



UNIwersYTET GDAŃSKI



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 523 5350, fax (+48 58) 523 5012 e-mail: adams86@wp.pl, www.chemia.ug.edu.pl

dr Adam Sieradzan
AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: Adam Sieradzan

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- a) październik 2013 – doktor nauk chemicznych - Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.
- b) lipiec 2009– magister chemii – Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- a) styczeń 2018 - obecnie: asystent na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
- b) wrzesień 2015-styczeń 2018: adiunkt naukowy na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Cykl prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, stanowiących osiągnięcie naukowe (IF~34,2)

[H1] Sieradzan AK, Niemi A, Peng X, *Peierls-Nabarro Barrier and Protein Loop Propagation*, Phys. Rev. E, 2014, 90:062717 (IF=2.284)

[H2] Sieradzan AK, Krupa P, Scheraga HA, Liwo A, Czaplewski C, *Physics-Based Potentials for the Coupling between Backbone- and Side-Chain-Local Conformational States in the United*

Residue (UNRES) Force Field for Protein Simulations, J. Chem. Theory Comput., 2015, 11:817 (IF=5.399)

[H3] Sieradzan AK, *Introduction of periodic boundary conditions into UNRES force field*, J. Comput. Chem 2015, 36:940 (IF= 3.221)

[H4] Yin Y, Sieradzan AK, Liwo A, He Y, Scheraga HA, *Physics-based potentials for coarse-grained modeling of protein-DNA interactions*, J. Chem. Theory Comput., 2015, 11:1792 (IF= 5.31)

[H5] *A novel coarse-grained description of protein structure and folding by UNRES force field and discrete nonlinear Schrödinger equation*, Adam Liwo A, Niemi A, Peng X, Sieradzan AK, in *Frontiers in Computational Chemistry*, ed. Zaheer Ul-Haq, Bentham e-books, 2016, 257-289

[H6] Peng X, Sieradzan AK, Niemi AJ, *Thermal unfolding of myoglobin in the Landau-Ginzburg-Wilson approach*, Phys. Rev. E, 2016, 94:062405 (IF=2.284)

[H7] Sieradzan AK, Jakubowski R, *Introduction of steered molecular dynamics into UNRES coarse-grained simulations package*, J. Comput. Chem., 2017, 38:553 (IF= 3.221)

[H8] Sieradzan AK, Krupa P, Wales DJ, *What Makes Telomeres Unique?*, J. Phys. Chem. B, 2017 121:2207 (IF=3.146)

[H9] Sieradzan AK, Makowski M, Augustynowicz A, Liwo A, *A general method for the derivation of the functional forms of the effective energy terms in coarse-grained energy functions of polymers. I. Backbone potentials of coarse-grained polypeptide chains*, J. Chem. Phys., 2017 146:124106 (IF=2.843)

[H10] Mozolewska MA, Sieradzan AK, Niadzvedstki A, Czaplewski C, Liwo A, Krupa P, *Role of the sulfur to α -carbon thioether bridges in thurincin H*, J Biomol. Struct. Dyn., 2017, 35:2868 (IF=3.107)

[H11] Sieradzan AK, Lipska AG, Lubecka E, *Shielding effect in protein folding*, J Mol. Graph. Model., 2018, 79:118 (IF=1.885)

[H12] Sieradzan AK, Mozolewska MA, *Extension of coarse-grained UNRES force field to treat carbon nanotubes*, J. Mol. Model., 2018, 24:121 (IF=1.507)

b) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

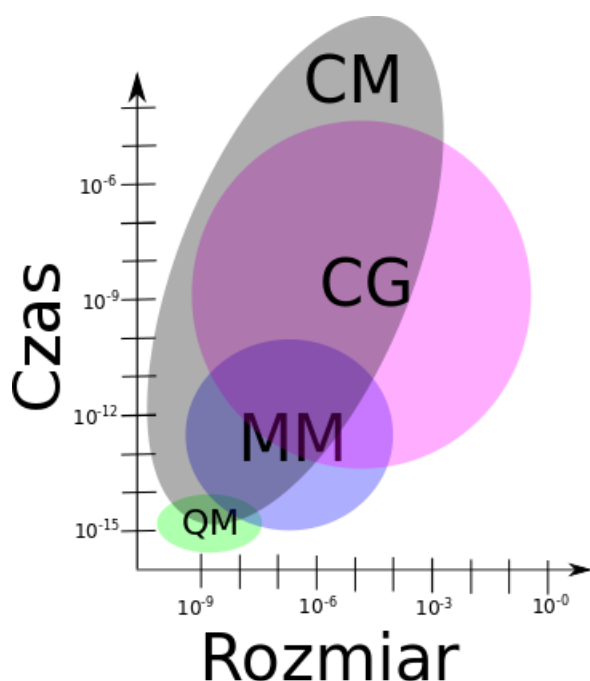
Modelowanie oddziaływań z udziałem biomolekuł na różnych poziomach rozdzielczości

Wstęp

Kluczem do zrozumienia życia jest poznanie jak funkcjonują biomolekuły, takie jak białka i kwasy nukleinowe. Pierwsze z nich są jednymi z najważniejszych komponentów komórki, stanowiąc ponad 50% ich suchej masy [1] oraz pełnią zróżnicowane funkcje budulcowe, transportujące czy regulujące. Informacja o sekwencji białek zawarta jest z kolei w DNA, które w procesie translacji przepisuje te dane na mRNA, które następnie w trakcie transkrypcji wykorzystywane są do tworzenia białek z pojedynczych aminokwasów. Poznanie struktury, zachowania i procesów związanych z białkami i kwasami nukleinowymi stanowi jedno z najważniejszych wyzwań stawianych przed naukowcami [2].

W badaniach nad biomolekułami wykorzystuje się szeroką gamę technik eksperymentalnych takich jak: krystalografia [3], magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) [4], transfer energii między chromoforami (FRET) [5], nisko kątowe rozpraszanie promieni X (SAXS) [6], powierzchniowy rezonans plazmowy (SPR) [7] oraz wiele innych metod pozwalających na uzyskanie informacji o najważniejszych właściwościach strukturalnych danej molekule oraz jej najważniejszych ruchach [8-9]. Jednak badania eksperymentalne są często bardzo czasochłonne i kosztowne, dlatego techniki teoretyczne coraz częściej stosuje się jako uzupełnienie badań eksperymentalnych [10]. Ciągły rozwój metod teoretycznych pozwala w niektórych przypadkach na projektowanie nowych leków [11] oraz na przewidywanie nowych zjawisk zachodzących w układach biologicznych [12]. Przy weryfikacji uzyskanych przewidywań na drodze eksperymentalnej, metody teoretyczne znacząco obniżają koszt i czas przeprowadzania badań.

Istotnym aspektem stosowania metod teoretycznych jest odpowiednie dobranie narzędzia do zadanego problemu. Narzędzia teoretyczne ze względu na sposób traktowania układu (rozdzielczość centrów oddziaływań) można podzielić na: metody chemii kwantowej, pełnoatomowe pola siłowe, gruboziarniste pola siłowe oraz modele ciągłe (Rysunek 1).



Rysunek 1 Schematyczne przedstawienie zależności dostępnej skali czasowej od rozmiaru symulowanego układu oraz stosowanych technik chemii komputerowej. QM oznacza metody chemii kwantowej (ang. quantum mechanics), MM oznacza mechanikę molekularną (ang. molecular mechanics), CG oznacza gruboziarniste pola siłowe (ang. coarse-grain force fields) a CM oznacza modele ciągłe (ang. continuous models).

Metody chemii kwantowej rozdzielają ruch jąder i elektronów, są metodami bardzo dokładnymi, pozwalającymi badać reakcje chemiczne, przemiany konformacyjne z dużą precyzją. Niestety metody te są bardzo kosztowne obliczeniowo i ich zastosowanie ogranicza się jedynie do bardzo małych układów [13].

Metody pełnoatomowych pól siłowych traktują każdy atom jako pojedyncze centrum oddziaływań, pozwalając badać znacznie większe układy biologiczne. Zastosowanie kart graficznych oraz odpowiednich algorytmów zrównoleglających pozwala na badania układów tak dużych jak 1/10 komórki [14], jednakże takie układy mogą być symulowane tylko przez około kilkadziesiąt ns, wymagając przy tym ogromnych nakładów obliczeniowych, a dodatkowo są obciążone dużym błędem zależności od struktury początkowej systemu. Z drugiej strony możliwe jest prowadzenie symulacji zwijania niewielkich, 92 resztowych białek w coraz dłuższym czasie symulacji wynoszącym kilkadziesiąt μ s [15]. Z tego powodu, w przypadku większych układów oraz dłuższych symulacji konieczne jest zastosowanie gruboziarnistych pól siłowych.

