatanja proteina

Zagorec, Viktor

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:271298

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







VIKTOR ZAGOREC

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

RAČUNALNE SIMULACIJE SMATANJA PROTEINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, 2016

Predložak za izradu Završnog rada na Kemijskom odsjeku PMF-a *Autor predloška: T. Hrenar, datum zadnje promjene: 2016-05-12*
Ovaj dokument je isključivo vlasništvo Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu i mogu ga koristiti samo studenti i nastavnici Kemijskog odsjeka za izradu Završnog rada. Dokument se ne smije koristiti u druge svrhe ili distribuirati bez pismene suglasnosti Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu. Prije predaje Završnog rada izbrisati ovaj tekst.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	28. srpnja 2016.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	19. rujna 2016.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	23. rujna 2016.

Mentor rada: izv. Prof. dr. sc. Branimir Bertoša	Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak iv

§ 1. Uvod 1

§ 2. Računalne simulacije smatanja proteina 2

2.1. Proteini 2

2.1.1. Aminokiseline 2

2.1.2. Struktura polipeptida 2

2.2. Međumolekulske i unutarmolekulske interakcije proteina i smatanje proteina 3

2.2.1 Molekulske interakcije proteina 3

2.2.2. Smatanja proteina 5

2.3. Računalne simulacije 6

2.3.1 Simulacije smatanja pomoću molekularne dinamike 7

2.3.2. Monte Carlo simulacijska metoda 7

2.3.3. Simulacije procesa smatanja i agregiranja proteina Monte Carlo metodom 7

2.3.4. Primjeri slaganja teorijskog i eksperimentalnog pristupa za molekularnu dinamiku i slične simulacije 10

2.3.5. Primjeri proučavanja smatanja peptida simulacijama molekularnom dinamikom 11

§ 3. Literaturna vrela 14

§ Sažetak

Proteini su biološki polimeri aminokiselina. Njihova razina organizacije se može promatrati na nekoliko razina. Najnižu razinu predstavlja primarna struktura koju tvori kovalentni slijed aminokiselina u proteinu. Slijedi sekundarna struktura aminokiselina. Tu strukturu izgrađuju interakcije bliskih aminokiselina u kovalentnom slijedu. Tercijarnu strukturu izgrađuju svi elementi sekundarne strukture jednog polipeptidnog lanca te predstavlja 3D koordinate proteina. Kod proteina s jednim polipeptidnim lancem tercijarna struktura ujedno predstavlja i najvišu razinu organizacije. Kvartarnu strukturu posjeduju proteini s više polipeptidnih lanaca, izgrađuju je interakcije između više polipeptidnih lanaca. Postoji više vrsta interakcija koje doprinose kooperativnom procesu smatanja proteina. To su razne ionske interakcije, dipol-dipol interakcije, interakcije induciranih dipola s induciranim dipolima, dipolima i ionima, interakcije koje nastaju između hidrofobnih skupina polipeptida i vodikove veze. Za proces smatanja je također vrlo bitan hidrofobni efekt. Zbog složenosti procesa smatanja potrebno je posegnuti za računalnim simulacijama. Dvije temeljne metode koje se koriste su molekularna dinamika i metoda temeljena na Monte Carlo algoritmu. One se razlikuju po mnogim obilježjima i stoga se koriste za različite vrste simulacija. Monte Carlo metoda je pogodnija za određivanje kompeticije između procesa smatanja i agregacije proteina u otopini. Molekularnom dinamikom se puno bolje opisuju vremenski ovisni procesi prilikom smatanja. Isto tako se može mjeriti brzina smatanja za različite proteine s različitom sekundarnom i tercijarnom strukturom. Provedene su simulacije raznih biokemijskih procesa vezanih uz smatanje proteina. Eksperimentalni rezultati se vrlo dobro slažu s računalnim simulacijama. Zbog te vjerodostojnosti može se gotovo u potpunosti oslanjati na metode računalnih simulacija.

§ 1. Uvod

U ovom završnom radu će se obraditi tema računalne simulacije smatanja proteina. Proteini su biološki polimeri aminokiselina. Oni izgrađuju brojne organizme uključujući i čovjeka. Kondenzacijom aminokiselina peptidnom vezom nastaju polipeptidni lanci koji se smataju u složenije 3D strukture te posjedovanjem biološke funkcije postaju proteini. Taj proces organizacije struktura polipeptidnih lanaca i proteina je vrlo složen. Uključuje 4 razine strukturne organizacije proteina. To su primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura. Smatanje polipeptida se može promatrati kroz termodinamičke i kinetičke pristupe. Zahvaljujući brzom razvoju računalnih simulacija mogu se promatrati sve složeniji biokemijski procesi i molekule. Promatrajući proteine može se simulirati brzina i mehanizam njihovog smatanja, određivati alternativne puteve smatanja, kompeticiju između procesa smatanja i agregiranja te mnogi drugi.

§ 2. Računalne simulacije smatanja proteina

2.1. Proteini

2.1.1. Aminokiseline

Aminokiseline su vrste molekula koje posjeduju amino skupinu, karboksilnu skupinu i bočni ogranak koji varira za svaku od 20 standardnih aminokiselina. Zbog te dvije skupine, karboksilne skupine koja je negativno nabijena pri pH 7 i amino skupine koja je pozitivno nabijena pri pH 7, aminokiseline su dipolarne (zwitterion) molekule, tj. električki neutralne molekule iako posjeduju i pozitivan i negativan naboj. Promjena pH medija u kojem se aminokiseline nalaze utječe na naboj, odnosno na protoniranost i deprotoniranost pojedinih skupina. Bočni ogranci se razlikuju po veličini, obliku, kemijskoj reaktivnosti, hidrofobnosti, hidrofilnosti, polarnosti, naboju i aromatičnosti. Različita kemijska reaktivnost nastaje kao posljedica različitih skupina na bočnim ograncima. Svi ti efekti stvaraju veliku raznolikost i različitu funkcionalnost pojedinih aminokiselina. Kiralnost aminokiselina je posljedica vezanja 4 različitih skupina na α-ugljikov atom aminokiseline. U biološkim sustavima dominiraju L izomeri. Jedina iznimka je glicin zbog toga što ne posjeduje kiralni centar.

