



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

F1190 Úvod do biofyziky

Masarykova Univerzita

Podzimní semestr 2024

5.12.2024 Transport kyslíku, myoglobin, molekulární dynamika

Doporučená doplňující četba:

Molecular Modelling: Principles and Applications, second edition

Andrew R. Leach

Pearson Education EMA, 2001

ISBN 0-582-38210-6

**Prof. Jiří Kozelka, Biofyzikální Laboratoř, Ústav fyziky kondenzovaných látek, PŘF MU,
Kotlářská 2, kozelka.jiri@gmail.com**

Cvičení 1

Cvičení ze 17.10.2024

1. Stáhněte si z proteinové databáze <https://www.rcsb.org/pdb/home/sitemap.do> souřadnice krystalové struktury 4u2t.pdb. Načtěte si souřadnice do programu VMD.
2. Prozkoumejte interakci šestičlenného aromatického kruhu tyrosinu **TYR446** s kofaktorem **FAD** a popište, o jakou (jaké) interakci (interakce) se jedná.
3. Prozkoumejte interakci aminokyseliny asparagin **ASN119** s tricyklickou aromatickou skupinou kofaktoru **FAD** a popište, o jakou (jaké) interakci (interakce) se jedná.
4. Prozkoumejte interakci aminokyseliny methionin **MET41** s adeninovou skupinou kofaktoru **FAD** a popište, o jakou (jaké) interakci (interakce) se jedná.

Nápověda: Mají-li v krystalové struktuře dva atomy různých molekul mezi sebou odstup blízký součtu jejich «van der Waalsových poloměrů», lze předpokládat, že mezi nimi působící Londonovy síly jsou nezanedbatelné. Tabulku van der Waalsových poloměrů nejdůležitějších biogenních prvků najdete na české Wikipedii pod heslem «van der Waalsův poloměr».

Cvičení 2

Přitažlivé mezimolekulární interakce jsme rozdělili podle jejich fyzikální podstaty na následující typy:

1. Ion-ion
2. Ion-dipól
3. Dipól-dipól
4. Ion-indukovaný dipól
5. dipól-indukovaný dipól
6. náhodný dipól-indukovaný dipól (= disperzní / Londonovy síly)

Uveďte příklady dvojic molekul či iontů (nebo párů ion-molekula), anorganických či organických, v jejichž interakci dominuje

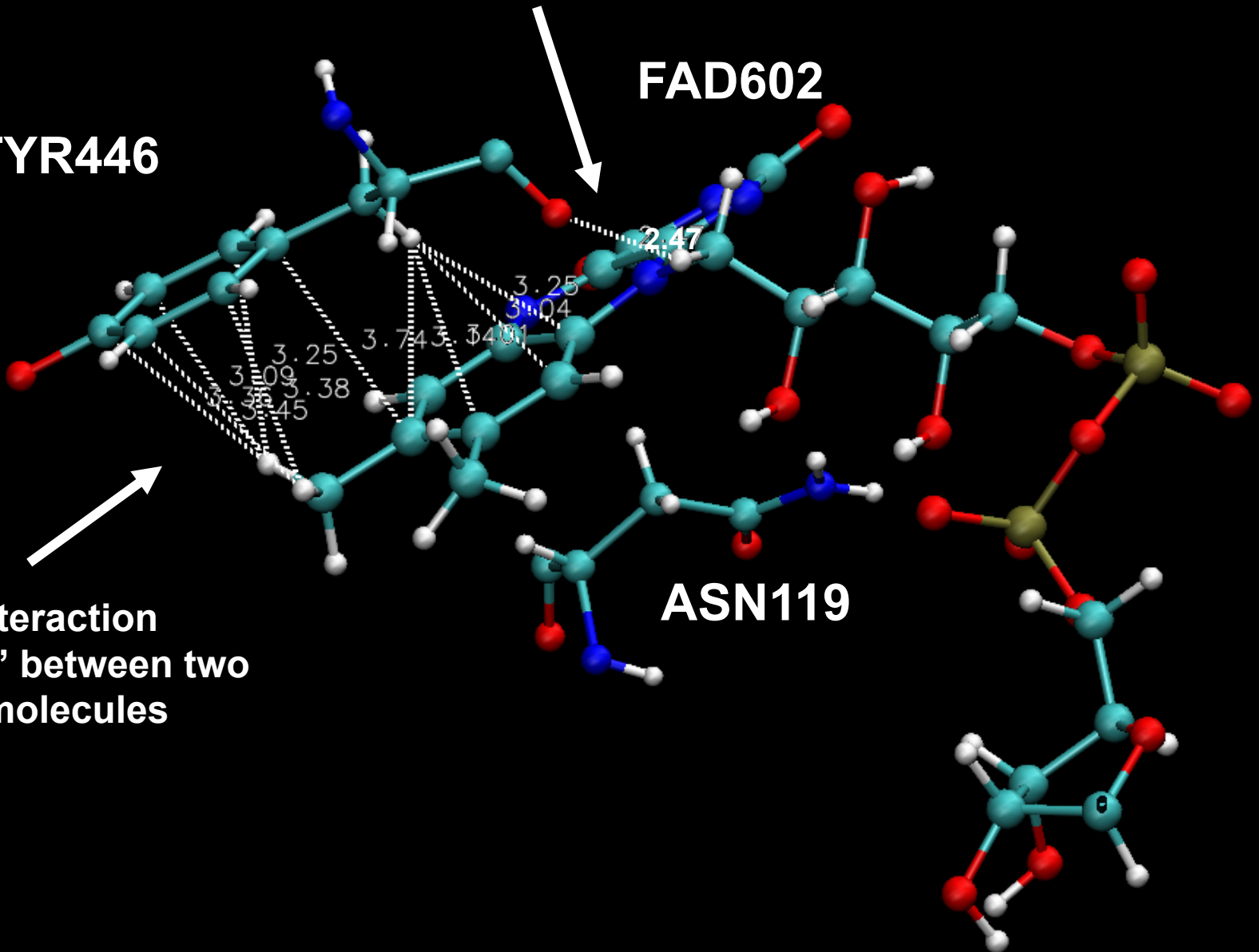
- a) Typ 1 b) Typ 2 c) Typ 3 d) Typ 4 e) Typ 5 f) Typ 6

C-H...O hydrogen bond significantly shorter than sum of vdW radii (1.2+1.5 Å)

TYR446

FAD602

ASN119



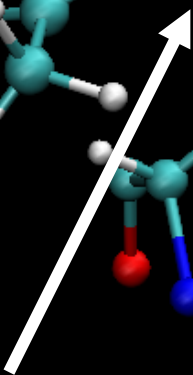
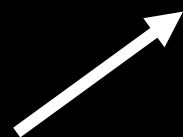
London interaction
"Stacking" between two
aromatic molecules

C-H...O hydrogen bond significantly shorter than sum of vdW radii (1.2+1.5 Å)

