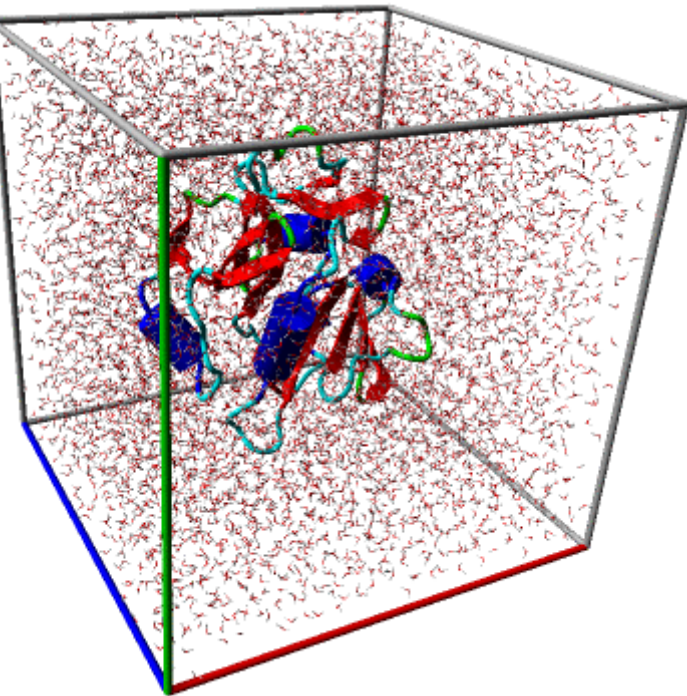


# Molekulová dynamika a její využití při studiu efektu mutací



# Molekulová dynamika

Forma počítačové simulace, kde atomy vzájemně interagují po daný časový interval na základě aproximací fyzikální chemie.



Původní záměr MD:

oblast teoretické fyziky 50. léta 20. stol.

(Alder and Wainwright, studium tuhých koulí)

Alder, B. J. and Wainwright, T. E. *J. Chem. Phys.* **27**, 1208 (1957)

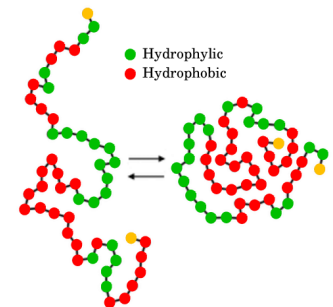
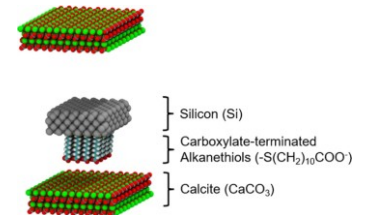
Alder, B. J. and Wainwright, T. E. *J. Chem. Phys.* **31**, 459 (1959)

Současnost:

1. Materiálové vědy a nanotechnologie:  
fyzikální vlastnosti nano-systémů

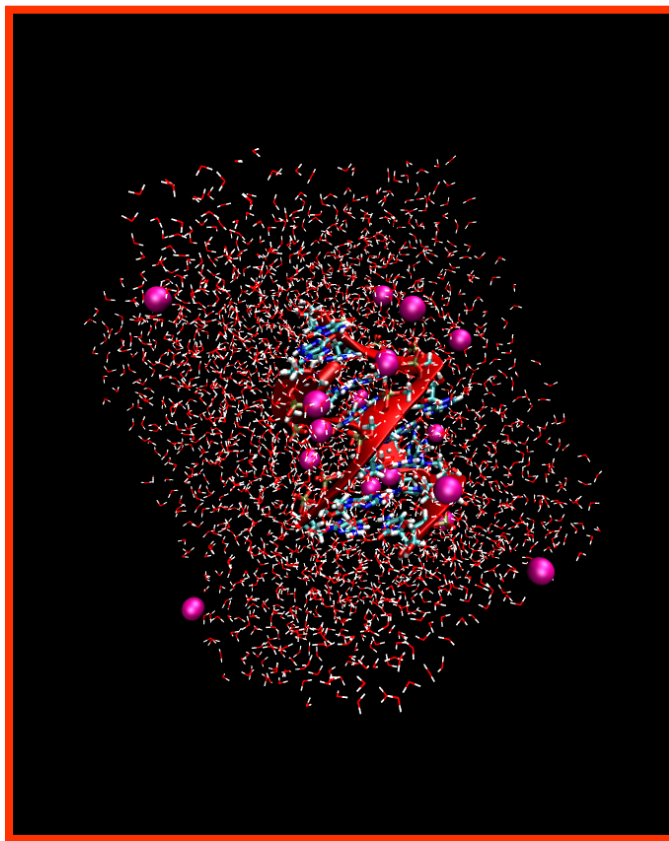
2. Biovědy: Studium konformačních změn molekul (foldování), určení termodynamických veličin, studium elasticity molekul, interakce DNA-protein, protein-léčivo, určené vazebné energie

3. Refinement Xray a Nmr struktur,





## Stavění modelu pro simulace: molekula + ionty + voda

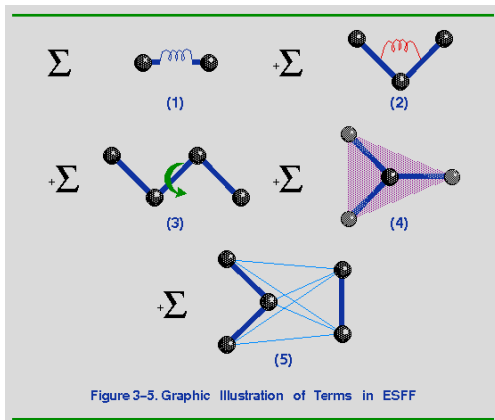


Simulace na klastrech,  
Analýzy na lokálních PC.

