

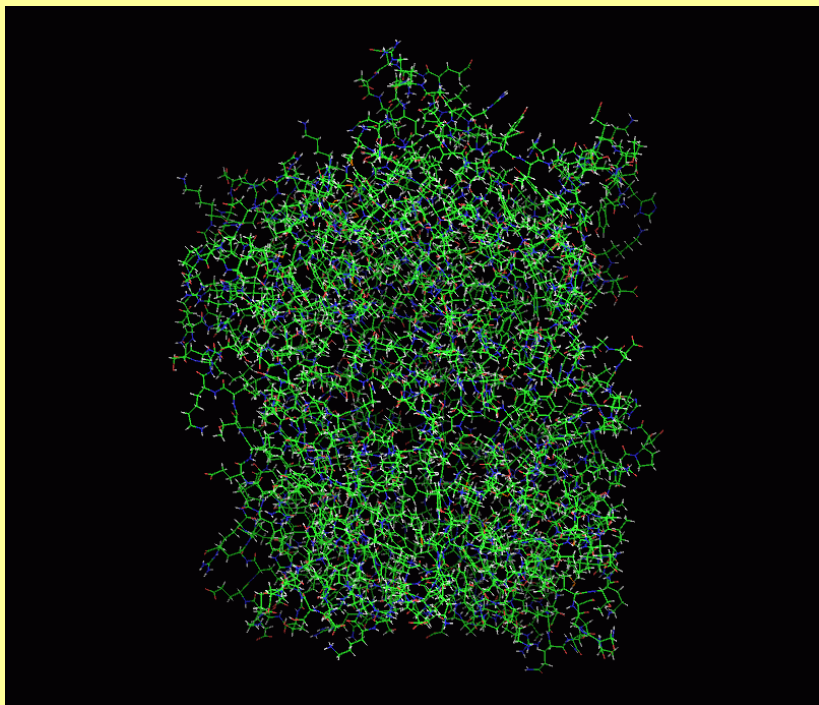
Molekuladinamika a szerkezet- és funkciókutatásban



Eötvös Loránd Tudományegyetem,
Budapest



Mire jó a molekuladinamika?

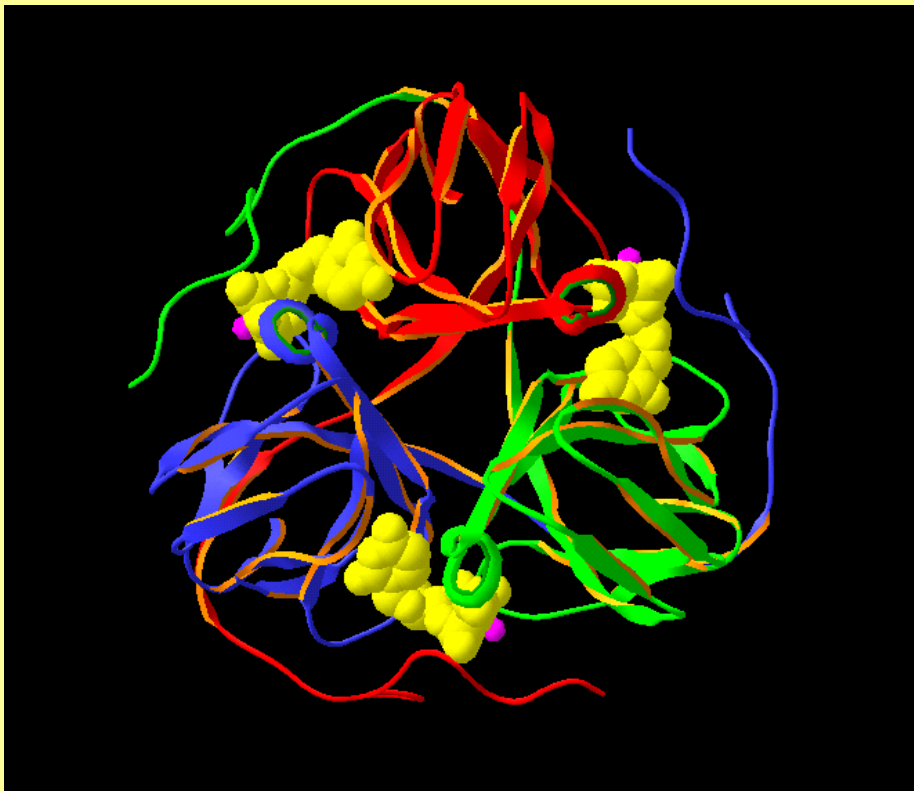


- szerkezetmeghatározás
- konformációk oldatfázisban
- flexibilitás
- folding mechanizmusa
- szubsztrát kötődés, leválás
- katalízis dinamikus vonatkozásai



Szerkezetmeghatározás hiányosságai

Példa 1.

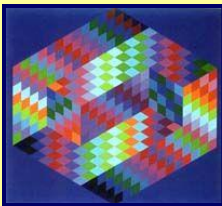


dUTPáz



- homotrimer
- N-terminális, C terminális szegmensek nem láthatóak
- katalitikusan fontos

(Vértessy Bea és mtsai)



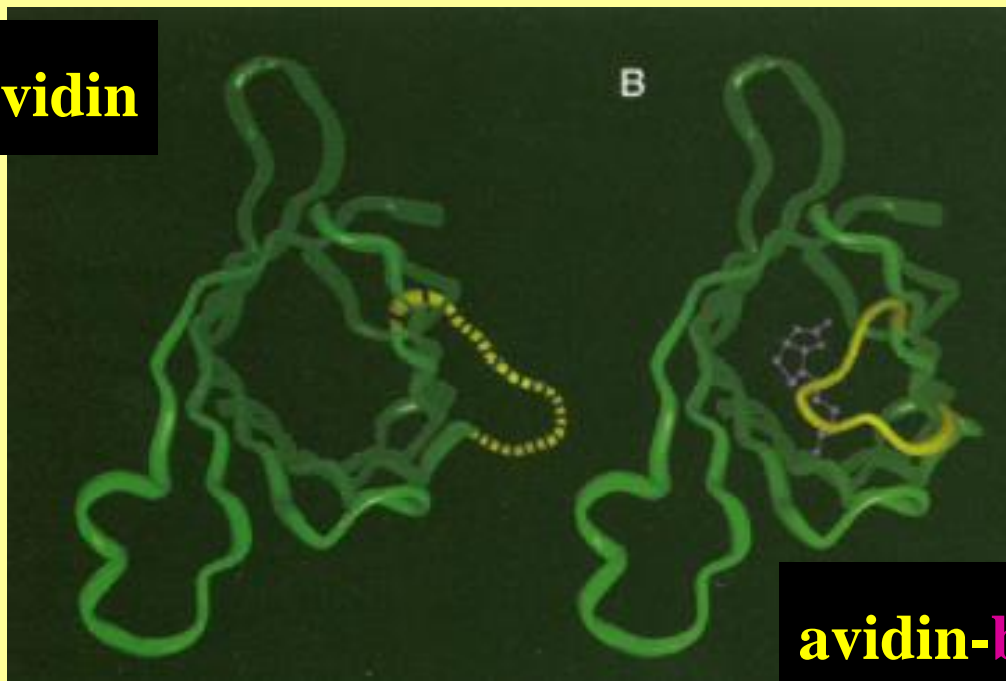
Szerkezetmeghatározás hiányosságai

Példa 2.

Coupling of Local Folding to Site-Specific Binding of Proteins to DNA

Ruth S. Spolar and M. Thomas Record Jr.

avidin



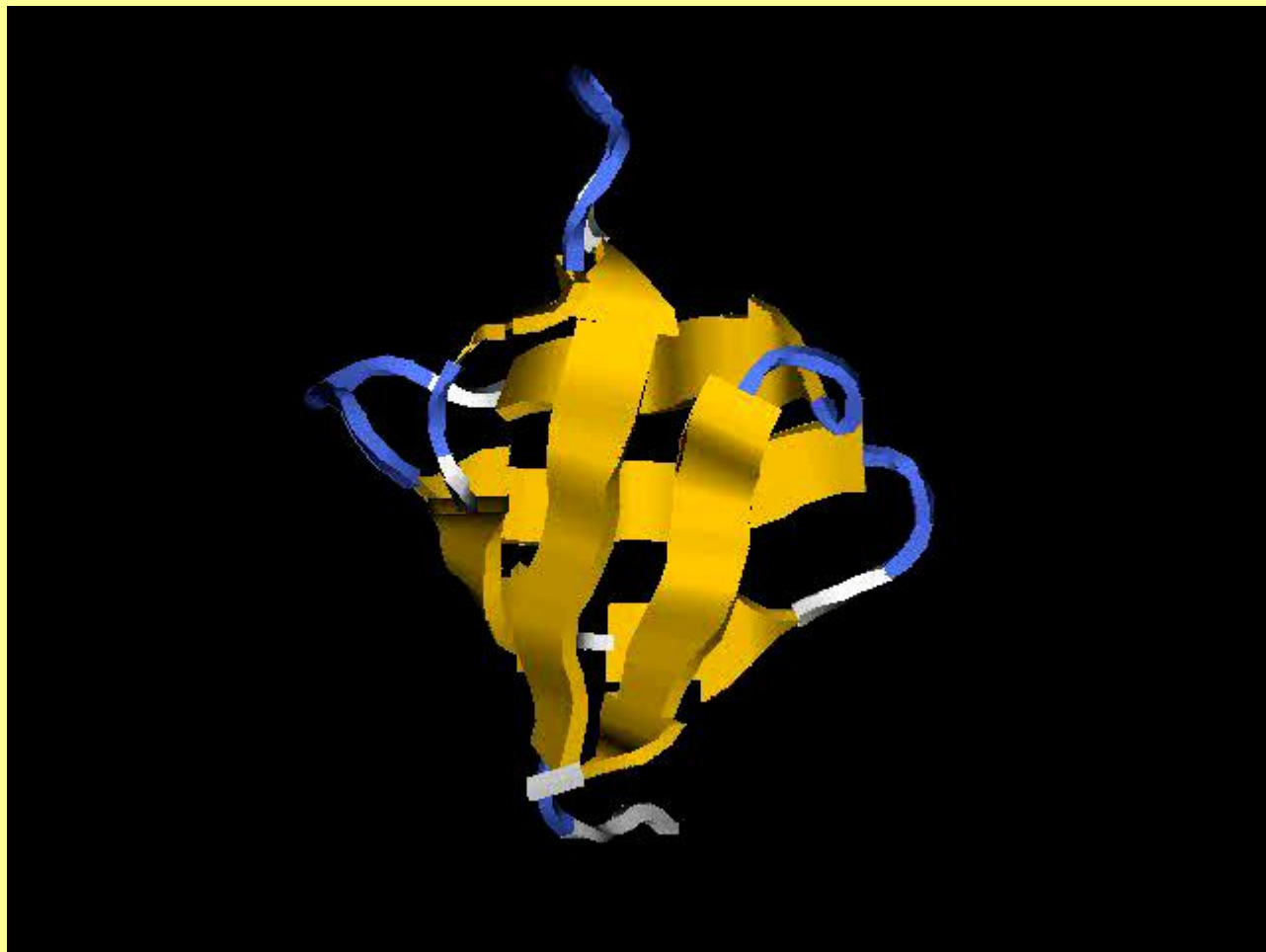
avidin-biotin complex



Folding mechanizmus

Példa:

