

# Fyzika biopolymerů

## Solvatace

Robert Vácha

Kamenice 5, A4 2.13  
[robert.vacha@mail.muni.cz](mailto:robert.vacha@mail.muni.cz)



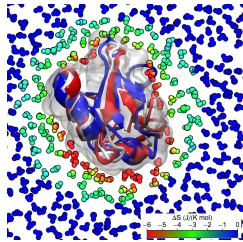
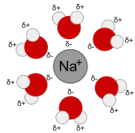
## Solvatace

IUPAC definition: solvation is an interaction of a solute with the solvent, which leads to stabilization of the solute species in the solution. In the solvated state, a solute in a solution is surrounded or complexed by solvent molecules. Solvated species can often be described by coordination number, and the complex stability constants.

první solvatační vrstva - je v kontaktu s rozpuštěnou látkou a je nejvíce ovlivněna

druhá solvatační vrstva - je v kontaktu s první solvatační vrstvou a je ovlivněna přítomností rozpuštěné látky méně

nejčastějším solventem je voda => solvatace = hydratace

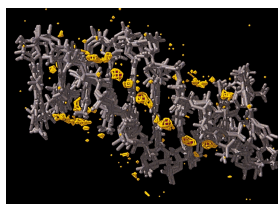


2

## Solvatace

- solvent je nezbytný pro funkci biologických systémů, které ovlivňuje:
  - přímo = aktivní účast v biologických procesech např. enzymatická reakce
  - nepřímo = stabilizace biologicky aktivních konformací biomolekul
- interakce rozpuštěná látka-voda silně ovlivňuje konformace biopolymerů
- hydrofobní efekt u protein foldingu
- solvent hraje klíčovou roli při tvorbě komplexů, rozpoznávání ligandů, interakci mezi DNA a proteiny
- stíní elektrostatické interakce

Hydratační páteř na DNA



3

## Parametry solvatace

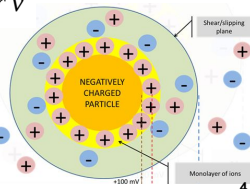
- solvatační číslo
  - počet molekul rozpouštědla (vod) ovlivněných rozpuštěnou molekulou (obvykle první a druhá solvatační vrstva)
- relativní rezidenční časy
  - je-li rezidenční čas u rozpuštěné látky/ rezidenční čas v roztoku > 1 zvýšení strukturního stupně < 1 narušení struktury
- Stokesův poloměr
  - efektivní hydrodynamický poloměr pohybující se sféry se stejnou difuzní konstantou (obvykle zahrnuje i silněji interagující vody)
  - výpočet ze Stokesova zákona:

$$\vec{F} = 6 \pi \eta r \vec{v}$$

- porovnává se s poloměrem otáčení (gyration)

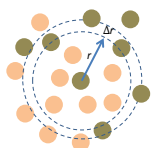
- Slip plane

- hypotetická vzdálenost do které se solvent hýbe s rozpuštěnou látkou - používá se při měření elektrostatického potenciálu a odhadu náboje



4

## Radiální distribuční funkce RDF, g(r)

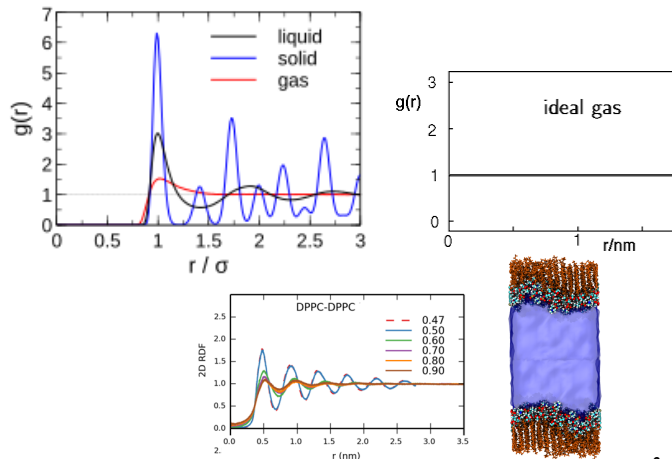


$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local} N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2}$$