W modelach gruboziarnistych pól siłowych, co najmniej kilka atomów jest zgrupowane w jedno centrum oddziaływań. W zależności od rozdzielczości wyróżniamy modele, w których część atomów jest w reprezentacji gruboziarnistej, a część w pełnoatomowej (np. pole siłowe PaLaCe) [16] oraz modele, w których kilka centrów oddziaływań przypada na jednostkę powtarzalną do takich modeli zalicza się pola siłowe MATRINI [17], CABS [18] czy UNRES [19]. Kolejne są modele gruboziarniste o jeszcze niższej rozdzielczości, w których kilka jednostek powtarzalnych złączonych jest w jedno centrum oddziaływań np. SURPASS [20], w którym cztery kolejne aminokwasy są połączone w jedno centrum oddziaływań, aż po modele supergruboziarniste, w których całe domeny lub białka upraszcza się do jednego centrum oddziaływań [21].

Metodami o najniższej rozdzielczości są metody ciągłe, w których symuluje się całość układu. Służą do badania przepływów czy jednorodnych polimerów [22].

Warto wspomnieć, iż obecnie coraz większą popularnością cieszą się modele mieszane wykorzystujące dwa lub więcej poziomów rozdzielczości, w których fragment układu jest symulowany na jednym poziomie rozdzielczości, podczas gdy reszta jest na drugim poziomie. Pozwala to łączyć dokładność metody o większej rozdzielczości z możliwościami symulacji dłużej skali czasowej systemu o mniejszej rozdzielczości. Najpopularniejsze są połączenia: QM/MM [13,23] czy MM/CG [24].

Istotną rolę pełni również połączenie modeli ciągłych z dowolnymi innymi poziomami reprezentacji. Przykładem jest połączenie QM z modelami rozpuszczalników takimi jak COSMO [25] czy PCM [26], gdzie oblicza się powierzchnię dostępną dla rozpuszczalnika oraz ekranowanie oddziaływań elektrostatycznych wywołanych przez jego obecność. Natomiast w pełnoatomowych i gruboziarnistych polach często wykorzystuje się rozpuszczalnik w formie niejawniej zmieniając formę funkcyjną oddziaływań lub parametry w funkcji energii.

Przykładem takiego pola jest, rozwijane w naszej grupie badawczej, pole siłowe UNRES (ang. UNited RESidue) [27-33]. W modelu tym łańcuch polipeptydowy uproszczony został do dwóch centrów oddziaływań: scalonej grupy łańcucha bocznego (SC, ang. Side Chain) oraz scalonej grupy peptydowej (p, ang. peptide group), a współrzędne atomów C α definiują jedynie geometrię łańcucha głównego. Rozpuszczalnik traktowany jest w sposób niejawny poprzez uwzględnienie go w niektórych wkładach do wyrażenia na energię potencjalną. Zastosowane uproszczenia pozwalają osiągać skale czasowe o 3-4 rzędy wielkości większe niż w przypadku zastosowania pól pełnoatomowych przy wykorzystaniu takich samych zasobów obliczeniowych [34].

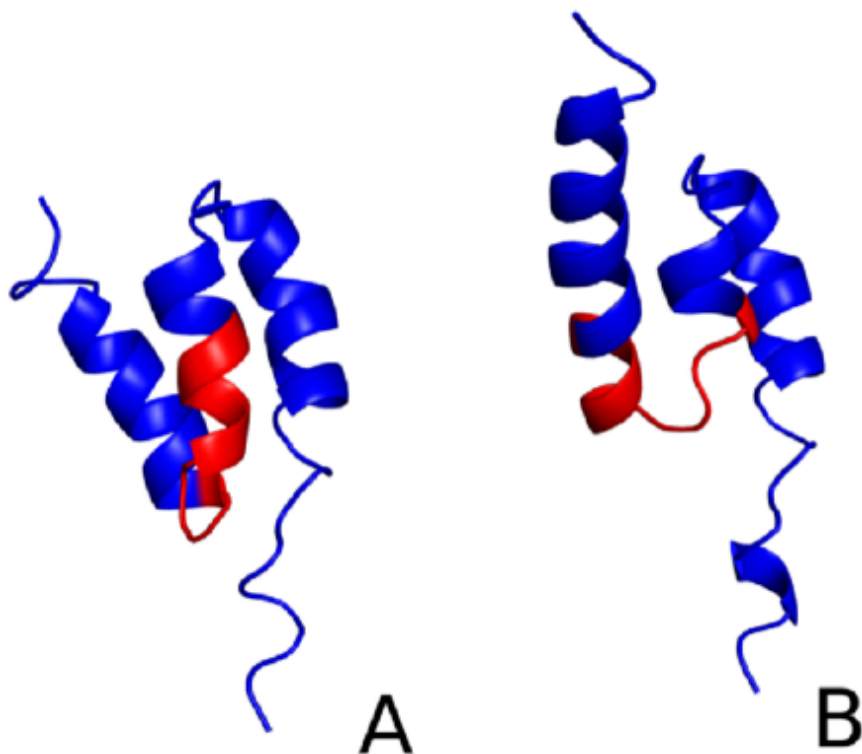
W swojej pracy skupiłem się na rozwijaniu metod teoretycznych z wykorzystaniem istniejących narzędzi na różnych poziomach reprezentacji oraz zastosowaniem uzyskanych i udoskonalonych narzędzi do badania najistotniejszych przemian konformacyjnych w wybranych biomolekułach. Cykl prac można podzielić na dwie przeplatające się części. Pierwszą część stanowi rozwijanie i rozszerzenie zastosowań gruboziarnistych pól siłowych UNRES i jego siostrzanego odpowiednika dla kwasów nukleinowych NARES[35]. Do pola siłowego UNRES wprowadzono nowy potencjał korelujący położenie łańcuchów bocznych i grupy peptydowej, wyprowadzono potencjał średniej siły dla oddziaływań między kwasami nukleinowymi i białkami dla centrów oddziaływań NARES i UNRES, wprowadzono sterowaną dynamikę molekularną do pól siłowych UNRES i NARES, wprowadzono potencjał ekranowania oddziałujących grup peptydowych przez łańcuchy boczne do gruboziarnistego pola siłowego UNRES oraz wprowadzono potencjał opisujących oddziaływanie białek z nanorurką w formie ciągłej do gruboziarnistego pola siłowego UNRES. Drugą część stanowi badanie najważniejszych przemian konformacyjnych takich jak: przejścia od struktury niepoprawnie zwiniętej do struktury natywnej, rozwijania biomolekuł, zwijania białek i asocjacji multimerów. W dalszej części mojego autoreferatu krótko scharakteryzowałem własne osiągnięcia naukowe. Szczegółowe wyniki badań zostały opisane w 12 publikacjach [H1-H12], które stanowią mój cykl habilitacyjny, z których 11 prac to publikacje z tzw. *listy filadelfijskiej*, natomiast jedna to rozdział w książce.

Opis osiągnięć naukowych

Okolo 30 procent zsyntezowanych białek ulega degradacji gdyż ulega niepoprawnemu zwinięciu [36]. Zrozumienie w jaki sposób białko powraca do swojej natywnej struktury stanowi wyzwanie. Kluczowe jest znalezienie odpowiedzi na pytania: Czy białko musi ulec całkowitemu rozwinięciu? Czy proces przejścia ze struktury źle zwiniętej do natywnej jest związany z dużą barierą energetyczną? Jaki jest mechanizm tego procesu?

W pierwszej pracy z cyklu habilitacyjnego [H1] przeprowadzono symulacje dla białka wiążącego albuminę (kod pdb: 1GAB) przesuwając pozycję drugiej pętli o 5 reszt aminokwasowych (Rysunek 2).

W celu zbadania tego procesu, prowadzono symulację badając zachowanie przesuniętej pętli, a analizę wykonano stosując opis fizyczny dla fali stojącej (solitonu). Badania wykazały, iż nie następuje przesunięcia reszta po reszcie, lecz głównym mechanizmem przesuwania pętli jest rozszerzenie i zwężenie (podobnie jak dla fali stojącej). Warto podkreślić, iż występuje więcej niż jeden mechanizm przesunięć pętli, dodatkowo występuje skokowe przesunięcie pętli [H5].