Međusobno se aminokiseline mogu povezivati peptidnom vezom. Ona je po svojoj prirodi amidna te se stvara između karboksilne skupine jedne i amino skupine druge aminokiseline. Reakcijska Gibbsova energija nastanka peptidne veze je pozitivna. No, zbog svog velikog vremena poluraspada, peptidna veza je postojana i njeno vrijeme poluraspada iznosi oko 1000 godina[1] .Također, zbog rezonancije, peptidna veza ima djelomično karakter dvostruke veze.

Više aminokiselina povezanih peptidnom vezom tvore polipeptide i u konačnici izgrađuju proteine. Proteini su biološki polimeri aminokiselina. Strukturno se razlikuju prema molekulskim masama, broju aminokiselinskih jedinica i u broju polipeptidnih lanaca. Osim prema navedenim razlikama protein se razlikuju i prema biološkim funkcijama.[1]

2.1.2. Struktura polipeptida

Proteinski lanci se mogu sastojati od mnogo pojedinačnih aminokiselina koji tvore određeni oblik, hijerarhiju i strukturu. Prema razini strukture dijele se na primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvartarnu.

Primarnu strukturu čini kovalenti slijed polipeptidnog lanaca. Alternirajuća peptidna veza i α-ugljikovi atomi aminokiseline čine proteinsku okosnicu. Sekundarnu strukturu aminokiselina izgrađuju prostorno međusobno bliske aminokiseline . Tako izgrađeni prostorni oblici se često ponavljaju. Elementi sekundarne strukture su α-zavojnice, β-nabrane ploče, β-okreti, Ω-omče, te različite kombinacije navedenih. Struktura polipeptidnog lanca će sadržavati mnoge elemente sekundarne strukture. Koji će elementi sekundarne

strukture izgrađivati polipeptidni lanac ovisi o mnogim parametrima kao što su bočni ogranci polipeptidnog lanca, otapalu u kojem se protein nalazi, duljina lanca i mnogi drugi. Zbog složenosti samog procesa stvaranja, odnosno smatanja sekundarnih struktura, za proučavanje tog procesa često se koriste računalne simulacije. Osim smatanja, može se promatrati i stabilnost sekundarne strukture i degradacija. Slijedeća razina strukture proteina je tercijarna. Ona uključuje organizaciju, oblik i orijentaciju cijelog polipeptidnog lanca, stabilnost i interakciju s otapalom. Kvartarna struktura je najveća razina strukture proteina. Njenu strukturu čine više podjedinica odnosno više polipeptidnih lanaca. Promatra se njihova interakcija i organizacija u prostoru. Jednako kao sekundarna struktura, i tercijarna i kvartarna struktura su predmet proučavanja računalnih simulacija.[2]

2.2. Međumolekulske i unutarmolekulske interakcije proteina i smatanje proteina

2.2.1 Molekulske interakcije proteina

Termodinamička mjerenja su pokazala da nativni proteini imaju tek graničnu stabilnost pod određenim fiziološkim uvjetima. Zbog toga na smatanje i stabilnost proteina utječu brojne interakcije koje se stvaraju unutar samog polipeptidnog lanaca, unutar tercijarne i kvartarne strukture, te otapala i ostalih molekula koje se nalaze u blizini promatrajućeg proteina. Najznačajnije interakcije su elektrostatske interakcije, vodikove veze, disulfidni mostovi i hidrofobne interakcije. Disulfidni mostovi su kovalentne veze koje nastaju oksidacijom dva cisteina.[3] Rezultat svih sila i interakcija će u konačnici biti struktura proteina.[4] Jedan od modela računalne simulacije koji mogu dolaziti do ukupne energije sustava preko tih interakcija je model polja sila. Pored raznih energija elektrostatskih interakcija uzima u obzir energiju rastezanje veza, promjene energije promjena veznih kuteva i energije promjena torzije veza.[5]

Elektrostatske interakcije nastaju zbog parcijalnih naboja pojedinih atoma u polipeptidnom lancu. One mogu biti ionske interakcije, dipol-dipol interakcije ili interakcije induciranog dipola s induciranim dipolima, dipolima i ionima. Ionske interakcije osim pozitivno i negativno nabijenih bočnih ogranaka aminokiselina, ubrajaju N-terminalan kraj i C-terminalan kraj polipeptidnog lanca. S određenim stupnjem aproksimacije, elektrostatska međudjelovanja mogu se opisati Coulombovim zakonom. Osim naboja pojedinih atoma i udaljenosti između njih važan je i utjecaj otapala preko dielektrične konstante. Sparivanjem raznovrsnih naboja (ionskih parova) i solvatacija parcijalnih naboja pozitivno utječu na stabilnost strukture proteina. Interakcija istovrsnih naboja će negativno utjecati na stabilnost jer će dolaziti do njihovog odbijanja.

Dipol-dipol interakcije su nekovalentne interakcije između kemijskih veza, odnosno skupina koje posjeduju dipolni moment. Slabije su od ionskih. Nazivaju se još van der Waalsove sile te se pojavljuju između atoma stalnih dipola ili induciranih dipola. Interakcije stalnih dipola su vrlo važne strukturne determinante proteina posebno zbog određenih skupina na aminokiselinama. Osim dipol-dipol interakcija između atoma, također, čitava α-zavojnica posjeduje svoj dipolni moment. On se pruža u smjeru pozitivno nabijene amino

skupine N-terminalnog kraja prema negativno nabijenoj karboksilnoj skupini na C-terminalnom kraju zavojnice. Dipol-dipol sile su vrlo značajne u smatanju sekundarnih struktura proteina zbog njihovog ograničenog dometa. Važne su zbog svoje brojnosti i za stabilnost α-zavojnica i ostalih elemenata sekundarne strukture. Interakcije između dva inducirana dipola se nazivaju Londonove disperzne sile. One su puno slabije od dipol-dipol sila. Njihov veliki broj pridonosi konformaciji proteina i stvaranju velike količine vezne energije.