TYR446

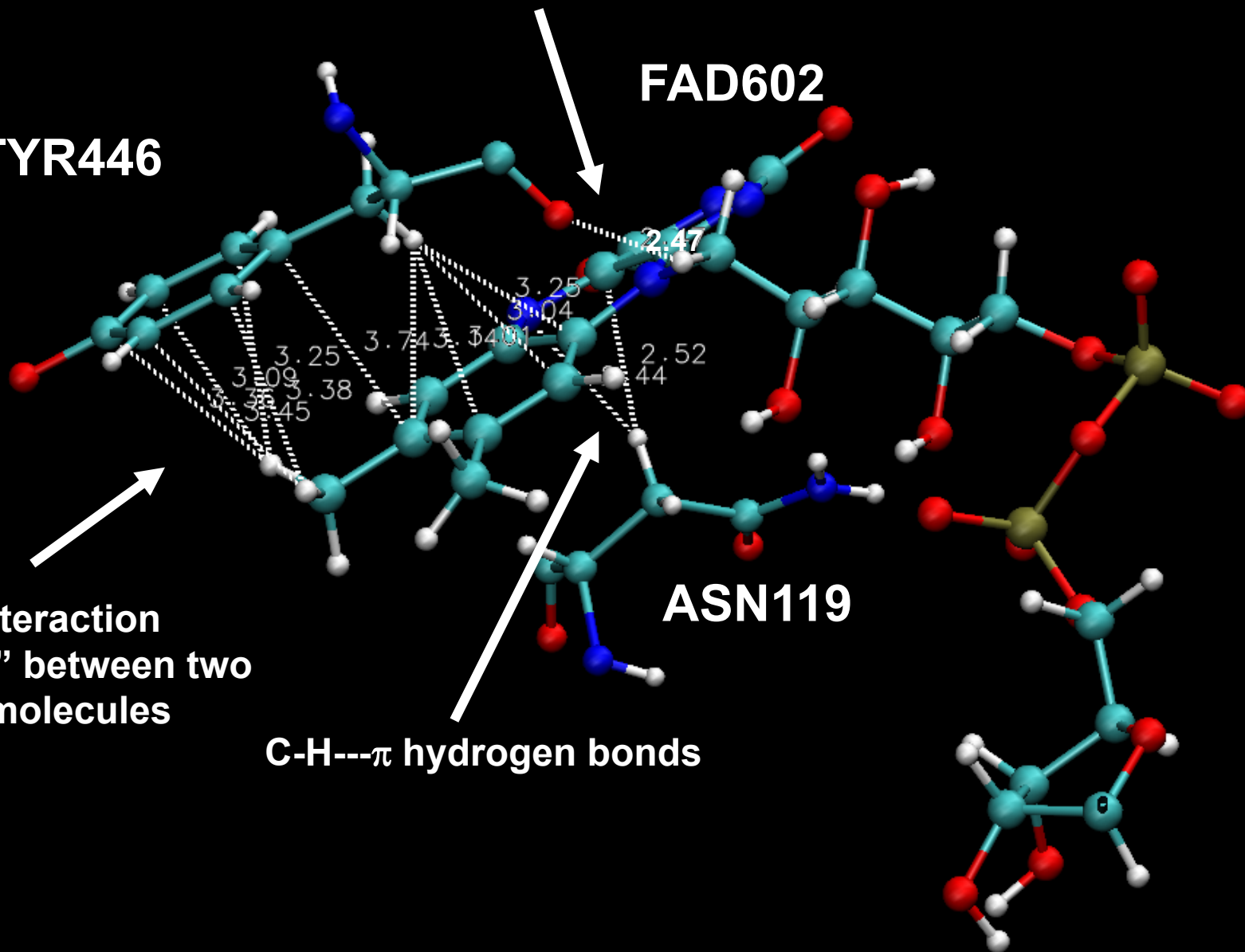
FAD602

ASN119



London interaction
"Stacking" between two
aromatic molecules

C-H... π hydrogen bonds



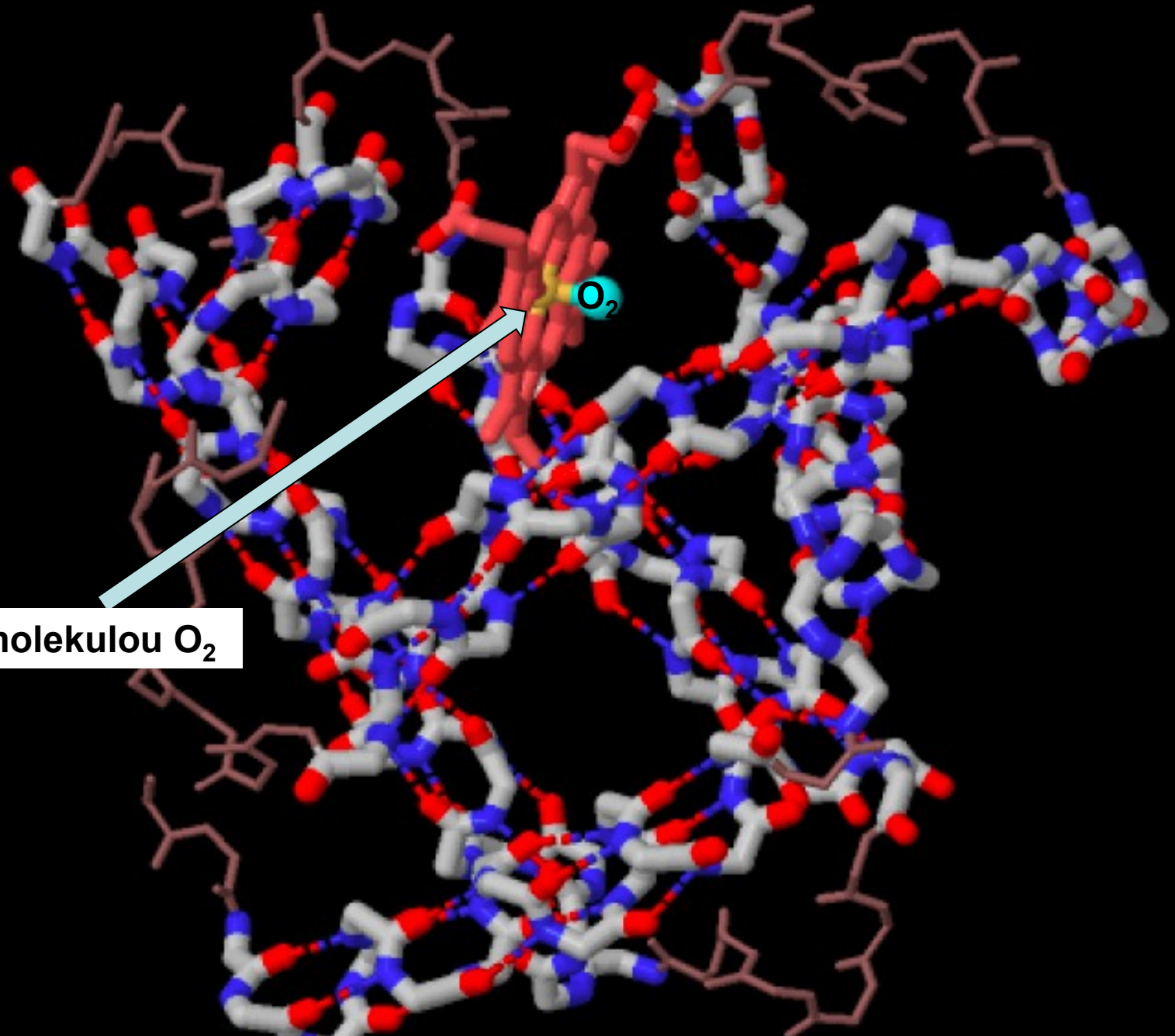
Dynamika molekul

Důležitost strukturních fluktuací biomolekul (neboli dynamiky molekul) pro jejich funkci si ukážeme na příkladu **myoglobinu**, proteinu, který ve svalech obratlovců přebírá kyslík od hemoglobinu a přenáší jej z krve do mitochondrií, organel provádějících buněčnou oxidaci pro získávání energie.

Myoglobin: « Molekula měsíce », leden 2000

<http://pdb101.rcsb.org/motm/1>

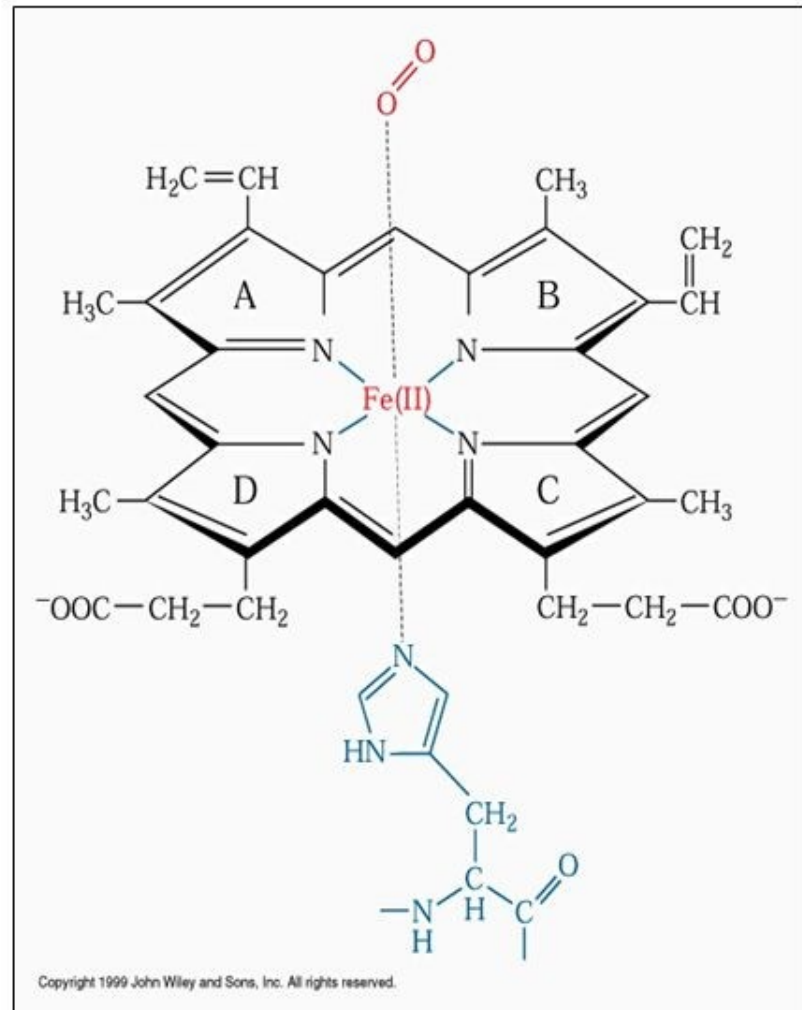
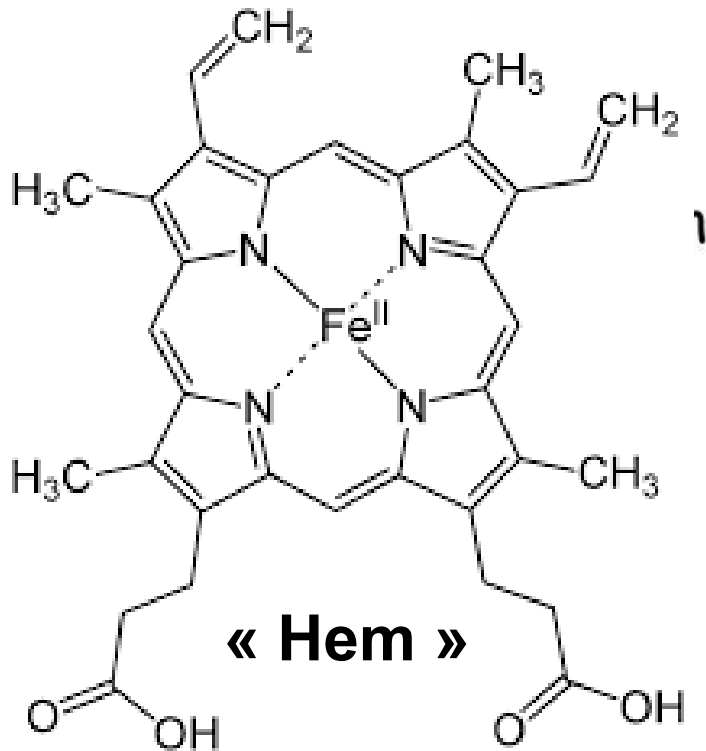
Krystalová struktura myoglobinu s navázanou molekulou O₂ (pdb code 1mbo)