**HIV integráz
DNS-kötő
domén**

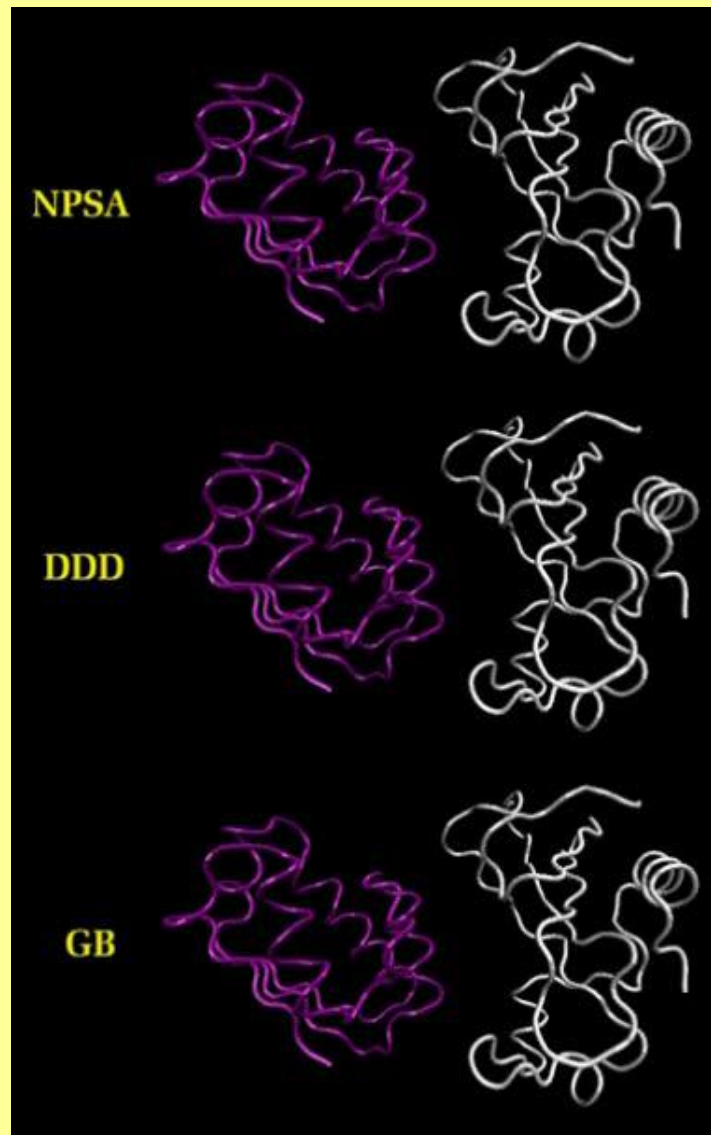


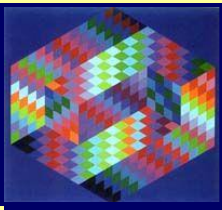


Kötődés vizsgálata

Példa:

Barnáz-barsztár

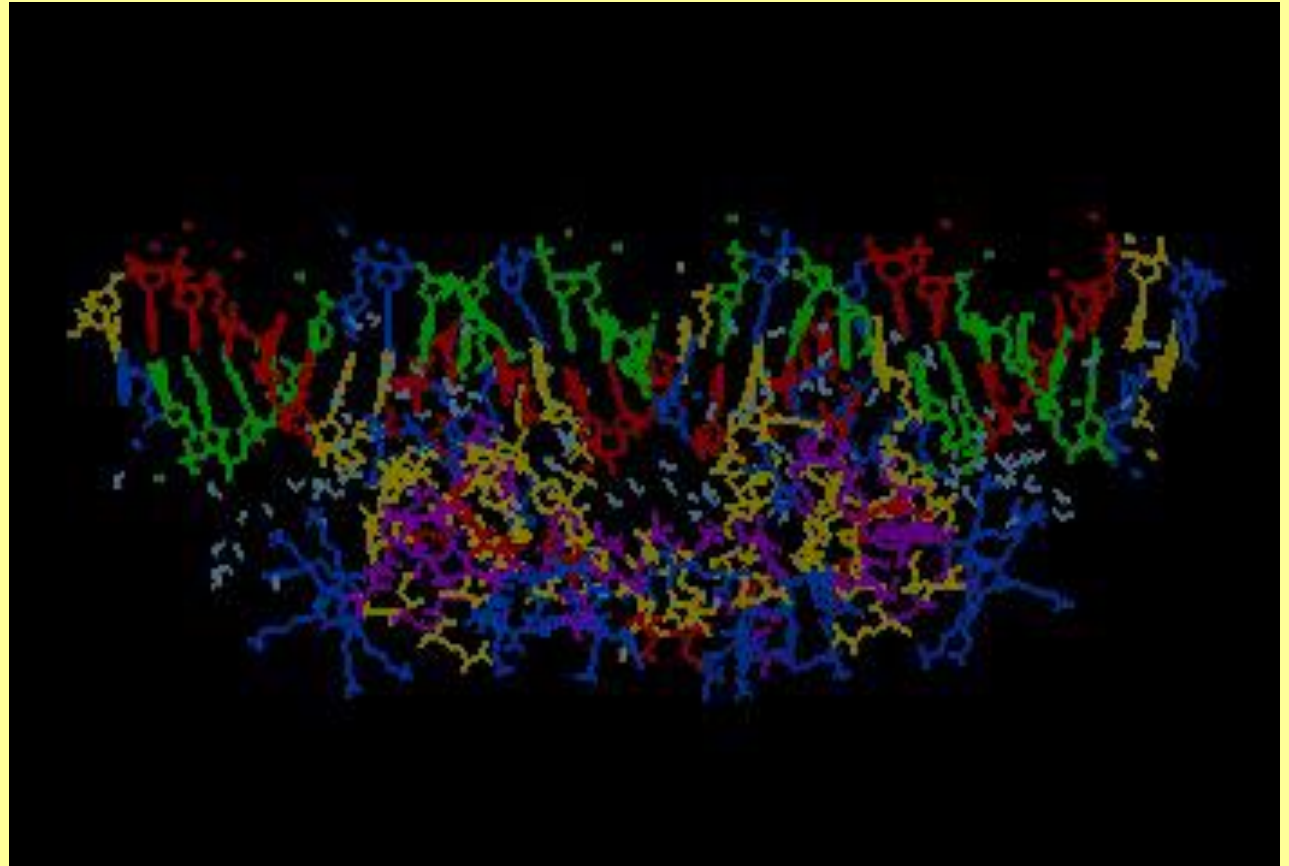




Kötődés vizsgálata

Példa

Glükokortikoid
receptor – DNS

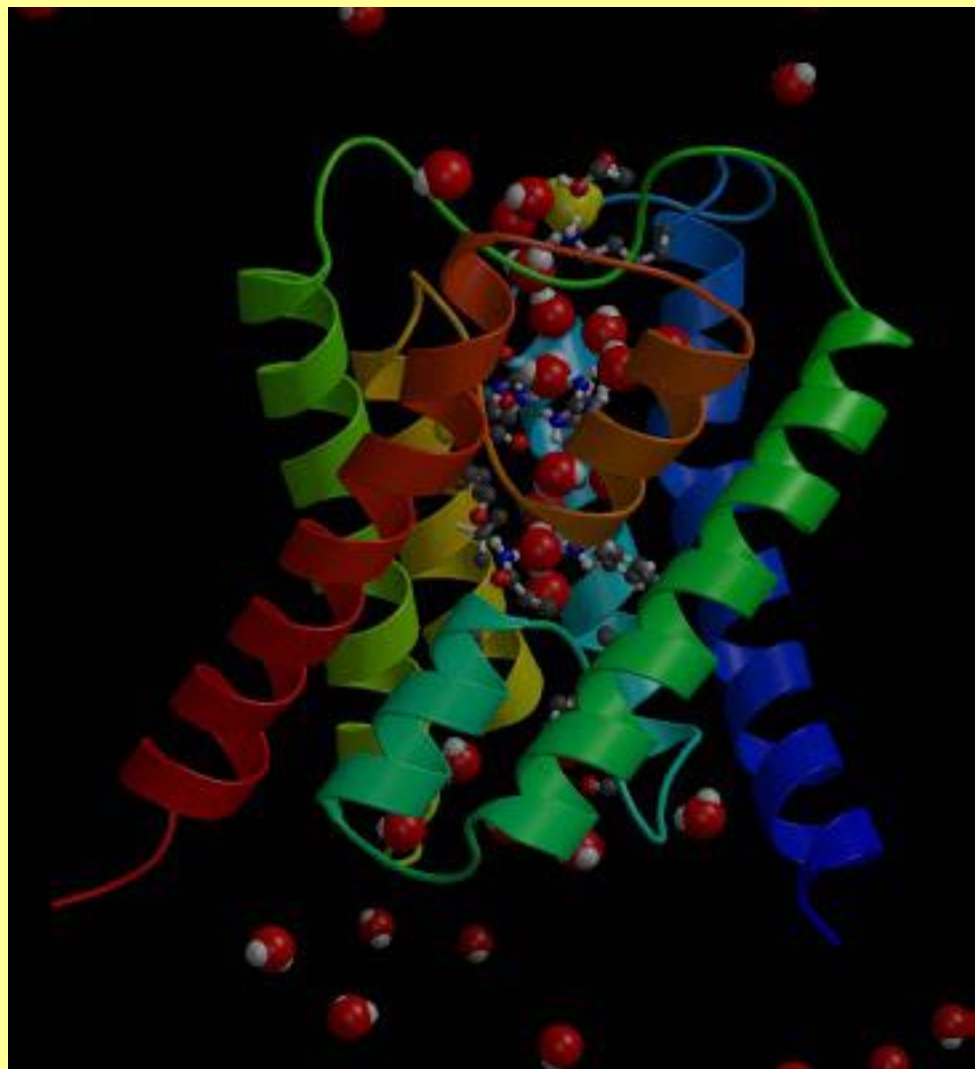




Dinamikus funkció

Példa:

