

**Molecular dynamics investigation of the structure-function relationships in proteins with examples
from Hsp70 molecular chaperones, α A-crystallin, and sericin**

**Badanie metodą dynamiki molekularnej zależności między strukturą a funkcją białek na
przykładzie molekularnych chaperonów Hsp70, α A-krystaliny i serycyny**

Rozprawa doktorska

Ewa Irena Gołaś

STRESZCZENIE

Badanie zależności między strukturą a funkcją białek i innych makromolekuł biologicznych jest jednym z głównych zagadnieniem nauk o życiu. Ważnym celem takich badań jest poznanie oddziaływań wewnątrz- i między molekularnych niezbędnych do funkcjonowania układów biologicznych. Pojęcie zależności między strukturą i funkcją jest bardzo szerokie—po jednej stronie znajdują się białka opiekuńcze, których funkcją jest doprowadzenie do przyjmowania prawidłowej struktury przez inne białka, zaś na przeciwnym końcu znajdują się białka strukturalne (np. budujące mięśnie), których funkcją jest występowanie w ściśle określonej strukturze. Zrozumienie zagadnienia zatem polega na zbadaniu wzajemnej zależności pomiędzy strukturą i funkcją w przykładach biologicznych. W mojej pracy doktorskiej badałam zależności struktura-funkcja dla trzech białek: białka opiekuńczego Hsp70 (Heat shock protein 70kDa), α A-krystaliny oraz biopolimeru składającego się głównie z serycyny. Białko Hsp70, jako białko opiekuńcze, znajduje się przy jednym końcu zakresu badanych zagadnień, odpowiada bowiem za prawidłowo zwiniętą strukturę innych białek, które są jej substratami. α A-krystalina znajduje się po środku: spełnia funkcję białka opiekuńczego oraz jednocześnie spełnia rolę strukturalną w soczewce oka kręgowców. Praca nad biopolimerem serycynowym umożliwiła zaś zaprojektowanie metodami chemii obliczeniowej nowego biodegradowalnego materiału elastycznego. Ponieważ zależność struktura-funkcja obejmuje zjawiska, które zachodzą na poziomie mikroskopowym, głównym

narzędziem badań była dynamika molekularna, która umożliwia zrozumienie zagadnienia na poziomie mobilności poszczególnych części białka oraz zachodzących w niej zmian konformacyjnych.

Białka opiekuńcze Hsp70 składają się z dwóch poddomen: poddomeny wiążącej nukleotydu (NBD), będącej ATP-azą, oraz poddomeny wiążącej substrat (SBD). Złożona sieć oddziaływań allosterycznych przekazuje wzajemnie informacje dotyczące stanu wiązania obu subdomen. Zachowanie poddomeny NBD (*Bos Taurus*, pdb 3C7N:B) w zależności od rodzaju związanego nukleotydu było badane metodą dynamiki molekularnej, przy użyciu pola siłowego AMBER. Po przeprowadzeniu kanonicznych symulacji dynamiki molekularnej, trajektorie były podane analizie Essential Dynamics (metoda oparta na analizie głównych składowych, PCA), która umożliwiła określenie dynamiki białka jako superpozycji ruchów opisywanych przez wektory własne macierzy wariancji-kowariancji współrzędnych odpowiadające największym wartościom własnym. Dominującym ruchem okazał się obrót składowych poddomen względem siebie, co zgadza się z wynikami badań NMR. Zmianę orientacji poddomen wobec siebie można opisywać jako zmianę kątów określających wzajemną orientację jej dwóch części w płaszczyźnie głównej (δ) oraz w płaszczyźnie prostopadłej (τ) do płaszczyzny głównej domeny NBD. Jednocześnie występują ruchy poszczególnych fragmentów na powierzchni białka oraz na styku jego poddomen. Te fragmenty o zwiększonej mobilności ('hotspots') stanowią miejsca kluczowe w allosterycznej sieci domeny NBD. W zależności od stanu wiązania nukleotydu, ruchy obejmowały odrębne zestawy punktów allosterycznych. Niektóre miejsca wyznaczone w obecnych badaniach jako punkty allosteryczne pokrywają się z regionami zasugerowanymi eksperymentalnie. Ponadto w przypadku wiązania ATP, udział ruchów allosterycznych w dynamice białka jest nieco większy co powoduje, że względne ruchy obrotowe domen w płaszczyźnie domeny NBD i poza nią są bardziej ze sobą skorelowane..

