



Imię i nazwisko autora rozprawy: **Beata Adamczak**

Dyscyplina naukowa: **Chemia Fizyczna**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

Wpływ osmolitów na stabilność białek w oparciu o metodę dynamiki molekularnej.

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

Effect of osmolytes on protein stability revealed by molecular dynamics simulations.

Promotor: **prof. dr hab. inż. Janusz Stangret**

Promotor pomocniczy: **dr hab. inż. Jacek Czub, prof. PG**

Gdańsk, 2018

Pragnę podziękować wszystkim,
którzy przyczynili się do powstania
tej pracy. W szczególności dziękuję
Prof. dr hab. inż. Januszowi Stangretowi oraz
Dr hab. inż. Jackowi Czubowi, prof. PG.

Spis treści

Wykaz skrótów	v
1 WPROWADZENIE	1
2 PRZEGLĄD LITERATURY	2
2.1 Białka	2
2.1.1 Budowa chemiczna i strukturalna białek	2
2.2 Oddziaływania osmolitów z białkami	4
2.3 Zastosowanie osmolitów	5
2.4 Modelowe białka – lizozym, ubikwityna, β -hairpin, Trp-cage	6
2.5 Wpływ temperatury na równowagę reakcji rozwijania białek	7
2.6 Mechanizm stabilizacji białek	8
3 CELE I ZAŁOŻENIA	15
4 METODYKA BADAWCZA	16
4.1 Podstawy teoretyczne metody	16
4.1.1 Dynamika molekularna	16
4.1.2 Algorytmy całkowania równań ruchu	17
4.1.3 Krok czasowy	19
4.1.4 Temperatura, ciśnienie	19
4.1.5 Periodyczne warunki brzegowe	19
4.1.6 Pola siłowe	20
4.2 Procedura symulacyjna	26
4.2.1 Wpływ osmolitów na stabilność białek na przykładzie mechanicznego rozwijania lizozymu	26
4.2.2 Czy wszystkie osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni białek?	28
4.2.3 Wpływ osmolitów na stabilność białek na przykładzie mechanicznego rozwijania ubikwityny	29
4.2.4 Wpływ osmolitów na termiczną stabilność białek	31
4.2.5 Czy istnieje szansa wyznaczenia parametru charakteryzującego wpływ wybranych osmolitów na równowagę konformacyjną białka dla zadanej sekwencji aminokwasowej w oparciu o sumowanie elementarnych wkładów?	33
4.3 Analiza danych	34
4.3.1 Średnie odchylenie kwadratowe (z ang. root-mean square deviation, RMSD)	34
4.3.2 Wiązania wodorowe (z ang. hydrogen bonds)	35
4.3.3 Liczba cząsteczek w kontakcie z białkiem	35
4.3.4 Lokalny współczynnik podziału dla osmolitu – C_O	35
4.3.5 Współczynnik preferencyjnego oddziaływania – Γ	36

4.3.6	Radialna funkcja preferencji – $f_O(r)$	36
4.3.7	Średnia ważona funkcja preferencji	36
4.3.8	Powierzchnie dostępne dla rozpuszczalnika (z ang. solvent accessible surface area, SASA)	37
4.3.9	Współczynniki $\Delta\Gamma$ dla modelowych białek	37
4.4	Sprzęt i oprogramowanie komputerowe	37
5	WYNIKI I ICH DYSKUSJA	39
5.1	Wpływ osmolitów na stabilność białek na przykładzie mechanicznego rozwijania lizozymu	40
5.1.1	Wspólna ścieżka wymuszonego rozwijania	40
5.1.2	Praca rozwijania jako miara przesunięcia równowagi denaturacji wywołanej przez cząsteczki osmolitu	42
5.1.3	Analiza wiązań wodorowych ujawnia istotne różnice między rozwijaniem lizozymu w obecności cząsteczek betainy i mocznika	45
5.1.4	Wykluczanie cząsteczek betainy i akumulacja cząsteczek mocznika jako zjawisko ogólne	49
5.1.5	Termodynamiczna analiza oddziaływań ujawnia istotę akumulacji i wykluczania cząsteczek osmolitu	53
5.1.6	Podsumowanie	57
5.2	Czy wszystkie osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni białek?	59
5.2.1	Podsumowanie	63
5.3	Wpływ osmolitów na stabilność białek na przykładzie mechanicznego rozwijania ubikwityny	64
5.3.1	Praca rozwijania jako miara przesunięcia stanu równowagi wywołanej przez cząsteczki osmolitu	64
5.3.2	Ciśnienia osmotyczne przyczyną stabilizacji? Walidacja modelu cząsteczki betainy.	66
5.3.3	Wykluczanie osmolitu jako funkcja symulowanego momentu dipolowego w przypadku cząsteczek betainy	69
5.3.4	Czy efekt stabilizacyjny jest związany ze zmniejszeniem solwatacji?	75
5.3.5	Podsumowanie	77
5.4	Wpływ osmolitów na termiczną stabilność białek – symulacje białka Trp-cage w roztworach mocznika i betainy metodą replik temperaturowych (REMD)	79
5.4.1	Wzrost temperatury przyczyną zwiększenia wykluczania cząsteczek betainy oraz zmniejszenia akumulacji cząsteczek mocznika na powierzchni białka Trp-cage	79
5.4.2	Entalpowa siła napędowa dla asocjacji cząsteczek mocznika i betainy do powierzchni białka Trp-cage zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury	80
5.4.3	Słabsze oddziaływania białko-osmolit w wyższych temperaturach są odpowiedzialne za zmniejszoną akumulację cząsteczek osmolitu na powierzchni białka	84
5.4.4	Podsumowanie	86
5.5	Czy istnieje szansa wyznaczenia parametru charakteryzującego wpływ wybranych osmolitów na równowagę konformacyjną białka dla zadanej sekwencji aminokwasowej w oparciu o sumowanie wkładów elementarnych?	87
5.5.1	Podsumowanie	91
6	PODSUMOWANIE	95