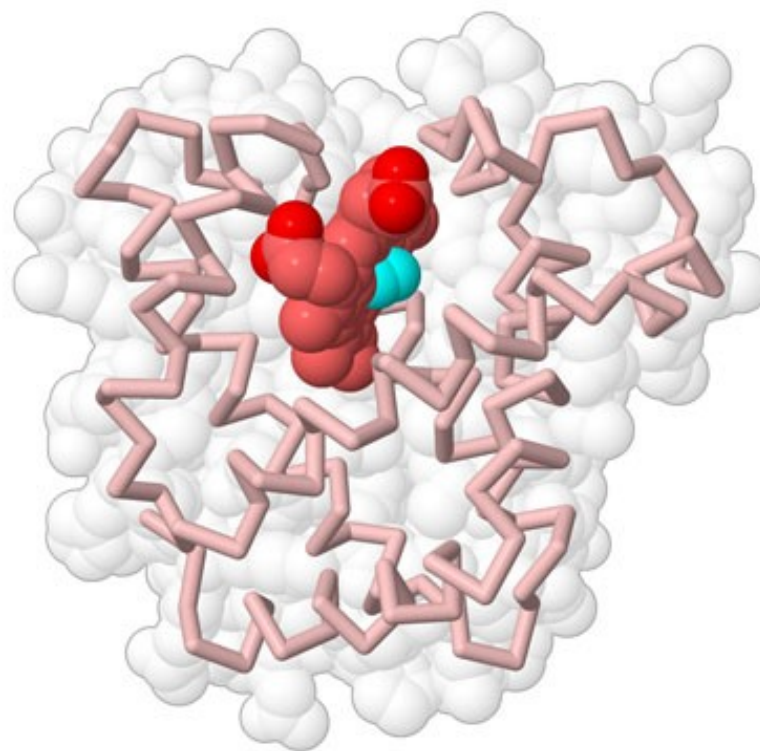
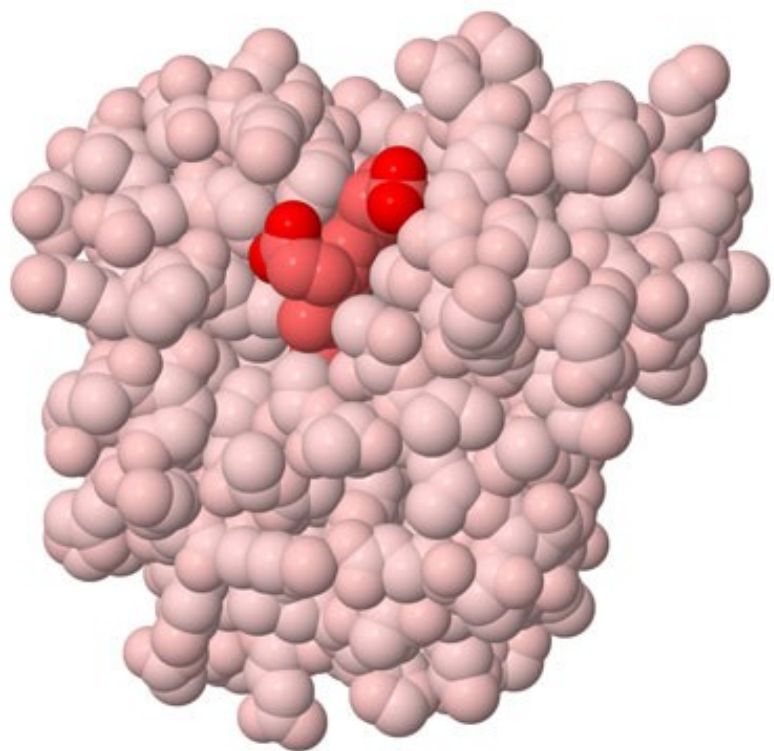
Hem s molekulou O₂