Posebna vrsta elektrostatskih interakcija koja je izrazito važna kod smatanja struktura proteina na svim razinama su vodikove veze. One nastaju između donora vodikove veze i akceptora. To su atomi velike elektronegativnosti između kojih se nalazi atom vodika. Tipična energija veze iznosi oko 20-30 $kJ \cdot mol^{-1}$,[6] što ju svrstava u vezu jaču od dipol-dipol interakcije. Vodikove veze mogu nastati unutar sekundarnih struktura. Struktura α-zavojnice se stabilizira s pomoću vodikovih veza između vodika na dušikovom atomu peptidne veze i karbonilnog kisika polipeptidne okosnice. Povezivanjem karbonilnog kisika s dušikovim vodikom četvrte aminokiseline u primarnom slijedu[7] određuje jedan zavoj zavojnice. Osim stabilizacije vodikove veze imaju i ulogu u smatanju sekundarnih struktura. Strukture β-listovi se kao i α-zavojnice smataju i stabiliziraju pomoću vodikovih veza između karbonilnog kisika i dušika polipeptidne okosnice. Antiparalelne, paralelne i miješane β-strukture se razlikuju po smjeru polipeptidnih lanaca. Antiparalelne strukture imaju veću stabilnost jer im je vodikova veza ravna, dok paralelni lanci imaju vodikovu vezu pod određenim kutem.[8] Stabilizacijsku ulogu osim internih proteinskih interakcija imaju interakcije vodikovih veza između proteina i otapala.[9,10]

Hidrofobne sile, odnosno hidrofobni efekt utječe na nepolarne molekule na način da stvaraju što manje interakcija s polarnim otapalima. Ukoliko se protein nalazi u polarnom otapalu, polarne skupine polipeptidnog lanca će biti na površini proteina te će međudjelovati s molekulama otapala. U tom slučaju će unutrašnjost proteina biti izgrađena pretežito od nepolarnih aminokiselinskih podjedinica. Protein se organizirao u otapalu u obliku micela, tj. hidrofobni proteinski dijelovi se pakiraju u unutrašnjost, a hidrofilne aminokiseline na površini interagiraju s otapalom. Smatra se da je hidrofobni efekt prvenstveno entropijske prirode. Doprinos slobodnoj energiji je povoljan i u entropijskom i entalpijskom slučaju ovakve strukturne organizacije proteina.[11] Molekule vode stvaraju različite strukture kaveza oko ionskih molekula i molekula ugljikovodika. Molekule vode oko ionskih molekula tvore klatrate i heksagonalnih i pentagonalnih oblika.[12] Snižena entropija molekula vode uključene u takav klatrat uređene strukture nadoknađuje se snažnom interakcijom iona s polarnim molekulama vode. Nepolarne molekule u vodi tvore uglavnom pentagonalne oblike. Oni posjeduju manju entropiju od heksagonalnih i stvaraju vrlo slabe interakcije s polarnim molekulama vode. Zbog toga će biti netopljivi u vodenoj otopini. Za razliku od vodenog okruženj,a nepolarne molekule će stvarati bolje interakcije s nepolarnim molekulama. Hidrofobni efekt u entropijskom smislu se promatra kroz organizaciju molekula otapala prije i poslije smatanja proteina. Prije samog procesa smatanja molekule otapala, koje ja najčešća voda, okružuju promatrani protein. Solvatizirani su svi djelovi, hidrofobni i hidrofilni. Zbog nepovoljnih interakcija molekula vode s hidrofobnim dijelovima proteina, koji imaju pretežno pentagonalnu strukturu klatrata, stvara se pokretačka sila koja oslobađa molekula vode u stanje veće entropije i povoljnijih interakcija. Na taj način se postiže mehanizam hidrofobnog efekta.

2.2.2. Smatanja proteina

Smatanje velikih polipeptida je vrlo složen proces zbog hijerarhije strukturne organizacije te brojnim varijablama poput otapala, temperature i brojnim drugim parametrima . Proteinske strukture se samostalno sastavljaju u nativne konformacije pod određenim fiziološkim uvjetima. Implicira se da primarna struktura polipeptida određuje trodimenzionalnu strukturu proteina u funkcionalnom obliku. Proces smatanja polipeptida u proteine je hijerarhijski određen. Denaturirana primarna struktura polipeptidnog lanca se prvo sastavlja u jednostavne i periodične sekundarne strukture poput α-zavojnice i β-nabrane ploče. Tako stvoreni oblici čine jezgre za daljnji proces smatanja. U slijedećem koraku jezgre sekundarnih strukturnih elemenata se međusobno privlače raznim elektrostatskim i hidrofobnim silama. Na ovaj način se izgrađuju nativne domene u kooperativnom procesu. Nakon što se izgradi cijela tercijarna struktura polipeptida, kod proteina s više pojedinačnih polipeptidnih lanaca se sastavlja i organizira kvartarna struktura. [13]

Termodinamičkim pristupom gledan proces smatanja proteina ima oblik stošca slobodne energije. Taj model shematski prikazuje konformacijske promjene proteina prema najstabilnijoj strukturi. Vrh stošca predstavlja upravo tu energetski najstabilniju konformaciju. Denaturirana (ne smotana) struktura ima visok stupanj konformacijske entropije i relativno visoku slobodnu energiju.[14] Promjenama konformacije strukture, protein je sve bliži svojoj nativnom i funkcionalnom obliku, te je ukupna energija sve manja i teži najpovoljnijoj konformaciji.[15] Prikaz svih mogućih konformacija nam prikazuje ploha potencijalne energije. Na njoj postoje brojni lokalni minimumi koji predstavljaju prijelazna stanja i strukture. Globalni minimum posjeduje najmanju moguću energiju, te je ujedno i najpovoljnija konformacija.[16]

2.3. Računalne simulacije

Povezanost trodimenzionalne strukture proteina i njegove funkcije uzrokuju veliki interes za predviđanjem strukture proteina. Pokušaj razumijevanja mehanizma na koji se proteini organiziraju u biološki aktivne i funkcionalne jedinice naziva se problem smatanja proteina. Računalne simulacije za realne proteinske sustave su vrlo složeni. To je glavni razlog zbog kojeg se koriste klasične i statističke metode poput molekularne dinamike ili Monte Carlo metoda određivanja strukture.[17] Složeniji kvantnomehanički modeli se ne koriste zbog veličine sustava.