**Aquaporin –
vízátersztó csatorna**

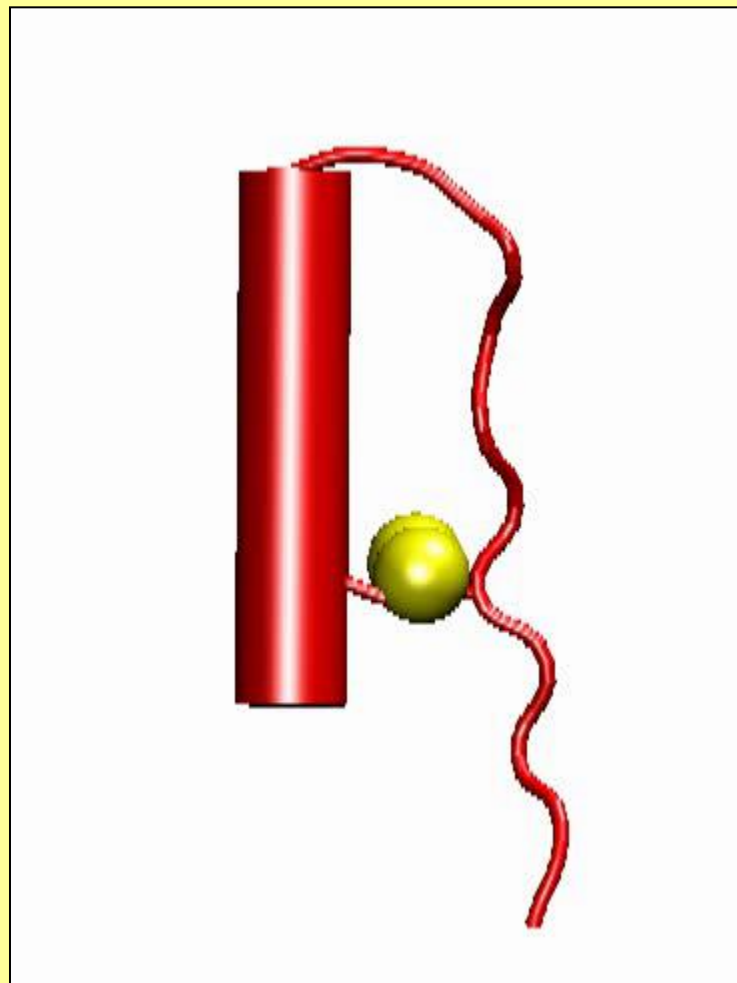




Konformációs változások

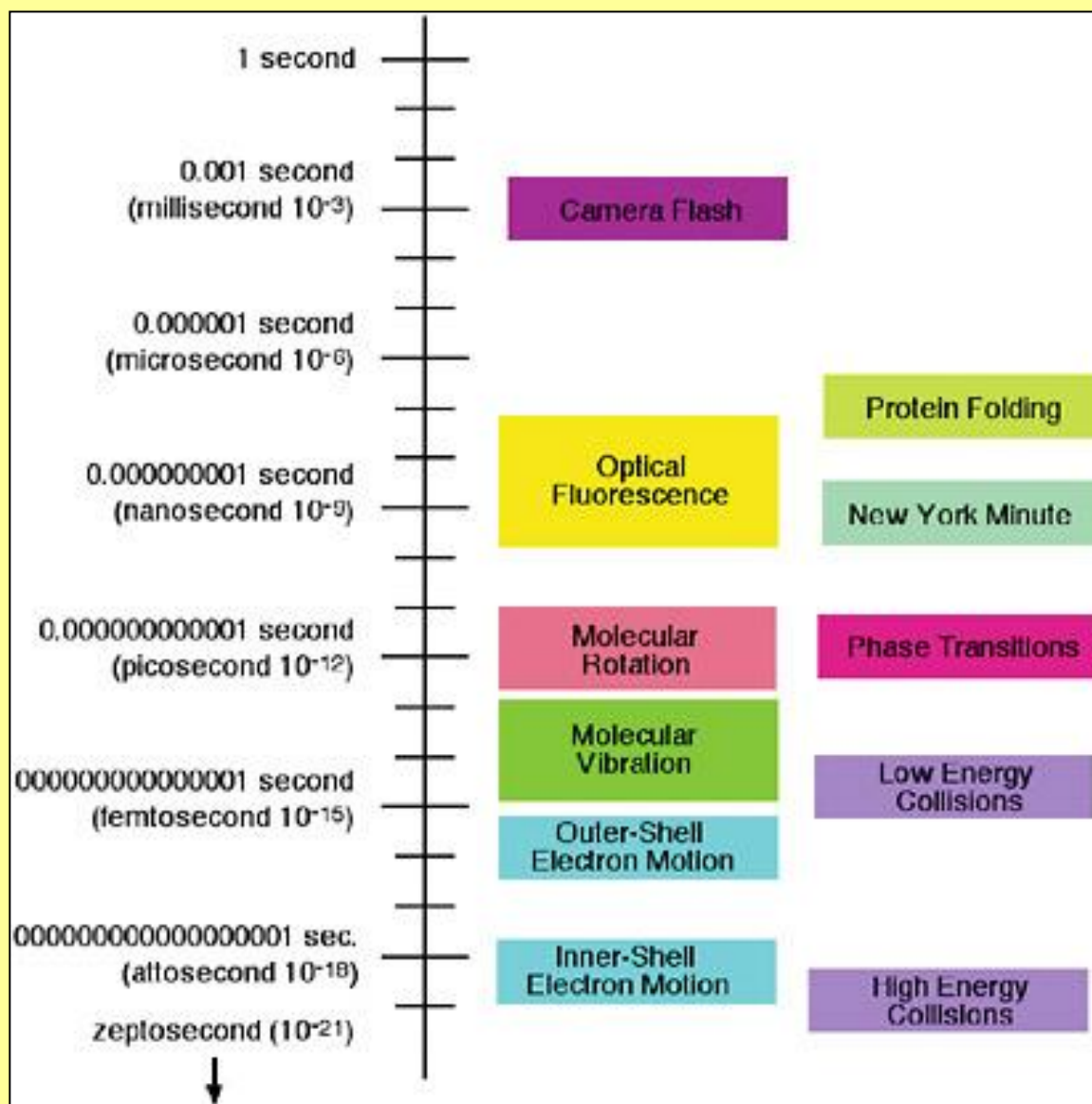
Példa

Laktoferricin:
hélix – β -redő átalakulás





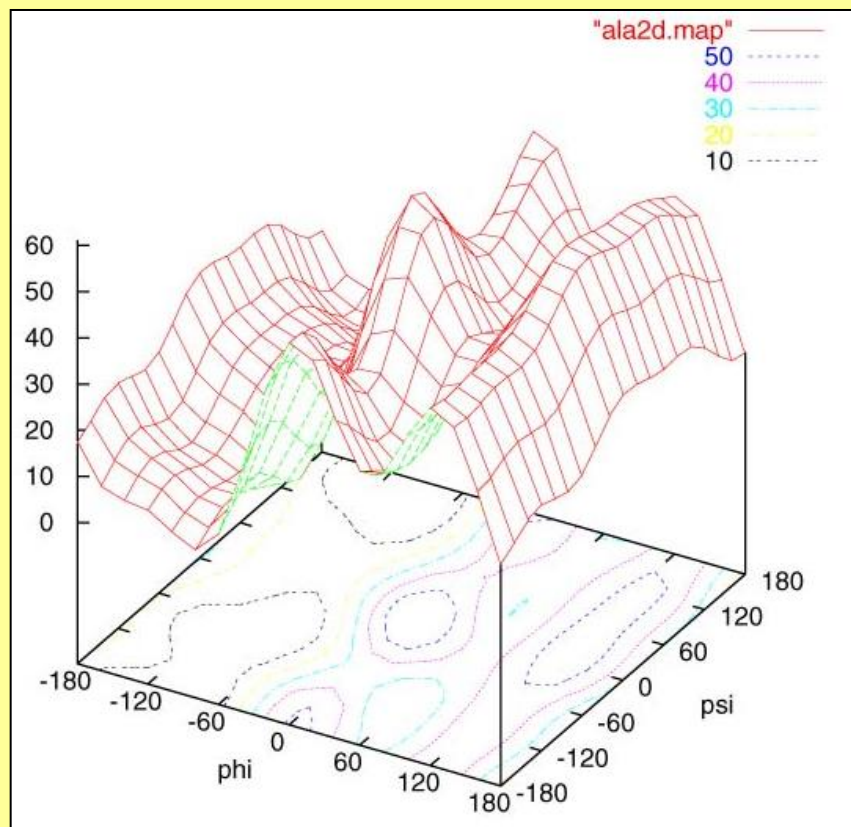
Időskála





Konfigurációs tér feltérképezése

Potenciális energia felszín (sokváltozós függvény)



Alakja

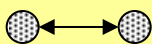
- minimumok
- maximumok
- nyeregpontok



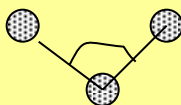
Hogyan írjuk le a rendszert?

Erőtér:

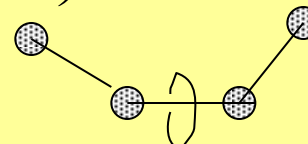
$$\begin{aligned}
 E(r^N) = & \sum_{\text{bonds}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \\
 & + \sum_{\text{torsions}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \\
 & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned}$$



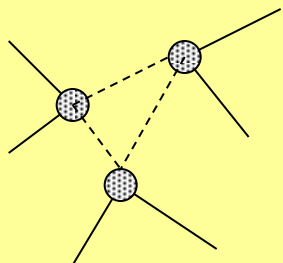
kötés-nyújtás



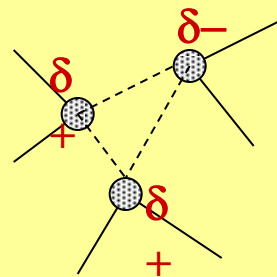
kötésszög-hajlítás



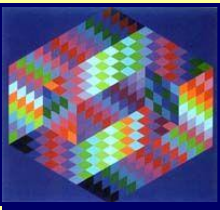
torzió változtatás




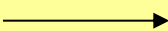
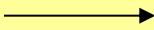
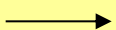
van der Waals tag



elektrosztatikus tag



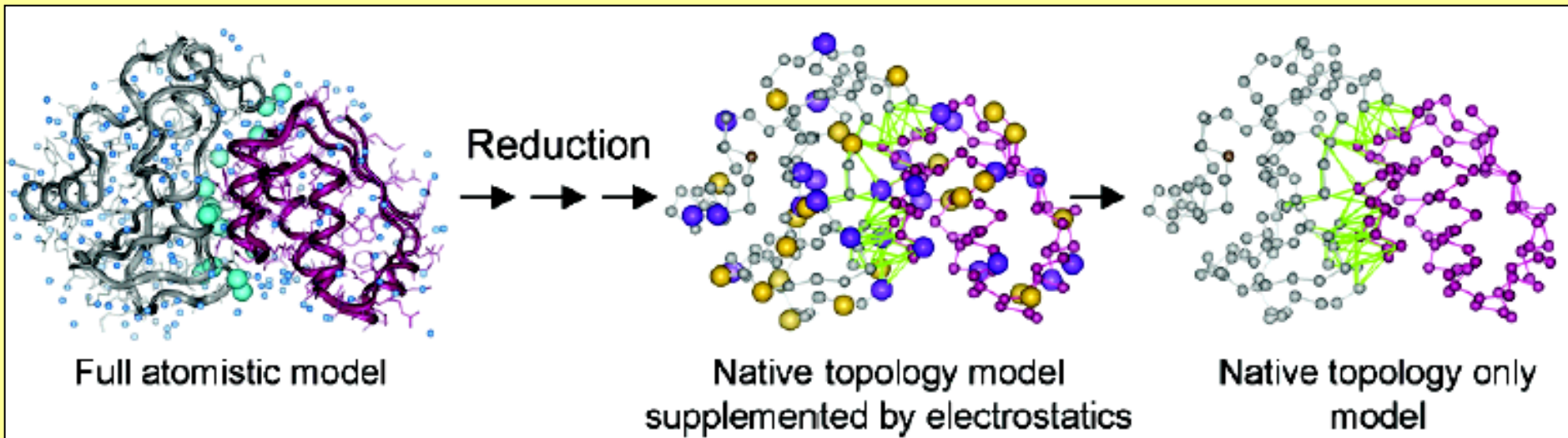
Korlátok

- Számítógépkapacitás  Egyszerűsítések
 - sokatomos rendszerek  durva leírásmód
 - oldószer modellezése  implicit oldószer / vákuum
 - biológiai jelenség időskálája  gyorsítsuk fel!

ms-ns



Hogyan írjuk le a rendszert?