Vlastnosti železa v hemu

- **Koordinační číslo železa v hemu = 6**

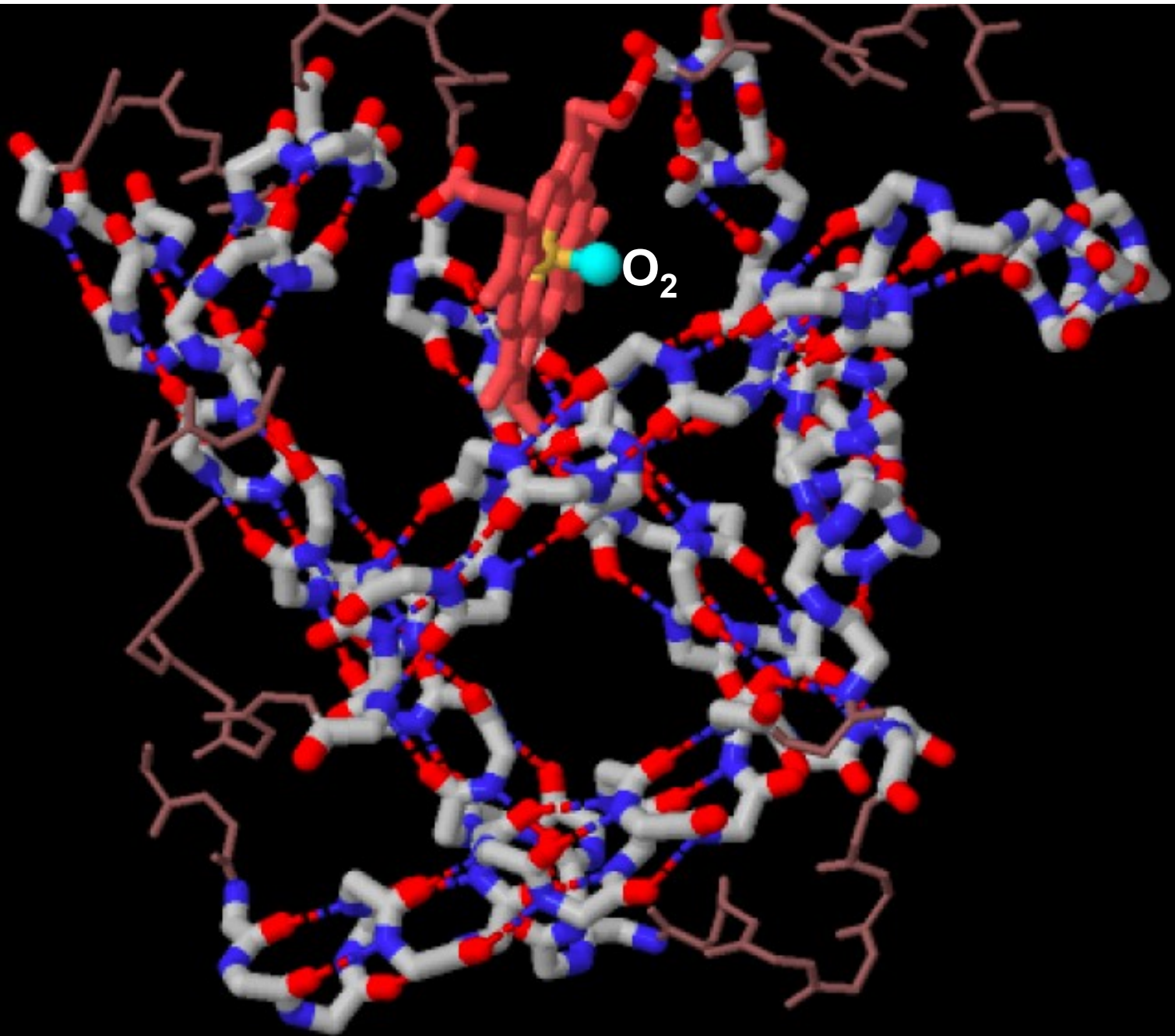


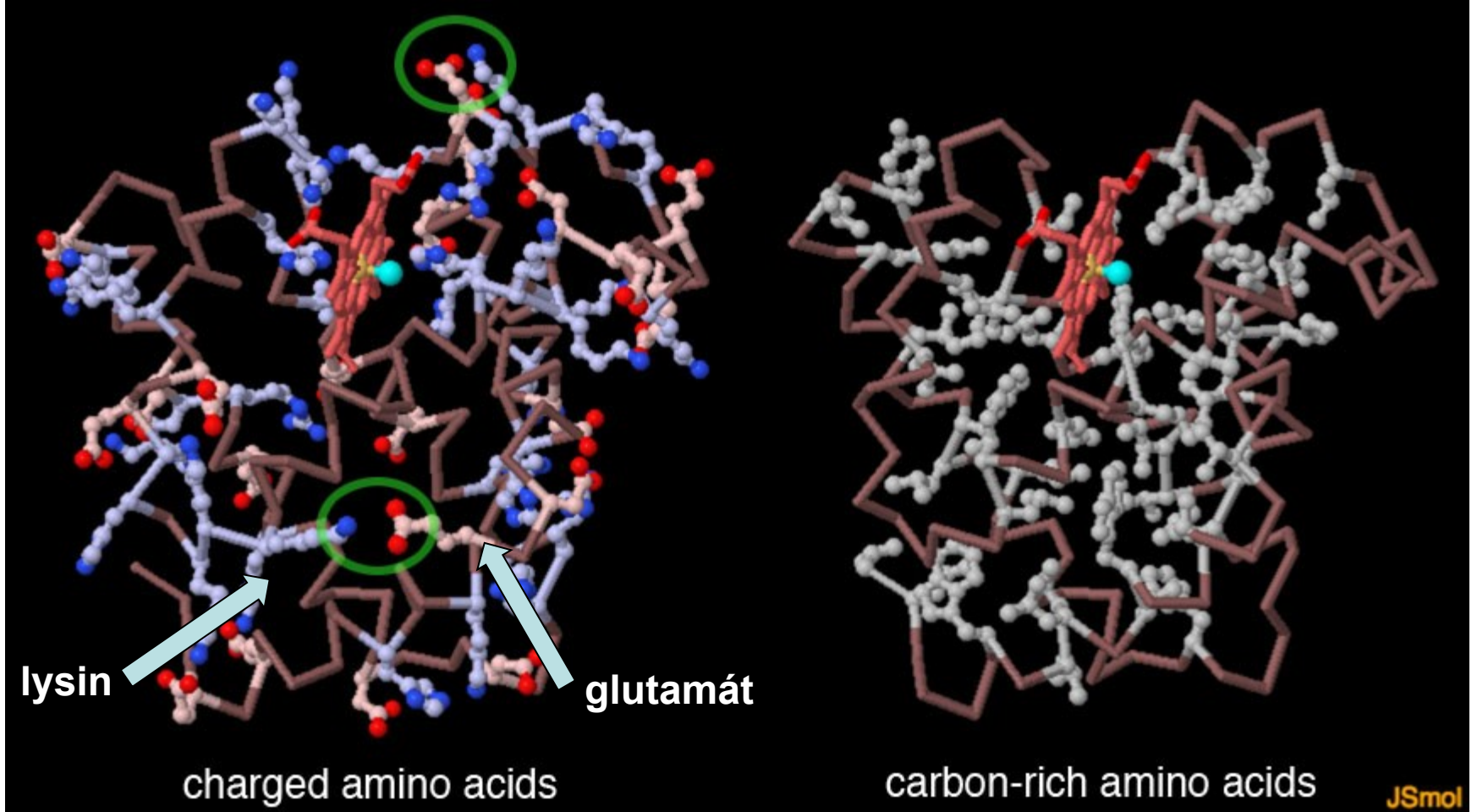
Hem je prostetická skupina obsahující železnatý ion Fe²⁺ (železitý ion Fe³⁺ při vazbě na O₂) ve středu tetrapyrrolového jádra, na něž jsou navázány substituenty. Červená barva hemu je způsobena konjugovaným systémem dvojných vazeb, kvůli kterému se hem snadno excituje a následně emituje červenou část spektra viditelného světla. (Pramen: Wikipedie)



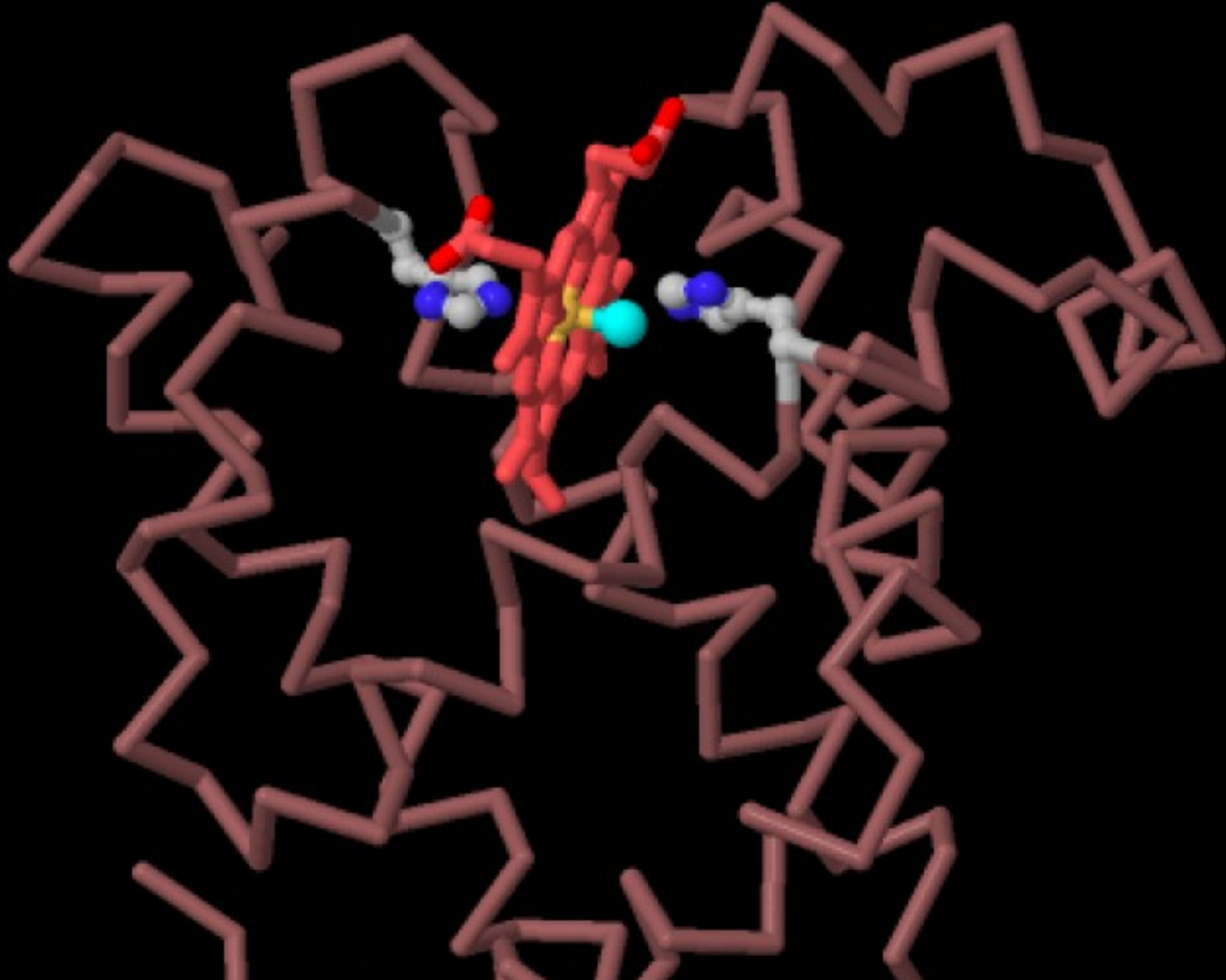
Molekula O₂ (tyrkisová barva, červená: hem) se nachází poměrně hluboko v proteinové struktuře myoglobinu.