Systém je popsán pomocí silového pole:

$$\begin{aligned}
 V(r) = & \sum K_b(b-b_0)^2 \\
 & + \sum K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum (V_n/2)(1 + \cos[n\phi - \delta]) \\
 & + \sum (A_{ij}/r_{ij}^{12}) - (B_{ij}/r_{ij}^6) \\
 & + (q_i q_j / r_{ij})
 \end{aligned}$$

harmonický potenciál chem. vazeb  
 harmonický, determinuje změny vazeb.úhlů  
 periodický potenciál pro torzní úhly  
 Van der Waals člen –Lennard-Jones p.  
 Elektrostatická interakce

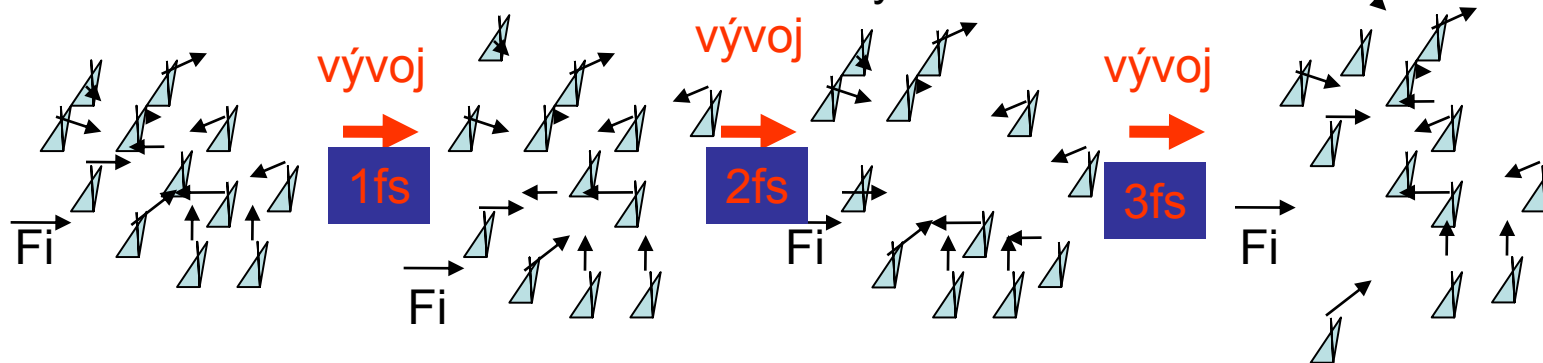


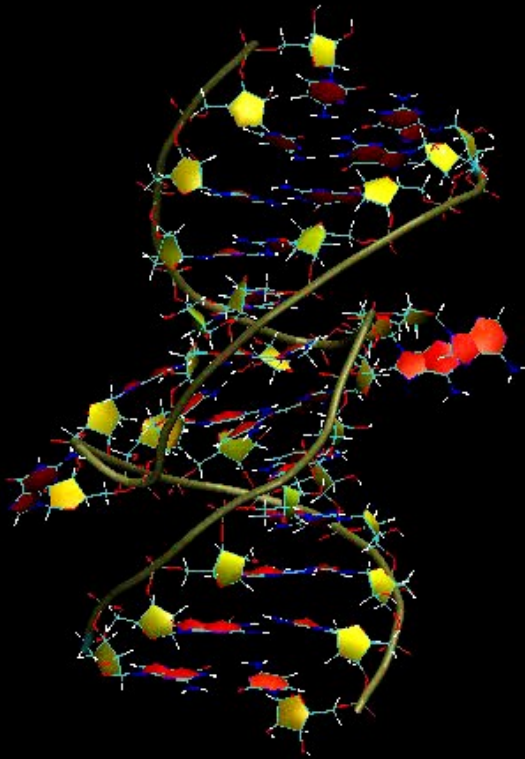
$$\text{Forces: } F_i = -\nabla V(r)$$

$$F_i = m a_i = m d^2r/dt^2$$

Derivace potenciální energie podle souřadnic atomů

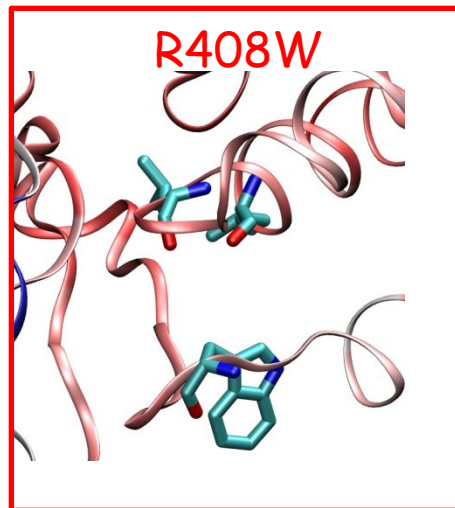
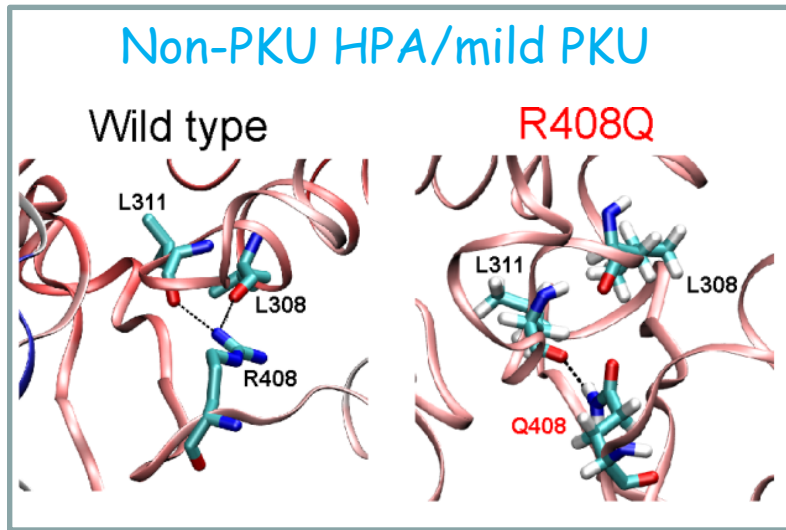
Komplexní systémy MD není možné řešit analyticky  
 Integrace Newtonových pohyb rovnic se řeší numericky..  
 Metoda konečných diferencí ... řešení v čase  $t+\delta t$