- csak a natív szerkezetet stabilizáló kölcsönhatásokkal foglalkozunk (NMR, X-ray)
- residue = bogyó + elektrosztatikus potenciál (ponttöltés)
- oldószer (dielektromos állandó)
- hosszabb időskála (ms-s)



Durva felbontású modellek

~ Coarse-grained modellek

DNS

Egy nukleotid = 3 bogyó

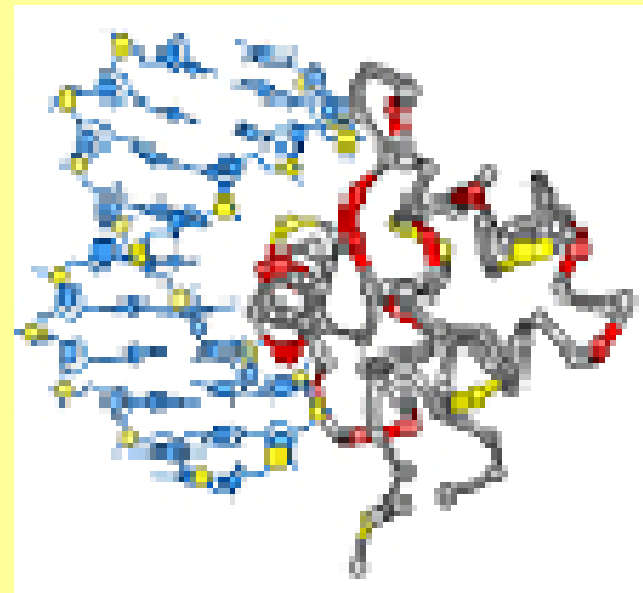
1. bázis = semleges bogyó
2. cukor = semleges bogyó
3. foszfát = negatívan töltött bogyó

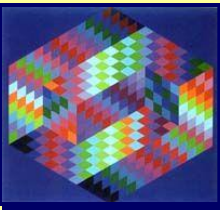
Fehérje

Egy aminosav = egy bogyó (semleges/pozitív/negatív) a $C\alpha$ -n

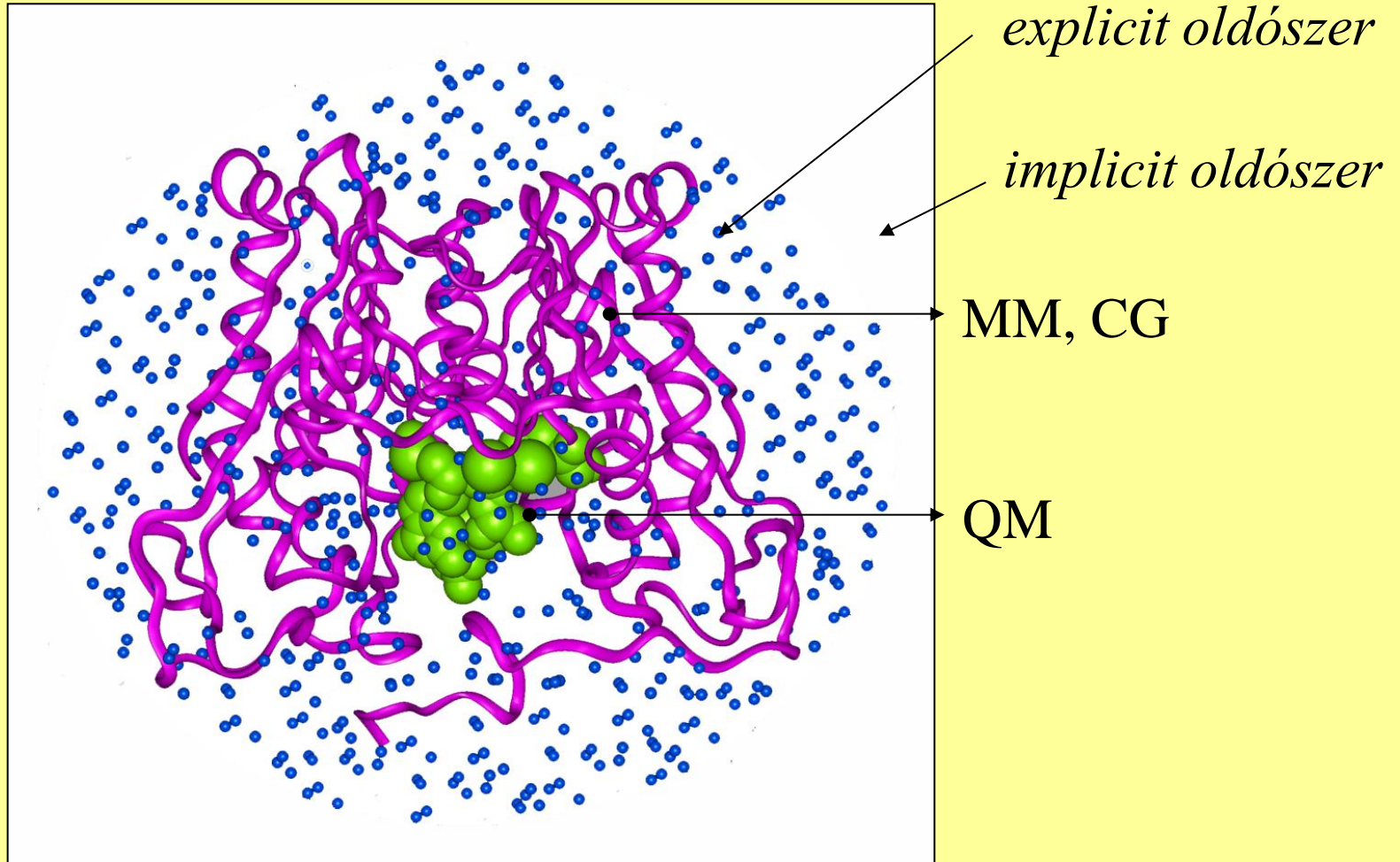
Hogyan írjuk le a polimer láncot?

virtuális kötéshosszakkal és kötésszögekkel



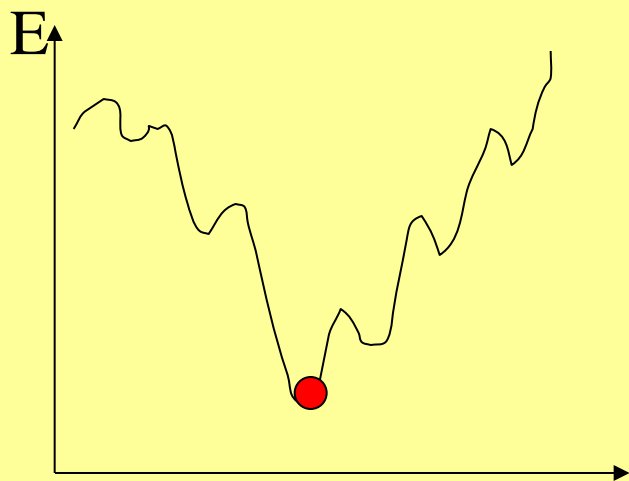


Multiscale

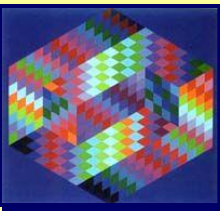




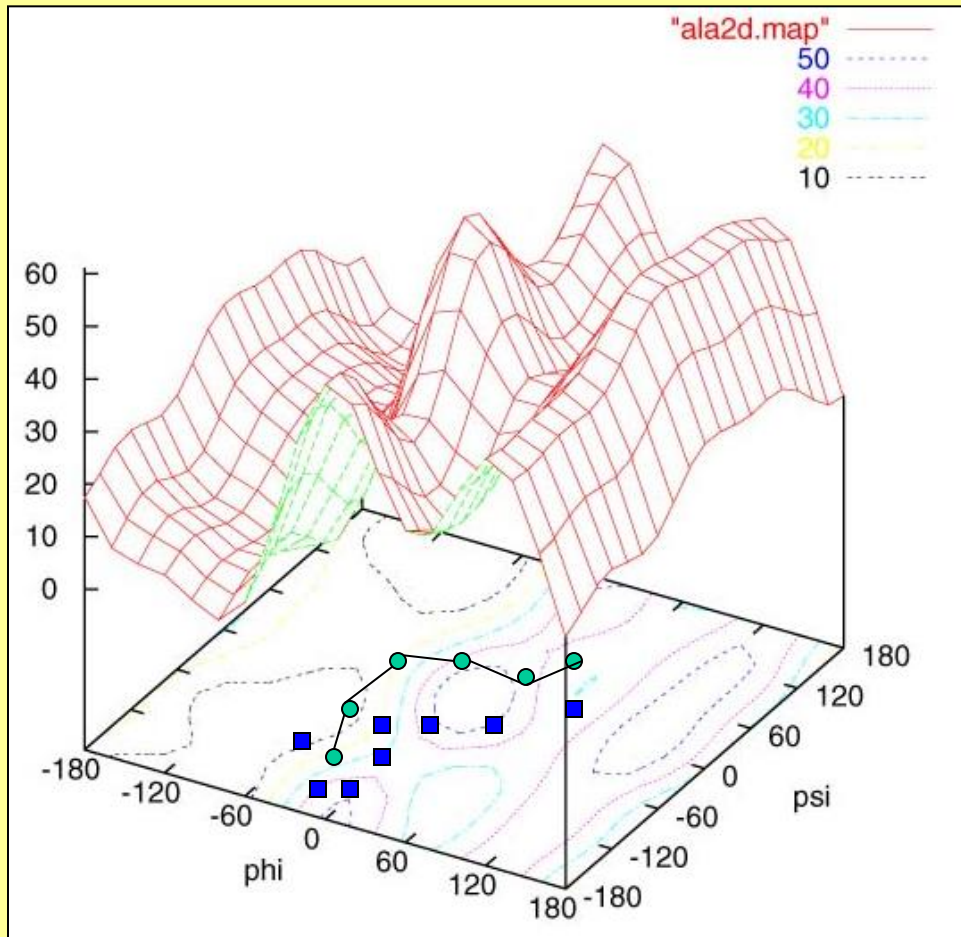
Mi a minimum?



- globális minimum?
- funkció \Leftrightarrow szerkezet
- szerkezet nélküli fehérjék
- flexibilitáshoz kötött funkció



Konfigurációs tér feltérképezése



- Determinisztikusan (MD) időátlag

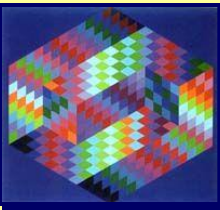
$$A_{ave} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(p^N(t), r^N(t)) dt$$

- Sztohasztikusan (MD) sokaságátlag

$$\langle A \rangle = \iint dp^N dr^N A(p^N, r^N) \rho(p^N, r^N)$$

p= impulzus, r= hely, ρ =állapotsűrűség

Ergodicitás elve: időátlag = sokaságátlag

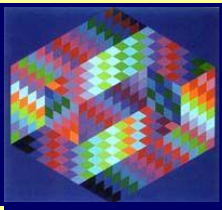


A szimuláció menete

- kiindulási konfiguráció (energiaminimalizált szerkezet)
- T választása, kezdősebességek megadása

$$p(v_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{1/2} \exp \left[-\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T} \right]$$

- következő pozíció számítása (integráló algoritmus, lépéshossz)
- erők számítása
- új sebességek számítása



A szimuláció menete

Integráló algoritmusok

Verlet

Taylor sor:

következő lépés: $r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t) + 1/2 \delta t^2 a(t) + \dots$

előző lépés: $r(t - \delta t) = r(t) - \delta t v(t) + 1/2 \delta t^2 a(t) - \dots$

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + \delta t^2 a(t)$$

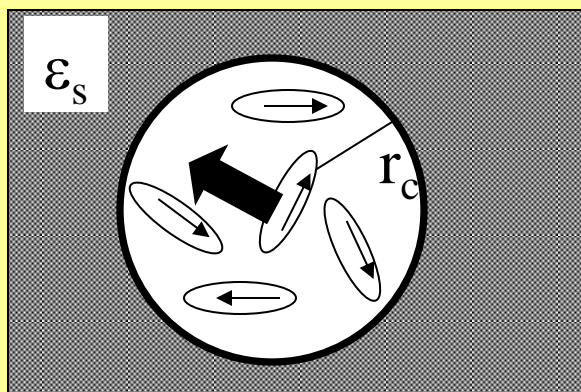
$$v(t) = [r(t + \delta t) - r(t - \delta t)] / 2\delta t$$