2.3.1 Simulacije smatanja pomoću molekularne dinamike

Opis pomoću statičnih struktura nije dovoljan jer sustav posjeduje dinamiku. Stoga je potrebno promatrati dinamičke promjene sustava u vremenu (simulacije). Molekularna dinamika je metoda određivanja ponašanja dinamičkog molekulskog sustava u vremenskoj

ovisnosti. Gibanje pojedinačnih čestica u molekulskoj dinamici se opisuje Newtonovim jednadžbama gibanja, a energija se određuje molekularnom mehanikom. Stanje takvog klasičnog sustava se opisuje koordinatama koje određuju položaje atoma u sustavu i pripadajućim im brzinama, i impulsima sila. Rezultat simulacije je trajektorija koja opisuje kako se pozicija i brzina čestica u sustavu ponašaju u određenom vremenskom intervalu.[18]

2.3.2. Monte Carlo simulacijska metoda

Monte Carlo simulacijska metoda se bazira na generiranju raznih konformacija sustava temeljem stvaranja slučajnih pozicija čestica, zajedno s orijentacijama i konformacijama. Svakoj slučajno odabranoj konformaciji se iz pozicija atoma računa potencijalna energija. Uzorak na kraju čine konformacije svih čestica u 3N dimenzionalnom prostoru. [19]

Pošto su Monte Carlo metoda i metoda molekularne dinamike osnovne računalne metode za proučavanje smatanja proteina potrebno je uočiti razlike među njima. Odabir prave metode je ključno za postizanje što boljih rezultata. Zbog toga je vrlo važan izbor između Monte Carlo metode i molekularne dinamike. Molekularna dinamika se najčešće koristi kada je potrebno simulirati dinamički sustav koji je ovisan o vremenu poput transportnog koeficijenta. Monte Carlo metoda je češće mnogo prigodnija metoda za istraživanje sustava poznatog sastava i obilježja kao što su konstantna temperatura i konstantni tlak.[20] Monte Carlo metoda također puno bolje opisuje određene modele sustava poput kristalnih rešetki. Također jedna od razlika između ove dvije metode je u načinu pretraživanja faznog prostora. Monte Carlo metoda često daje puno bržu konvergenciju za računanje termodinamičkih svojstava uzorka. Još jedna od mogućnosti te metode je u nefizikalnim pomacima čestica sustava. Takav način generiranja novih konformacija sustava daje značajno povećanje područja faznog prostora koje se istražuje. S druge strane molekularnom dinamikom se ponekad ne može postići prijelaz visokoenergetskih barijera između dva konformera promatrane molekule ukoliko nije uz dovoljno dugo vrijeme simuliranja. Zbog toga ona unaprjeđuje pozicije i brzine svih čestica zajedno čime postaje vrlo korisna metoda za istraživanje malih lokalnih djelova faznog prostora. Monte Carlo metoda je zato puno efikasnija za simulacije konformacijskih prostora i preskakanja na drugi dio faznog prostora. Zbog svih nabrojanih svojstva tehnika molekularne dinamike i Monte Carlo metode, odnosno njihovih nedostataka se stvaraju nove računalne metode koje kombiniraju svojstva obje metode.[20]

2.3.3. Simulacije procesa smatanja i agregiranja proteina Monte Carlo metodom

Monte Carlo metoda se može primijeniti na ponašanje proteina u različitim otopinama. Proces solvatacije proteina molekulama je vrlo važan za biološke procese. Proteini u otopinama mogu mijenjati razna svojstva kao što su konformacije, oblici, reaktivnost, katalitička moć i mnoge druge. Postoje brojni parametri koji određuju otopine. To su temperatura, koncentracija vodikovih iona (pH), ionska jakost, koncentracije otopljenih soli,

... Proteini se u otopini mogu promatrati s više razina. Može se pratiti smatanje i organizacije elemenata sekundarne, tercijarne i kvartarne strukture. Sastavljanje (agregiranje) proteina započinje od djelomično razmotane strukture s vrlo velikom izloženosti hidrofobnih djelova proteina otopini. Predložen je dvodimenzijski proteinski model rešetke (HP model) koji opisuje hidrofobne interakcije za proteinsko smatanje i agregiranje. Koristeći rešetku Monte Carlo simulacija prikazuje kompeticiju između smatanja proteina i njegovog agregiranja.[21] Kod vraćanja aktivnosti denaturiranog proteinskog agregata prvi korak je desolvatirati protein. Problem se javlja zbog agregacije pojedinih djelova kako protein poprima nativnu strukturu smatanjem. Jedan način sprečavanja agregacije je dodavanje otopine koja djeluje preventivno na agregaciju, poput etilen glikola koji je neutralni polimer. Povećava prinos renaturacije nekolicine nesolvatiziranih proteina u vodenoj otopini. Prvi dio simulacije je usmjeren na proučavanje jedne sekvence od 20 djelova, 8 hidrofobnih i 12 polarnih. Ti djelovi su postavljeni tako da njihova nativna forma bude u obliku β-nabrane ploče s hidrofobnom jezgrom koja je okružena polarnim omotačem. Kada su dva hidrofobna djela, koji nisu međusobno povezani vezom najbliži susjedi u kvadratnoj rešetci, tada međusobno interagiraju jačinom ε. Energija ε predstavlja parametar koji učinkovito mjeri koncentraciju denaturiranog proteina. Za velike koncentracije denaturiranog proteina parametar ε je mali i obrnuto. Primjenom konformacijske analize i Monte Carlo simulacije na protein s različitom koncentracijom denaturiranog oblika se određuje kako ta količina denaturiranog proteina utječe na smatanje i puteve smatanja. Konformacijska analiza je dala informacije o radijusu giracije, energiji, specifičnoj toplini i lokaciji procesa smatanja. Monte Carlo simulacija je otkrila puteve smatanja i međuprodukte. Ispitivana je prisutnost djelomično smotanih međuprodukta koji se pojavljuju u većem broju puteva smatanja. Isto tako se tražila kritična koncentacija denaturiranog proteina, pri kojoj je prisutna vrlo velika koncentracija agregata denaturiranog ili djelomično nativnog proteina. Eksperimentalna opažanja za koncentraciju denaturiranog proteina pri kojoj je puno veća količina agregata proteina od smotanog proteina je motivacija ovoj simulaciji. Drugi dio simulacije je proveden s nekoliko višelančanih modela proteina kojima se mijenjala koncentracija proteina i koncentracija denaturiranog proteina.