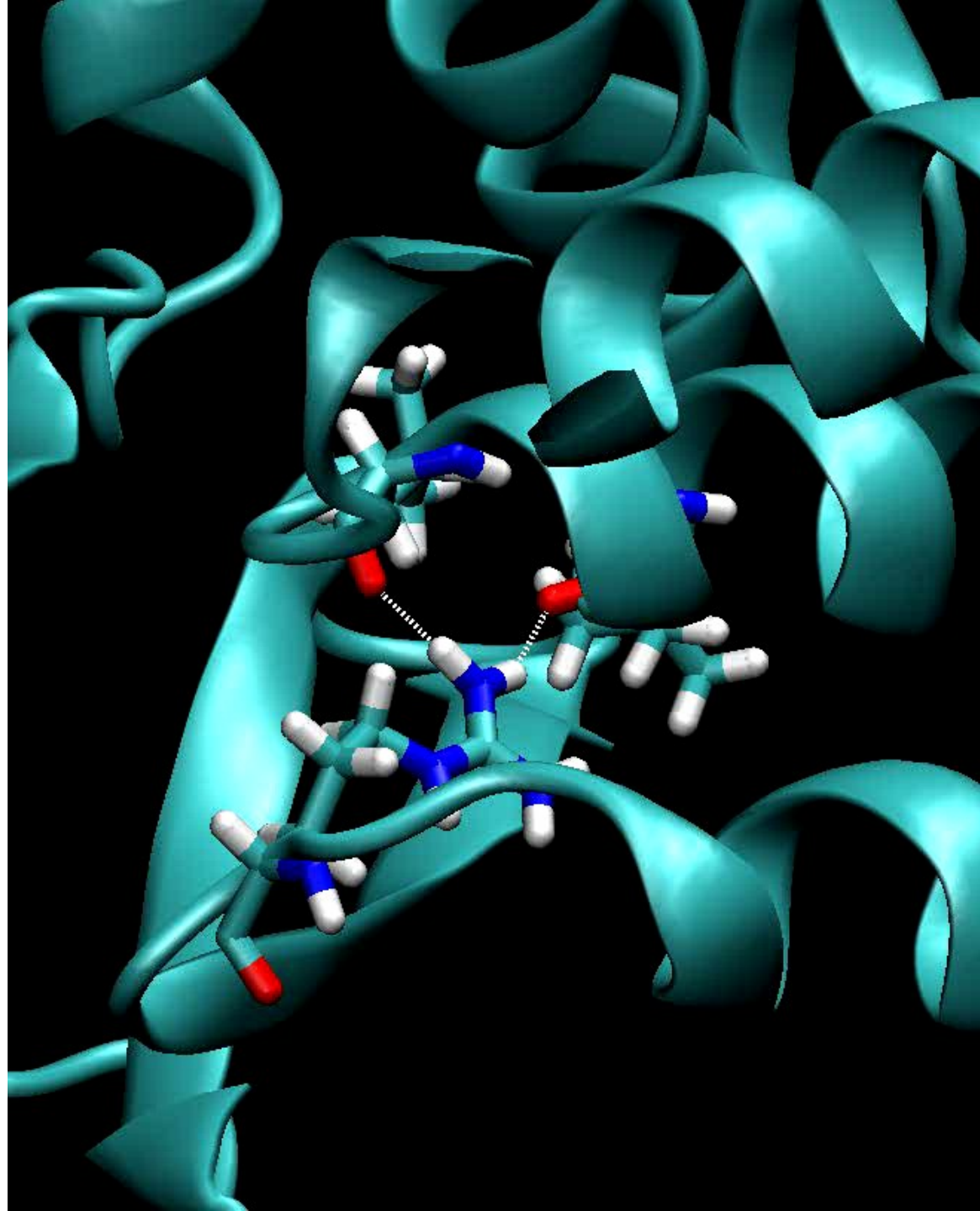




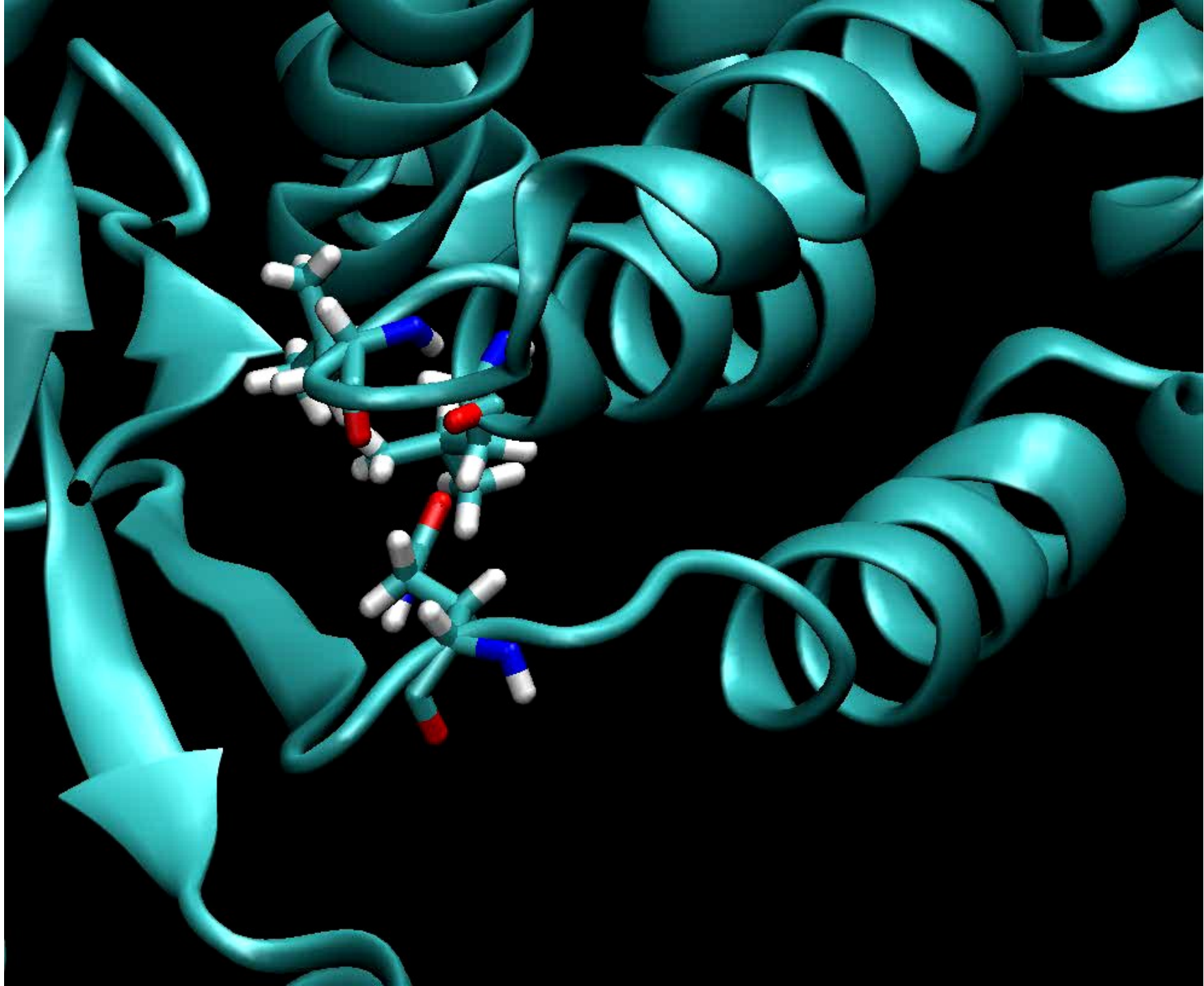
- Studium termodynamických veličin,  $H$ ,  $S$ ,  $G$
- Studium interakace s ionty, vodou, ligandem
- Studium flexibility a elasticity molekuly
- Studium dynamiky párů bází  
nebo  
aminokyselin /mutací