Molekuladinamika típusok

Probléma: szimuláció tömbfázisban,
hosszútávú kölcsönhatások kezelésére

Reakciótér korrekció



r_c : cutoff

ϵ_s : tömbfázis dielektromos állandója

$$\mu_i^{\text{eff}} = \frac{2(\epsilon_s - 1)}{(\epsilon_s + 1)} \left(\frac{1}{r_c^3} \right) \sum_{j; r_{ij} \leq r_c} \mu_j$$

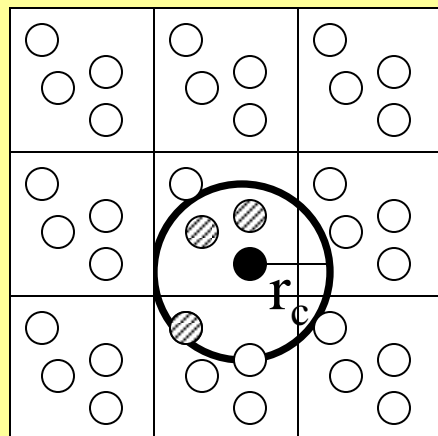
kölcsönhatás a reakciótérrel;

határ-probléma: az energia nem folytonossága nem biztosított



Molekuladinamika típusok

Minimum image:



r_c : cutoff

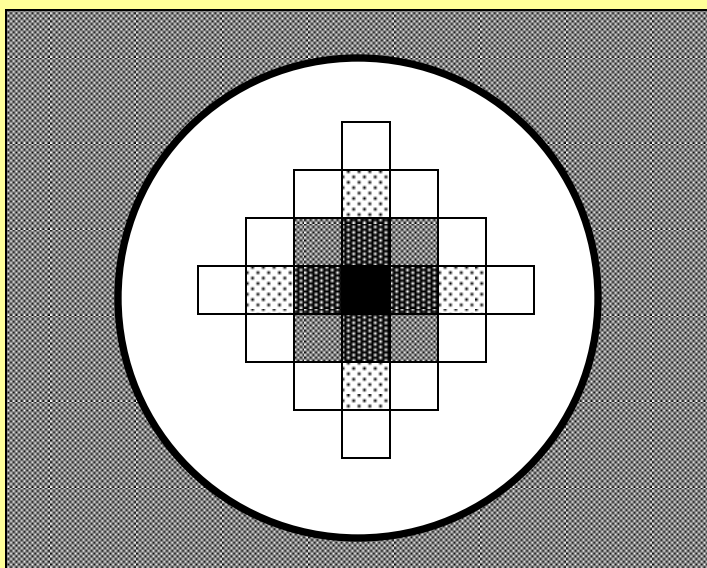
- minden atom csak a legközelebbi replikával hat kölcsön
- $r_c < a/2, b/2, c/2$
- $r_c \sim 10\text{\AA}$



Periodikus határfeltételek

Ewald módszer: „kristály-szerű szimuláció”

$\epsilon_r=0$ vagy $\epsilon_r=\infty$



$$E = \frac{1}{2} \sum_{|n|=0}^{\infty} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|}$$

minden "képpel"

probléma: lassú konvergencia
az összegzést reciprok térben végzik

PME: Particle Mesh Ewald
B-spline interpolációval



A rendszer előállítása

Sokaság választását a problémához kell igazítani

- mikrokanonikus: N, V, E
nem periódikus rendszeren
- kanonikus: N, V, T
 T függő tulajdonságok vizsgálata (folding)
- izoterm-izobár: N, P, T
térfogat nem ismert (hidratált komplexek)
- nagykanonikus (μ, V, T)
részecskeszám nem ismert (kristályvizek)



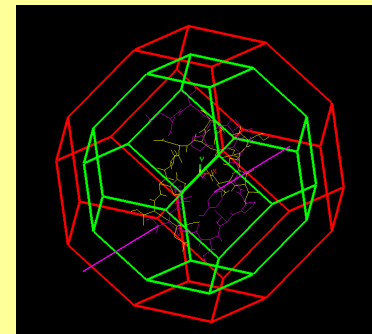
A rendszer előállítása

Kezdő konfiguráció előállítása:

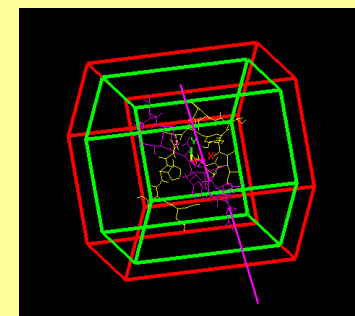
- solvatálás
 - első solvatációs szféra
 - 2-3 solvatációs szféra
 - cella (pl. MC vizekkel)
- ionok hozzáadása
- határfeltételek definiálása (PBC)
- sokaság kiválasztása (NVT, NPT, μ VT)
- kényszerfeltételek megválasztása
 - merev részek
 - kiindulási helyzetükhöz kötött részek

$$E(x) = k(x - x_0)^2$$

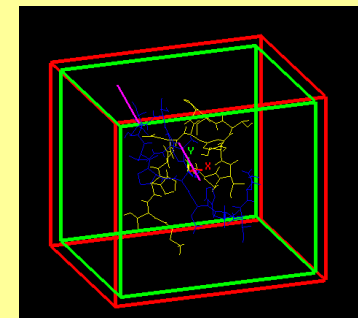
adott geometria (pl. hidrogének)



csonkolt oktaéderes



hatszögös



ortogonális

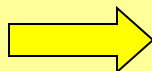


Molekuladinamika típusok

Hőmérséklet

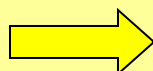
Cél

állandó



konformációs mintavételezés

hőkezelés
(simulated annealing)



globális minimum keresés





A szimuláció menete

I. Relaxáció (minimalizálás)

1. legmeredekebb leereszkedés (steepest descent)
2. konjugált gradiens
 $< 0,1 \text{ kcal/mol \AA}^2$

II. Fűtés

$0 \rightarrow 300 \text{ K}$

$15 \text{ ps}, dt = 1 \text{ fs}$

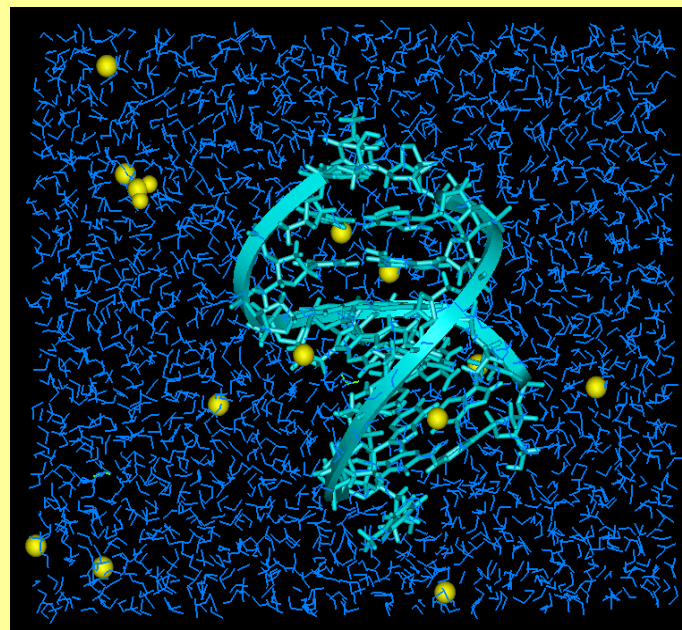
III. Equilibráció

1. NVT, $500 \text{ ps}, dt=1 \text{ fs}$
2. NPT, $500 \text{ ps}, dt=1 \text{ fs}$
3. NPT, $5000 \text{ ps}, dt=1 \text{ fs}$

IV. Adatgyűjtés

NPT, $20 \text{ ns}, dt=2 \text{ fs}$

20000 konfiguráció





A szimuláció eredménye

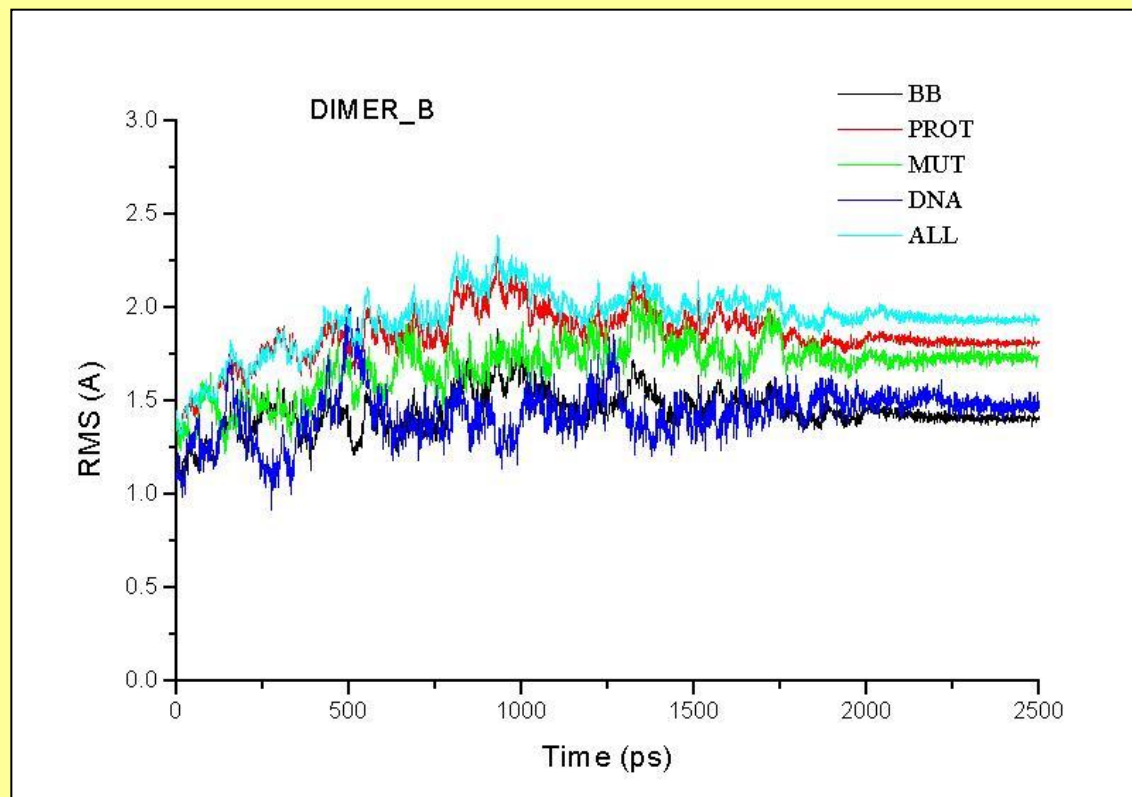
Trajektória

- atomi koordináták
- sebességek

Output

- energia
- hőmérséklet
- nyomás
- részecskeszám

Egyensúly?