Rezultat simulacije izoliranog proteinskog lanca je pokazao da protein prolazi kroz relativno oštru tranziciju smatanja od nasumičnog stanja visoke denaturacije do nativnog stanja niske denaturacije. Proces smatanja proteina iz modela dobro opisuje proces smatanja stvarnih proteina, te njihov dobro definiran put smatanja i intermedijare. Kod različitih koncentracija denaturiranog proteina javlja se različita zastupljenost pojedinih intermedijara u procesu smatanja. Na puteve smatanja također drastično utječe koncentracija denaturiranog proteina na način da se pri određenoj koncentraciji pojavljuju neki međuprodukti, dok se kod druge koncentracije ti isti međuprodukti ne pojavljuju. Isto tako uočeno je da se proces smatanja događa kooperativno. Zbog toga se protein neće početi smatati dok se ne formira središnji dio odnosno jezgra. Nakon čega se ostatak vrlo brzo formira u nativnu strukturu. Rezultati nekoliko višelančanih modela su pokazali da agregacija raste asocijacijom djelomično smotanih proteina prije od denaturiranih nestrukturiranih stanja. Veličine agregata su se povećavale porastom koncentracije proteina. Višelančana okolina stabilizira djelomično smotane intermedijare koji nisu prisutni u modelu s jednim lancem. Analizom varijabilnosti nastanjenih međuprodukata proteina i denaturirana koncentracija otkriva da na njihovu stabilnost jako utječe otapalo, tj. svojstva otpala.

Nastanjenost kompaktne konformacije proteina raste s proteinskom koncentracijom. Nesmotani kraj te konformacije će se vrlo vjerojatno upetljati s nesmotanim krajem te iste konformacije, čime se postiže duže vrijeme zadržavanja u toj konformaciji. Druga proučavana kompaktna konformacija ima drugačiji trend promjene zastupljenosti u ovisnosti o koncentraciji proteina zbog kinetičke zamke. Ona govori o tome da jedna hidrofobna interakcija mora puknuti da bi se lanac smotao. Obrnuti trend promjene zastupljenosti promatranog stanja u ovisnosti o koncentraciji se može objasniti tako da promatrana konformacija prethodi kompaktnoj konformaciji s nesmotanim repom na putu smatanja proteina. Pri niskim koncentracijama nesmotani rep kompaktne konformacije ima veliku količinu slobode te prelazi u drugu kompaktnu konformaciju, čime se relativna nastanjenost te konformacije povećava. Pri visokim koncentracijama proteina ne smotani kraj je relativno manje mobilan zbog prisutnosti više proteinskih lanaca. Zbog toga će uglavnom upetljati taj rep s repom drugog proteina. Treća konformacija proteina je također vrlo kompaktna. Ima puno veću kinetičku zamku od druge strukture jer je potrebno raskinuti tri nevezne interakcije da bi se dobila nativna forma. Udio takve konformacije proteina će biti poprilično neosjetljiv na promjene koncentracija proteina. Razlog toga je to što je protein gotovo potpuno stabiliziran intramolekularnim interakcijama i interakcijama s okolinom. Jedini negativan doprinos stabilizaciji je jedno hidrofobno mjesto izloženo otapalu. Četvrta i peta konformacija proteina su djelomično smotane strukture. Oni su intermedijeri koji nisu zabilježeni kod proučavanja modela s jednim proteinskim lancem. Njihova struktura je blago otvorena i stoga tvore agregate. Koncentracije četvrte i pete strukture rastu povećanjem koncentracije proteina u otopini. Ostale 4 strukture su vrlo otvorene i jako sklone agregaciji. Isto kao i kod četvrte i pete strukture njihova koncentracija naglo raste povećanjem koncentracije proteina u otopini.

Proučavajući model s više proteinskih lanaca dobivena je slika kako i zašto promjene u proteinu i denaturaciji utječu na zastupljenost pojedinih djelomično smotanih, otvorenih intermedijera u procesima smatanja i agregacije. Otvorene, ne kompaktne intermedijarske strukture zbog izloženosti svojih hidrofobnih mjesta otapalu sudjeluju u stvaranju raznih agregata. Promjenom uvjeta u otopini stvaraju se dva efekta za smatanje. Prvi efekt govori da mala koncentracija denaturiranog proteina obeshrabruje stvaranje otvorenih konformacija zbog snažnih unutarlančanih hidrofobnih sila koje uzrokuju stvaranje kompaktnijih struktura. Isto tako između otvorenih konformacija proteinskih lanaca postoji snažna međulančana sila koja omogućuje da otvorene strukture ulaze u vrlo stabilne agregate. Što se tiče visoke koncentracije denaturiranog proteina on potiče stvaranje otvorenih konformacija. Obrnuto je od niske koncentracije denaturiranog proteina i za stvaranje višelančanih agregata. Drugi efekt govori da visoka koncentracija proteina ne potiče stvaranje otvorenih konformacija zbog veličine svih proteinskih lanaca koji se tada pakiraju puno zbijenije. U tom slučaju otvorene konformacije će stvarati vrlo stabilne agregate.