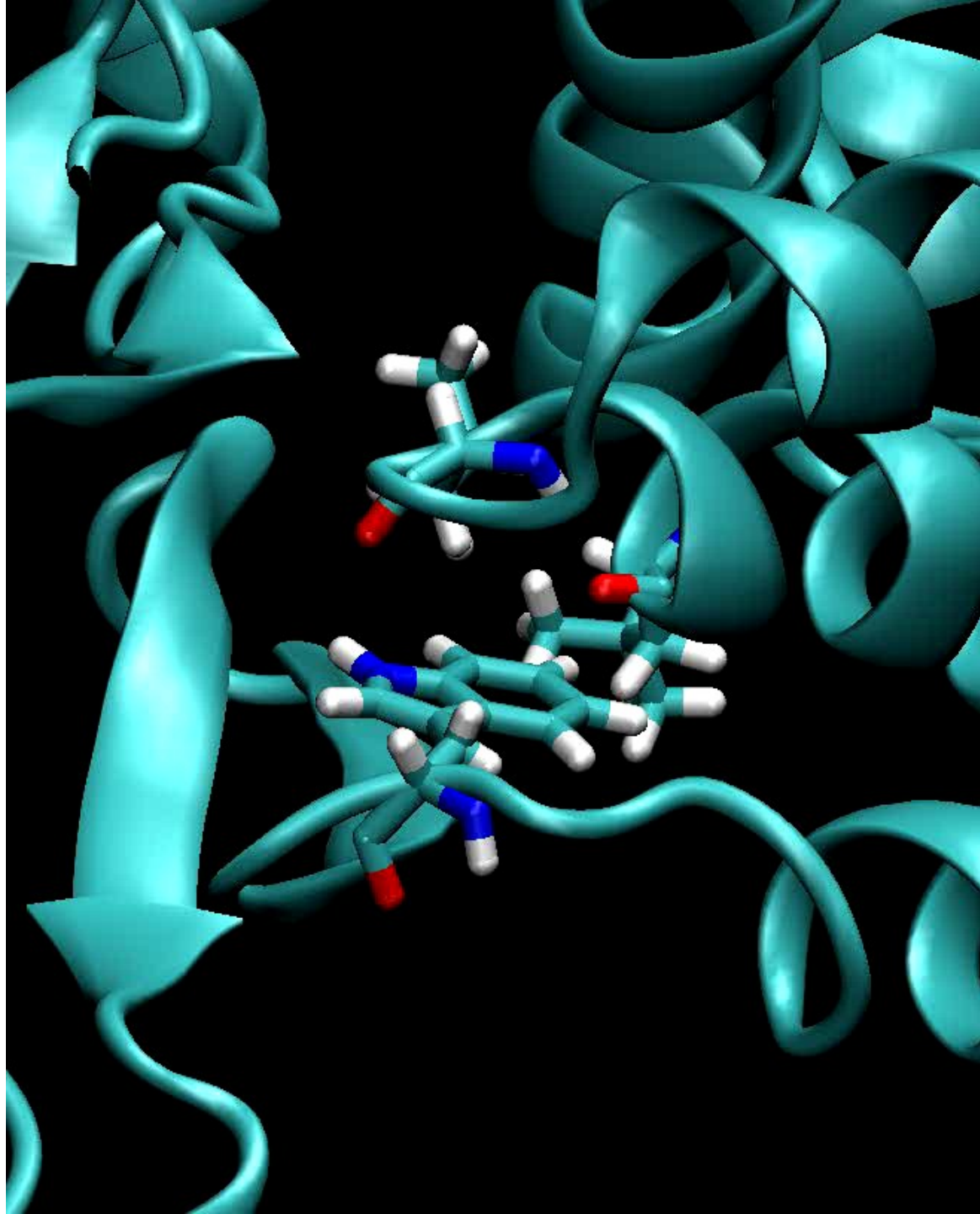
# Příklad: Využití MD při studiu PAH mutací