Symulacje dynamiki całego białka opiekuńczego DnaK (Hsp70 z *E. Coli*; pdb 2KHO) przeprowadziłam przy użyciu gruboziarnistego modelu oraz pola siłowego UNRES. Stan wiązania nukleotydu był symulowany poprzez wprowadzenie harmonicznym potencjałów ograniczających na

odległości w obrębie domeny NBD, odpowiadające stanowi niezwiązanemu bądź związanemu z ADP oraz stanowi związanemu z ATP. Na podstawie przeprowadzonych symulacji dynamiki Langevina wyodrębniłam trzy typy struktur, w których SBD wiąże się (niekowalennie) z NBD. Pierwszy typ wiązania, zwanym typem I, polegał na otwarciu obu części domeny SBD i związanie poddomeny α z poddomeną I domeny NBD, a poddomeny β z poddomeną II NBD. Drugi typ wiązania, zwanym typem II, polegał na odwróceniu orientacji poddomen α i β o 180 stopni. Poddomena β lokalizowała się nad granicą poddomen I i II domeny NBD, a poddomena α znajdowała się po przeciwnej stronie domeny NBD. Trzeci typ wiązania, zwanym wiązaniem zamkniętym, polegał na wiązaniu zamkniętej domeny SBD do domeny NBD. Mimo że, wszystkie stany wiązania wykazały powinowactwo do wiązania zamkniętej domeny SBD z NBD, preferencja do otwarcia domeny SBD oraz dalsze jej związanie zależały od rodzaju nukleotydu. Wiązanie ATP powodowało największe prawdopodobieństwo występowania struktur związanych typu I i typu II. Takie zachowanie jest zgodne z eksperymentem, gdyż białko wiążące cząsteczkę ATP wykazuje najmniejsze powinowactwo do substratu a zatemotwarcie SBD sprzyjało utracie substratu. W przypadku stanu związanego z ADP, domena SBD wiąże się z domeną SBD głównie w postaci zamkniętej, co powoduje zmniejszenie prawdopodobieństwa jej występowania w konformacji otwartej, która nie wiąże substratu. Dla struktur związanych z ATP występowała również największa częstotliwość pojawiania się struktur związanych typu I. Struktura tego typu została zaproponowana przez innych badaczy jako struktura konformacji związanej z ATP a już po zakończeniu moich badań pojawiła się pierwsza struktura DnaK związanego z ATP, która była bardzo bliska strukturze obliczonej przeze mnie. Funkcja białka Hsp70 jest zatem określona poprzez dynamikę NBD, która zależy od rodzaju związanego nukleotydu, oraz oddziaływania między domenami białka.

Przeprowadziłam symulacje sterowanej dynamiki molekularnej (Steered Molecular Dynamics) białka α A-krystaliny (z *B. Taurus*, pdb 3L1E), używając pola siłowego AMBER. Symulacje SMD polegają na zewnętrznej sile rozciągającej układ podczas symulacji dynamiki molekularnej. W przypadku α A-krystaliny, została wprowadzona siła rozciągająca która rozciągała białko wzdłuż swojej osi głównej.

Badalam wpływ podstawienia reszty D-aminokwasu na właściwości mechaniczne oraz strukturalne białka. Racemizacja aminokwasów jest naturalnie zachodzącym oraz szkodliwym zjawiskiem w soczewce oka, stanowiąc jedną z wielu możliwych modyfikacji postranslacyjnych (PMT) α A-krystaliny; spodziewanym jej skutkiem jest zaćma oraz twardnienie soczewki (co jest jednym z czynników powodujących dalekowzroczność starczą). Przeprowadziłam symulacje SMD trzech układów, w których wprowadziłam pojedynczą mutację reszty L-aminokwasową do reszty D-aminokwasowej oraz białka natywnego. Do analizy wyników użyłam metody podobnej do Essential Dynamics—w tym przypadku, zamiast współrzędnych kartezyjskich atomów użyłam ‘ogniw strukturalnych’ (‘structural links’). Ogniwa strukturalne wskazują na obecność oddziaływań między dwoma resztami w strukturze białka—często odzwierciedlają one zatem istnienie elementu struktury drugorzędowej, takiej jak np. β -kartki lub α -helisy. Ogniwo może również wskazywać na obecność innego kontaktu międzyłańcuchowego. Wektory własne wynikające z takiej analizy korelują siłę rozciągającą z określonym zestawem ogniw strukturalnych. Natura efektu wywołanym racemizacją oraz jego wpływ na właściwości mechaniczne jak i strukturalne białka były ściśle powiązane z lokalizacją wprowadzonej mutacji. Ogólnym skutkiem była zmiana sztywności poszczególnych elementów strukturalnych występujących w białku. Wzrost sztywności był spowodowany reorganizacją ogniw strukturalnych względem struktury natywnej. Zmniejszenie sztywności było wywołane zanikaniem zestawu ogniw strukturalnych występujących w strukturze natywnej oraz zanikaniem korelacji tych ogniw z siłą. Następstwem tych procesów były zmiany ścieżki rozwijania białka. Zmiany sztywności elementów strukturalnych oraz pojawienie się nowych pośrednich konformacji podczas rozwijania wiążą się z podwyższonym ryzykiem niepożądanych oddziaływań, prowadzących do aglomeracji. Zależność struktura-funkcja występująca w α A-krystalinie jest zatem relacją złożoną, ściśle powiązaną z miejscem, w którym występuje racemizacja, która istotnie wpływa na właściwości mechaniczne jak i strukturalne rozwijającego się białka.