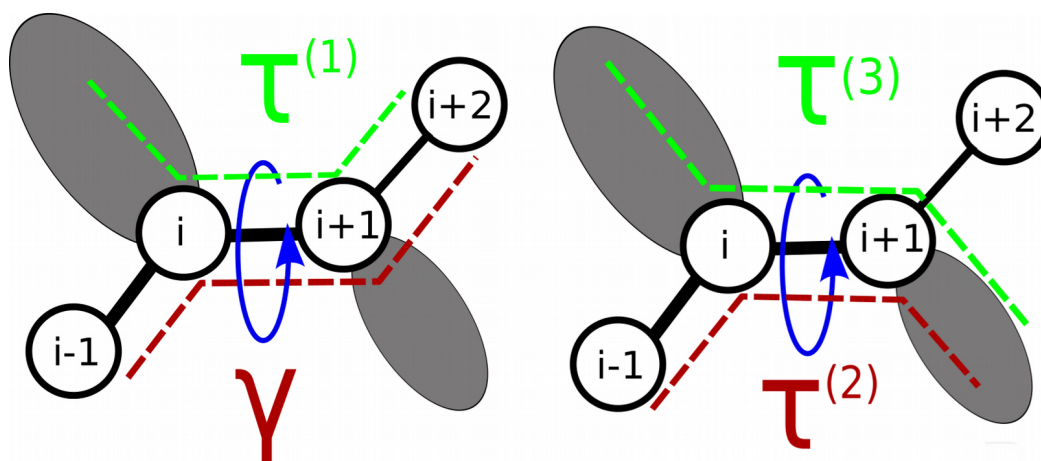
Rysunek 2 Struktura natywna domeny białka wiążącego albuminę (A), struktura z przesuniętą pętlą o 5 reszt aminokwasowych (B).

Bariera dla tego procesu (zwana również barierą Peierls-Nabarro) dla energii łańcucha głównego wynosi w przypadku tego białka około 4-6 kcal/mol. Jest to dość duża bariera biorąc pod uwagę fakt, iż białka są tylko marginalnie stabilne w temperaturze pokojowej (około 5-10 kcal/mol) [37]. Dlatego w niskich temperaturach białko nie może pokonać bariery przesuwania pętli i pętla ta zanika tworząc długą helisę [H1,H5]. Warto podkreślić, iż ruch łańcucha głównego jest skorelowany z ruchem łańcuchów bocznych co skutkuje obniżeniem bariery do 3 kcal/mol [H1,H5].

Potencjały korelacyjne

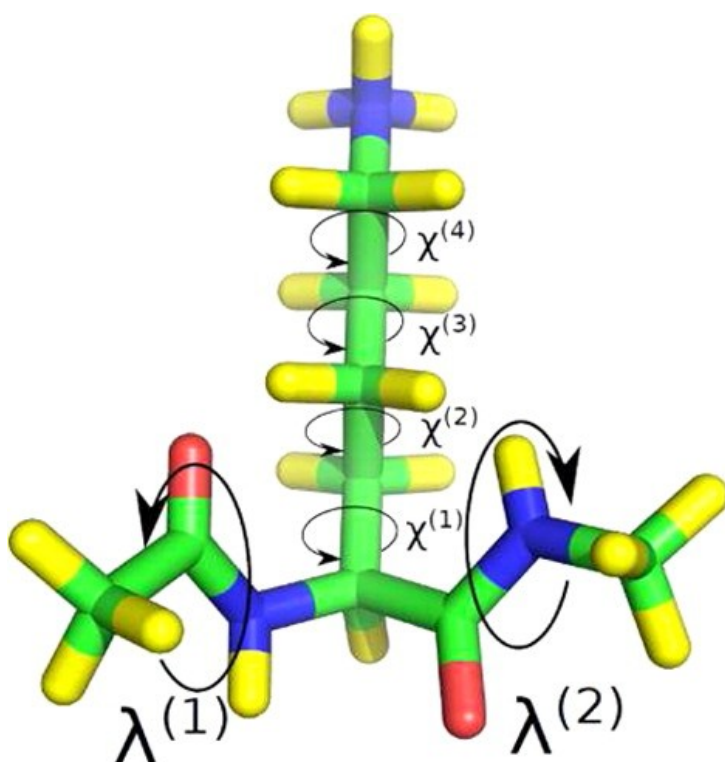
Jednym z najważniejszych kierunków rozwoju technik teoretycznych jest rozwój dokładności funkcji energii oraz udokładnianie parametrów stosowanych zarówno w polach gruboziarnistych jak i pełnoatomowych. Korzystając z wniosków płynących z istoty sprzężenia ruchów łańcucha głównego z ruchem łańcuchów bocznych [H1] postanowiono wprowadzić do funkcji energii gruboziarnistego pola siłowego UNRES ten potencjał korelacyjny w formie jawnej.

W swojej drugiej pracy naukowej [H2] wprowadzono do pola siłowego UNRES nowe potencjały korelujące położenie łańcucha bocznego względem łańcucha głównego (Rysunek 3).



Rysunek 3 Kąty opisujące położenie łańcucha bocznego względem łańcucha głównego. SC-Cα-Cα-Cα (τ_1), Cα-Cα-Cα-SC (τ_2), SC-Cα-Cα-SC (τ_3), używane jako zmienne gruboziarniste do nowych potencjałów korelacyjnych oraz kąt γ oznacza kąt torsyjny łańcucha głównego.

W celu wprowadzenia tych potencjałów wykonano obliczenia przy użyciu semi-empirycznej metody kwantowo-chemicznej AM1 dla N- i C- terminalnie blokowanych aminokwasów prowadząc obliczenia na siatce. Jako zmienne wykorzystane zostały kąty obrotu grupy peptydowej wokół osi łączącej węgiel Cα z grupą CH3 grupy blokującej oraz kąty χ opisujące obrót łańcucha bocznego, np. dla lizyny były to kąty λ_1 , λ_2 oraz kąty χ_{1-4} (Rysunek 4).



Rysunek 4 Terminalnie blokowana lizyna z zaznaczonymi kątami, których użyto jako zmienne do wykonania obliczeń potencjału średniej siły.

Na podstawie przeprowadzonego obliczeń wyliczono potencjały średniej siły (równanie 1), a uzyskane parametry zaimplementowano w gruboziarnistym polu siłowym UNRES.

$$U_{SC-corr}^{XY}(\tau^{(k)}) = -\beta^{-1} \ln \int_{-\pi}^{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} \dots \int_{-\pi}^{\pi} \int_{\gamma: \tau^{(k)}(\gamma, \chi_X^{(1)} \dots \chi_Y^{(n)}) = \tau^{(k)}} [\det H_X(\lambda_1, \tau^{(k)} - \pi - \lambda_2, \chi_X^{(1)}, \dots, \chi_X^{(m)})]^{-1/2} \\ \times [\det H_Y(\lambda_2, \lambda_3, \chi_Y^{(1)}, \dots, \chi_Y^{(n)})]^{-1/2} \exp\{\beta[e_X(\lambda_1, \gamma - \pi - \lambda_2, \chi_X^{(1)}, \dots, \chi_X^{(m)}) + e_Y(\lambda_2, \lambda_3, \chi_Y^{(1)}, \dots, \chi_Y^{(n)})]\} \\ \times d\lambda_1 d\lambda_2 d\lambda_3 d\chi_X^{(1)}, \dots, d\chi_X^{(m)} d\chi_Y^{(1)}, \dots, d\chi_Y^{(n)} d\gamma$$

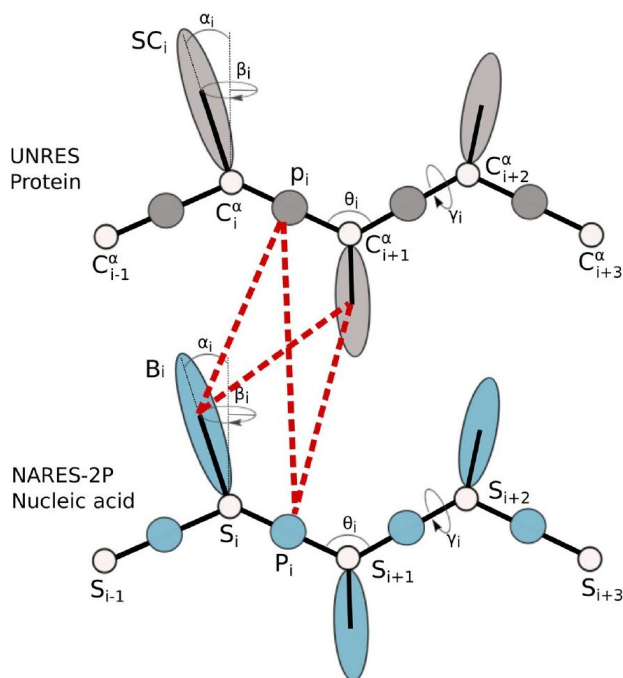
Gdzie, $\beta=1/RT$, R jest to stała gazowa, T jest to temperatura, H oznacza macierz Hessianu, e jest to energia badanej molekuly (X lub Y w zależności od typu potencjału średniej siły liczonego), λ_1, λ_2 oraz χ oznaczają kąty, które opisują pełno-atomową hiperpowierzchnię energii potencjalnej.