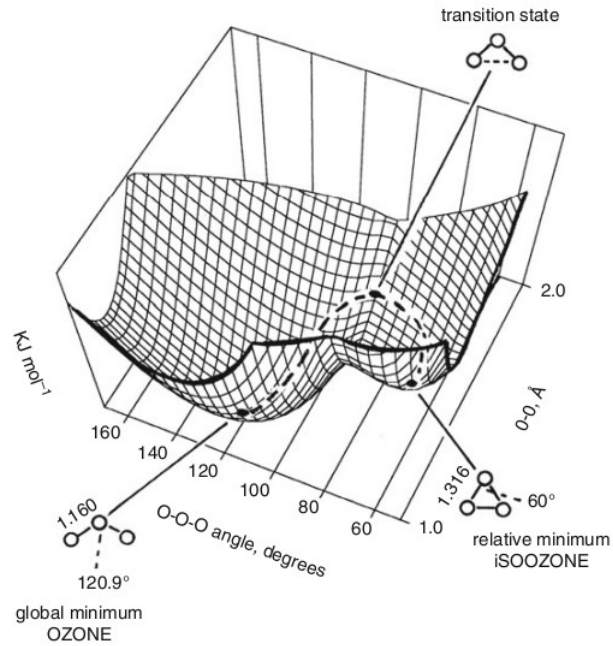




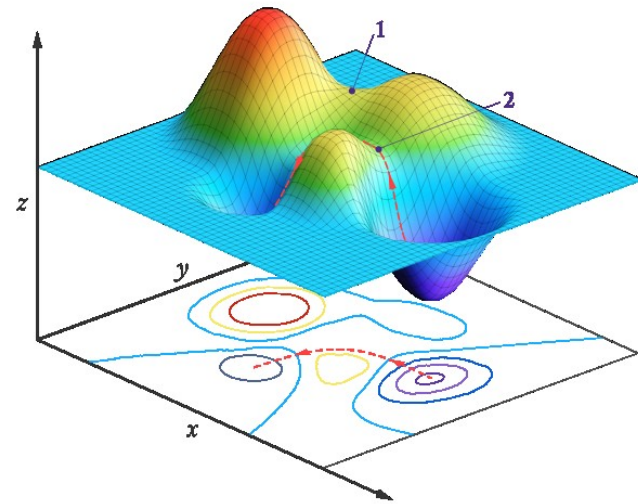
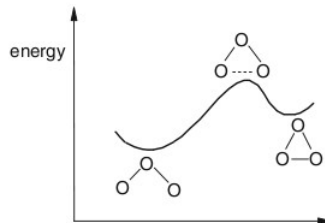
Missense mutací způsobují misfolding

# PES - potential energy surface

Závislost energie na geometrii

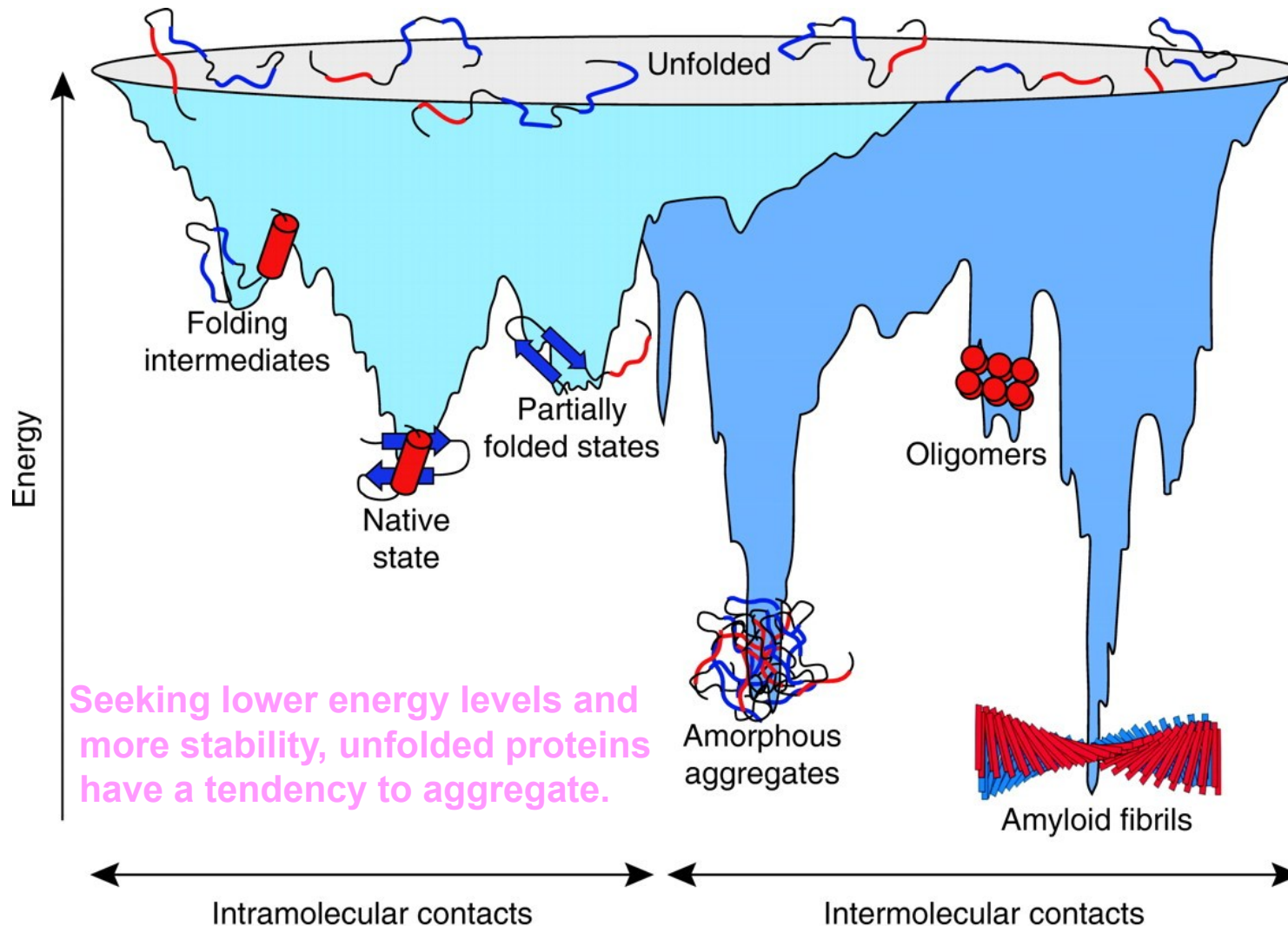


global minimum  
OZONE



# Protein folding

Energy state of protein folding under physiological and misfolding conditions.