7 STRESZCZENIE	98
8 SUMMARY	99
9 DOROBEK NAUKOWY	100
9.1 Publikacje	100
9.2 Doniesienia konferencyjne	100
9.3 Udział w projektach badawczych	101
9.4 Szkoły letnie	101
10 ZAŁĄCZNIKI	102

Wykaz skrótów

Arg	Arginina
Betaina	N,N,N-trimetyloglicyna
BSA	Surowicza albumina wołowa (z ang. B ovine S erum A lbumin)
ΔC_p	Zmiana pojemności cieplnej podczas zwiżania białka
C_O	Lokalny współczynnik podziału
DSC	Skaningowa kalorymetria różnicowa (z ang. D ifferential S canning C alorimetry)
E_{COUL}	Energia oddziaływań elektrostatycznych
E_{LJ}	Energia oddziaływań van der Waalsa
$f_O(\mathbf{r})$	Radialna funkcja preferencji
Γ	Współczynnik preferencyjnego oddziaływania
$\Delta H_o(\mathbf{r})$	Entalpia oddziaływania między pojedynczą cząsteczką osmolytu a środowiskiem
$\Delta H_w(\mathbf{r})$	Entalpia oddziaływania między pojedynczą cząsteczką wody a środowiskiem
$\Delta H(T_m)$	Entalpia zwiżania białka w jego „temperaturze topnienia”
Lys	Lizyna
MD	Dynamika Molekularna
NPT	Stała liczba cząstek (N), ciśnienie (P) i temperatura (T)
PME	Metoda sieci Ewalda (z ang. P article M esh E wald)
$P(\mathbf{r})$	Średnia ważona funkcja preferencji
REMD	Dynamika molekularna z wymianą replik (z ang. R eplica E xchange M olecular D ynamics)
R_{gyr}	Promień bezwładności (promień żyracji, z ang. R adius of g yratation)
R_{OO}	Rozkład odległości międzycząsteczkowych tlen-tlen wody
RMSD	Średnie odchylenie kwadratowe (z ang. R oot- M ean- S quare D eviation)
SASA	Powierzchnia dostępna dla rozpuszczalnika (z ang. S olvent A ccessible S urface A rea)
TMT	Trimetylotauryna



Rozdział 1

WPROWADZENIE

Zwijanie oraz rozwijanie białek to podstawowe procesy, które odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmów i w związku z tym są one szeroko badane przez naukowców od wielu lat. Mają one również kluczowe znaczenie dla przebiegu wielu procesów biotechnologicznych oraz związanych z nią gałęzi nauki i przemysłu. Wiele czynników, takich jak: temperatura, pH czy ciśnienie może wpływać na równowagę między stanem zwiniętym i rozwiniętym białek. Równowaga konformacyjna może być również modulowana poprzez dodatek drobnocząsteczkowych organicznych substancji rozpuszczonych, które ze względu na swoją aktywność osmotyczną bywają nazywane osmolitami. Związki tego rodzaju są akumulowane w żywych komórkach w warunkach ekspozycji na warunki hipertoniczne, zapobiegając nadmiernej utracie wody. W zależności od rodzaju osmolitu mogą one działać na zwiniętą formę białka stabilizująco (betaina, TMAO, prolina) bądź destabilizująco (mocznik).

Rozważa się dwa główne rodzaje mechanizmu: bezpośredni oraz pośredni, które próbują wyjaśnić stabilizujące bądź destabilizujące działanie osmolitów na białka. Bazują one na koncepcjach, odpowiednio, preferencyjnego oddziaływania osmolitu z białkiem oraz modyfikacji właściwości wody solwatacyjnej. Mimo wieloletnich badań, szczegółowy molekularny mechanizm przesuwania równowagi konformacyjnej białek przez osmolity nadal nie jest jeszcze w pełni poznany.

Metoda dynamiki molekularnej umożliwia opis zachowania układów bezpośrednio na poziomie molekularnym, dzięki czemu bywa coraz częściej wykorzystywana do wyznaczenia preferencyjnych oddziaływań osmolitów z poszczególnymi elementami strukturalnymi białka. Co więcej, symulacje metodą dynamiki molekularnej mogą efektywnie wspomóc interpretację wyników doświadczalnych.



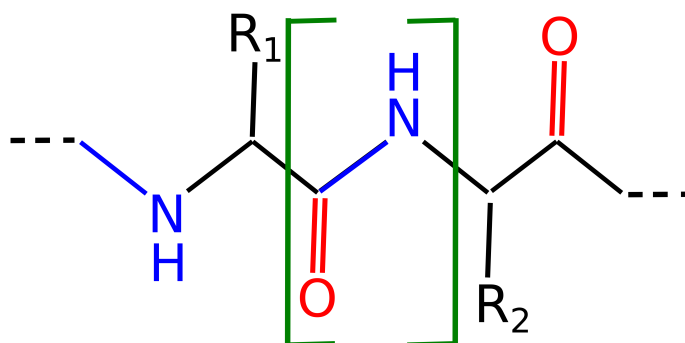
Rozdział 2

PRZEGLĄD LITERATURY

2.1 Białka

2.1.1 Budowa chemiczna i strukturalna białek

Białka są makrocząsteczkami, które mają ogromne znaczenie dla przebiegu procesów biologicznych. Pełnią one wiele ważnych funkcji, m.in. budulcową, immunologiczną i enzymatyczną. Zbudowane są z aminokwasów, połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi (Rysunek 2.1):



RYSUNEK 2.1: Wiązanie peptydowe.