Generalno gledano za danu koncentraciju denaturiranog proteina prinos ponovnog smatanja proteina je velik pri niskim koncentracijama proteina. Povećanjem koncentracije proteina prinos smatanja drastično pada. Takav trend za ovisnost o proteinskoj koncentraciji se poklapa s eksperimentalnim rezultatima. Što se tiče konstantne koncentracije proteina maksimalni prinos smatanja proteina se događa pri srednjim vrijednostima koncentracija denaturiranih proteina, dok njegovim povećanjem ili smanjenjem koncentracije dovodi do

smanjenja smatanja proteina. Takav trend vrijednosti nastaje zbog dva efekta navedenih u prijašnjem odlomku. Pri niskim vrijednostima ε, otvoreni, skloni agregaciji intermedijari će imati tendenciju stvaranja agregata umjesto smatanja do nativne strukture. Pri velikim vrijednostima ε, međulančane se interakcije teško slamaju. Zbog tih interakcija proces smatanja puno duže traje što daje prednosti agregaciji proteinskih jedinica pred procesom smatanja. Maksimalni učinak smatanja pri srednjoj vrijednosti denaturiranog proteina je i eksperimentalno pokazan pomoću proteina laktat dehidrogenaza. Njegov maksimalni učinak smatanja ima pri srednjim vrijednostima pH, gdje mu je denaturirana koncentracija srednja.[22]

2.3.4. Primjeri slaganja teorijskog i eksperimentalnog pristupa za molekularnu dinamiku i slične simulacije

U računalnoj kemiji vrlo je važno da simulacija bude što vjerodostojnija eksperimentalno određenim podacima. Simulacije s pomoću molekularne dinamike moraju osiguravati preciznost karakterizacije mnogih biokemijskih reakcija uključujući molekularna gibanja u vezanju, enzimsku aktivnost, sastavljanje bioloških makromolekula i ostale relevantne biološke procese.

Na primjeru studije pokazano je uspješno preklapaju eksperimentalnih podataka i molekularnog računa za aktivaciju tirozinskih kinaza preko konformacijskih promjena. Fosforilaciju tirozinskog ogranka na C-terminalnom kraju polipeptidnog lanca pokreće specifični mehanizam aktivacije aktivnog mjesta prema 40 Å udaljenom mjestu za fosforilaciju. Simulacije molekularnom dinamikom su pokazale da se SH2 i SH3 podjedinice kinaze spajaju, odnosno razdvajaju ovisno o fosforiliranosti tirozinskog kraja polipeptida. Pokretanje aktivne petlje korelira s gibanjem SH3 domene i prenosi na SH3 domenu preko veznog peptida. *In silico* mutacijom aminokiseline na veznom peptidu značajno se smanjilo korelirano gibanje domena SH2 i SH3. Kao posljedica te aminokiselinske zamjene izostala je fosforilacija tirozina.[23]

Sintaksin[23] se pojavljuje kao kompleksni klaster koji se samostalno sastavlja. Razne protein-protein interakcije i motivi doprinose stvaranju takvih molekulskih vrsta. Eksperimentalnim metodama je opaženo da postoji ravnoteža između samostalnog oblika i klastera. Povećanjem količine sintaksina povećao se i broj kompleksnih klastera, ali ne i njihova veličina. Simulacija pomoću Brownove dinamike, jedan oblik simulacija molekularne dinamike, je pokazala jednostavnu ravnotežu između privlačnih i odbojnih međuproteinskih interakcija koje se mogu promatrati preko veličine klastera, odnosno različite pokretljivosti slobodnih proteina i kompleksa. Određena je poželjna stehiometrija klastera, molekularni mehanizam sastavljanja kompleksa i dinamika sporog otpuštanja unutarnjih molekula.

Jedna od uloga molekularne dinamike je i rješavanje pojedinih signalnih puteva. Fosforilacija signalnog p53 veznog proteina ima odlučujuću ulogu u obuzdavanju tumora.[23] Aktivnost p53 ovisi djelomično o konformaciji proteina, te o sposobnosti interakcije s drugim srodnim molekulama na svom signalnom putu. Ubikvitin E3-ligaza MDM2 je molekula koja interagira s p53 proteinom. Njihovim spajanjem dešava se ubikvintacija i degradacija, te promjene njihove koncentracije, što je potrebno za normalno funkcioniranje stanice. Ključan događaj za otpuštanje p53 od kompleksa p53-MDM2 je postranslacijska modifikacija u obliku

fosforilacije tirozina na proteinu p53. Analiza je pokazala da se na površini MDM2 nalazi par aminokiselina s karboksilnom skupinom na bočnom ogranku u blizini veznog mjesta treonina. Računi molekularne dinamike su pokazali da se kod fosforiliranog treonina pojavljuju elektrostatska odbijanja s negativno nabijenim karboksilnim skupinama MDM2 proteina. To u konačnici dovodi do disocijacije kompleksa p53-MDM2 na podjedinice.

Analiza postranslacijske modifikacije veznih mjesta jezgrinog faktora aktiviranih T stanica (NFAT) je proučavana molekularnom dinamikom.[23] Proučavano je kako fosforilacija dovodi do jezgrine lokalizacije faktora. Simulacija je pokazala da je nefosforilirani faktor helikalne strukture. Njegovi jezgrini lokalizacijski signali (NLS) ostaju izloženi. Višestrukom fosforilacijom se uvodi mnoštvo negativnog naboja koji međudjeluju s izloženim pozitivno nabijenim ostacima. Naboji stvaraju klaster u koje ulaze i NLS, te se sprečava transport NFAT u jezgru i transkripciju.