# Vznik amyloidních struktur

**Propagace konformačních změn** – Patologicky konformovaný protein indukuje změnu konformace i u normálně konformovaného proteinu. Tento mechanismus se uplatňuje především u [prionových](#) onemocnění.

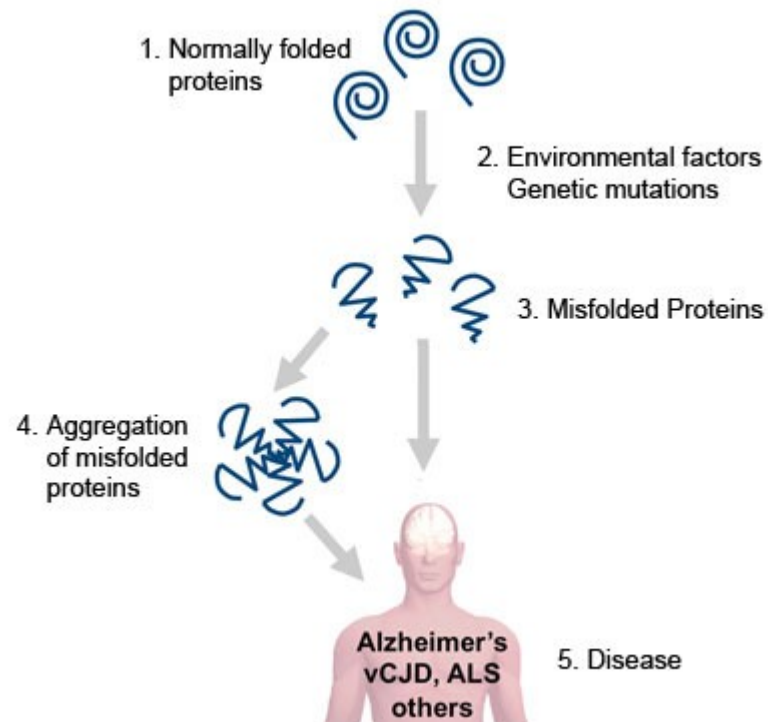
**Selhání proteolytického procesu** – Proteolytický proces chybně konformovaného proteinu může proběhnout nestandardně a zbyde špatně degradovatelný proteinový zbytek. Tento mechanismus se uplatňuje např. v patogenezi [Alzheimerovy choroby](#).

**Mutace genu pro prekurzorový protein** – V některých případech je patologická konformace způsobena zárodečnou mutací v genu. Jde o případ dědičných amyloidóz.

**Nadprodukce** – Přílišná produkce fyziologického proteinu může sama o sobě zvýšit riziko vzniku kondenzačních jader amyloidových fibril. Podílí se na patogenezi zejm. lokalizovaných amyloidóz.

**Porucha kontroly kvality sestaveného proteinu.**

Příklad:



# Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide.

Amyloidní fibrily: **strukturované agregáty** nerozpustné, buňka je nedegraduje

Během formování amyloidu se  $\alpha$ -helixy mění na  $\beta$ -skládané listy

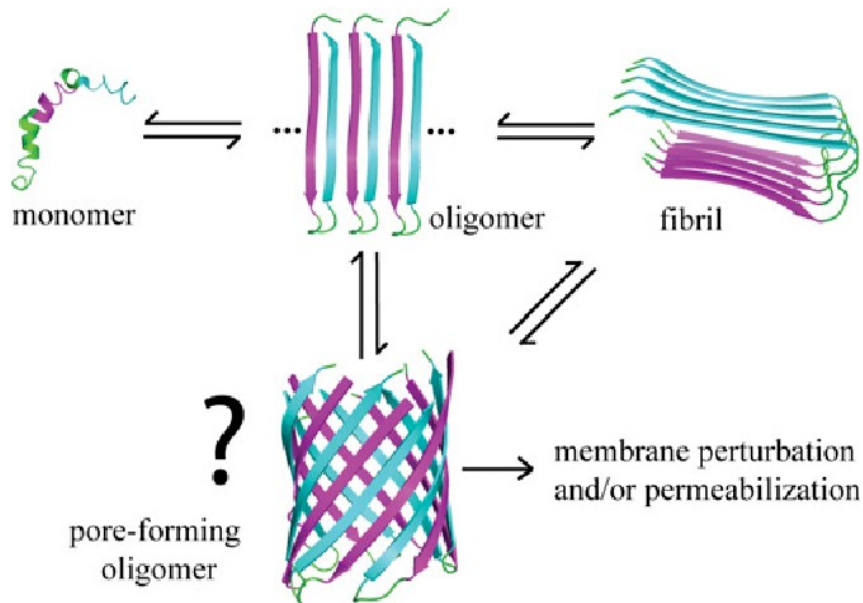
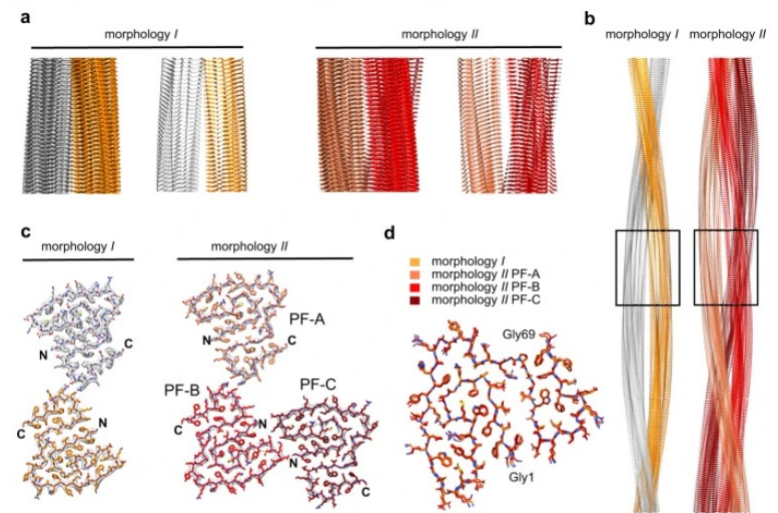


Fig. 1: Cryo-EM structures of AA amyloid fibrils purified from diseased tissue.