Następnie udoskonalone pole siłowe UNRES zostało zoptymalizowane i wykorzystane do testów zdolności predykcyjnych do zwijania małych białek, uzyskując poprawę zdolności przewidywania (średnie odchylenie standardowe względem struktury natywnej zmalało o około 0,9Å).

Również w pracach [H4,H9-H10,H12] rozwijano funkcję energii w gruboziarnistych polach siłowych.

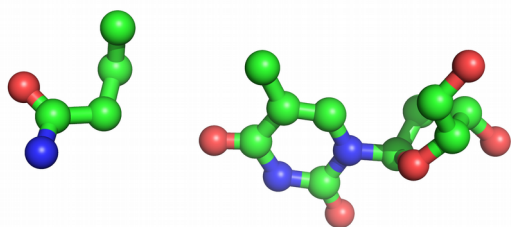
Potencjały dla pól UNRES i NARES

W pracy [H4] opracowano potencjały średniej siły dla oddziaływań centrów z gruboziarnistego pola siłowego UNRES z centrami oddziaływań gruboziarnistego pola siłowego NARES. (Rysunek 5)



Rysunek 5 Ilustracja oddziaływań między centrami białka w polu siłowym UNRES reprezentowanym przez szare sfery i elipsoidy z centrami kwasów nukleinowych w polu siłowym NARES reprezentowanym przez niebieskie sfery i elipsoidy. SC_i oznacza łańcuchy boczne reszt aminokwasowych, p_i oznacza grupę peptydową, P_i oznacza grupę fosforanową, B_i oznacza zasadę nukleinową a S_i oznacza fragment cukrowy.

W celu wyznaczenia potencjałów średniej siły przeprowadzono symulacje w pełnoatomowej rozdzielczości w polu siłowym AMBER ff10sb cząsteczek mających modelować centra oddziaływań (Rysunek 6), z użyciem więzów na odległości w celu przyspieszenia próbkowania przestrzeni konformacyjnej badanych układów. Na podstawie uzyskanych symulacji przeprowadzono analizę ważonych histogramów w celu wyznaczenia potencjałów średniej siły. Następnie przeprowadzono dopasowywanie funkcji analitycznych do uzyskanych potencjałów średniej siły.



Rysunek 6 Przykładowe cząsteczki użyte do symulacji wyznaczenia oddziaływań gruboziarnistych centrów z pól siłowych NARES i UNRES. Na rysunku zaznaczono tylko atomy ciężkie (zielony – węgiel, niebieski - azot, czerwony – tlen).

Potencjały torsyjne

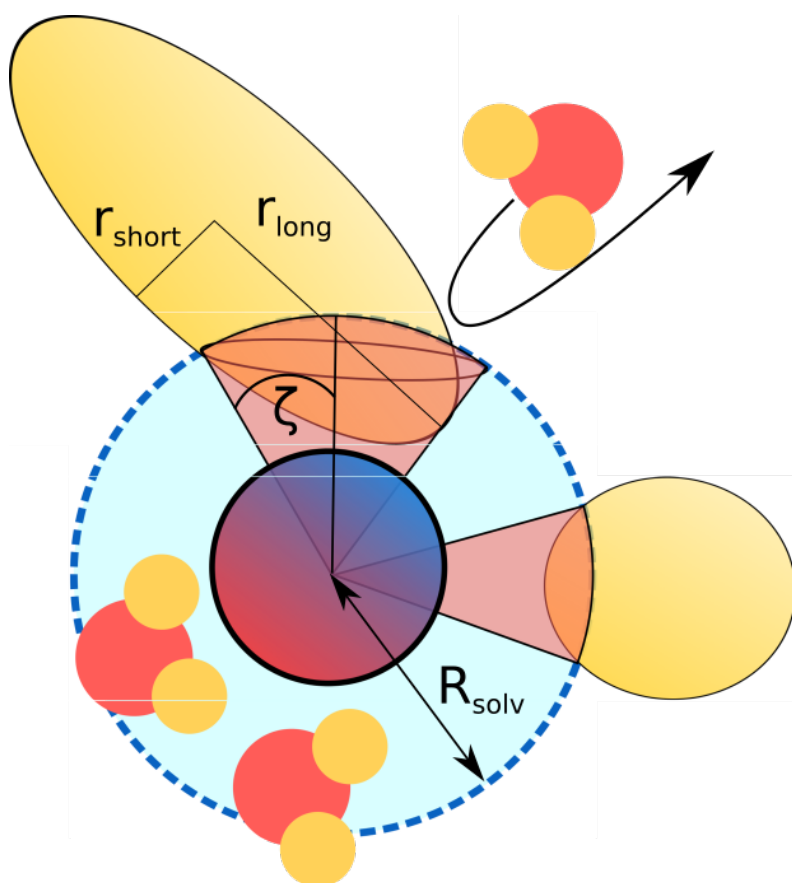
Rozwój gruboziarnistych pól siłowych nie sprowadza się tylko do wyznaczenia coraz dokładniejszych potencjałów średniej siły. W pracy [H9] wyznaczono dokładną formę funkcyjną jaką powinien zawierać potencjał średniej siły w gruboziarnistych polach siłowych. Wyprowadzenie to ukazało, iż stosowanie potencjałów torsyjnych w gruboziarnistych polach siłowych jest znacznym przybliżeniem, często powodującym błędy. Konieczne jest zastosowanie zmodyfikowanych potencjałów torsyjnych, w których zależność energii w kącie torsyjnym jest również zależna od dwóch kątów między wiązaniami wirtualnymi i wkład do energii „czysto” torsyjny nie powinien występować, ze względu na zależności geometryczne kąta torsyjnego. Warto nadmienić, iż wyprowadzenie ma charakter uniwersalny i te same zasady obowiązują w pełnoatomowych polach siłowych, jednak w przypadku tej rozdzielczości stosowanie potencjałów torsyjnych jest uzasadnione ze względu na dużą sztywność kątów walencyjnych. Przeprowadzone obliczenia potencjałów torsyjnych dla N- i C- terminalnie blokowanych reszt aminokwasowych glicyny, alaniny i proliny, z użyciem metody zaburzeń rachunku MP2 oraz uwzględnieniem rozpuszczalnika w formie niejawnej z wykorzystaniem modelu PCM ukazały, że użycie potencjałów torsyjnych do pól siłowych prowadzi do niepoprawnej funkcji rozkładu kątów torsyjnych i może prowadzić do niedokładności obliczeń szczególnie w tych polach siłowych, w których kąty między wiązaniami wirtualnymi mają dużą zmienność.

Efekt ekranowania

Również w kolejnej pracy [H11] udokładniono opis funkcji energii w gruboziarnistym polu siłowym UNRES. W pracy tej wyprowadzono zależność funkcji energii oddziałujących dwóch grup peptydowych w zależności od obecności łańcuchów bocznych w najbliższym otoczeniu. Ponieważ obliczenia efektu trójciałowego byłyby niezwykle kosztowne, rozłożono oddziaływania na sumę składowych przesłaniania poszczególnych grup peptydowych.

Współczynniki modyfikujące oddziaływania elektrostatyczne obliczono na podstawie wycinka sferycznego zajmowanego przez łańcuch boczny reszt aminokwasowych (Rysunek 7).

Wprowadzenie oddziaływań ekranujących do pola siłowego UNRES ukazało, iż uwzględnienie tych oddziaływań znacząco poprawia zdolności predykcyjne pola siłowego UNRES, co zostało sprawdzone na zbiorze białek testowych oraz w eksperymencie ślepego przewidywania struktur CASP12 [H11]. Badania nad wpływem efektu ekranowania pokazały również, iż uwzględnienie tego efektu prowadzi do utworzenia struktur skolapsowanych przyspieszając proces zwiłania od 2 do 1000 krotnie [H11].