Myoglobin: protein ze 153 aminokyselin organizovaných v 6 α -šroubovicích



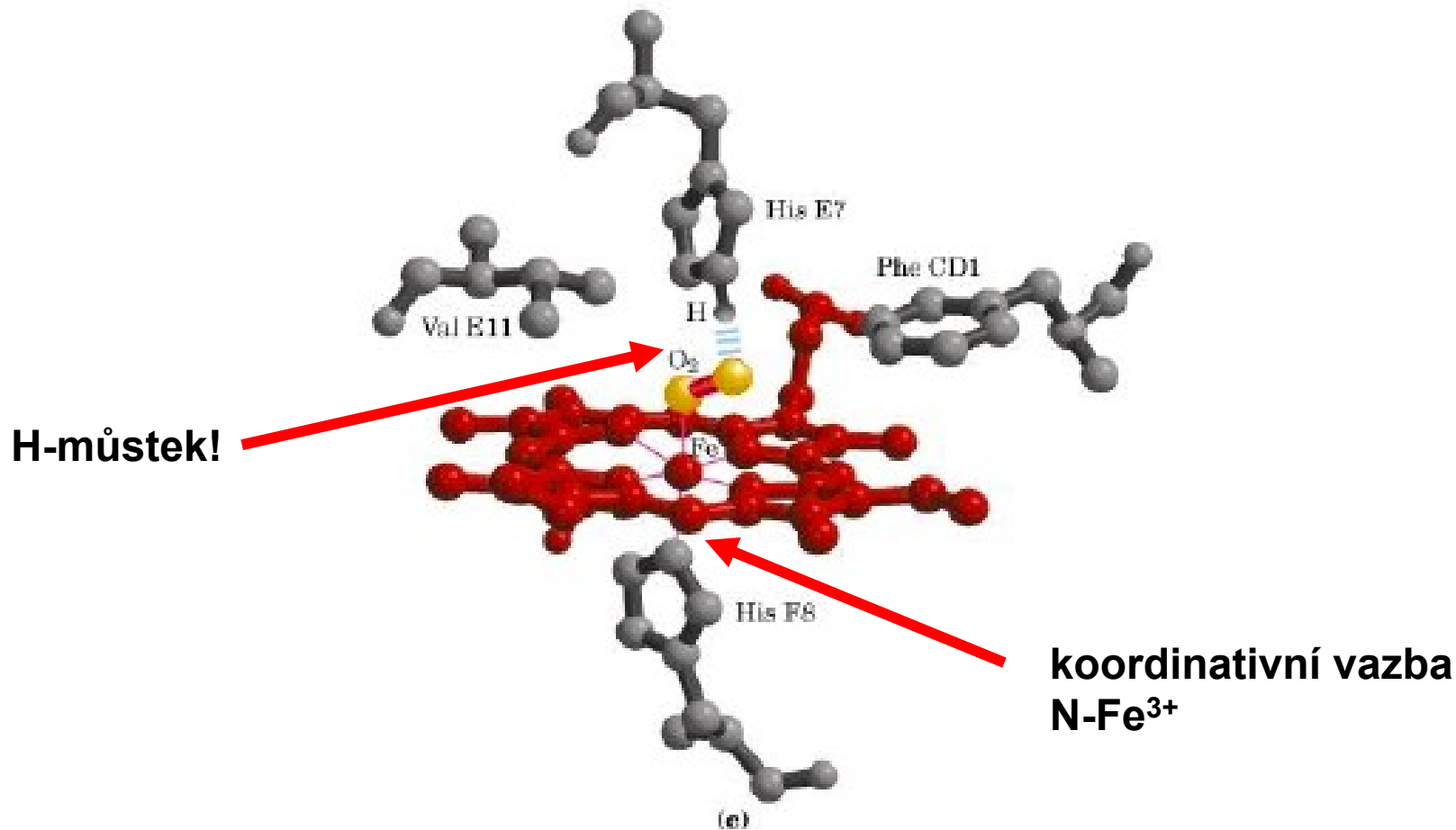


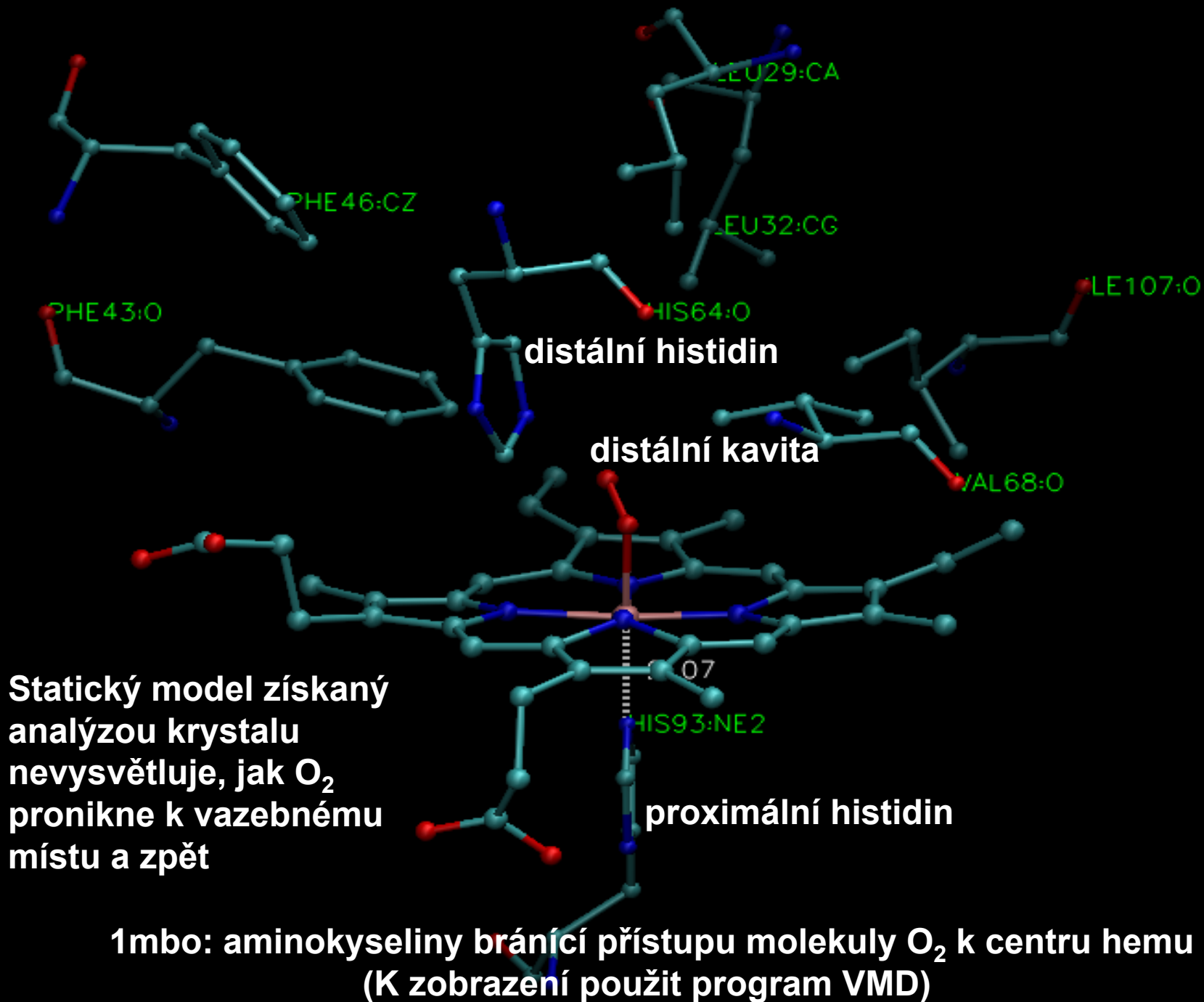
The atomic structure of myoglobin revealed many of the basic principles of protein structure and stability. For instance, the structure showed that when the protein chain folds into a globular structure, carbon-rich amino acids are sheltered inside and charged amino acids are most often found on the surface, occasionally forming **salt bridges** that pair two opposite charges (shown here with **green circles**).