**a** Side views of fibril morphologies I and II: corresponding segments of the 3D maps and models, shown as ribbon diagrams. **b** Models of fibrils in side view. The segment shown in **a** is boxed. **c** Cross-sectional layers of fibril morphologies I and II. The 3D maps (gray surfaces) are superimposed with the models, shown as sticks. **d** Alignment of the fibril proteins of morphology I and II (PF-A to PF-C) as indicated in the figure. The data of morphology I is taken from a previously deposited data (PDB 6DSO: <https://doi.org/10.2210/pdb6dso/pdb>)<sup>50</sup>.


**A $\beta$  způsobuje neurotoxicitu, ničí neuronové buňky**

# Strukturní mutace vedoucí k misfolding

**Misfolded protein = ne-nativní špatně sbalená proteinová struktura**

Až 1/2 lidských onemocnění je způsobena špatným sbalením proteinů, patří sem i mutace v p53.

TABLE 1 - uploaded by [Frank Shewmaker](#)  
Content may be subject to copyright.

[Download](#) [View publication](#) 

<b>Protein</b>	<b>Disorder</b>
<i>Aβ</i> peptides	Alzheimer's disease
Transthyretin	Senile systemic amyloidosis
Serum amyloid A	Secondary systemic amyloidosis (infections and chronic inflammatory conditions)
Amylin (IAPP)	Type II diabetes
<i>α</i> -synuclein	Parkinson's disease
Superoxide dismutase	Amyotrophic amyloidosis
<i>β</i> 2-microglobulin	Hemodialysis-related amyloidosis
Huntingtin	Huntington's disease
PrP	Transmissible spongiform encephalopathies
Ig light chain	Primary systemic amyloidosis

Examples of human amyloid peptides and proteins



Amyloidy mohou vznikat z různých proteinů a mohou se kumulovat v různých tkáních (ledviny, srdce, střevo, játra, kůže..)

Nejsou metabolizovány a odbourávány z těla, takže je jen otázkou času kdy začnou narušovat funkci orgánů.

### Důvod toxicity amyloidních struktur??

- Agregáty se začleňují do membrány a depolarizují ji dochází ke změně akčního potenciálu.

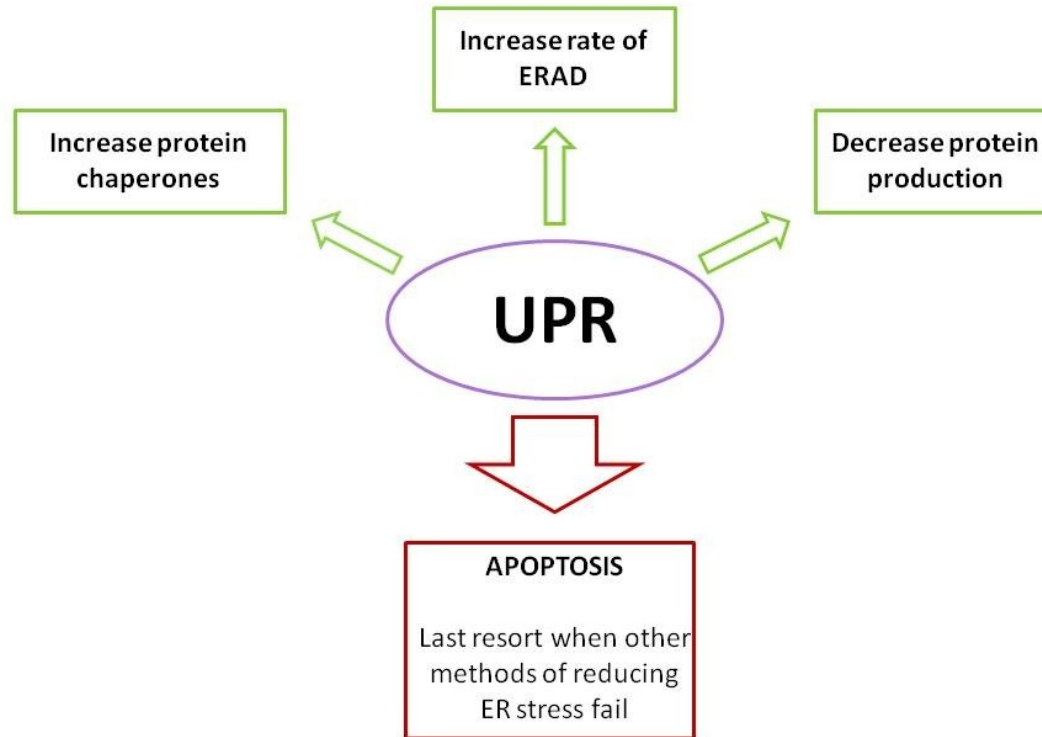
Důsledkem je programovaná smrt buňky (apoptóza) nebo nekróza, která může vést k zánětlivým reakcím.

## K misfolding může dojít z různých důvodů

Summary of protein-modifying conditions and their affected proteins or peptides

Modifying condition	Affected proteins	Reference
Mutations	$\alpha$ -Synuclein, amyloid- $\beta$	27<REFLINK> 28<REFLINK>
Increased temperature	Streptokinase, $\beta$ -lactoglobulin	29<REFLINK> 30<REFLINK>
High pH	PABP2, concanavalin A	31<REFLINK> 32<REFLINK>
Low pH	Fibroblast growth factor 20, vesicular stomatitis virus glycoprotein G	33<REFLINK> 34<REFLINK>
Increased hydrostatic pressure	Lysozyme, insulin	35<REFLINK> 36<REFLINK>
High shear rate	$\beta$ -Lactoglobulin	37<REFLINK>
High ionic strength	Amyloid- $\beta$ , melittin	38<REFLINK> 39<REFLINK>
Agitation	$\beta_2$ -Microglobulin, glucagons	40<REFLINK> 41<REFLINK>
Negatively charged surfaces	Ig light chain fragments	42<REFLINK>
Air-water interface	Amyloid- $\beta$ , ovalbumin	43<REFLINK> 44<REFLINK>
Phosphatidylserine	Lysozyme, insulin, myoglobin, G3PD, transthyretin, cytochrome C, histone, $\alpha$ -lactalbumin, endostatin	45<REFLINK> 46<REFLINK>
Glycation	APP, albumin, IAPP	47<REFLINK> 48<REFLINK>
Oxidation	Superoxide dismutase, LDL, ApoC-II	49<REFLINK> 50<REFLINK> 51<REFLINK>