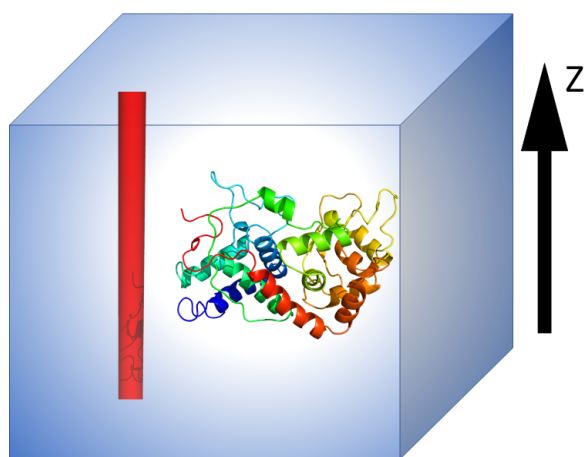
Rysunek 7 Schematyczna reprezentacja efektu ekranowania. Centralna kula z gradientem kolorów reprezentuje grupę peptydową z zaznaczonym momentem dipolowym, niebieską kulą zaznaczono pierwszą sferę hydratacyjną. Kolorem żółtym zaznaczono elipsoidy łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych, kolorem pomarańczowym zaznaczono wycinek sfery niedostępny dla cząsteczek wody. R_{solv} oznacza promień pierwszej sfery hydratacyjnej, r_{short} to krótki promień sferoidy łańcucha bocznego, r_{long} to długi promień sferoidy łańcucha bocznego, a kąt ζ oznacza połowę kąta stożkowego.

Potencjały nanorurka-białko

Oprócz udoskonalania funkcji energii w gruboziarnistym polu siłowym UNRES prowadzono również badania pozwalające wprowadzić do pola siłowego UNRES oddziaływania uwzględniające interakcje białek z nanorurkami [H12] (Rysunek 8). Wprowadzono potencjał Kihary, zgodnie z równaniem:

$$U_{CNT} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r-R_0} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r-R_0} \right)^6 \right]$$

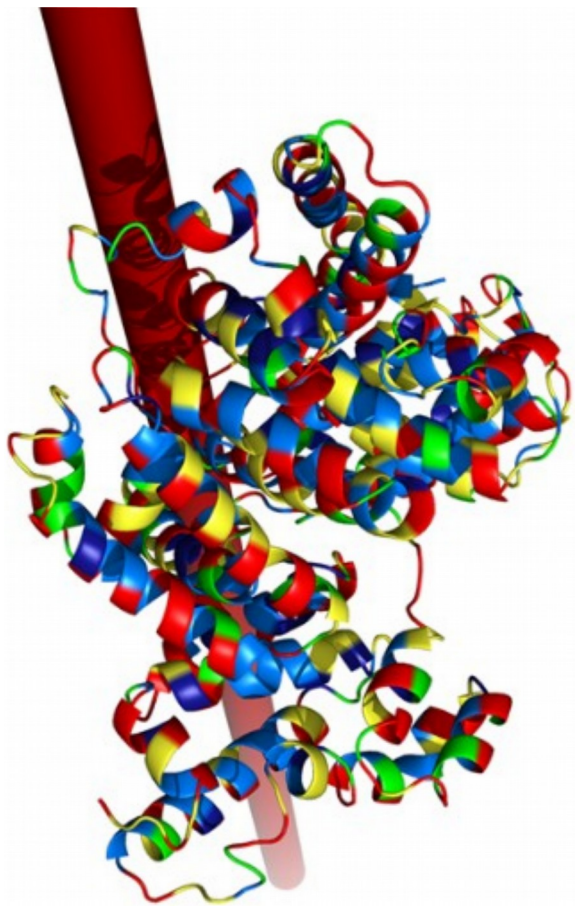
gdzie, ϵ jest to głębokość studni potencjału, σ jest to wartość dla wykres zależności potencjału od odległości przyjmuje wartość 0, r jest to odległość centrum aminokwasowego od osi nanorurki, $r-R_0$ jest to odległość centrum aminokwasowego od powierzchni nanorurki.



Rysunek 8 Schematyczna reprezentacja nanorurki (czerwony walec) w warunkach periodycznych (niebieski sześciąt).

Parametry oddziaływań nanorurek węglowych z poszczególnymi aminokwasami przybliżono używając parametrów z pola siłowego UNRES dla oddziaływań między łańcuchami bocznymi a fenyloalaniną. Badanie oddziaływań ukazały iż wszystkie trzy modelowe białka (chymotrypsyna, albumina wołowa oraz peroksydaza sojowa) stosunkowo silnie oddziałują z nanorurkami (Rysunek 9). Pomimo, iż nie wszystkie z badanych białek tracą strukturę całkowicie, chymotrypsyna ulega znacznym zmianom konformacyjnym i nie zachowuje struktury okolic triady

katalicznej. Badania te sugerują możliwą toksyczność nanorurek. W przypadku pozostałych białek zmiany struktury nie były aż tak drastyczne.

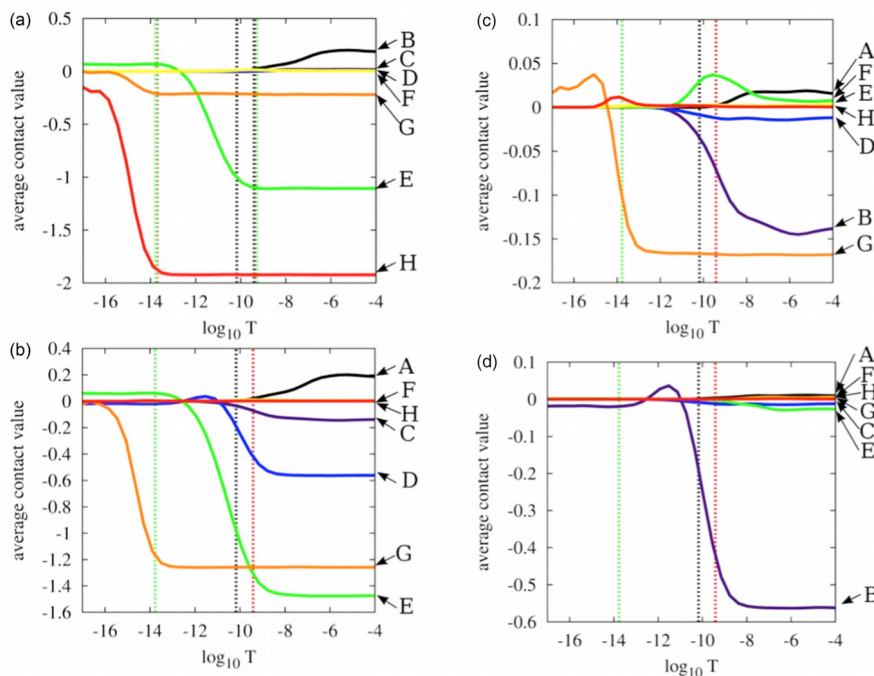


Rysunek 9 Wołowa albumina wyizolowana z serum oddziałująca z nanorurką. Kolorami zaznaczono odpowiednie typy reszt aminokwasowych: hydrofobowe (jasnoniebieskie), aromatyczne (ciemnoniebieskie), polarne (żółte), naładowane (czerwone), cysteinę, prolinę i glicynę (zielone).

Symulacje rozwijania białek i kwasów nukleinowych

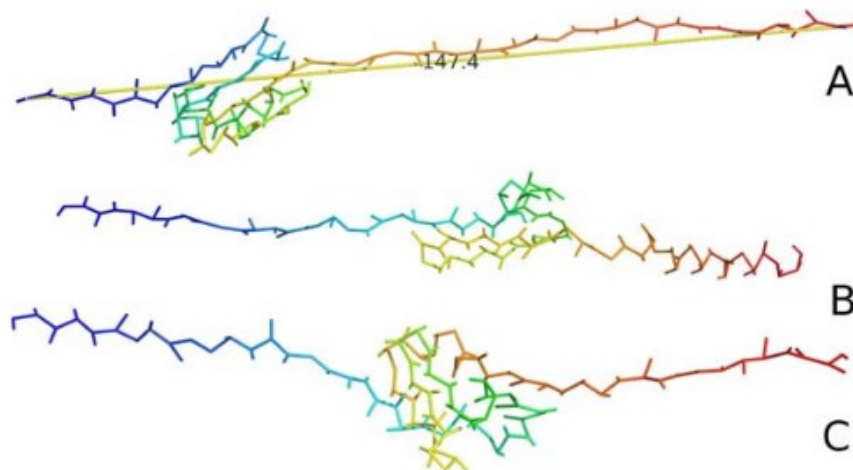
Ważnym elementem moich badań było zastosowanie technik teoretycznych do badania istotnych przemian konformacyjnych [H3, H6-H8, H10]. Jednym z najważniejszych procesów badanych teoretycznie jest rozwijanie biomolekuł. Są dwie najważniejsze techniki badania rozwijania molekuł: przez podgrzewanie układu oraz przez użycie sterowanej dynamiki molekularnej.