- reprezentuje pravděpodobnost výskytu částice B ve vzdálenosti r od částice A
- je to párová korelační funkce
- je normalizovaná na hustotu ideálního plynu (1 v ∞)
- lze i pro stejné částice g<sub>AA</sub>(r)
- lze v 3D i 2D
- charakterizuje dané skupenství
- není dobře definovaná v nehomogenním systému
- jde porovnat s rozptylovými experimenty
- může zachytit fázové strukturní změny
- lze z ní spočítat vazebnou konstantu
- lze spočítat jako histogram
- v periodických okrajových podmínkách omezena polovinou boxu

5

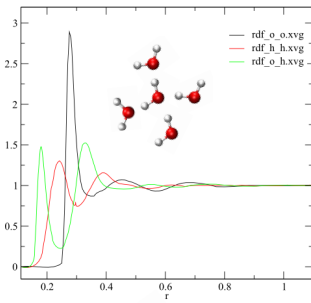
## Skupenství a RDF, g(r)



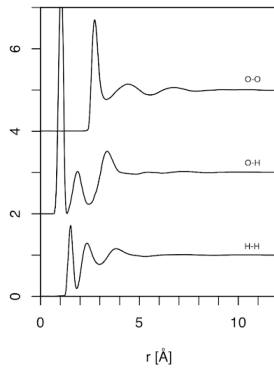
6

## Příklady RDF, g(r)

RDF water - MD



Experiment

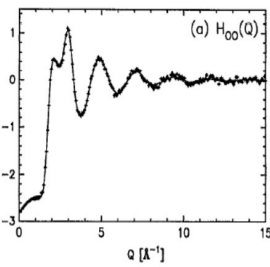
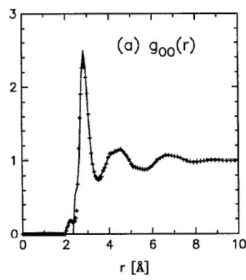


7

## Strukturní faktor a RDF, g(r)

strukturní faktor (měřitelný experimentálně, např. gama rozptylem) je Fourierova transformace radiální distribuční funkce

$$S(k) = 1 + \frac{4\pi\langle\rho\rangle}{k} \int_0^\infty r[g(r) - 1] \sin(kr) dr$$

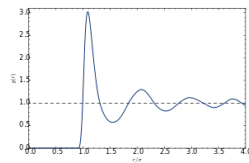


8

## Vazebná konstanta a RDF, g(r)

vazebné konstanta

$$K \equiv \left( \frac{\gamma_{RL} C_{RL} C^\circ}{\gamma_R C_R \gamma_L C_L} \right)_{eq}$$



z RDF  $g(r) = \exp(-dW(r)/kT)$ , kde  $W(r)$  je PMF... profil  $dG$

$$K_{Mayer} = C^\circ \int (e^{-\beta W} - 1) d\mathbf{r}$$

integral přes Mayerovu f-funkci  
souvisí s druhým viriálním koeficientem

$$B_2 = -2\pi \int_0^\infty (e^{-W/kT} - 1) r^2 dr$$

$$K_{Boltzmann} = C^\circ \int e^{-\beta W} d\mathbf{r} \quad (e^{-\beta W} - 1)$$

$$K_{Andersen} = C^\circ \int e^{-\beta W_R} (e^{-\beta W_A} - 1) d\mathbf{r}$$

9

## Experimentální metody

- rentgenová difrakce
  - rozptyl na elektronech (el. obal atomu) = citlivější na těžší atomy
  - elektron. hustota se průměruje přes čas a velké množství struktur
  - v krystalu přímá evidence přítomnosti vody v interakci s biomolekulou
- neutronová difrakce
  - rozptyl na jádrech = citlivá na vodíky, vhodná ke studiu vody
- SAXS, SANS
  - distribuce velikostí
- NMR
  - strukturální i dynamické informace o vodě v blízkosti biomolekuly
  - NOE: sledování solventu v přímé interakci s danou biomolekulou, omezené časové rozlišení

10

## Experimentální metody

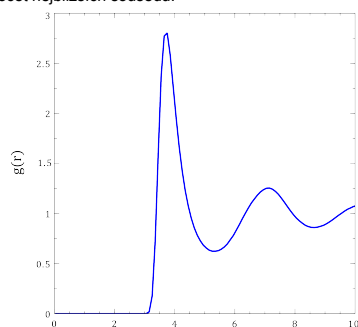
- optická spektroskopie
  - femtosekundová fluorescenční spektroskopie - pík je citlivý na dipól. moment sondy, který závisí na polarizaci solventu (množství vod a jejich reorientace) možnost vysokého časového rozlišení s prostorovým rozlišením
  - nelineární spektroskopie (VSFG, HFG) - citlivá na nehomogení prostředí = signál z rozhraní
  - infračervená spektroskopie - citlivá na tvorbu H-vazeb, umožňuje studovat specifické interakce solut-solvent, kvalitativní informace
- frekvenční závislost permitivity - síla interakce (omezení reorientace)