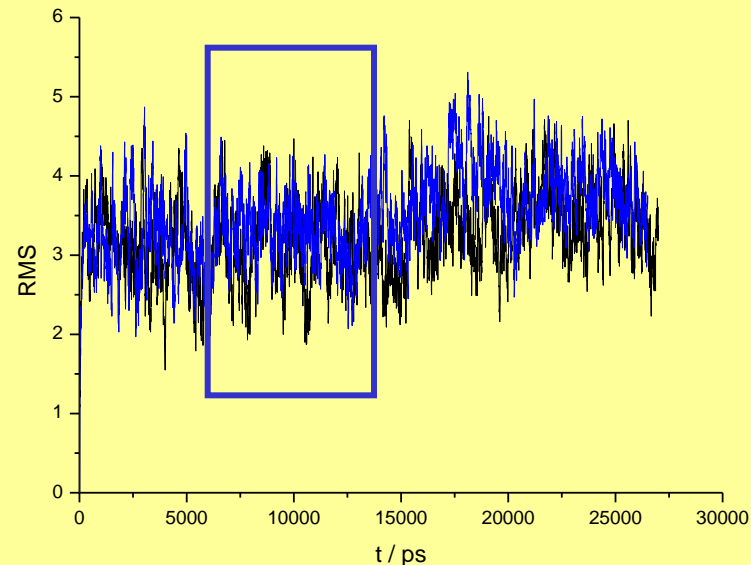


Egyensúly

Teljes szimuláció:

eltérés a kezdeti szerkezettől

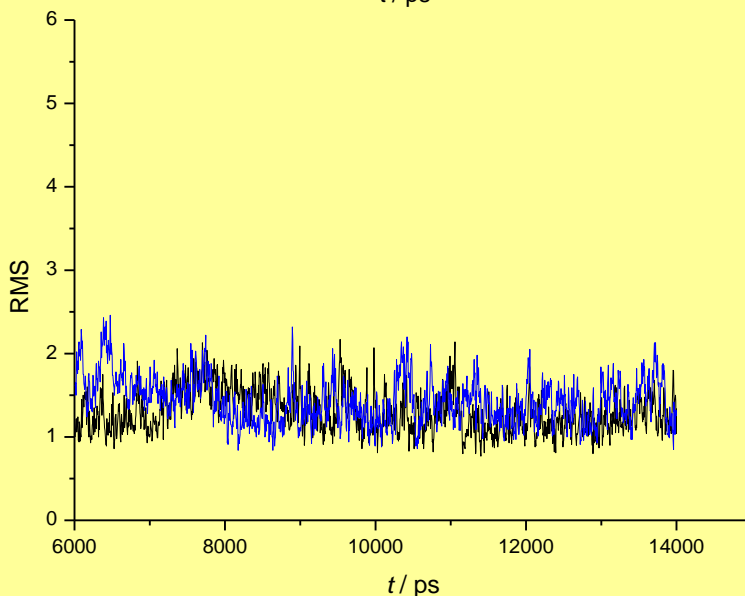
$$RMS = \sqrt{\frac{\sum (x_i(t) - x_i(0))^2}{N}}$$



Egyensúly:

eltérés az átlagszerkezettől

$$RMS = \frac{1}{N} \sqrt{\sum_N \frac{\langle \Delta x^2 \rangle - \langle \Delta x \rangle^2}{\langle \Delta x^2 \rangle}}$$





Trajektória analízise

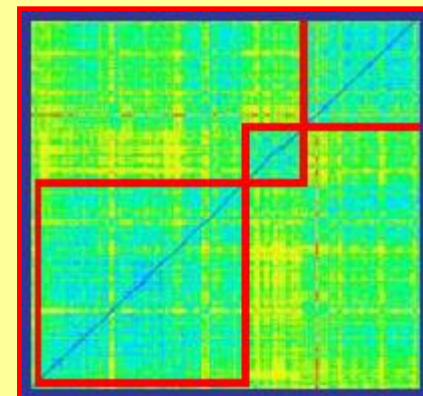
- szerkezeti tulajdonságok
- időfüggő tulajdonságok
- termodinamikusan átlagok

$$\langle A \rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M A(p^N, r^N)$$

- konformációs családok
- alacsony energiájú konformerek
- adott konformációs átalakulás részletei

$$\tau_{conf} < \sum_{i=1}^M \delta t$$

2D RMS





A szimuláció eredménye

Transzport tulajdonságok (diffúzió, viszkozitás, hővezetés)

Diffúziós koefficiens
Einstein egyenlet:

$$3D = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\langle |r(t) - r(0)|^2 \rangle}{2t}$$

Autokorrelációs függvényből

$$|r(t) - r(0)| = \int_0^t v(t') dt'$$

Green-Kubo formula

$$3D = \int_0^{\infty} \langle v(\tau)v(0) \rangle d\tau$$

sebesség-autokorrelációs függvény lecsengő részének fitteléséből



Trajektória analízise

- szerkezeti tulajdonságok

hidrogén-kötések hossza

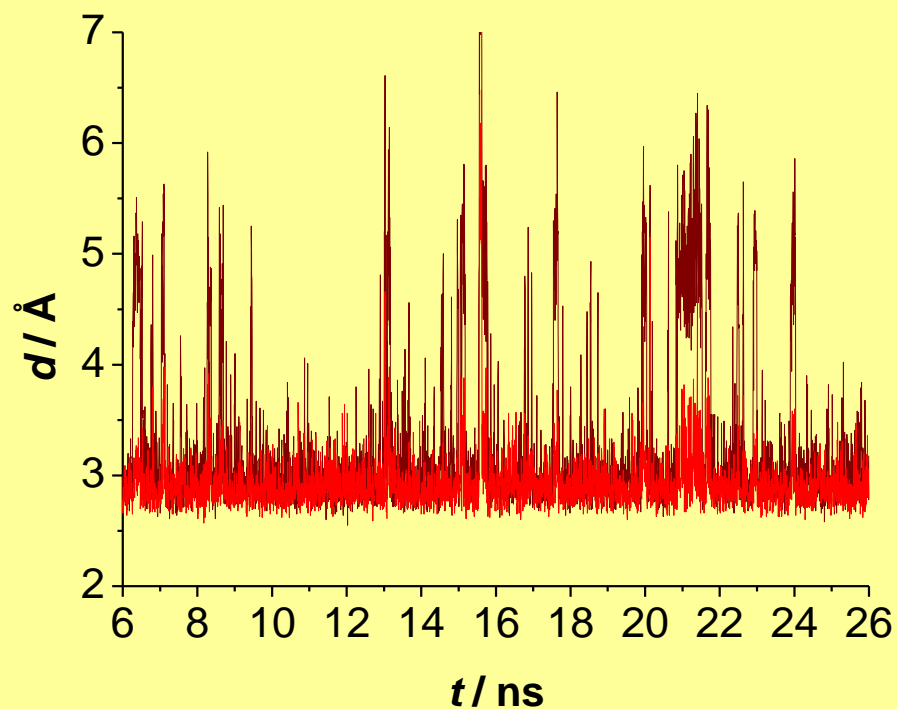
szerkezeti torzulások

szerkezeti elemek megléte

kontaktusok

molekulák távolsága

...



hidrogén-kötések hossza



A szimuláció eredménye

Termodinamikai átlagok

$$\langle A \rangle_{\beta} = \frac{\int dU \Omega(U) e^{-\beta U} A(U)}{\int dU \Omega(U) e^{-\beta U}}$$

A: szabadenergia

U: potenciális energia

$\beta = 1 / kT$

Ω : állapotsűrűség



Normál mód analízis

Normál mód analízis

rezgési sajátvektorok és sajátfrekvenciák meghatározása

$$E(x) = E(x_k) + (x - x_k)E'(x_k) + (x - x_k)^2 E''(x_k) / 2 + \dots$$

- Hessian mátrix meghatározása $E''(x_k)$
- Erőállandó mátrix $F = M^{-1/2} E'' M^{-1/2}$
- $|F - \lambda I| = 0$ λ sajátérték
- $\nu_i = \frac{\sqrt{\lambda_i}}{2\pi}$ ν sajátfrekvencia

harmonikus közelítés!

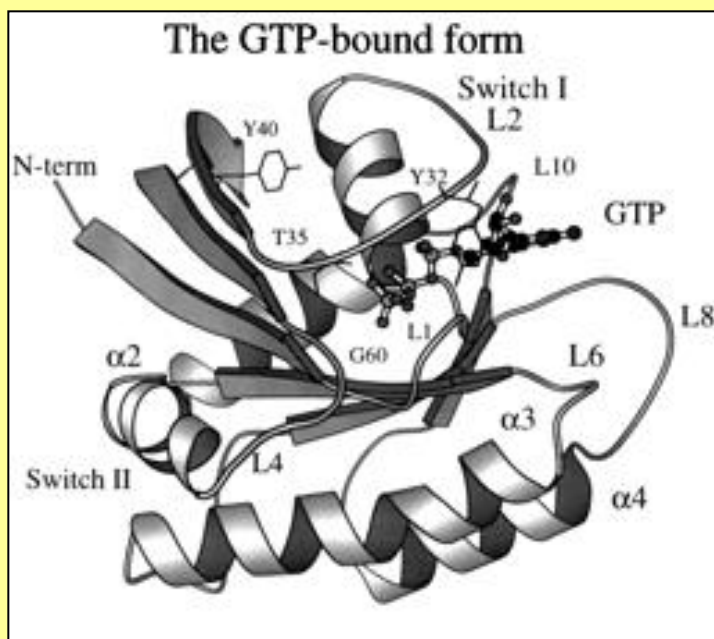
minimumtól távolabb kváziharmonikus analízis (QHA) MD alapján



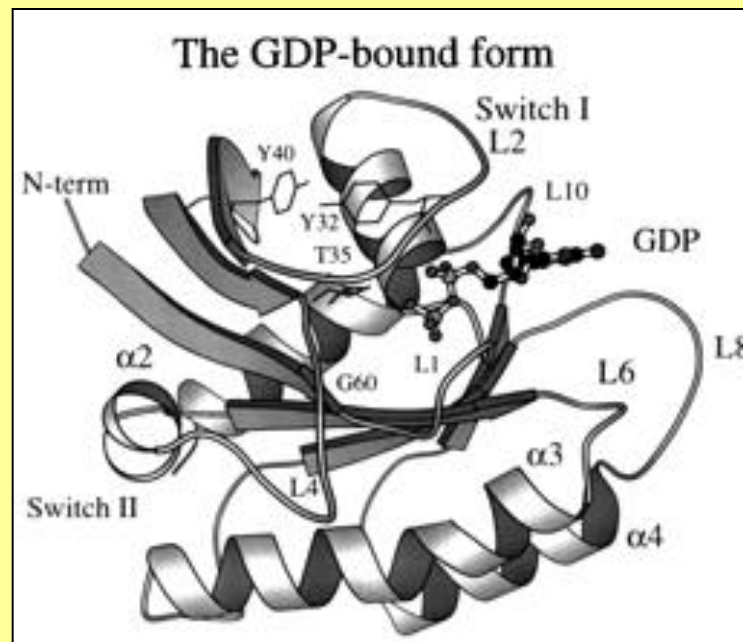
Ras p21

Alacsony frekvenciájú 20-200 cm^{-1} mozgások az érdekesek
(domain movement)