Ugrupowania peptydowe tworzą płaskie układy atomów o ograniczonej rotacji. Mają one kluczowe znaczenie dla tworzenia się struktur przestrzennych białek, zwanych także konformacjami. Strukturę białek charakteryzuje się, wyróżniając następujące struktury:

- pierwszorzędowa – sekwencja aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym
- drugorzędowa (α -helisy, β -kartki, pętle) – lokalny sposób skręcania łańcucha polipeptydowego
- trzęciorzędowa – trójwymiarowa struktura całego łańcucha polipeptydowego
- czwartorzędowa – przestrzenne ułożenie białek zbudowanych z więcej niż z jednego łańcucha polipeptydowego

Oprócz wiązań peptydowych duże znaczenie w formowaniu się struktur przestrzennych białek mają ograniczenia steryczne oraz rodzaj aminokwasów wchodzących w skład białka. W białkach powszechnie występuje dwadzieścia różnych aminokwasów, których łańcuchy boczne różnią się: wielkością, kształtem, aromatycznością, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych oraz hydrofobowością. Rodzaj aminokwasów ma wpływ na formowanie się struktury natywnej białka. Aminokwasy hydrofobowe, do których należą: alanina, cysteina, fenyloalanina, izoleucyna, leucyna, metionina, prolina, tryptofan i walina, odgrywają istotną rolę w procesie związania się białek. Stabilizują one strukturę przestrzenną białek poprzez tzw. efekt hydrofobowy [1]. Niepolarne łańcuchy boczne takich aminokwasów mają tendencję do unikania kontaktu z polarnymi cząsteczkami wody, umiejscawiając się w rdzeniu natywnej struktury białek. Istotne znaczenie w tworzeniu się struktur białek odgrywa także cysteina, w której w łańcuchu bocznym występuje grupa tiolowa. Poprzez tą grupę cysteina może tworzyć mostki disiarczkowe. Struktura przestrzenna białek i jej formowanie są niezmiernie istotne dla funkcjonowania żywych komórek i są w związku z tym przedmiotem wielu badań [2–5].

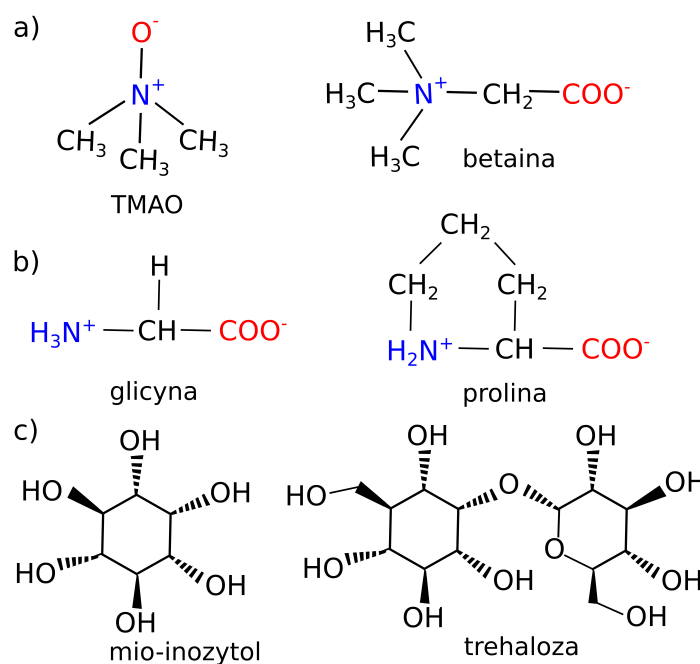
Wiadomo, że zasadniczą rolę w utrzymaniu struktury, stabilności i funkcji białek odgrywają cząsteczki wody [6]. Białka mogą oddziaływać z wodą poprzez tworzenie wiązań wodorowych. W roztworach wodnych białek można wyróżnić: wodę związaną bezpośrednio wiązaniami wodorowymi z białkiem, wodę zaburzoną przez białko, ale niezwiązaną z nim bezpośrednio wiązaniami wodorowymi oraz wodę charakteryzującą się strukturą i właściwościami czystej wody (o właściwościach takich jak we wnętrzu roztworu) tzw. wodę objętościową (z ang. bulk) [6–8]. W celu skrócenia, w dalszej części pracy będę używać sformułowania „woda objętościowa”.

Stabilność strukturalną białka można scharakteryzować przez położenie stanu równowagi między stanem natywnym a rozwiniętym (zdenaturowanym) białka. Zwijanie oraz rozwijanie białek to podstawowe procesy, które odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu komórek, organizmów i w związku z tym są one szeroko badane przez naukowców od wielu lat [2–5, 9]. Wiele czynników, takich jak: temperatura [10], pH czy ciśnienie [11, 12] może wpływać na tę równowagę. Równowaga konformacyjna może być również modulowana poprzez obecność niewielkich cząsteczek organicznych – osmolitów, które są akumulowane w żywych komórkach w warunkach ekspozycji na warunki hipertoniczne, zapobiegając nadmiernej utracie wody [13–18].