11

## Příklad

Na obrázku je radiální distribuční funkce kapaliny o průměrné hustotě  $\rho$ ,  $0,0213 \text{ \AA}^{-3}$

1. Jaká je fyzikální interpretace  $g(r)$ ?
2. Je více částic v první nebo ve druhé solvatační vrstvě?
3. Odhadněte poloměr u atomů/molekul kapaliny.
4. Odhadněte počet nejbližších sousedů.



12

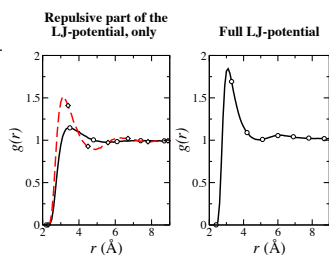
## Příklad 2

Uvažujme kapalinu, která se skládá z částic, které interagují pouze odpudivou částí Lennard-Jonesova (LJ) potenciálu,  $u(r) = A / r^{12}$ . Levá strana obrázku ukazuje,  $g(r)$ , mezi dvěma částicemi v takové kapalině.

1. Která křivka odpovídá nejvyšší hustotě částic?
2. Pro kompletní křivku na levém grafu načrtněte odpovídající potenciál střední síly,  $w(r)$ .
3. Vysvětlete, proč se částice v kapalině navzájem přitahují navzdory skutečnosti, že párový potenciál  $u(r)$  je vždy odpudivý.

4. Pravá strana obrázku ukazuje  $g(r)$  při teplotě  $T_0$ , kde částice interagují s plným Lennard-Jonesovým potenciálem. Načrtněte hodnotu  $g(r)$  při mírně nižší teplotě,  $T < T_0$ .

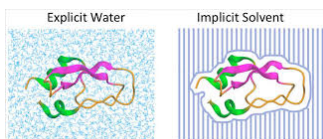
5. Načrtněte  $g(r)$ , když  $T \gg T_0$ .



13

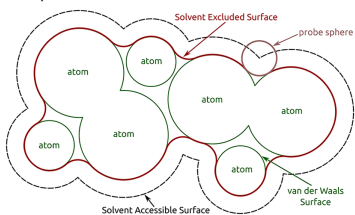
## Implicitní solvatace

- molekuly rozpouštědla jsou nahrazeny spojitým médiem o vlastnostech odpovídající rozpouštědlu



- umožňuje rychlé a jednoduché výpočty - interakce biopolymerů, jejich konformace nebo určení solvatační energie/rozpuštělosti

- SASA (solvent accessible surface area) hlavně se používá pro odhad hydrofobní interakce



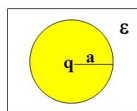
14

## Solvatační energie

Bornova solvatační energie (1920)

- volná energie na vložení náboje do dané kavity v roztoku (elektrostatická energie/práce potřebná na přenesení náboje z vakua do daného média)

$$\Delta G_{elec} = -\frac{q^2}{2a} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right)$$



Zobecněný Bornův model - zahrnující zjednodušené řešení Poisson-Boltzmanovy rovnice ( $a = \alpha =$  poloměr atomů... problematická definice)

$$G_p = -\left(\frac{\epsilon - 1}{\epsilon}\right) \sum_{i,j=1}^n \frac{q_i q_j}{2 f_{GB}}$$

$$f_{GB} = \sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_i^2 e^{-D_{ij}}} \quad \alpha_{ij} = (\alpha_i \alpha_j)^{0.5} \quad D_{ij} = \frac{r_{ij}^2}{(2\alpha_{ij})^2}$$

Kavitační energie - energie potřebná na vytvoření kavity v roztoku

implicitní model = není první solvatační vrstva ....