Ras p21



E+GTP



E+GDP

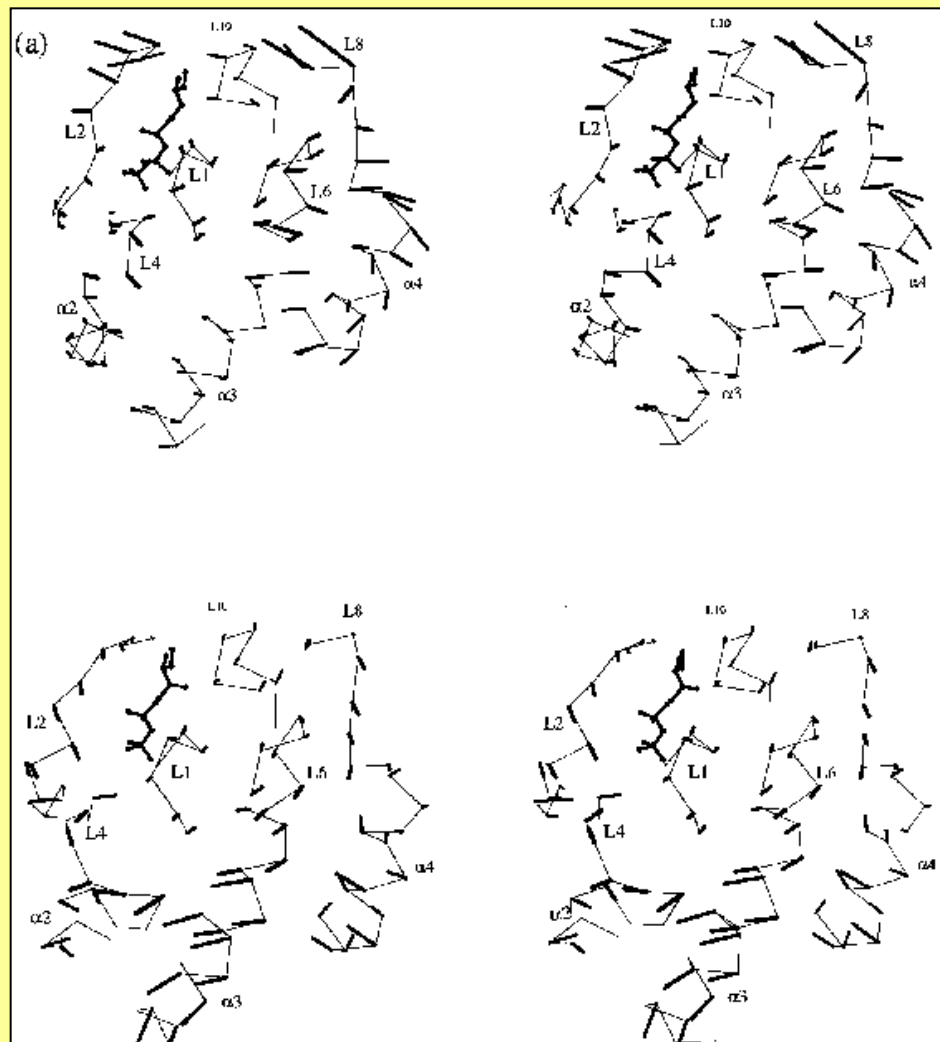


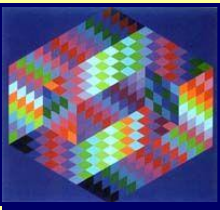
Normál mód analízis

Ras p21

E+GTP

E+GDP





Ras p21

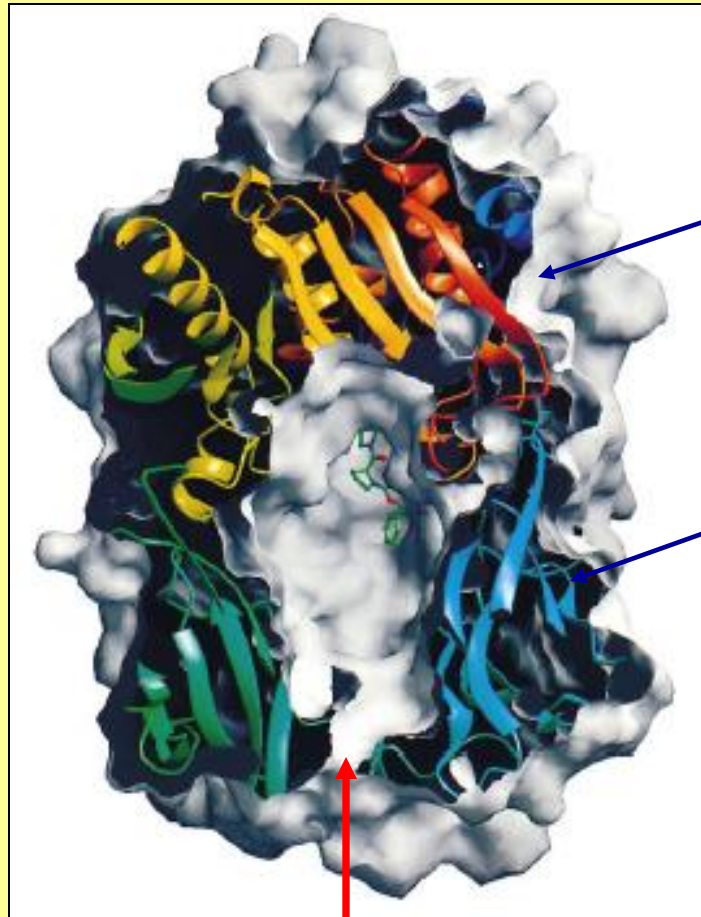
Módszer

Következtetés

- Energiaminimalizálás —————> „Switch” régiók szerepe
- Normál mód analízis —————> GTP forma: szoros nukleotid kötés
GDP forma: aktív hely nyílás-zárás
- GTP* forma NMA —————> minimumtól való eltérés
- G12D mutáns —————> merevebb, „on-state” marad



Prolil-oligopeptidáz szerkezete



peptidáz (α/β) domén:
Ser-554, His-680, Asp-641

β -propeller domén:
7 lapát

Hol a bejárat?

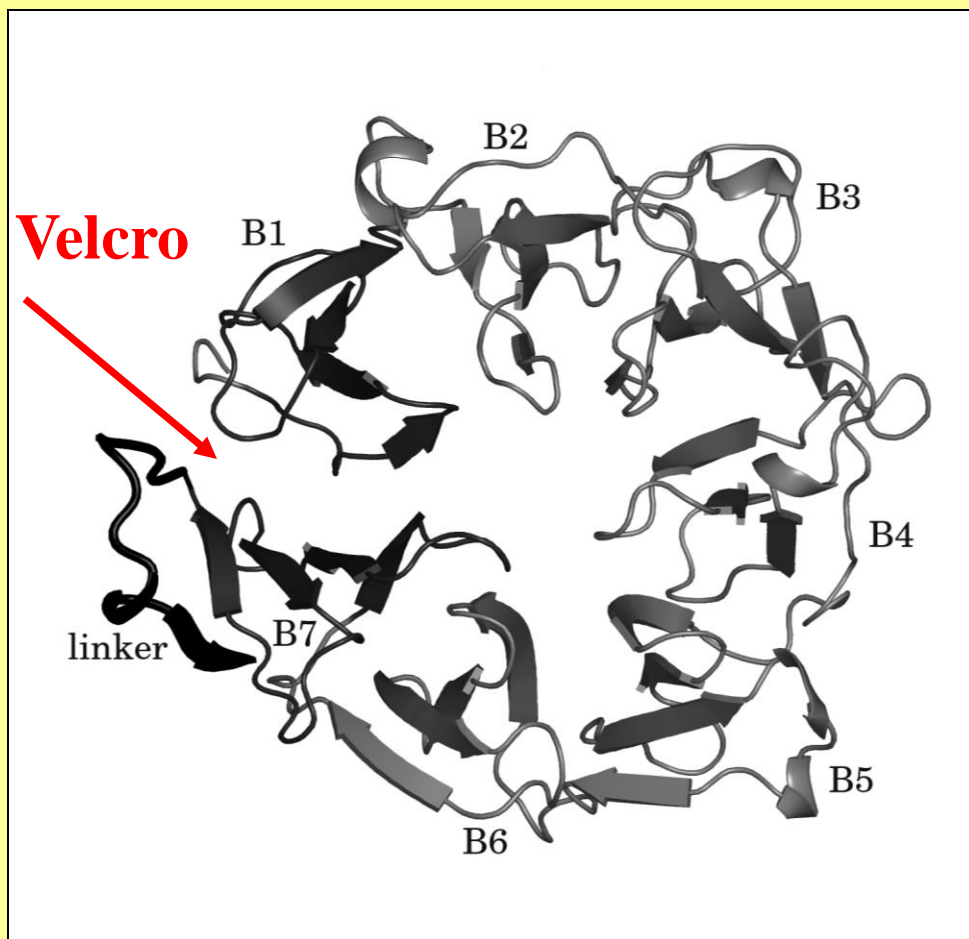
4Å

Fülöp, V., Böcskei, Zs. and Polgár, L. (1998) *Cell* 98, 161-170.

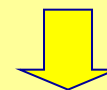


β -propeller

no Velcro



nincs kovalens linker
B1 és B7 között



B1 - B7 lapát szétnyílhat?



G-protein



Problémafelvetés

Kérdés::

Milyen lehetséges útvonalon közelítheti meg a szubsztrát az aktív helyet?

A statikus szerkezet ismerete nem ad választ.

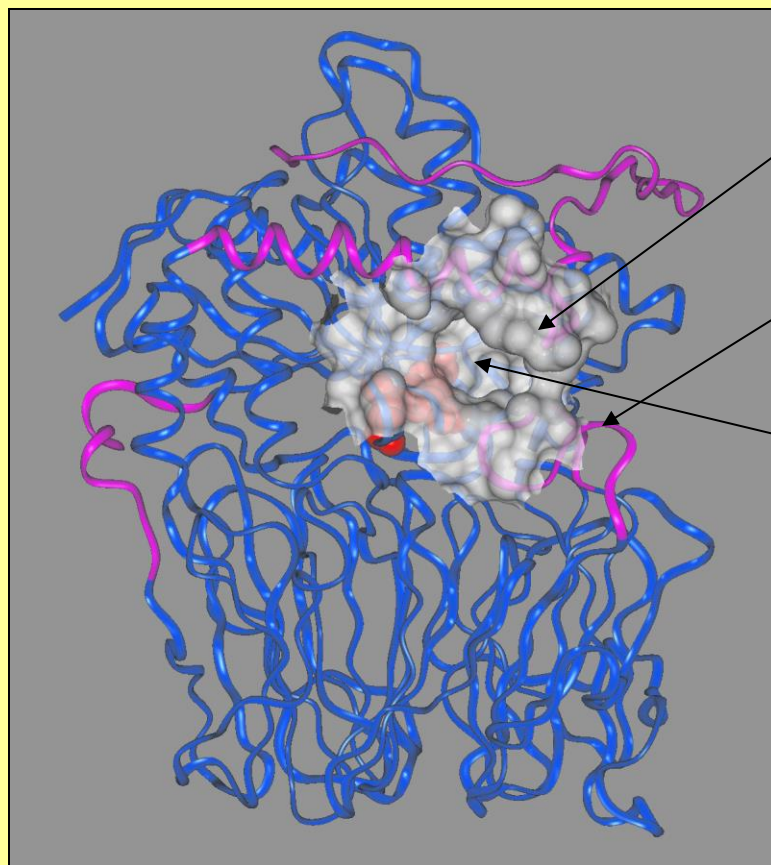
Vizsgáljuk meg a fehérje dinamikus tulajdonságait!



Essential dynamics

A sajátvektorok lineárkombinációja a korrelált aminosavak mozgásával

Üreg képződik!