Novi signalni mehanizam citokina interleukina-1β (1L-1β) je dobiven simulacijom molekularnom dinamikom. Uloga 1L-1β i receptora 1L-1 u upalama je dobro poznata. Struktura posjeduje unutarnju hidrofobnu šupljinu koja može ili ne mora biti ispunjena vodom. Molekularna dinamika je pomoću niza mutacija na 1L-1β u blizini šupljine i veznog mjesta za receptor pokazala povezanost između gibanja mutiranog ostatka i ostatka veznog mjesta. Gubitak signala je uzrokovan promjenom lančane strukture koja sprečava prirodnu fluktuaciju molekula vode, koje stvaraju prikladnu interakciju s receptorom. Time je dokazano prisutnost molekula vode u hidrofobnoj šupljini.

Enzimski katalizirane reakcije mogu također biti predmet računalnih simulacija. To su reakcije koje se zbog određenih molekula ubrzavaju. Enzimi mogu ubrzavati reakciju koristeći drugačiji mehanizam od mehanizma ne enzimatske reakcije ili mogu koristiti isti mehanizam uz stvaranje povoljnijih uvjeta za reakciju poput kanaliziranja supstrata, stvaranja električnog polja, stabilizacija međuprodukata i mnogi drugi. Unutarnja enzimska gibanja koreliraju s energetskom potrebom katalizirane reakcije. Enzim dihidrofolat reduktaza dovodi supstrat i kofaktore u bliski položaj. Stvara povoljno elektrostatsko polje za transfer hidrida između kofaktora i supstrata.[23]

2.3.5. Primjeri proučavanja smatanja peptida simulacijama molekularnom dinamikom

Proces smatanja proteina započinje samostalnim sastavljanjem polipeptidnog lanca neuređene strukture u definiranu trodimenzionalnu strukturu. Raznolikost samog procesa povećava zahtjevnost simulacija. Posebice zbog različite veličine samog polipeptidnog lanaca, topologije, stabilnosti i vrsta aminokiselinskih jedinica.

Molekularnom dinamikom je simulirano 12 peptida različitih veličina, raspon je bio između 10 i 80 aminokiselinskih ostataka. Sekundarne strukture aminokiselina su im bile različite. U simulaciji 9 od 12 peptida je imalo samo α-zavojnicu, 2 peptida su imali α/β strukturu i jedan peptid je imao samo β-nabranu ploču. Tijekom simulacija temeljenom na polju sila, 11 od 12 peptida se spontano smotalo u nativnu strukturu koja odgovara eksperimentalnom rezultatu. Nativna struktura 12. peptida je nestabilna u simulaciji, te je zamijenjena drugim peptidom. Svih 12 peptida je podvrgnuto simulacijom s dugačkom

simulacijom uravnoteženja, pri temperaturi blizu temperature tališta. Temperatura tališta je temperatura pri kojoj je polovica nativnih struktura peptida denaturirano, odnosno pola ih je razmotano.[24] Svaka simulacija je bila između 100 μs i 1 ms duga. Opaženo je da je svaki peptid imao najmanje 10 smotanih i 10 razmotanih struktura. U ukupno otprilike 8 ms simulacije dobiveno je preko 400 smotanih i razmotanih struktura. RSMD (srednji korijen kvadrata odstupanja), veličina koja pokazuje srednje apsolutno odstupanje od srednje vrijednosti, za 8 od 12 peptida je bio manji od 2 Å u odnosu na eksperimentalno određenu strukturu. To odstupanje najvjerojatnije je nastalo zbog fleksibilnog repa peptida. Peptidi s najvećom devijacijom, odnosno najfleksibilniji peptidi, su strukture s trostrukim helikalnim snopom. Nativna struktura bar jednog od ta tri peptida može ovisiti o eksperimentalnim uvjetima. Moguće je da devijacija može praviti razlike između peptidne strukture pri temperaturi simulacije i na nižoj temperaturi pri kojoj se eksperimentalno određivala struktura peptida. Ova usporedba polja sila u simulaciji i eksperimentalno dostupnih podataka može stvoriti dobro razumljiv opis strukture, kinetike i termodinamike ovih 12 proteina. Također doprinosi vjerodostojnosti računalnih simulacija procesa smatanja proteina.

U sljedećem koraku su proučavane trajektorije. One su podijeljene na smotane, razmotane i prijelazne segmente. Razmotani i prijelazni segmenti mogu biti smatrani kao događaji u procesu smatanja. Za svaki događaj u procesu smatanja se mjeri oblik nativne topologije, sekundarna struktura i ne-lokalni nativni dodiri. Oblik nativne topologije i sekundarne strukture se počinje ranije stvarati od većine ne-lokalnih dodira. U većini slučajeva oblik sekundarne strukture smanjuje površinu proteina izloženu otapalu. Analiza razmotanih stanja otkriva prisutnost sekundarnih struktura u razmotanoj strukturi. U prosjeku 12 ispitivanih peptida je imalo 16% strukture u obliku α-zavojnice i još 5% strukture u obliku β-ploča. Takve sekundarne strukture su granično stabilne bez interakcija i prolazne. Njihovo vrijeme trajanja je između 10 i 100 ns. Sklonost oblika lokalne nativne strukture u razmotanom stanju jako korelira s poretkom oblika lokalne nativne strukture duž prijelaznog puta. Mjesto za stvaranje interakcija smotavanja se preferencijalno nalazi u regiji koja ima visoku sklonost nativne forme i u razmotanom obliku. Nativni oblik u razmotanim peptidima uglavnom odgovara zavojnicama. Isto tako se one prve smataju u procesu. Takva opažanja su ključ potpomaganja mehanizmu peptidnog smatanja za više razine smatanja i interakciji na većim udaljenostima za proteine s većim brojem aminokiselina I većim brojem raznih podjedinica.