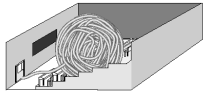
15

## Typy solventů

### Poor solvent

$$R = l N^{1/3}$$

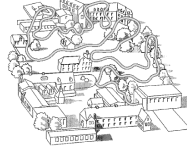
globule



### Theta solvent

$$R = l N^{1/2}$$

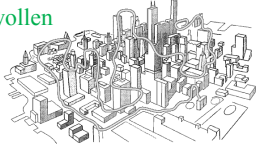
ideal-like



### Good solvent

$$R = l N^{3/5}$$

swollen



### Long-range repulsion

$$R \sim L = l N$$

extended



$l$  - Kuhnova délka

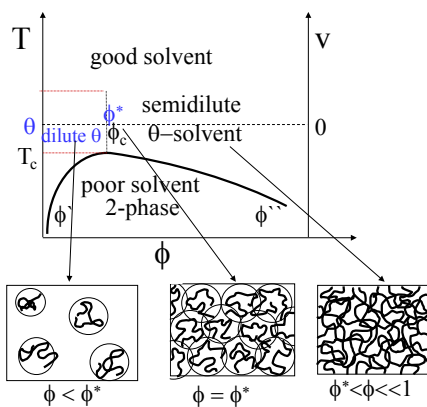
16

## Příklad

Jakou velikost má přirozeně nestructurovaný protein/polymer o délce 2000 residuí ve špatném, theta a dobrém rozpouštědle? V závislosti na sekvenci je persistentní délka až 4 Å, to je zároveň průměrná délka mezi  $C\alpha$  atomy.

17

## Solventy a fázový diagram

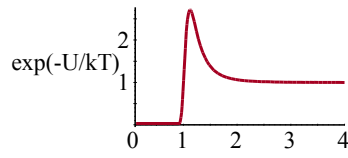
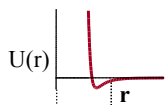


18

## Mayerova funkce

pravděpodobnost nalezení částic ve vzdálenosti  $r$   
(nenormalizovaná)

Potenciál

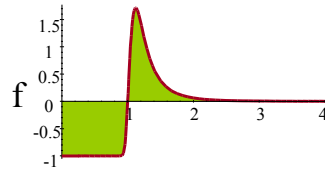


Mayerova f-funkce

$$f(r) = \exp\left[-\frac{U(r)}{kT}\right] - 1$$

aproximace vyloučeného objemu  
(excluded volume)

$$v = -\int f(\vec{r}) d^3r$$



19

## Dobry a špatny solvent

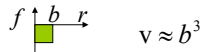
excluded volume  
 $v = -\int f(\vec{r}) d^3r$