Badania procesu rozwijania mioglobiny przy użyciu moledu solitonowego [H6] przez podgrzewanie tego białka ukazało dużą zgodność z wynikami eksperymentalnymi procesu zwijania [38]. Badania pokazały, iż struktury które powstają pierwsze w procesie zwijania są również najstabilniejsze w wysokich temperaturach. (Rysunek 10)



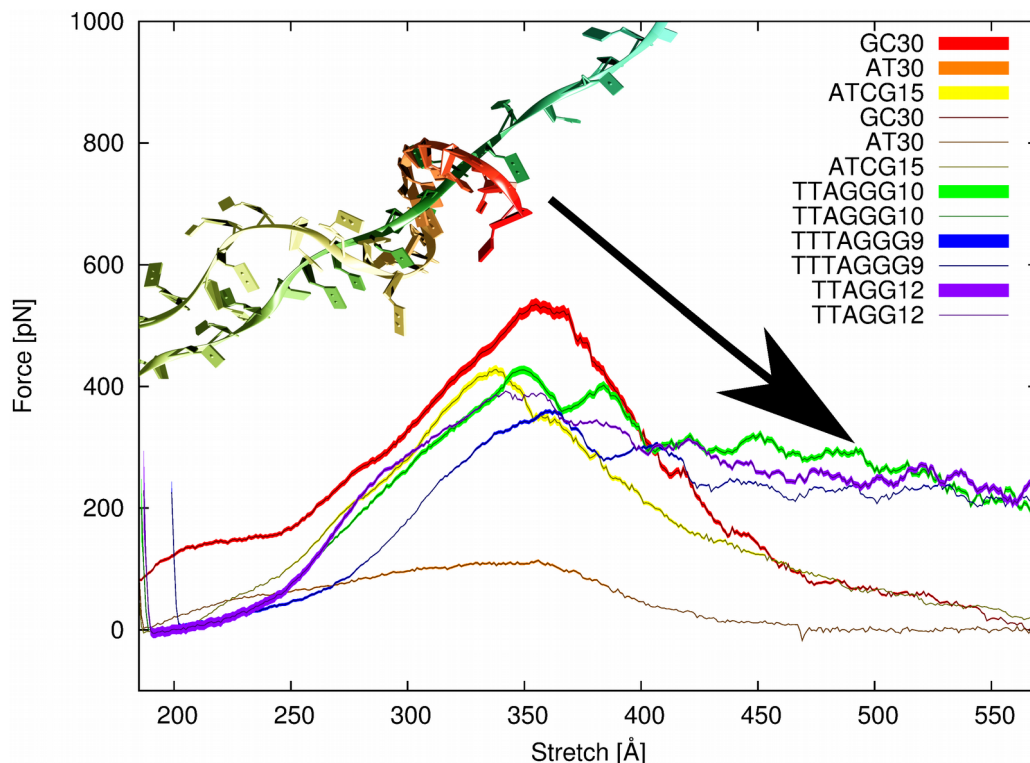
Rysunek 10 Zależności średniej wartości kontaktów między helisami w funkcji temperatury dla helisy: A (a), B (b), C (c), D (d).

Równie cennych informacji dostarcza badanie układów biologicznych przy użyciu sterowanej dynamiki molekularnej. Wprowadzono do gruboziarnistego pola siłowego UNRES sterowaną dynamikę molekularną, której możliwości przetestowałem poprzez wykonanie symulacji dla dwóch modelowych białek: domeny Fn3 domain ludzkiej kontaktyny and domeny I27 tyntyny. Przeprowadzone symulacje wykazały dużą zgodność z przeprowadzonym eksperymentem mikroskopii sił atomowych [39], ukazując najstabilniejsze struktury tego białka [H7]. Badanie to pozwoliło na określenie, które fragmenty białek łatwo ulegają rozciągnięciu pod wpływem sił zewnętrznych (Rysunek 11). Pozwala to zrozumieć, które fragmenty ulegają odkształceniu podczas funkcjonowania tyntyny wyizolowanej z ludzkich mięśni. [H7].



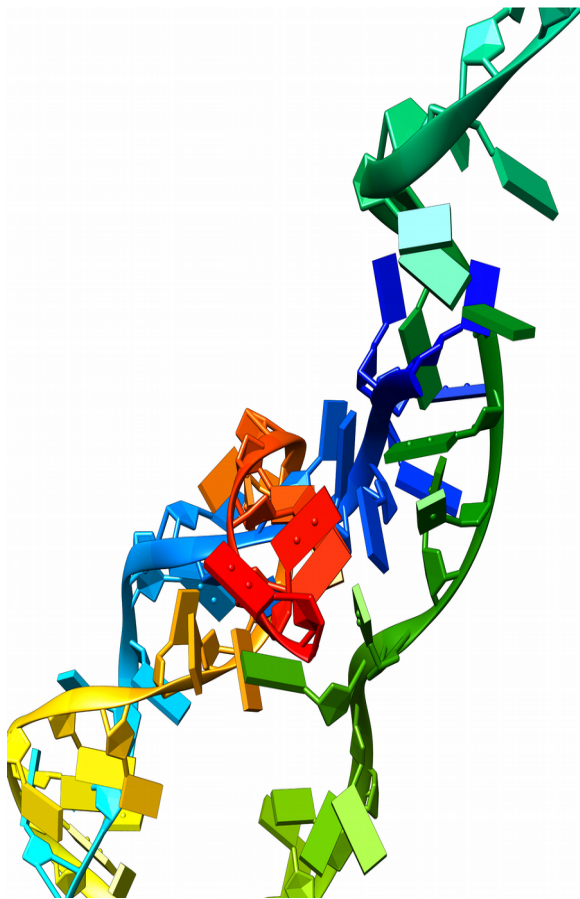
Rysunek 11 Struktury stanów przejściowych uzyskanych w trakcie rozwijania tyntyny z trzech dominujących ścieżek rozwijania: od C-końca (A), od N-końca (B), symetrycznej (C).

Badania odporności mechanicznej nie jest ograniczone tylko do białek i dostarcza wielu cennych informacji o funkcjonowaniu DNA. Wprowadzenie sterowanej dynamiki molekularnej do pola siłowego NARES pozwoliło porównać odporność na uszkodzenia mechaniczne różnych sekwencji kwasów nukleinowych [H8]. Przeprowadzone badania wykazały, iż sekwencje telomeryczne wykazują znacznie większą odporność mechaniczną niż inne modelowe układy. (Rysunek 12)



Rysunek 12 Wykres zależności siły rozciągającej od długości rozciągnięcia. Strzałką zaznaczono zakresy rozciągnięć, gdzie struktura ponownego nawinięcia nici telomerycznej po przesunięciu o pewien fragment ma istotne właściwości mechaniczne.

Sekwencje telomeryczne są zdolne do ponownego nawijania (Rysunek 12), co stanowi mechanizm zabezpieczający przed rozwinięciem szczególnie dla dużych odległości rozciągania. Co więcej w trakcie rozwijania zauważono, iż sekwencje telomeryczne tworzą trypleksy (Rysunek 13).



Rysunek 13 Struktura trypleksu uzyskana dla sekwencji telomerycznych uzyskana podczas rozwijania.