Heterogenost procesa smatanja proteina uključuje i brojne puteve. Osim za različite peptide oni se razlikuju i za smatanje istog peptida na dovoljno malom stupnju rezolucije. Može se definirati univerzalni put smatanja strukture zbog sličnog redoslijeda strukturnih elementa. Prvi korak u određivanju puteva za 12 peptida je odrediti koliko se puteva razlikuje u redoslijedu organizacije, bez da se pretvaraju u isti put smatanja. Te razlike puteva se računaju pomoću udaljenosti peptida u procesu smatanja do nativne strukture. Za većinu peptida može se definirati dva do tri dobro definirana klastera, koji otkrivaju prisutnost malog broja paralelnih puteva smatanja. Sljedeće pitanje je nastaju li ti različiti putevi zbog različitih početaka puteva koji se preklope u jedan dobro definiran put ili zbog doista postojanja različitih ruta. Rezultat je pokazao da čak 9 od 11 peptida ima slične puteve i intermedijarske točke. Oni dijele više od 60% forme tijekom procesa peptidnog smatanja. Za tih 9 peptida s visokim slaganjem može se smatrati da su to nekoliko oblika istog puta

mehanizma. Ovisno o kriterijima razlike između puteva s ovog stajališta bi se moglo reći da je proces smatanja vrlo homogen, tj. da su njegovi putevi vrlo slični. Ostala dva peptida koji imaju slične puteve, struktura im je izgrađena od kombinacije α-zavojnica i β-ploča. Razlika u putevima im je razlika u redoslijedu formacije β-ploča. Kod prvog peptida temeljna razlika puteva dolazi od različitog redoslijeda formiranja dviju omča. Računalna simulacija je pokazala preklapanje s eksperimentalnim rezultatima srodnog peptida. Do različitih mehanizama smatanja peptida dolazi zbog više varijabli. Između ostalog ti faktori su veličina peptida, djelomični β-strukturni elementi ili cijela β-sekundarna struktura, te višestruke jezgre smatanja peptida. Ukoliko peptid ima samo jednu strukturnu jezgru oko čega se formira cijeli peptid, prevladavat će jedan mehanizam smatanja peptida.

Završna faza određivanja procesa smatanja peptida je određivanje njegove termodinamike, kinetike, te postojanju i mjerenju barijera slobodnih energija za smatanje. Neki promatrani peptidi imaju konstantno padajuću energiju napretka smatanja, stoga im izostaje energetska barijera. Za utvrđivanje te činjenice korištena je metoda prikaza ploha slobodne energije za optimizaciju reakcijskih koordinata. Za sve peptide koji su podvrgnuti simulaciji potrebna je slobodna energija manja od 4,5 k_BT, što je u skladu s činjenicom da se ti peptidi brzo smataju. Za tri peptida nije bilo moguće odrediti barijeru slobodne energije odvajanjem smotane i razmotane faze. Izostanak slobodno energetske barijere u tim slučajevima je uzrokovao da se ne može odvojiti dvije različite faze, odnosno razdvojiti smotanu i razmotanu fazu, koristeći se jednom reakcijskom koordinatom. S prisutnosti značajne energetske barijere bi bio očekivan rast vremenske separacije između procesa smatanja i relaksiranja unutar smotanih i ne smotanih stanja. Molekularna dinamika je pokazala da je za sve peptide barijera manja od 1,5 k_BT, te da je mala i nikakva vremenska separacija između smatanja i brzog lokalnog relaksiranja. Za ove peptide vremenska ljestvica formacija individualnih strukturnih elemenata se preklapa s procesom smatanja, dajući puno kompleksnije kinetičko ponašanje od očekivanog. Analizirajući visinu slobodne energetske barijere struktura je vrlo kompaktna i nativna, posjeduje biološku aktivnost. Sadržava 60% do 97% nativne sekundarne strukture.[25]

§ 3. Literaturna vrela

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 6. izdanje, ŠK, Zagreb, 2013, str. 27-40
2. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 6. izdanje, ŠK, Zagreb, 2013, str. 40-61
3. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 6. izdanje, ŠK, Zagreb, 2013, str. 36
4. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second edition, John Wiley & sons,New York, 1995, str. 174
5. A. R. Leach, *Molecular modelling principles and applications*, second edition, Pearson, Dorchester, 2001, str. 181-218
6. P. Atkins, J. de Paula, *Atkins´ physical chemistry*, 10th edition, Oxford, Oxford, 2014, str. 672
7. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 6. izdanje, ŠK, Zagreb, 2013, str. 41
8. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 6. izdanje, ŠK, Zagreb, 2013, str. 43
9. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second edition, John Wiley & sons,New York, 1995, str. 175-179
10. P. Atkins, J. de Paula, *Atkins´ physical chemistry*, 10th edition, Oxford, Oxford, 2014, str. 668-675
11. A. R. Leach, *Molecular modelling principles and applications*, second edition, Pearson, Dorchester, 2001, str. 515-517
12. K. E. Van Holde, W. C. Johnson, P. S. Ho, *Principles of physical biochemistry*, second edition, Pearson, 2006, 15,16
13. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second edition, John Wiley & sons, New York, 1995, str. 196
14. J. Wang, C. Lee, G. Stell, *Chem. Phy.*, **316** (2005) 53-60
15. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Principles of Biochemistry*, sixth edition, Macmillan, New York, 2000, str. 145-146
16. C. J. Cramer, Essentials of Computational Chemistry, second edition, John Wiley & sons, New York, 2004, str. 6-10
17. U. H. E. Hansmann, *Chem. Phy. Communic.*, **147** (2002) 604-907
18. A. R. Leach, *Molecular modelling principles and applications*, second edition, Pearson, Dorchester, 2001, str. 353
19. A. R. Leach, *Molecular modelling principles and applications*, second edition, Pearson, Dorchester, 2001, str. 410
20. A. R. Leach, *Molecular modelling principles and applications*, second edition, Pearson, Dorchester, 2001, str. 452
21. L. Zhang, D. Lu, Z. Liu, *Biophy. Chem.*, **133** (2008) 71-80
22. P. Gupta, C. K. Hall, A. Voegler, *Fluid Phase Equilibria*, **158-160** (1999) 87-93
23. G. G. Dodson, D. P. Lane, C. S. Verma, *Euro. mol. bio. org.*, **9** (2008) 144-150
24. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 6. izdanje, ŠK, Zagreb, 2013, str. 55
25. K. Lindorff-Larsen, S. Piana, R. O. Dror, D. E. Shaw, *Science*, **334** (2011) 517-520