Mayerova f-funkce

$$f(r) = \exp\left[-\frac{U(r)}{kT}\right] - 1$$

Athermal solvents

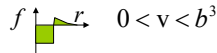
high T limit



$$v \approx b^3$$

Good solvents

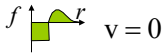
repulsion dominates



$$0 < v < b^3$$

Theta solvents

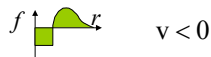
attraction balances repulsion



$$v = 0$$

Poor solvents

attraction dominates

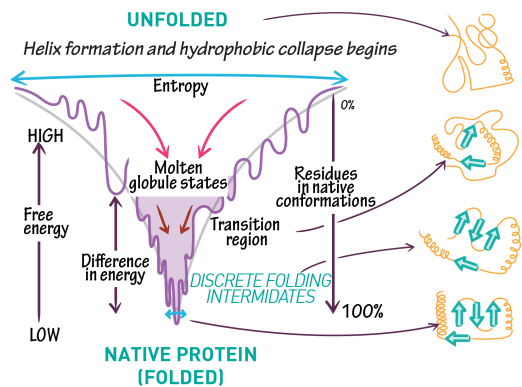


$$v < 0$$

20

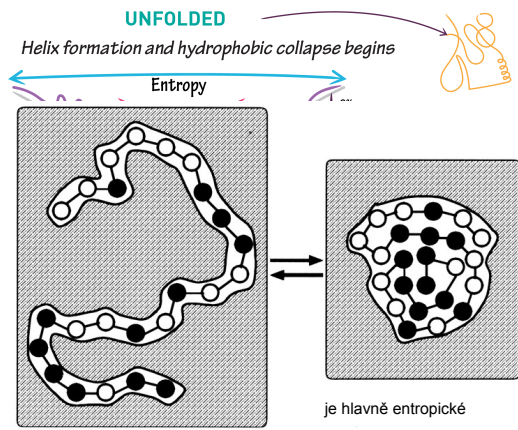
## Protein folding / sbalování proteinů

folding funnel - sbalování proteinů do přirozeného stavu



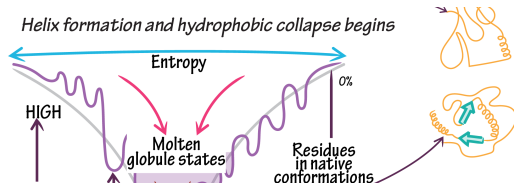
21

## Hydrofobní kolaps



22

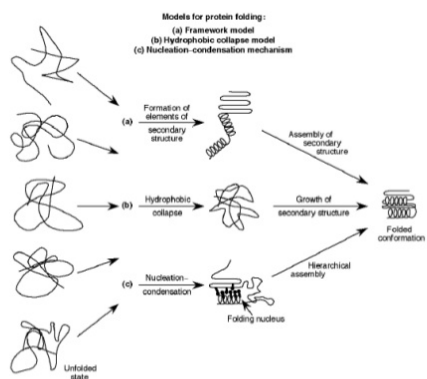
## Molten globule



- univerzální intermediát při popisu sbalování a rozbalování proteinu
- hydrofobní residua hlavně uvnitř a hydrofilní residua venku
- některá residua již v přirozeném kontaktu, "skoro" nativní konformace, sekundární struktura často blízka nativní formě proteinu
- malé uspořádání bočních řetězců, méně kompaktní než nativní protein

23

## Více modelů



24



## Levinthalův paradox

- pokud by pro každé reziduum existovaly 2 možné konformace, pak pro řetězec se 100 rezidui existuje  $2^{100}$  alternativních struktur, a protože přechod z jedné konformace do druhé nemůže být rychlejší než 1 ps, prohledávání prostoru potenciální energie by trvalo nejméně  $\sim 2^{100}$  ps ( $\sim 10^{10}$  let)

Otázka: Jak se dokáže protein sbalit do nativní formy během krátké doby (s-min)?

- Nativní forma proteinu je určena kineticky spíše než termodynamicky a jde cestou hledání snadno dosažitelného lokálního minima, než hledání globálního minima volné energie.

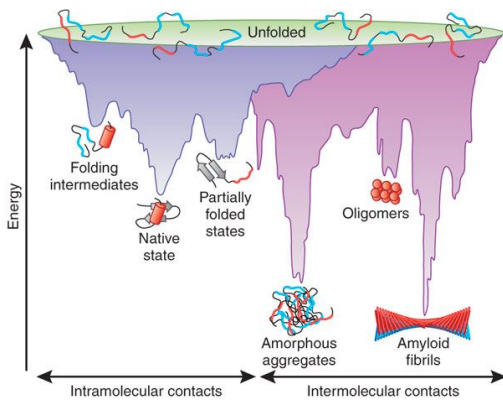
Kinetika : sbalování nesmí obsahovat příliš vysoké energetické bariéry a nemít mnoho mezikroků

Termodynamika : za normálních podmínek je přirozený stav jen o několik kcal/mol stabilnější než nesbalený

Požadavky kinetiky i termodynamiky mohou být splněny současně: předpokládá se, že v biologických procesech našly uplatnění právě ty proteiny, které se takto formovat dokáží.

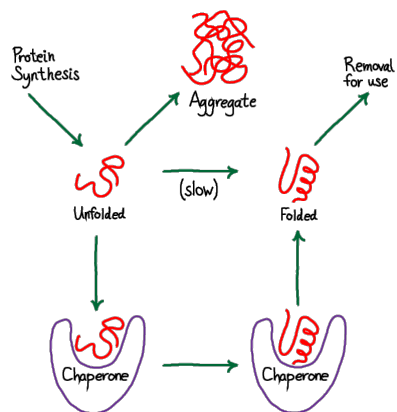
25

## Amyloidy - nesprávné sbalování



26

## Chaperons

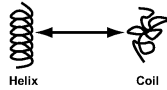
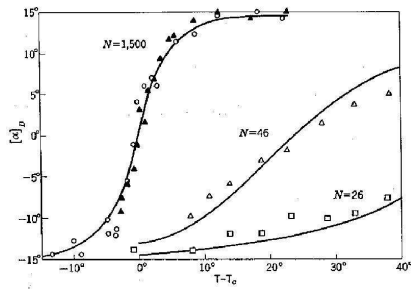