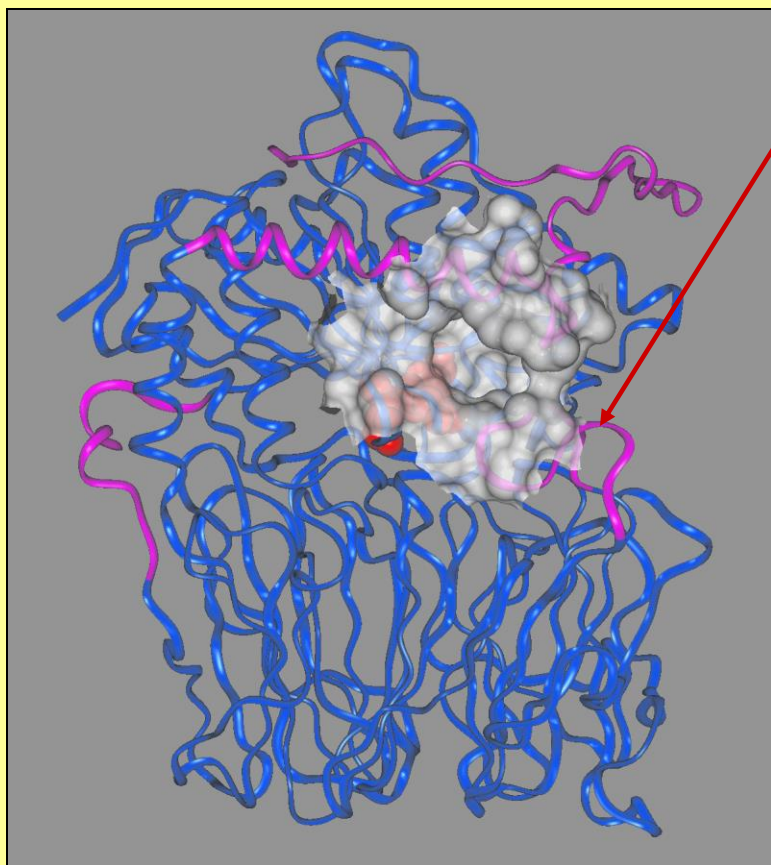
- 31-35, 39-43
flexibilis, anti-korreláció az aktív
hellyel
- 196-202
flexibilis, anti-korreláció az N-
szegmensen
- 637-650
felxibilis, anti-korreláció az N-
szegmensen

térfogatnövekedés az MD
szimuláció során
 $241 \text{ \AA}^3 \rightarrow 670 \text{ \AA}^3$



Kísérleti bizonyíték

Üreg– VALÓSÁG???



Hidrofil loop (192-205)

nick: Lys-196-Ser-197

	wt	nick
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	1.75	10.1 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
ΔG^{\ddagger}	35.2	32.0 kJ/mol
ΔS^{\ddagger}	88.4	114.2 kJ/molxK

megnövekedett flexibilitás

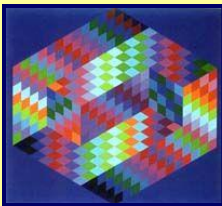


megnövekedett katalitikus hatás

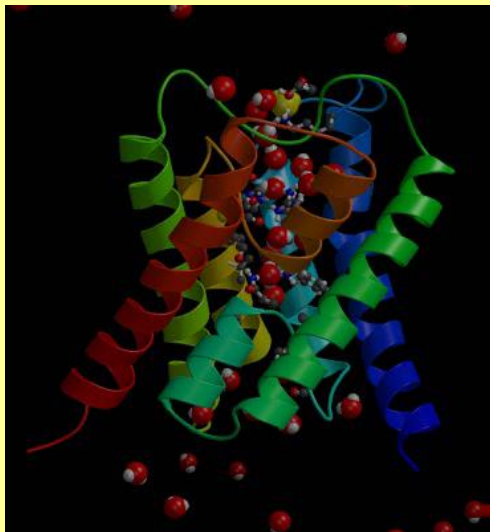


Lehetséges szubsztrát útvonal

- a β -propeller merev, nem nyílik ki
- az 1-es és 7-es lapát nem tud kinyílni
- a 2 domén közötti útvonal valószínűbb
- valószínűleg kinyílik a két domén
- a hidrofil loop (192-205) szerepét kísérletesen is igazolták



Feladat 1.



Aquaporin

Kérdések:

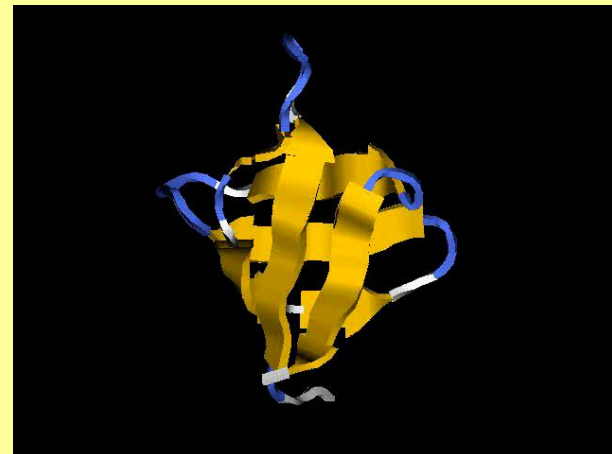
- Milyen sokaságon szimuláljuk a rendszert?
- Milyen cellába helyezzük?
- All-atom leírás alkalmazható-e?
- Szükséges az oldószerhatás figyelembe vétele?
- Használhatunk-e explicit oldószer modellt?
- Vajon milyen hosszú szimuláció szükséges?
- Milyen paramétereket elemezzünk a szimuláció után?



Feladat 2.

Kérdések:

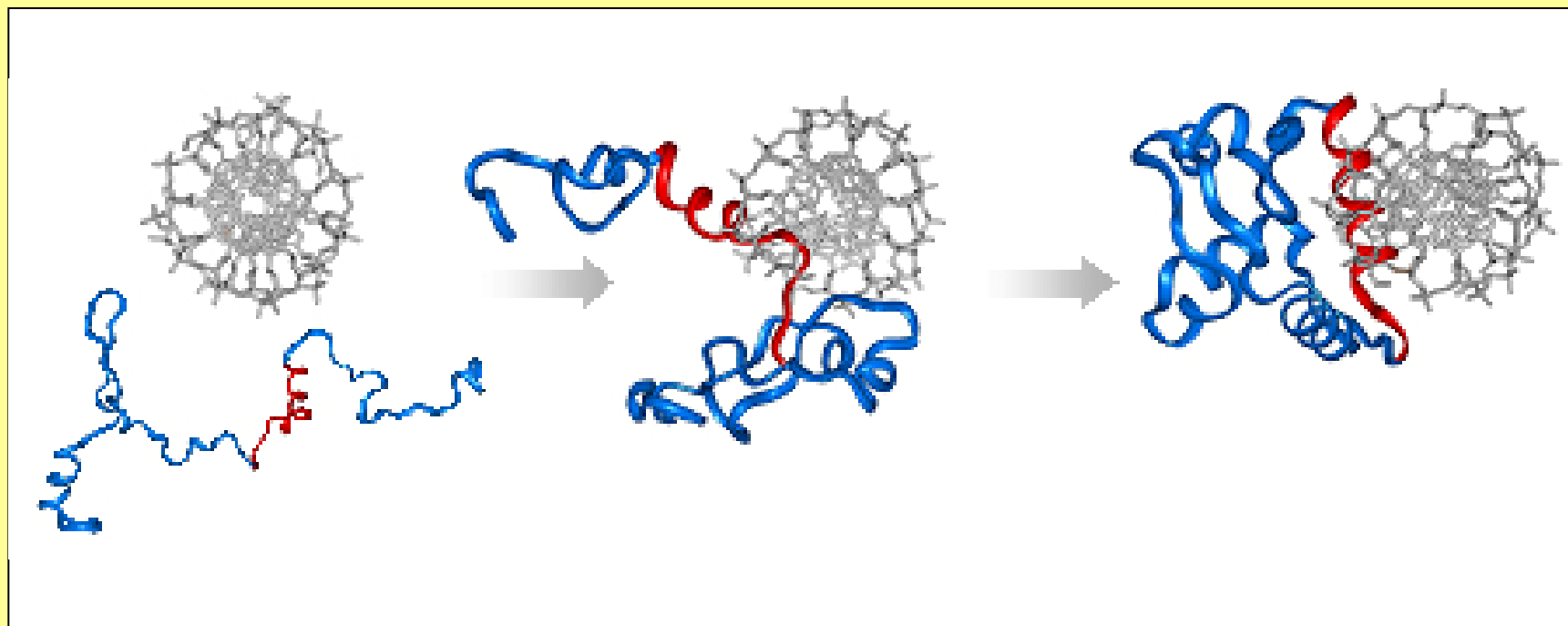
- Milyen sokaságon szimuláljuk a rendszert?
- Milyen hőmérsékleten szimuláljunk?
- Milyen cellába helyezzük?
- All-atom leírás alkalmazható-e?
- Szükséges az oldószerhatás figyelembe vétele?
- Szükséges-e periodikus határfeltételek alkalmazása?
- Milyen időskálán zajlik le az átalakulás?
- Milyen paramétereket elemezzünk a szimuláció után?



HIV integráz



Feladat 3.



letekeredett,
rendezetlen
állapot

részlegesen és nem-
specifikusan kötött
állapot

specifikus
komplex

SAP-1

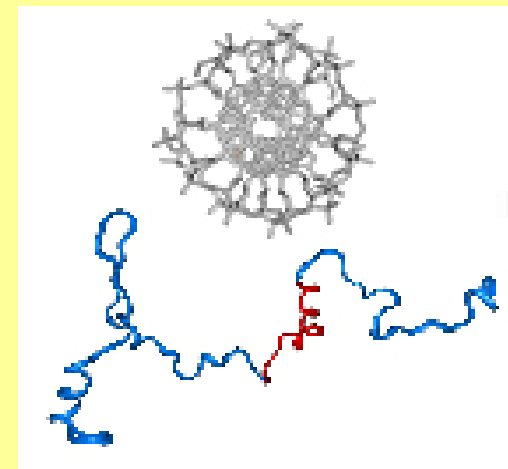
Levy, Y., JACS (2007) 129(4), 738-739



Feladat 3.

Kérdések:

- Hogyan írjuk le a DNS-t?
- Hogyan írjuk le a fehérjét?
- Milyen hőmérsékleten szimuláljunk?
- Szükséges az oldószerhatás figyelembe vétele?
- Milyen időskálán megy végbe a kötődés?
- Milyen kényszerfeltételt használhatunk?
- Mikor kezelhetjük a DNS-t merev molekulaként?
- Milyen paramétereket elemezzünk a szimuláció után?



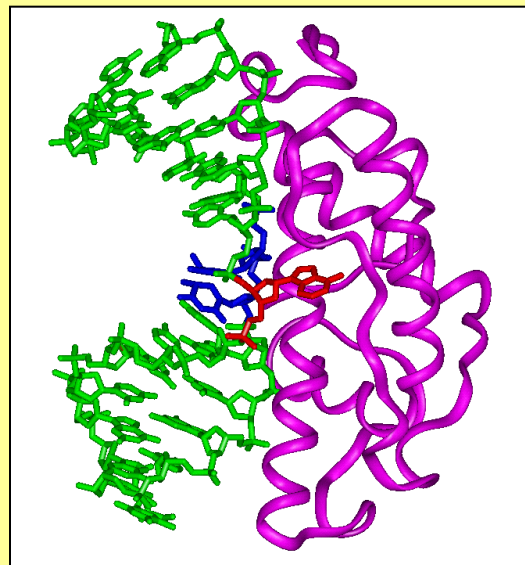
SAP 1 - DNS



Feladat 4.

Kérdések:

- Hogyan írjuk le a DNS-t?
- Hogyan írjuk le a fehérjét?
- Milyen hőmérsékleten szimuláljunk?
- Szükséges az oldószerhatás figyelembe vétele?
- Milyen kényszerfeltételt használhatunk?
- Milyen paramétereket elemezzünk a szimuláció után?



T4 Endonukleáz V

Köszönöm a figyelmet!