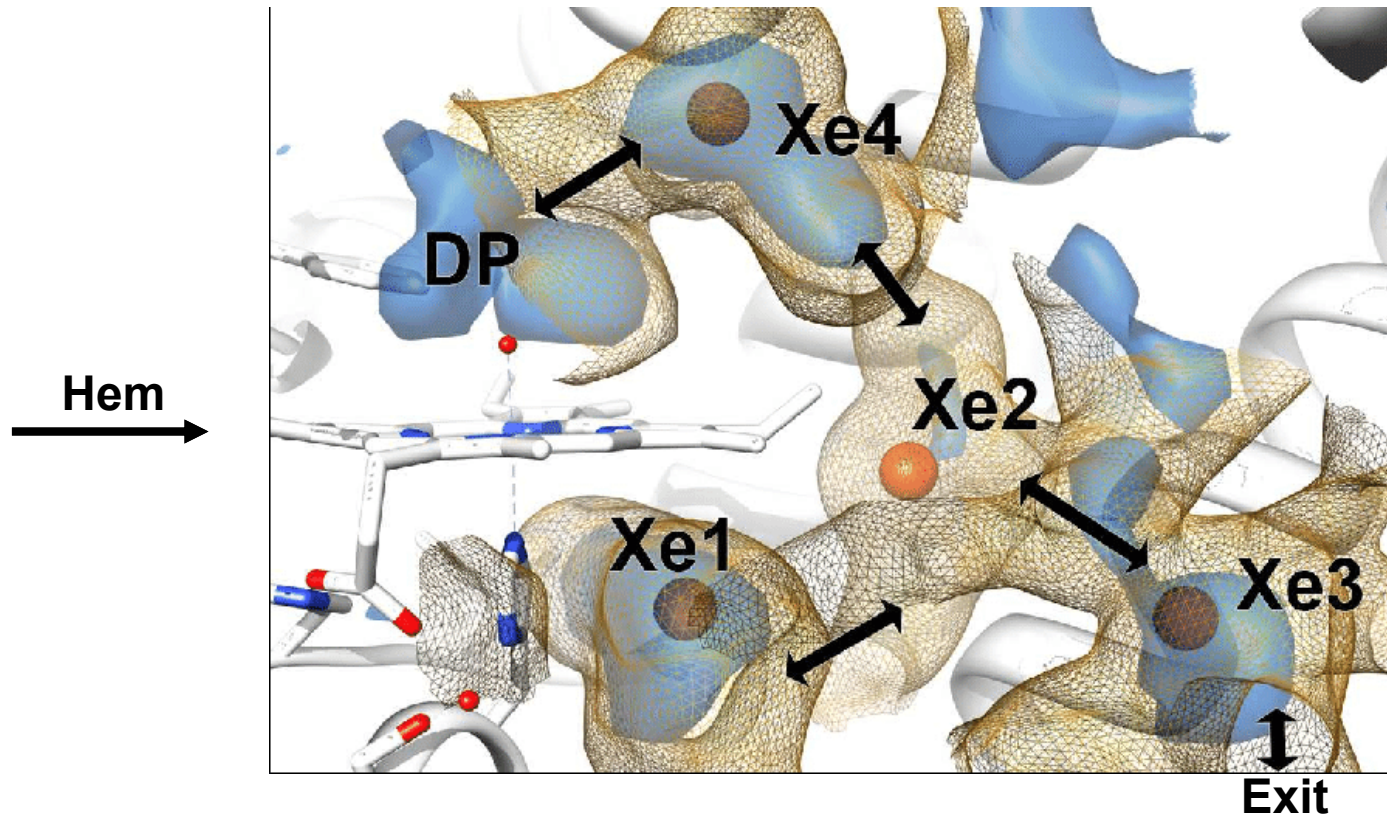
**Proximální histidin (vlevo) zakotvuje hem v proteinu.
Distální histidin (vpravo) stabilizuje molekulu kyslíku H-můstkem.
(Viz následující diapozitiv)**

Oxymyoglobin: proximální (F8) a distální (E7) histidin



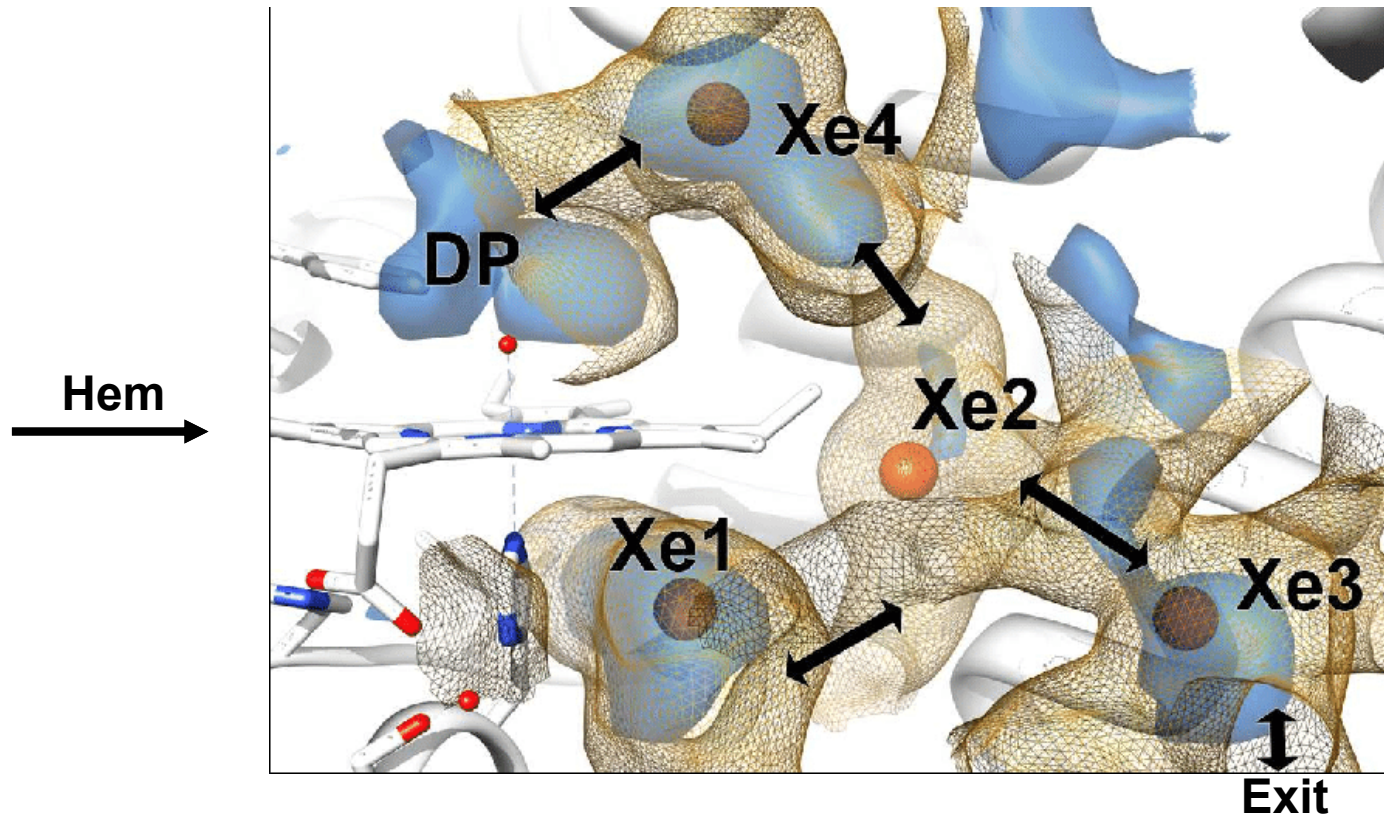


Jak se molekula kyslíku dostane k vazebnému místu uvnitř myoglobinu?
V krystalové struktuře oxymyoglobinu (1mbo) není vidět žádný přístupový kanál. Možnou přístupovou cestu ukázala rentgenová struktura deoxymyoglobinu, který byl nasycen xenonem (pdb kód 1J52). Xenon tvoří sice jednoatomové, sférické molekuly, jejich velikost je však podobná molekulám O₂ nebo CO (ten se na myoglobin rovněž váže). V krystalu jsou místa, kde jsou molekuly Xe „uvězněny“, dobře vidět (Xe1 až Xe4), neboť rentgenové paprsky atomy s mnoha elektrony (atomové číslo Xe: 54) snadno zobrazují. Analýza molekulární dynamiky (P. Schmidke et al., Bioinformatics 27, 2011, 3276-3285) naznačila cestu, jakou kyslík z distální kavity („distal pocket“, DP) může uniknout (nebo k ní vniknout): DP→Xe4→Xe2→Xe3→Exit



Přechody mezi jednotlivými místy na trase DP→Xe4→Xe2→Xe3→Exit jsou možné jen díky tomu, že atomy proteinu nejsou statické, ale vykonávají vibrační a rotační pohyby (např. metylové skupiny X-CH₃ se mohou otáčet kolem osy X-C). Díky těmto pohybům se mezi jednotlivými místy DP, Xe4, Xe2 atd. krátkodobě otvírají kanálky, kterými “uvězněná” molekula (Xe, O₂, CO) může difundovat z jednoho místa na druhé.

Na příkladu myoglobinu jsme si tedy ukázali, že k pochopení funkce biomolekul nestačí znát jejich statickou strukturu, musíme znát i dynamiku této struktury. Ve druhé části přednášky si vysvětlíme, jak se dynamika biomolekul studuje.