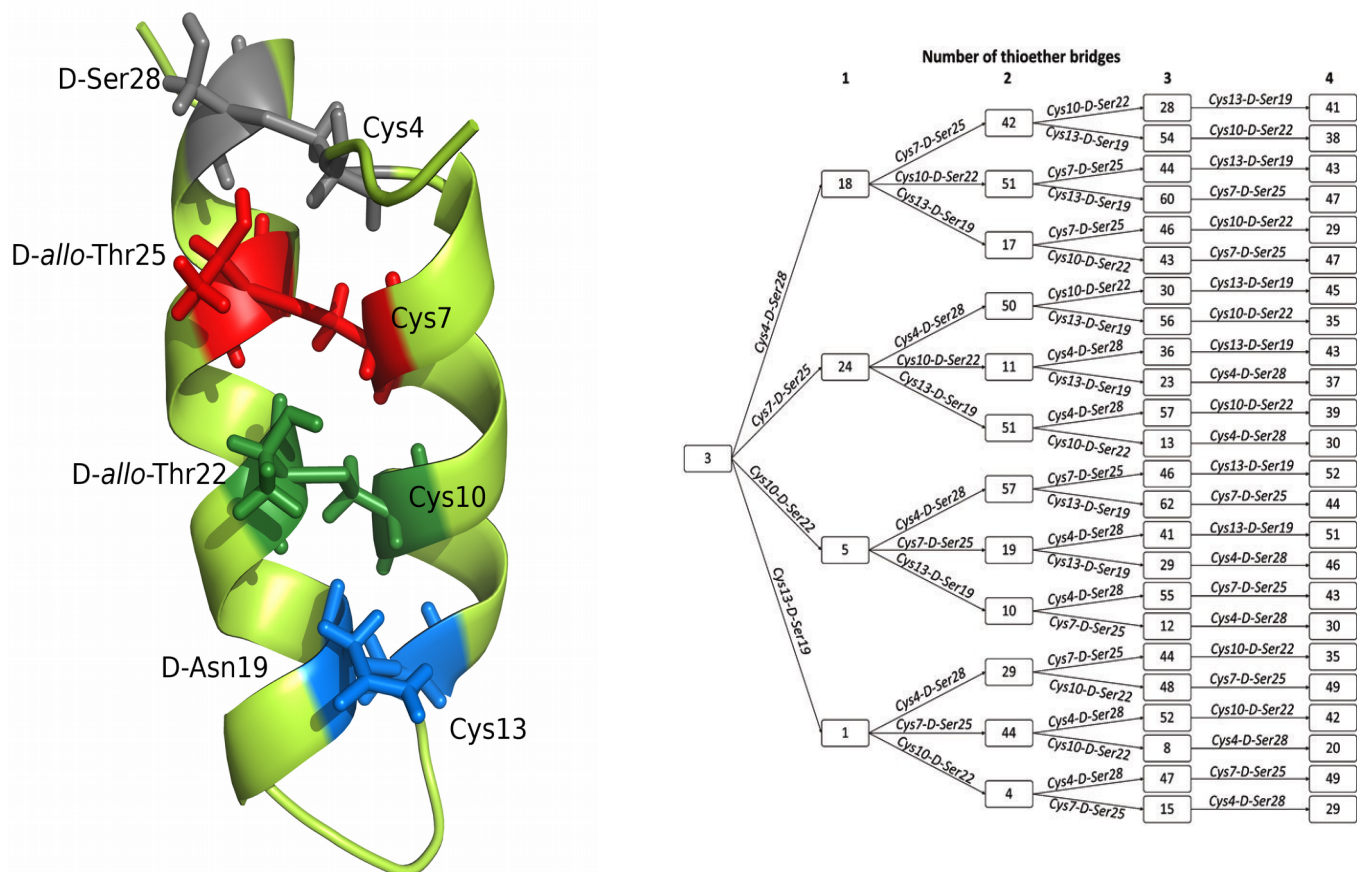
Utworzenie trypleksu zapewnia dodatkową stabilizację DNA. Wyjątkowa stabilność sekwencji telomerycznych daje częściowo odpowiedź, dlaczego właśnie te sekwencje zostały wybrane jako zabezpieczenie końcowych fragmentów DNA.

Zwijanie białek

Znacznie trudniejsze metodologicznie i obliczeniowo jest badanie procesu zwijania białek. W przypadku rozwijania białek znana jest skturktura startowa, a stan rozwinięty zawsze można osiągnąć przez użycie odpowiednio dużej siły lub przez podgrzanie do bardzo wysokiej temperatury. Natomiast w przypadku zwijania stan początkowy nie jest dobrze zdefiniowany, skuteczność zwijania jest zależna od pola siłowego, istnienia pułapek kinetycznych na ścieżce zwijania oraz od metody próbkowania przestrzeni konformacyjnej.

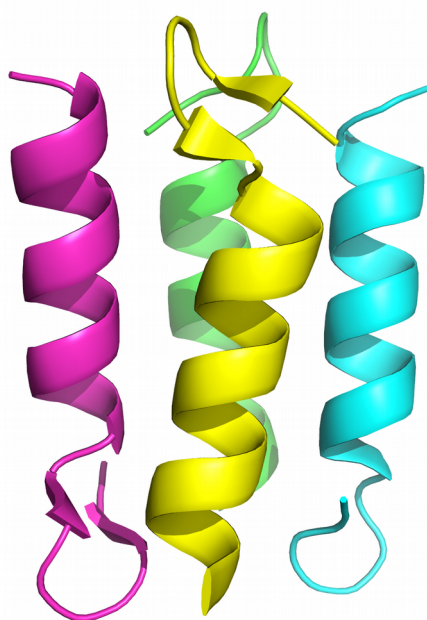
Zastosowano pole siłowe UNRES do badania procesu zwijania bakteriocydu thurincyny H wyizolowanego z *Bacillus thuringiensis* [H10]. Peptyd ten zawiera nietypową strukturę mostków węglowo-siarkowych oraz D-aminokwasy (Rysunek 14A). Przeprowadzono serię symulacji włączając więzy na odpowiednie mostki węglowo-siarkowe (imitujące powstające wiązania), które

pozwołyły na ustalenie, które mostki tworzą się pierwsze oraz czy kolejność tworzenia mostków jest istotna. Badania pokazały, iż na początkowym etapie zamknięcie mostków D-Ser²⁸ – Cys⁴ oraz D-Ser²⁵-Cys⁷ jest najbardziej korzystne dla procesu zwijania (Rysunek 14B).



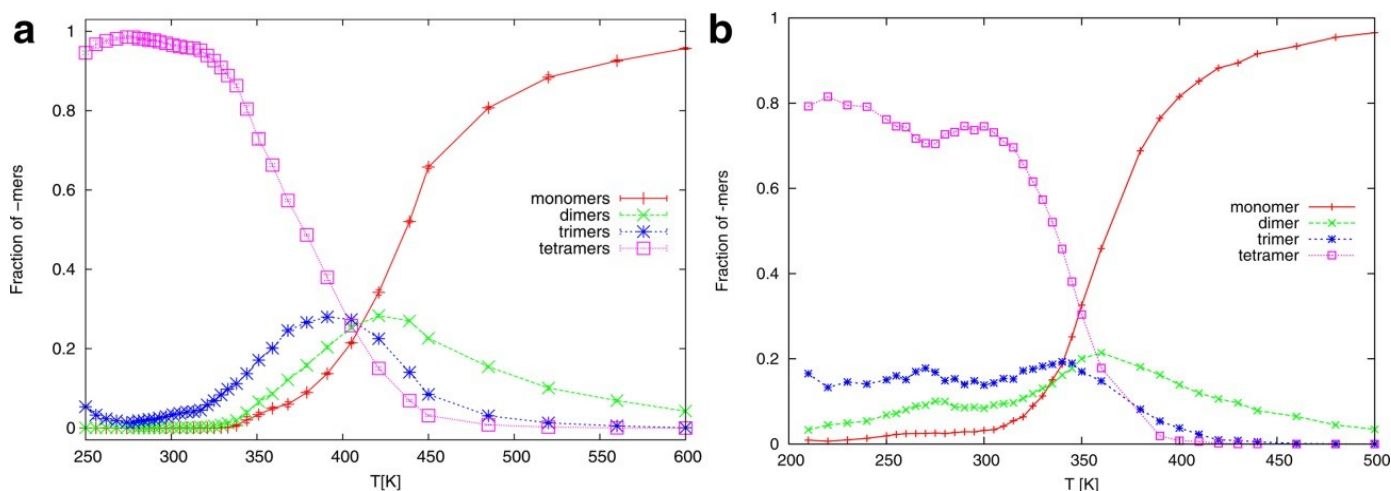
Rysunek 14 Struktura thurincyny H z zaznaczonymi mostkami węglowo-siarkowymi (A), drzewo procesu zwijania z zaznaczonymi ilością trajektorii ze strukturami natywnymi w zależności od utworzonych mostków (B).

Jeszcze trudniejszym zadaniem jest badanie jednoczesnej asocjacji oraz zwijania białka. Dotychczas w polu siłowym UNRES między łańcuchami nakładane były więzy na C- i N- koniec odpowiednich łańcuchów tak by uniemożliwić oddalenie się ich do nieskończoności. Technika ta niestety powoduje zbytnią stabilizację asocjacji oraz może prowadzić do nierealistycznych trajektorii, w których poszczególne mery szybko zbliżają się do siebie w linii prostej. W celu wyeliminowania tych problemów wprowadzono do pola siłowego UNRES warunki periodyczne [H3], a następnie zbadano proces asocjacji i zwijania białka BBAT1 (Rysunek 15).