2.2 Oddziaływania osmolitów z białkami

Jak już wcześniej wspomniano, osmolity są to małe, organiczne substancje rozpuszczone. Występują one w komórkach żywych [18, 19], gdzie pełnią szereg ważnych funkcji, między innymi odgrywają ważną rolę w procesie fałdowania się białek. Cząsteczki te mogą wpływać na stabilność strukturalną i termiczną białek oraz innych makromolekuł, [20, 21] asocjację białko-białko oraz białko-DNA [22] a także na stopień odwracalności przejścia między stanem zwiniętym i rozwiniętym białka [18, 21, 23]. Osmolity regulują ciśnienie osmotyczne w cytoplazmie [17, 24]. Są niezbędne do kontroli procesów odbywających się w komórkach żywych. Pomagają one przeżyć komórkom w ekstramalnych warunkach, takich jak: wysoka temperatura, duża wilgotność czy wysoki poziom zasolenia [17, 18, 24]. Bardzo istotne znaczenie odgrywają podczas stresu osmotycznego ochraniając organizmy, organy (m.in. nerki), komórki [17, 23]. Osmolity zmieniają rozłożenie cząsteczek wody w komórkach żywych, co powoduje zmianę hydratacji występujących tam makrocząsteczek.

W zależności od rodzaju osmolitów mogą one działać na białka stabilizująco – przesuując równowagę konformacyjną w kierunku stanu natywnego bądź destabilizująco – przesuując równowagę w kierunku stanu zdenaturowanego. Przykładem osmolitów stabilizujących są metyloaminy (np. TMAO i betaina), aminokwasy (np. prolina) czy też poliole (np. cukry i glikole). Bywają one często określane jako chemiczne chaperony albo osmolity kompatybilne (Rysunek 2.2), ponieważ stabilizują one struktury białek na ogół bez wpływu na ich funkcję komórkową [15, 19, 23, 25–27].



RYSUNEK 2.2: Struktury podstawowych osmolitów: a) metyloaminy (np., TMAO oraz betaina), b) aminokwasy (np., prolina oraz glycyna), c) poliole (np., trehaloza oraz inozytol).

Przykładem osmolitu destabilizującego jest mocznik, produkt uboczny katabolizmu aminokwasów, który jest znany z przesuwania równowagi w kierunku stanu rozwiniętego. Przy stosunkowo wysokich stężeniach (> 4 M) wywołuje on całkowitą denaturację białka [21, 23, 27, 28]. Co ciekawe, mimo że mocznik zakłóca strukturę i funkcje białek, a jego wysokie stężenia są szkodliwe dla komórek, to jest gromadzony w niektórych komórkach i tkankach ekspozowanych na warunki hipertoniczne, nawet do stężenia (~ 600 mM) w celu zrównoważenia wysokiego ciśnienia osmotycznego [15, 29, 30]. W tkankach tych efekt denaturujący mocznika jest niwelowany przez akumulację osmolitów stabilizujących, w szczególności przez N-tlenek trimetyloaminy (TMAO) i N,N,N-trimetyloglicynę (betainę) [13–15, 18, 29, 31–34]. Osmolity te są gromadzone m.in. w komórkach nerkowych, które zawierają wysokie stężenia mocznika, w celu zbalansowania hipertoniczności zewnątrzkomórkowej [14, 19, 24, 29, 31–33].

2.3 Zastosowanie osmolitów

Wykazano, że akumulacja osmolitów pod wpływem stresu może mieć istotny wpływ na szereg procesów komórkowych takich jak fałdowanie białek, rozpoznanie molekularne i wiązanie ligandów [18, 35]. Możliwość szybkiej i niekosztownej oceny wpływu danego stężenia osmolitu

na właściwości strukturalne konkretnych białek byłaby także cenna w zastosowaniach biotechnologicznych. Osmolity są bowiem obecnie powszechnie wykorzystywane na wielu etapach procesu nadekspresji białek, m.in. do ułatwiania fałdowania niektórych białek *in vitro* (stabilizatory jako chemiczne chaperony), stabilizacji białek labilnych strukturalnie w warunkach pozakomórkowych (metyloaminy, poliole), zapobiegania agregacji (aminokwasy, metyloaminy), oczyszczania białek (aminokwasy w ułatwianiu elucji białek), ponownego zwijania białek niewłaściwie uformowanych (mocznik), rozpuszczania ciał inkluzyjnych (mocznik), uzyskania optymalnej funkcjonalności enzymów a także do zapobiegania inaktywacji termicznej enzymów (np. betaina używana jako dodatek w reakcji PCR działa destabilizująco względem DNA bogatego w pary GC i jednocześnie protekcyjnie względem polimerazy DNA) [18, 35, 36].

Przewidywanie działania osmolitów na równowagę konformacyjną białek byłoby także użyteczne z punktu widzenia badania roli osmolitów w procesach patologicznych a także ich potencjalnego wykorzystania terapeutycznego. W szczególności dotyczy to chorób, których etiologia wiąże się z niewłaściwym fałdowaniem oraz agregacją białek w postaci złogów amyloidowych. Ustalono mianowicie, że w zależności od rodzaju i stężenia osmolitów ich obecność może zarówno zapobiegać, jak i sprzyjać procesowi fibrylacji białek. Dla przykładu, TMAO w wysokich stężeniach utrudnia powstawanie złogów α -synukleiny, leżących u podłoża choroby Parkinsona, [18] a także zapobiega powstawaniu agregującej formy białka prionowego [37]. Z drugiej strony przy niższych stężeniach osmolit ten promuje agregację peptydów β -amyloidowych będących głównym czynnikiem patologicznym w chorobie Alzheimera. Wpływ osmolitów na procesy agregacji białek potwierdzono także w badaniach *in vivo* – pokazano m.in., że trehaloza i inozytol zapobiegają patologicznej agregacji białek w mysich modelach, odpowiednio, płasawicy Hauntingtona i choroby Alzheimera [18]. W tym kontekście intrygujący jest także do dziś nieustalony mechanizm, który łączy zwiększoną produkcję TMAO przez florę jelitową z chorobami serca i układu krążenia [38].