# Přítomnost misfodovaných proteinů indukuje záchranné akce



# Chaperony: (heat shock or stress proteins)

Klasifikace:

## Podle molekulové hmotnosti (kDa):

(Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 and the so-called small Hsps)

## Podle mechanismu účinku:

- Foldázy - HSP60, HSP70, HSP90 foldování pomocí ATP (mají ATP-azovou doménu a substrátovou)
- Holdázy – HSP40, HSP33 nevyužívají ATP

# **Funkce chaperonů za normálních podmínek (není přítomen buněčný stres)**

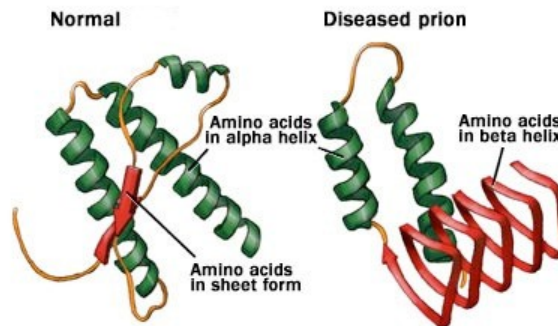
Chaperony asistují při foldování řady velkých proteinů, (např tubulin nebo aktin), kde stabilizují přechodné intermediáty, čímž umožňují vznik správné konformace.

Při foldování z jednoho stavu do druhého, u těchto proteinů, existují velké energetické bariéry

Další funkce: asistence při transportu a proteolytické degradaci

# Mechanismus účinku chaperonů u misfolded proteins

- Chaperony váží hydrofóbní místa unfoldovaného proteinu (samotná vazba zabraňuje agregaci neboť stíní hydrofóbní místa)
- Uvolněná E z vazby ch-p se využije na narušení vazeb v misfoldovaném proteinu, což umožní nové přeskládání nebo využívá E z ATP-hydrolyzy ve své ATP-azové doméně
- Chaperon se váže cyklicky a různě na misfoldované proteiny umožňuje znovu sbalení = iterative annealing
- Transfer entropie – neuspořádaný chaperon se vazbou uspořádá a naopak misfoldovaný protein se rozbálí

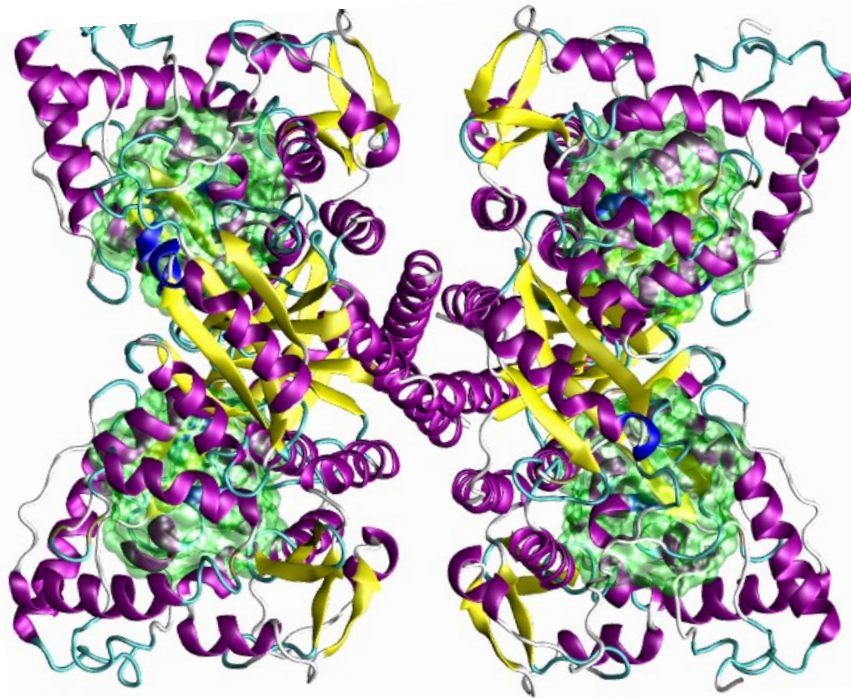


© Mayo Foundation for Medical Education and Research. All rights reserved.

Při foldování mohou vzniknout tzv. dead-end konformace, které se již nedají pomocí chaperonů přeskládat do funkční struktury.

# Terapie – protein misfolding diseases

- Využití protilátek k blokování proteinových agregátů
- výroba farmakologických nebo chemických chaperonů (malé molekuly)

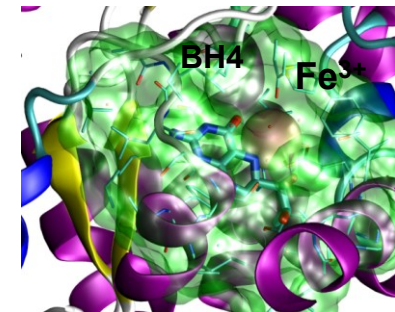


**Phenylalanine hydroxylase**  
onemocnění: *Hyperphenylalaninemia*  
(*fenylketonurie*) recesivní

Př:



Někteří pacienti dobře reagují na podání tetrahydrobiopterinu (BH4), který je přirozeným kofaktorem PAH a který působí jako farmakologický „chaperone“. BH4 zvyšuje termální stabilitu a ochranu proti proteolytické degradaci a oxidační inaktivaci mutovaného proteinu,



Aktivní místo