Rysunek 15 Struktura eksperymentalna homotetrameru BBAT1.

BBAT1 jest to homotetramer, każdy pojedynczy mer składa się z helisy oraz krótkiej beta kartki. Uzyskane wyniki badań porównałem z wcześniej otrzymaną ścieżką zwijania dla pola siłowego UNRES gdy stosowane były więzy na C- i N- koniec. Przeprowadzone symulacje pokazały, iż metoda traktowania oligomerycznego układu nie wpływa znacząco na sam proces zwijania poszczególnych monomerów, natomiast znacząco wpływa na proces asocjacji (Rysunek 16). W przypadku zastosowania więzów na C- i N- koniec odpowiednich łańcuchów temperatura asocjacji wynosi trochę ponad 400K natomiast dla układów w warunkach periodycznych temperatura ta jest bardziej realistyczna i wynosi mniej niż 350K. Pokazuje to, iż metoda traktowania układów oligomerycznych (więzy na poszczególne mery lub warunki periodyczne) może znacząco wpływać na badanie procesów asocjacji.



Rysunek 16 Wykres zależności frakcji monomerów, dimerów trimerów i tetramerów w funkcji temperatury dla białka BBAT1: w warunkach symulacji asocjacji z wiązaniami na C- i N- koniec (A), w warunkach pudełka periodycznego (B).

Podsumowanie

Ciągły rozwój technik teoretycznych pozwala na coraz dokładniejsze przewidywania struktur białek oraz symulowania ich najważniejszych ruchów [40-41]. Istotną rolę w tych badaniach pełnią gruboziarniste pola siłowe, w których możliwe jest symulowanie dużych układów biologicznych [42].

W swojej pracy udoskonaliłem gruboziarniste pole siłowe UNRES poprzez: wyprowadzenie nowych potencjałów korelacyjnych dla lokalnych i lokalno-elektrostatycznych oddziaływań, efektu ekranowania, zależności geometrycznej dla kątów torsyjnych i kątów między wiązaniami wirualnymi oraz wprowadziłem warunki periodyczne. Zbadałem fizyczność zachowań gruboziarnistego modelu solitonowego. Rozszerzyłem stosowalność pól siłowych UNRES i NARES na sterowaną dynamikę molekularną oraz stworzyłem model umożliwiający symulację układów zawierających kwasy nukleinowe i białka. Wprowadziłem nanorurki do pola siłowego UNRES co umożliwiło badanie oddziaływań białko-nanorurka. Rozszerzenie pola siłowego UNRES o warunki periodyczne umożliwiło na badanie przemian konformacyjnych w trakcie asocjacji w realistyczny sposób, a udoskonalenie funkcji energii znacząco poprawiło zdolności predykcyjne tego pola i jego stosowalność.

Udoskonalone pola siłowe zweryfikowałem dla wielu układów biologicznych takich jak małe peptydy, mioglobina, tyntyna aż do telomerycznych układów kwasów nukleinowych. Moje badania pozwoliły na określenie najważniejszych ruchów badanych układów biologicznych, a udoskonalone narzędzia zostały udostępnione dla środowiska naukowego na stronie www.unres.pl.

Literatura

- [1] Delgado F. F., Cermak N., Hecht V. C., Son S., Li Y., Knudsen S. M., Olcum S., Higgins J. M., Chen J., Grover W. H., Manalis, S. R., PLOS ONE 2013, 8:e67590
- [2] Ding X.M., Pan X.Y., Xu C., Shen H.B., Curr Comput Aided Drug Des 2010,6:197
- [3] Kendrew J.C., Bodo G., Dintzis H.M., Parrish R. G., Wyckoff H., Phillips D. C., Nature, 1958, 181: 662.
- [4] Johansson M.U., Cheteua M., Wilstorm M., Forsen S., Drakenberg T., Bjorck L., J Mol Biol, 1997, 266: 859
- [5] Ma L., Yang F., Zheng J., J Mol Struct, 2014, 1077:87
- [6] Chen Y., Pollack L., Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016, 7:512
- [7] Nikolovsk-Coleska Z., Methods Mol Biol, 2015, 1278:109
- [8] Kleckner I.R., Foster M.P., Biochim Biophys Acta, 2011, 1814:942
- [9] Xin Y., Shi Y., Niu T., Wang Q., Niu W., Huang X., Ding W., Yang L., Blankenship R.E., Xu X., Sun F., Nature Comm, 2018,9:1568
- [10] Zhao G., Perilla J. R., Yufenyuy E.L., Meng X., Chen B., Ning J., Ahn J., Gronenborn M.A., Schulten K., Aiken C., Zhang P., Nature, 2013, 497:643
- [11] Brooks C.L., Fleischman S.H., J Am Chem Soc, 1990, 112:3307
- [12] Mozolewska M.A., Krupa P., Scheraga H.A., Liwo A., Prot Struct Func Bioinf, 2015, 83:1414
- [13] Lin H., Truhlar D.G., Theor Chem Acc, 2007,117:185
- [14] Yu I., Mori T., Ando T., Harada R., Jung J., Sugita Y., Feig M., e-Life, 2016, 5: e19274
- [15] Perez A., MacCallum J.L., Dill K. A., Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 11846
- [16] Pasi M, Lavery R., Ceres, N., J Chem Theory Comput 2013, 9: 785
- [17] Monticelli L., Kandasamy S. K., Periole X., Larson, R. G., Tieleman, D. P., Marrink, S.J., J Chem Theory Comput 2008, 4: 819
- [18] Kolinski A., Skolnick, J. Polymer 2004, 45: 511
- [19] Liwo A., Lee J., Ripoll D. R., Pillardy J., Scheraga H. A., Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96: 5482
- [20] Dawid A. E, Gront D., Kolinski A., J Chem Theory Comput 2017, 13: 5766
- [21] Dama J.F., Sinitskiy A.V., McCullagh M., Weare J., Roux B., Dinner A.R., Voth G.A., J Chem Theory Comput 2013, 9: 2466
- [22] Mu Y., Zhao G., Wu X., Hang L., Chu H., Appl Math Mod, 2015, 39:1352
- [23] Jindal G., Warshel A., J Phys Chem B, 2016, 120:9913
- [24] Shelly M.Y., Selvan M.E., Zhao J., Babin V., Liao C., Li J., Shelly J.C., J Chem Theor Comput, 2017,13:3881
- [25] Klamt A., Schumann G., J Chem Soc Perkin Transaction 2, 1993:799
- [26] Mennucci B., Adv Rev., 2012,2:386
- [27] Liwo A., et al. J. Mol. Model. 2014, 20, 2306.

- [28] Liwo A., S., Pincus M. R., Wawak R. J., Rackovsky S., Scheraga H. A., J Comput Chem 1997, 18: 849
- [29] Liwo A., Czaplewski C., Pillardy J., Scheraga H. A., J Chem Phys, 2001, 115: 2323
- [30] Liwo A., Khalili M., Czaplewski C., Kalinowski S., Ołdziej S., Wachucik K., Scheraga H. A., J Phys Chem B, 2007, 111: 260
- [31] Liwo A., Czaplewski C., Ołdziej S., Rojas A. V., Kaźmierkiewicz R., Makowski, M., Murarka R. K., Scheraga, H. A., In Coarse-Graining of Condensed Phase and Biomolecular Systems; Voth, G., Ed.; CRC Press, 2008; Chapter 8, pp 1391–1411
- [32] He Y., Xiao Y., Liwo A., Scheraga H. A., J Comput Chem 2009, 30: 2127
- [33] Kozłowska U., Maisuradze G. G., Liwo A., Scheraga H. A., J Comput Chem 2010, 31: 1154
- [34] Liwo A., Khalili M., Scheraga H.A., Proc Natl Acad Sci, 2005, 102:2362
- [35] He Y., Liwo A., Scheraga H.A., J Chem Phys, 2015, 143:243111
- [36] Schubert U., Anton L.C., Gibbs J., Norbury C.C., Yewdell J.W., Bennink J.R., Nature, 2000, 404:770
- [37] Alber T., Ann Rev Biochem, 1989, 58: 765
- [39] Mikulska M, Strzelecki J., Nowak W., J. Mol. Model. 2014, 20:1
- [40] Kryshtafovych A., Monastyrskyy B., Fidelis K., Moulton J., Schwede T., Tramontano A., Proteins, 2018, 86, S1:321
- [41] Kesar C., et al., Sci Rep, 2018, 8: 9939
- [42] Kmiecik S., Gront D., Kolinski M., Wieteska L., Dawid A.E., Kolinski A., Chem Rev. 2016, 116:7898



Sienadron