2.4 Modelowe białka – lizozym, ubikwityna, β -hairpin, Trp-cage

Lizozym to modelowe białko szeroko stosowane w badaniach nad zwijaniem i stabilnością temperaturową białek [39–41]. Jest to globularny, zasadowy enzym o masie 14.4 kDa, odkryty w 1922 roku przez A. Fleminga. Lizozym składa się z 129 reszt aminokwasowych i posiada aż 8 reszt cysteinowych połączonych czterema mostkami disiarczkowymi. Występuje on w ludzkich łzach, ślinie, białku jaja kurzego a także w licznych innych komórkach roślin i zwierząt. Jego działanie polega na rozkładaniu wiązania glikozydowego między N-acetyloglukozaminą a kwasem

N-acetylmuraminowym w polisacharydach ściany komórkowej bakterii. Dodatkowo hydrolizuje on także wiązania glikozydowe w chitynie występującej między innymi w ścianie komórkowej grzybów [41]. Taki mechanizm działania sprawia, że lizozym ma właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybiczne [39–41], dzięki czemu pełni wiele istotnych funkcji i znajduje szerokie zastosowanie w medycynie i weterynarii: wspomaga terapię antybiotykami, antyseptykami, kortykosteroidami a w przemyśle spożywczym dodawany jest do konserwacji produktów mięsnych i rybnych itp.

β -hairpin jest prostym motywem strukturalnym białka składającym się z dwóch zorientowanych względem siebie antyrównoległe β -nici (N-koniec jednej nici sąsiaduje z C-końcem drugiej), połączonych krótką pętlą składającą się z kilku reszt aminokwasowych.

Trp-cage jest modelowym mini białkiem globularnym złożonym z dwudziestu reszt aminokwasowych, które przyjmuje stabilną zwiniętą strukturę zawierającą również dobrze zdefiniowaną strukturę drugorzędową (α -helisę). Reszty hydrofobowe tworzące rdzeń białka usytuowane są wokół centralnej reszty tryptofanu. Trp-cage przyjmuje swoją natywną strukturę (fałduje się) w czasie kilku mikrosekund [42, 43].

Ubikwityna jest naturalnie występującym, małym, globularnym białkiem składającym się z siedemdziesięciu sześciu aminokwasów. Pełni ważną rolę w procesie degradacji białek: znakuje białka przeznaczone do degradacji poprzez kowalencyjne wiązanie się z nimi [44].

2.5 Wpływ temperatury na równowagę reakcji rozwijania białek

Od dawna wiadomo, że osmolity zmieniają równowagę zwijania białek w temperaturze pokojowej, jednak temperaturowa zależność tego efektu jest mniej zrozumiała [45–48]. Podczas gdy stwierdzono, że działanie denaturujące mocznika jest ogólnie zwiększane przez temperaturę [49, 50], wpływ temperatury na stabilizację białek przez osmoprotektanty jest bardziej złożony [46, 48]. W szczególności zaobserwowano, że w temperaturze pokojowej betaina i inne stabilizujące osmolity (sarkozyna, glicyna i prolina) działają jako stosunkowo słabe stabilizatory i mogą nawet nieco destabilizować niektóre białka. Jednakże, wraz ze wzrostem temperatury, ich stabilizujący efekt również wyraźnie się zwiększa (np. wpływ betainy na entalpię swobodną rozwijania cytochromu c zmienia się od ≈ 0 kcal/mol w temperaturze 293 K do 0.6 kcal/mol w temperaturze 353 K) [46, 48]. Z biologicznego punktu widzenia temperaturowa zależność może pozwolić na dodatkową ochronę przed stresem termicznym bez silnego zakłócania równowagi zwijania białek w normalnych temperaturach [48, 51]. W przeciwieństwie do tego, w innych badaniach

stwierdzono, że stabilizujący wpływ β -hydroksyektoiny, sorbitolu i betainy na RNazę A wzrasta z temperaturą tylko nieznacznie [47, 52] a w przypadku argininy nawet spada [45].

Molekularny mechanizm temperaturowej zależności wpływu osmolitów na stabilność białek nie jest w pełni zrozumiały [28, 53]. Na podstawie symulacji wykonanych metodą dynamiki molekularnej zasugerowano, że w niskich temperaturach denaturacja indukowana mocznikiem jest zdominowana przez oddziaływania Lennarda-Jonesa między osmolitem a powierzchnią białka [28]. Jednak wraz ze wzrostem temperatury, elektrostatyczne oddziaływania między mocznikiem a białkiem stają się bardziej przyciągające, co prowadzi do zwiększonej destabilizacji białka w wyższych temperaturach. Elektrostatyczne oddziaływania między białkiem i wodą najwyraźniej stają się także bardziej korzystne, co dodatkowo stabilizuje stan rozwinięty i przyczynia się do destabilizacji białka [28]. Jeszcze mniej wiadomo na temat wpływu temperatury na stabilizację białek przez osmolity stabilizujące, takie jak betaina i TMAO. Mechanistyczne badania nad tymi stabilizatorami stanowią duże wyzwanie, ponieważ ich wpływ na równowagę zwijania jest znany tylko dla konkretnych białek i okazało się, że jest zależny od wielu czynników, w tym stężenia osmolitu i pH [47, 48, 54]. Na przykład stwierdzono, że 1.0 M roztwór betainy stabilizuje lizozym i mioglobinę, podczas gdy destabilizuje cytochrom c [48]. Według badań Singha [54], cząsteczki betainy stabilizują RNazę A w obojętnym pH (6–8), podczas gdy destabilizują α -laktalbuminę w zakresie pH 4–4.5 [54].