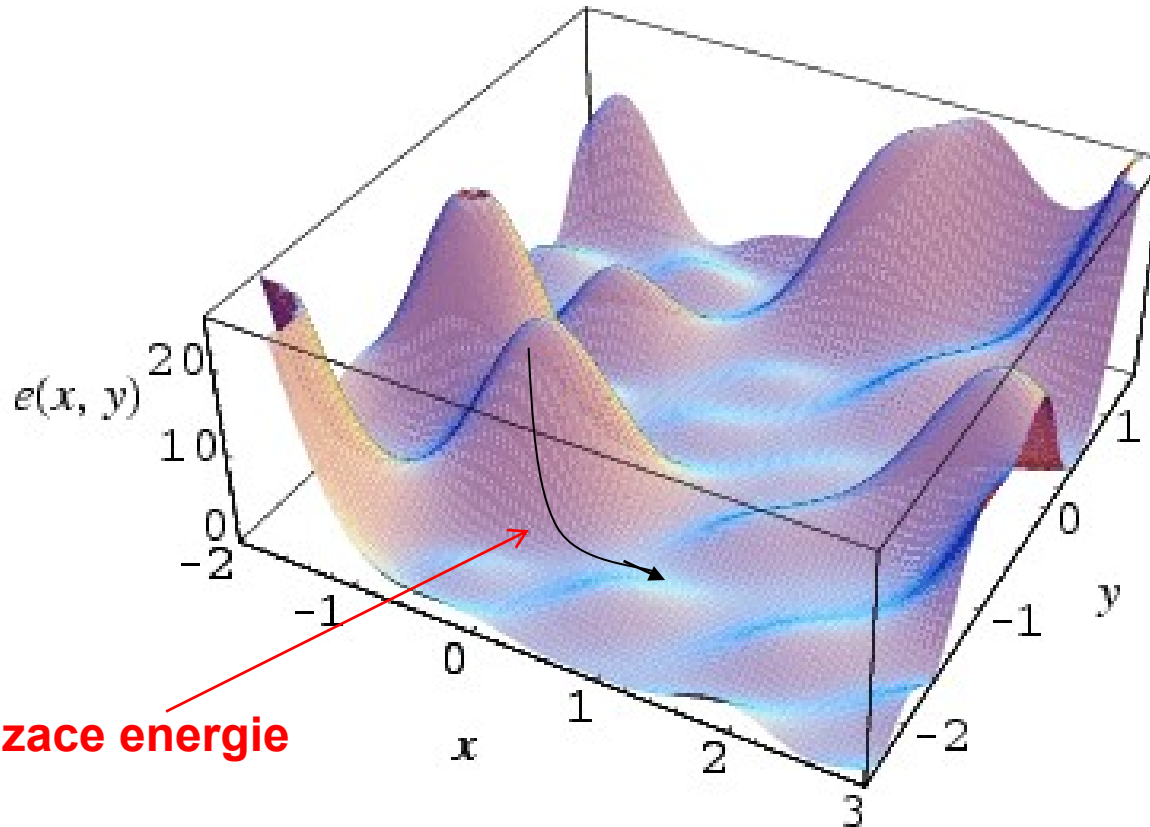
Konformační dynamika makromolekul

Biologické makromolekuly nejsou rigidní. Jejich struktury vykazují různé stupně volnosti:

- Vazby a vazebné úhly vibrují kolem rovnovážných poloh
- Jednoduché vazby umožňují rotaci a tím konformační změny
- Cyklické podjednotky (např. cukry) přecházejí mezi energeticky výhodnými konformacemi (pro ribózu: N a S)

Jednotlivé konformace se liší stabilitou. Stabilitu konformace **k** (závislou na souřadnicích x_{ki} , y_{ki} , z_{ki} všech atomů **i**) určuje její potenciální energie **E**.

Potenciální energie v závislosti na dvou souřadnicích (v n-atomové molekule je souřadnic 3n)

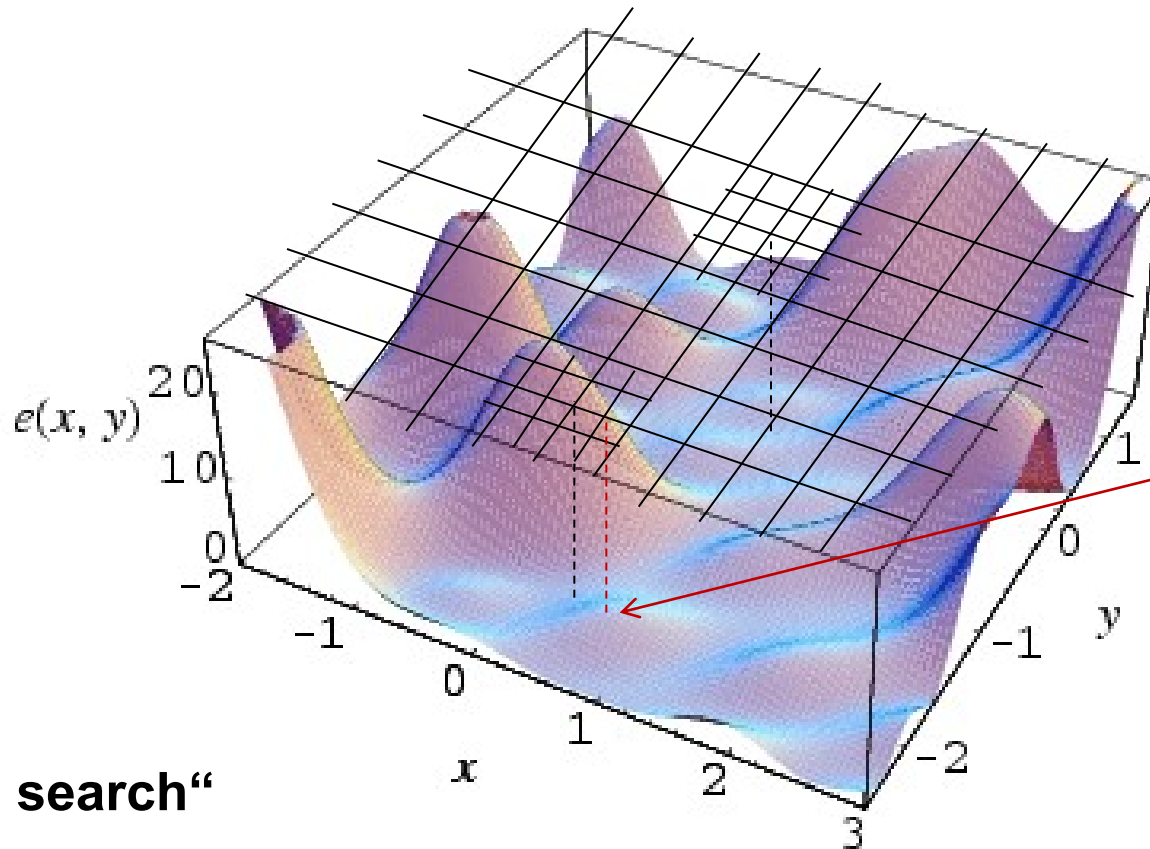


minimalizace energie

Při výzkumu biomolekul nás zajímají především:

1. Nejstabilnější konformace (konformace s nejnižší energií)
→ hledáme metodou **minimalizace energie**
2. Konformační změny v závislosti na čase při dané teplotě
→ popisujeme **simulacemi molekulární dynamiky**