27



## Helix-coil transition

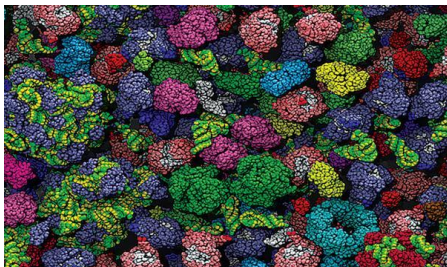
- peptidy, proteiny, DNA, RNA
- je to modelový zjednodušený systém pro sbalování proteinů
- dvou stavový model, každé residuum je buď v helixu nebo coilu (ising model)
- nukleace a propagace sbalování
- kooperativní proces
- dva popisy: Zimm-Bragg a Lifson-Roig (první bere vliv okolních residuí a druhý zahrnuje trojici residuí)



31

## Crowding

- efekt makromolekulárního zaplnění popisující změnu vlastností molekul v roztoku, pokud jsou přítomny ve vysoké koncentraci (koncentrace proteinů v cytosolu 300 - 400 mg / ml, v čočce až 500 mg / ml)
- vliv na sbalování a konformace proteinů
- mění associační/dissociační konstanty = afinity
- větší molekuly ovlivněny více než malé



32

## Fickovy zákony

1. zákon

$$j = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

zákon zachování hmotnosti

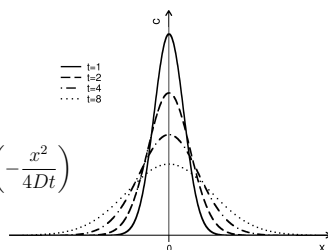
$$\frac{\partial j}{\partial x} = -\frac{\partial c}{\partial t}$$

2. zákon

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

$$c(x, t) = \frac{N}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right)$$

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt$$



33

## Difuzní koeficient

Green-Kubo

$$D = \int_0^{\infty} \langle v(t - t'')v(0) \rangle dt(t - t'')$$

Einstein-Stokesův zákon

$$D = \frac{kT}{\gamma} = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Stokesův zákon

$$F_f = -6\pi\eta Rv_s$$

Molecule	Medium	Diffusion coefficient $\mu\text{m}^2/\text{s}$
$\text{H}^+$	water	7000
$\text{H}_2\text{O}$ , $\text{O}_2$ , $\text{CO}_2$	water	2000
Protein (30 kDa), tRNA (20 kDa)	water	100
Protein (30 kDa)	cytoplasm	10 - 30
Protein (70 -250 kDa)	cytoplasm	0.4 - 2
Protein (70 -140 kDa)	membrane	0.03 - 0.2

34

## Příklad

Vypočítejte, jak dlouho bude trvat 30 kDa proteinu difundovat přes E. Coli a HeLa buňku. Protein může být aproximován koulí s poloměrem 2 nm. E. Coli má průměr 1  $\mu\text{m}$ , zatímco HeLa buňka má průměr asi 20  $\mu\text{m}$ . Předpokládejme, že buněčné stěny nemají žádný vliv na difuzi. (Viskozita vody je  $\eta = 10^{-3} \text{ N s m}^{-2}$ )

35

## Příklad 2

Jak dlouho (v řádu) trvá, aby protein s poloměrem 1 nm dodifundoval z mozku do paže? Předpokládejme, že celý pohyb je uvnitř jedné osy s viskozitou vody  $10^{-3} \text{ Pa s}$  a že celková délka je asi 1 m.

36

## Příklad - Proteinové interakce

Obrázek ukazuje volnou energii interakce,  $w(r)$  mezi dvěma nabitými identickými proteiny ve dvou různých koncentracích soli. Když je protein-proteinová separace,  $r$ , větší než 50 Å, lze předpokládat, že  $w(r)$  bude následovat potenciál Debye-Huckel potenciál pro interakci dvou nábojů v soli.

1. Vypočítejte délku Debyeho screeningu,  $D = 1 / \kappa$ , pro 0,016 M roztok NaCl.
2. Použijte  $w(r)$  při koncentraci 0,016 M soli (plná křivka) pro stanovení celkového náboje  $Z$  proteinu.
3. Je čárkovaná čára na obrázku pro vyšší nebo nižší koncentraci soli než plná čára?
4. Proč jsou  $w(r)$  strmé a odpuzující při krátkých separacích protein-protein?
5. Odhadněte poloměr proteinu.