2.6 Mechanizm stabilizacji białek

Molekularny mechanizm stabilizacji/destabilizacji białek przez osmolity nie jest jeszcze w pełni poznany [23, 26, 26–28, 30, 55–61]. Rozważa się zwykle dwa główne rodzaje tego mechanizmu:

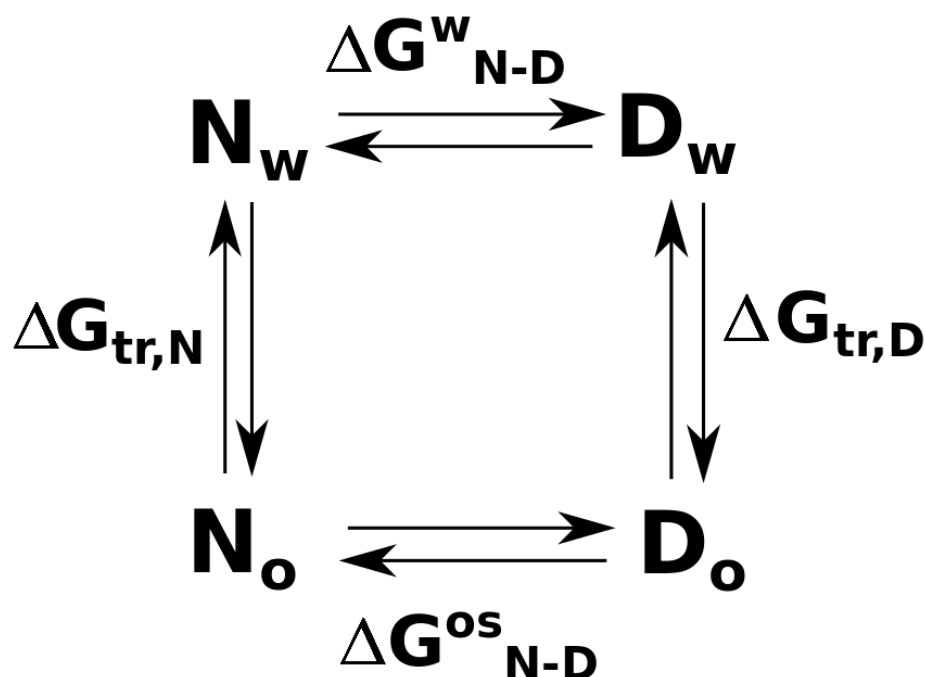
- mechanizm pośredni [62–64]
- mechanizm bezpośredni [28, 56, 60, 65–68]

W pierwszym z tych mechanizmów osmolity działają pośrednio, stabilizując lub destabilizując strukturę białka poprzez zmianę właściwości rozpuszczalnika [62–64]. Przykładem może być denaturacja, która jest wywołana osłabieniem efektu hydrofobowego w obecności osmolitu. Przykładem zaś mechanizmu bezpośredniego są preferencyjne oddziaływania osmolitu z białkiem, np. poprzez tworzenie wiązań wodorowych [28, 56, 60, 65–68]. Należy jednak pamiętać, że te dwa mechanizmy nie wykluczają się i obserwowany efekt może być wypadkową ich działania.

Istnieje kilka szczegółowych teorii tłumaczących w jaki sposób osmolity wpływają na stabilność białek, m.in. teoria wykluczania sterycznego, teoria napięcia powierzchniowego oraz teoria oddziaływań osmofobowych/osmofilowych, przy czym największe uznanie zdobyła dotąd ta ostatnia [23, 25, 26, 55, 69–73].

Teoria ta wprowadzona została przez zespół Bolena i wyjaśnia ona dlaczego osmolity stabilizują bądź destabilizują białka. W ramach tej teorii uważa się, że z termodynamicznego punktu widzenia, osmolity stabilizujące nie oddziałują korzystnie z białkiem. Z kolei osmolity destabilizujące oddziałują korzystnie (preferencyjnie) z białkiem.

Zespół Bolena teorię tę badał z wykorzystaniem cyklu termodynamicznego pokazanego na Rysunku 2.3 [55] gdzie: N – stan natywny, D – stan zdenaturowany, w – białko w czystej wodzie, o – białko w roztworze osmolitu, ΔG_{N-D} – standardowa entalpia swobodna denaturacji, ΔG_{tr} – standardowa entalpia przeniesienia białka z wody czystej do roztworu osmolitu.



RYSUNEK 2.3: Cykl termodynamiczny pozwalający wyznaczyć zmiany entalpii związania się białka w wyniku obecności osmolitu.