Metody minimalizace energie



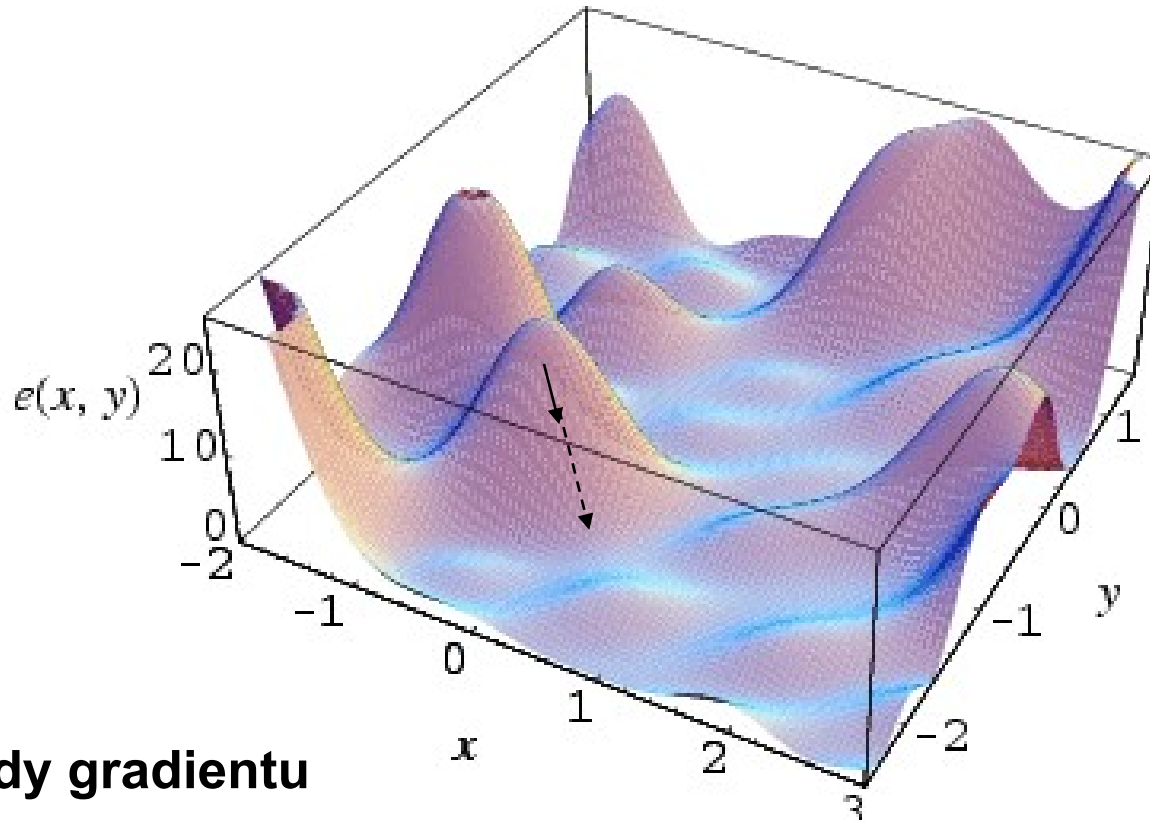
**Nejnižší energie.
Zde vytvoříme nový,
ještě jemnější raster,
atd.**

1. „Grid search“

- Zvolíme raster intervalů na obou osách, pro každý pár hodnot vypočteme energii
- Kolem bodů s nejnižší energií vytvoříme raster menších intervalů, opět vypočteme energii a takto dále zjemňujeme, dokud pokles energie v posledním kroku neklesne pod zadanou prahovou hodnotu

Grid search používá pouze výpočet energie, nikoliv jejích derivací.

Metody minimalizace energie



2. Metody gradientu

- Vypočítáme gradient (vektor růstu) energie. Pro molekulu tvořenou n atomy je rozměr gradientu $3n$ (matice parciálních derivací energie podle atomových souřadnic). **Pozor, šipka znázorňuje gradient s negativním znaménkem.**
- Posuneme souřadnice atomů ve směru negativního gradientu energie. Pro určení koeficientu, kterým negativní gradient znásobíme, abychom obdrželi posuny atomů, používáme různé algoritmy. Tento krok opakujeme, až pokles energie klesne pod zadanou prahovou hodnotu.

Výpočet potenciální energie
 E_{total} pro danou konformaci
 molekuly:

známé z experimentů nebo výpočtů

ideální vazby

ideální úhly

deformace vazeb

deformace vazeb. úhlů

E_{total}

$$= \sum_{\text{bonds}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2$$

ideální torzní úhly

$$+ \sum_{\text{torsions}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))$$

deformace torzních úhlů

nevazebné kontakty

$$+ \sum_{\substack{i=1 \\ \text{atoms}}}^N \sum_{\substack{j=i+1 \\ \text{1...N}}}^N \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right)$$

Lennard-Jones

Coulomb

Výpočet potenciální energie
 E_{total} pro danou konformaci
 molekuly:

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

"harmonická aproximace"
 ideální vazby
 ideální úhly
 ideální torzní úhly
 deformace vazeb
 deformace vazeb. úhlů
 deformace torzních úhlů
 ne vazebné kontakty
 Lennard-Jones
 Coulomb

Výpočet potenciální energie
 E_{total} pro danou konformaci
 molekuly:

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

deformace vazeb deformace vazeb. úhlů harmonická aproximace
 ideální vazby ideální úhly
 ideální torzní úhly
deformace torzních úhlů
Lennard-Jones Coulomb
nevazebné kontakty
 Pauli repulsion dispersion energy

Výpočet potenciální energie
 E_{total} pro danou konformaci
molekuly:

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

deformace vazeb deformace vazeb. úhlů harmonická aproximace
ideální vazby ideální úhly
ideální torzní úhly deformace torzních úhlů
nevazebné kontakty Lennard-Jones Coulomb
Pauliho repulse dispersní energie electrostatika

Simulace molekulární dynamiky (MD)

Popisují pohyb molekul a atomů v molekule pomocí zákonů klasické mechaniky, tak, aby byly splněny základní podmínky:

1. Kinetická energie všech atomů odpovídá teplotě, kterou simulujeme
2. Velikosti kartézských složek rychlosti mají Gaussovo rozdělení

K nastartování simulace makromolekuly (např. proteinu) potřebujeme smysluplný model, který by měl mít určitou stabilitu (jinak se molekula při simulaci “rozpadne“). Ten získáme např. z krystalové struktury.

Atomům v molekule přiřadíme náhodné rychlostní vektory tak, aby celková okamžitá kinetická energie odpovídala teplotě (např 300 K). Algoritmus generující náhodné rychlostní vektory je součástí každého programu simulací MD. Vycházejí z rozložení pohybu na infinitezimální časové úseky dt . Síla působící na jednotlivé atomy je vypočtena derivace energie podle atomových souřadnic. Zrychlení každého atomu i je pak definováno Newtonovými pohybovými rovnicemi $a_i = F_i / m_i$, a_i je předpokládáno konstantní během každého sudého intervalu $1/2dt$ a nulové během každého lichého (viz následující diapozitiv). Nejznámější algoritmus pro výpočet atomových souřadnic na konci každého krůčku je **Verletův algoritmus**. Posuny atomů se v něm počítají na základě střední rychlosti pro daný časový interval.

Verlet algorithm



$v = \text{const.}$

$a = \text{const.}$

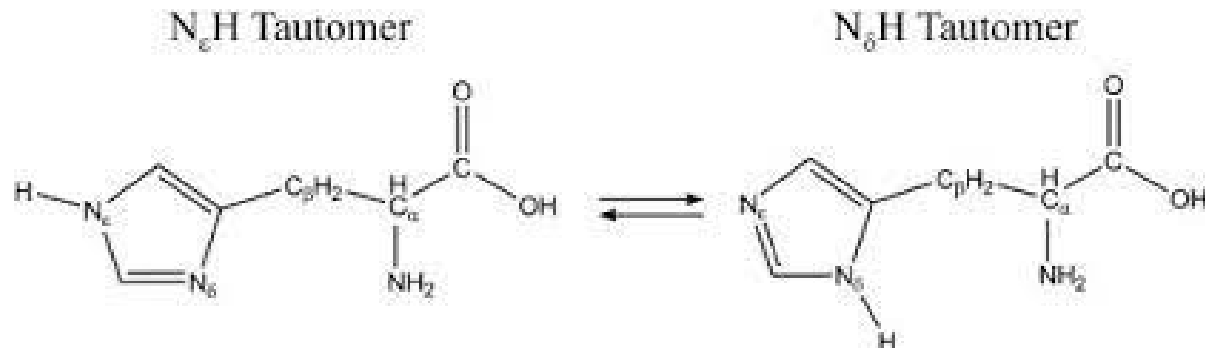
$v = \text{const.}$

$a = \text{const.}$

Každý lichý násobek $1/2\delta t$ aktualizujeme souřadnice, síly a vektory zrychlení

Každý sudý násobek $1/2\delta t$ aktualizujeme vektory rychlosti

Cvičení



- A) Aminokyselina histidin existuje ve dvou izomerních formách lišících se v poloze vodíkového atomu v pětičlenném heterocyklickém kruhu postranního řetězce (viz obrázek nahoře). Takové izomery se nazývají tautomery, v případě histidinu se označují jako tautomer N_δ tautomer N_ε, podle toho, na který atom dusíku je vázán atom vodíku. V proteinech se vyskytují obě tautomerní formy, v závislosti na tom, kterou formu konkrétního histidinu interakce s okolím energeticky zvýhodňují.

Pomocí programu VMD proveďte inspekci vazebného místa pro hem a kyslík ve struktuře 1mbo a prozkoumejte pozorně okolí proximálního a distálního histidinu. Rozhodněte pro oba histidiny, ve které tautomerní formě se preferenčně každý z nich nachází. Své rozhodnutí odůvodněte.

(V rentgenových strukturách proteinů zpravidla vodíkové atomy nelze lokalizovat.)

- B) Vyzdvihněte vlastními slovy, co nejdůležitějšího jste se v dnešní přednášce naučili.

1. Myoglobin
2. Simulace molekulární dynamiky **NEPOVINNÉ**

Věnujte každé části půl až maximálně celou stránku A4.

Cvičení mi zašlete mailem do 11.12.