W ostatniej części mojej pracy zaprojektowałam oraz zbadalam pod kątem właściwości mechanicznych biopolimer oparty na serycynie. Badania przeprowadziłam metodą symulacji SMD z

wykorzystaniem pola siłowego AMBER. Serycyna występuje jako uboczny produkt podczas procesu oczyszczania jedwabiu. W przeciwieństwie do jedwabiu, struktura serycyny jest niejednorodna, z przewagą występowania statystycznego kłęбка. Wprowadzenie serycyny do syntetycznych polimerów powoduje, że stają się one biodegradowalne oraz wykazują inne (często możliwe do dostosowania) właściwości, takie jak absorpcja wody, właściwości antyoksydacyjne lub ochrona przed promieniowaniem UV. Biomateriały składające się z czystej serycyny są jednak kruche. Struktura jedwabiu włóczkowego jest natomiast wysoko zorganizowana, a jej właściwości fizyczne są związane z występowaniem poszczególnych motyw strukturalnych. Elastyczność jedwab zawdzięcza motywowi elastycznemu, który przypomina strukturalnie sprężynę. W moich badaniach zaprojektowałam nowy biopolimer, w którego skład wchodzi monomery serycyny oraz motywu elastyny. Właściwości mechaniczne zaprojektowanego polimeru przetestowałam przy pomocy symulacji SMD. Biopolimer złożony z czystej serycyny służył jako punkt odniesienia. Elastyczność każdego polimeru była zbadana poprzez wtórne rozciąganie, które zostało przeprowadzone po pierwotnym rozciągnięciu i następującym po nim okresie równowagowania, przeprowadzonego za pomocą kanonicznej symulacji MD. Oba biopolimery w pierwotnych etapach rozciągania zachowały się podobnie: przyłożenie siły wywoływało rozwijanie struktury statystycznego kłęбка serycyny; proces ten zachodził nawet pod wpływem małej siły. Dopiero po osiągnięciu stanu, w którym ulegały deformacji wiązania między monomerami, polimer złożony z czystej serycyny wykazywał duży wzrost odpowiedzi na przyłożoną siłę, z powodu rozciągania wiązań chemicznych. W przeciwieństwie do tego, rozwijanie biopolimeru składzie dualnym w odpowiedzi na przyłożoną siłę było kontynuowane bez znacznych zmian odpowiedzi na przyłożoną siłę—zachodziło tutaj rozwijanie się motywu elastycznego. Próba ponownego rozciągnięcia polimeru złożonego z czystej serycyny potwierdziła, że jego deformacja była permanentna a zatem że jest on biomateriałem o ograniczonych właściwościach elastycznych. Biopolimer z motywem elastycznym odpowiadał na przyłożoną ponownie siłę podobnie jak po pierwszym jej przyłożeniu, co świadczy o podwyższonej wytrzymałości oraz elastyczności tego materiału. Znane zależności struktura-funkcja

występujące w przypadku jedwabiu pozwoliły zatem na zaprojektowanie oraz przetestowanie *in silico* kandydata na biopolimer o pożądanych właściwościach mechanicznych.

Podsumowując, w mojej rozprawie doktorskiej zbadalam zależność między strukturą i funkcją trzech białek, pełniących różne role biologiczne. Badania te stanowią ilustrację molekularnych narzędzi, które przyroda wykorzystuje do zapewnienia funkcjonowania organizmów żywych oraz tego, jak można w oparciu o te narzędzia projektować materiały o pożądanych cechach.