Z faktu, że entalpia swobodna jest funkcją stanu wynika że, nie zależy od drogi przemiany. A zatem suma entalpii swobodnej denaturacji w wodzie i entalpii przeniesienia białka w stanie zdenaturowanym z wody do roztworu osmolitu równa się sumie entalpii swobodnej procesu

przeniesienia białka w stanie natywnym z wody do roztworu osmolitu oraz entalpii swobodnej denaturacji w roztworze osmolitu. Otrzymujemy zatem, że:

$$\Delta G_{tr,D} - \Delta G_{tr,N} = \Delta G_{N \rightarrow D}^{os} - \Delta G_{N \rightarrow D}^w \quad (2.1)$$

W przypadku osmolitów stabilizujących proces przeniesienia białka z wody do roztworu osmolitu jest niekorzystny termodynamicznie co wyraża się przez wzrost standardowego potencjału chemicznego białka. Zaś dla osmolitów destabilizujących proces ten jest korzystny a standardowy potencjał chemiczny białka maleje. Ponieważ białko w stanie zdenaturowanym ma większą powierzchnię dostępną do oddziaływania z osmolitem niż w stanie natywnym, proces jego przeniesienia do roztworu osmolitu stabilizującego będzie bardziej niekorzystny w stanie zdenaturowanym. Z kolei dla osmolitów destabilizujących proces ten będzie w stanie zdenaturowanym bardziej korzystny. Na podstawie poczynionych obserwacji widać zatem, że dla osmolitu stabilizującego wartość wyrażenia $\Delta G_{tr,D} - \Delta G_{tr,N}$ jest dodatnia, a zatem wartość $\Delta G_{N \rightarrow D}^{os}$ jest większa niż wartość $\Delta G_{N \rightarrow D}^w$. Świadczy to o tym, że białko w roztworze takiego osmolitu jest bardziej stabilne niż w wodzie czystej. Z kolei, dla osmolitu destabilizującego wartość wyrażenia $\Delta G_{tr,D} - \Delta G_{tr,N}$ jest ujemna, a co za tym idzie wartość $\Delta G_{N \rightarrow D}^{os}$ jest mniejsza niż w wodzie czystej.

Dodatkowo powyższy cykl termodynamiczny jest bardzo przydatny w wyznaczaniu wywołanej przez osmolit zmiany w entalpii swobodnej zwijania. Można ją mianowicie wyznaczyć na podstawie pomiarów entalpii swobodnej przeniesienia białka lub składających się na niego aminokwasów z wody do roztworu osmolitu.

Wielkością, której używa się do charakteryzowania oddziaływań białko-osmolit jest parametr m , który definiuje się następującym wyrażeniem [57, 74–77]:

$$m = \frac{\partial \Delta G_{obs}^0}{\partial m_2} = -RT \frac{\partial \ln K_{obs}}{\partial m_2} = RT \Delta \left(\frac{\partial \ln \gamma_1}{\partial m_2} \right) = \Delta \mu_{12} \quad (2.2)$$

gdzie:

ΔG_{obs}^0 – entalpia swobodna rozwijania się białka

m_2 – stężenie osmolitu

K_{obs} – stała równowagi

γ_1 – współczynnik aktywności białka

$\Delta \mu_{12}$ – różnica wartości pochodnej potencjału chemicznego względem stężenia osmolitu pomiędzy stanem zdenaturowanym a natywnym białka



Parametr m opisuje zatem nachylenie wykresu zależności entalpii swobodnej procesu rozwijania białka od stężenia osmolitu. Z definicji potencjału chemicznego wynika, że oddziaływania między białkiem a osmolitem są korzystne termodynamicznie, jeżeli $\Delta\mu_{12} < 0$, zaś gdy $\Delta\mu_{12} > 0$ wówczas oddziaływania są niekorzystne.

Ustalono jednoznacznie, że denaturanty, czyli przede wszystkim mocznik, promują rozwijanie poprzez preferencyjną akumulację na powierzchni białka, a więc poprzez entalpową stabilizację stanu rozwiniętego, w którym powierzchnia białka dostępna dla bezpośrednich oddziaływań z rozpuszczalnikiem jest większa [21, 23, 66, 73]. Molekularny mechanizm leżący u podłoża tej akumulacji jest zdecydowanie mniej jasny. Na podstawie pomiarów entalpii swobodnej przeniesienia jednostek budulcowych białka (szkieletu peptydowego i poszczególnych łańcuchów bocznych) z wody do roztworu mocznika zaproponowano, że za stabilizację stanu zdenaturowanego odpowiada przede wszystkim preferencyjne oddziaływanie mocznika ze szkieletem peptydowym [73, 78]. Badania osmometryczne z wykorzystaniem związków modelowych wskazują jednak, że oddziaływania z łańcuchami bocznymi są co najmniej tak samo istotne, odpowiadając za 60 % efektu denaturującego [57, 76]. Wyznaczono preferencyjne oddziaływania między cząsteczkami mocznika a poszczególnymi atomami w białku, m.in. tlenem z grupy amidowej, karboksylanowej i hydroksylowej; azotem z grupy amidowej i azotem amoniowym, a także z węglami alifatycznymi i aromatycznymi [57, 76]. W wyniku tych pomiarów zaobserwowano, że cząsteczki mocznika chętnie oddziałują z tlenem z grupy amidowej. Entalpia swobodna przeniesienia modelowego ugrupowania peptydowego z wody do jednomolowego roztworu mocznika przyjmuje wartość ujemną ($\frac{m}{RT} = -0.1$). Cząsteczki mocznika chętnie oddziałują również z tlenem z grupy karboksylowej ($\frac{m}{RT} = -0.02$). Dzieje się tak prawdopodobnie z tego powodu, że cząsteczki mocznika mogą być zarówno donorem, jak i akceptorem wiązań wodorowych. Z pozostałymi grupami, tj. z grupą amidową, azotem w postaci kationu, węglem aromatycznym, oddziaływania cząsteczek mocznika nie mają decydującego znaczenia [57, 76].

Sugeruje się, że za obserwowaną skłonność cząsteczek mocznika do wiązania się z powierzchnią białka odpowiadają zarówno wiązania wodorowe, przede wszystkim z grupami amidowymi i karbonyłowymi szkieletu peptydowego, [67] jak również oddziaływania dyspersyjne, głównie z niepolarnymi łańcuchami bocznymi [65, 66, 79, 80]. Nasze badania z wykorzystaniem symulacji molekularnych potwierdziły znaczenie oddziaływań z łańcuchami bocznymi, sugerując także dodatkowy efekt destabilizujący polegający na redukcji oddziaływań hydrofobowych poprzez ograniczenie kontaktu między wodą a fragmentami niepolarnymi białka [81].

Jeszcze mniej wiadomo na temat mechanizmu działania osmolitów stabilizujących (np. TMAO i betainy). Liczne badania wskazują, że są one wykluczane z bezpośredniego sąsiedztwa białka, destabilizując stan zdenaturowany [23, 57, 82], jednak przyczyny tego zachowania nie zostały jednoznacznie ustalone. Według klasycznego modelu Asakury-Oosawy, destabilizacja stanu zdenaturowanego ma charakter czysto entropowy i polega na ograniczeniu przestrzeni konfiguracyjnej dostępnej dla cząsteczek osmolitów traktowanych jak „twarde sfery” o skończonej objętości [83]. Wobec stwierdzonego entalpowego wkładu do działania stabilizującego metyloamin [84, 85], ujęcie powyższe zostało ostatnio rozwinięte przez dodanie efektywnego potencjału modelującego energetycznie niekorzystne oddziaływanie pomiędzy białkiem a osmolitem. Wkład ten może wynikać np. z silnej hydratacji osmolitu, która prowadzi do jego wykluczenia z powierzchni białka i w efekcie entalpowej destabilizacji stanu rozwiniętego. Na podstawie pomiarów entalpii swobodnej przeniesienia oraz badań osmometrycznych dla związków modelowych wyznaczono preferencyjne oddziaływania między cząsteczkami betainy a poszczególnymi atomami w białku, m.in. tlenem z grupy amidowej, karboksylanowej i hydroksylowej; azotem z grupy amidowej i azotem amoniowym, a także z węglami alifatycznymi i aromatycznymi [57]. W wyniku tych pomiarów zaobserwowano, że entalpia swobodna przeniesienia modelowego ugrupowania peptydowego z wody do jednomolowego roztworu betainy przyjmuje wartość dodatnią ($\frac{m}{RT} = 0.34$). Widać zatem, że cząsteczki betainy nie preferują oddziaływań z tlenem z grupy amidowej. Dodatkowo można zauważyć, że cząsteczki betainy unikają także oddziaływań z tlenem z grupy karboksylowej ($\frac{m}{RT} = 0.12$) [57, 76]. Dzieje się tak prawdopodobnie z tego powodu, że cząsteczki betainy mogą być wyłącznie akceptorem wiązań wodorowych. Z pozostałymi grupami tj. z grupą amidową, azotem w postaci kationu, węglem aromatycznym oddziaływania cząsteczek betainy nie mają decydującego znaczenia [57, 76]. Rezultaty te, sugerujące silnie zróżnicowany rozkład osmolitów stabilizujących na powierzchni białka, znalazły także potwierdzenie w przeprowadzonych przez nas symulacjach dynamiki molekularnej [86]. Sugeruje się także, że osmolity stabilizujące wykluczane są zwłaszcza z otoczenia szkieletu peptydowego, zaś ich oddziaływania z łańcuchami bocznymi zależą silnie od typu aminokwasu.

Na podstawie spektroskopowych badań można znaleźć różnice w wpływie cząsteczek osmolitów na strukturę wody, które są kluczowe dla wyjaśnienia wpływu osmolitów na stabilność białek [87]. W celu wyjaśnienia mechanizmu działania osmolitów badano hydratację osmolitów oraz białka za pomocą spektroskopii oscylacyjnej z zastosowaniem metody widm różnicowych [87–90] oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej (z ang. differential scanning calorimetry, DSC) [87]. Okazało się, że wszystkie analizowane osmolity stabilizujące i destabilizujące wzmacniają



strukturę wody [87]. Autorzy zaproponowali dwa kryteria, które są kompatybilne z stabilizującymi i destabilizującymi właściwościami osmolitów a jednocześnie różnicują wpływ osmolitów na strukturę wody. Pierwszym kryterium jest wartość parametru całkowitej szerokości połówkowej pasma OD w odniesieniu do pasma wody zaburzonej przez osmolit. Parametr ten jest miarą odległości strukturalnej (rozkłady odległości międzycząsteczkowych wody – R_{OO}) i energetycznego stanu dystrybucji cząsteczek. Dla osmolitów stabilizujących przyjmuje on wartości większe niż w wodzie objętościowej (162 cm^{-1}) a dla osmolitów destabilizujących – wartości mniejsze. Drugim zaś kryterium jest populacja cząsteczek wody o średniej energii wiązań wodorowych w odniesieniu do wody objętościowej. Osmolity destabilizujące wykazują zwiększoną populację średniej energii wiązań wodorowych w odniesieniu do wody objętościowej, zaś dla osmolitów stabilizujących populacja tych wiązań jest zmniejszona [87].

Zauważono, że rozkłady odległości międzycząsteczkowych wody (R_{OO}) zaburzonej przez osmolity stabilizujące mają maksimum przesunięte w kierunku krótszych odległości w porównaniu z rozkładem wody czystej. Stwierdzono zatem, że woda w otoczeniu osmolitów stabilizujących tworzy więcej silniejszych wiązań wodorowych w porównaniu z wodą czystą. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że osmolitem, który najsilniej w tym sensie wzmacnia strukturę wody jest TMAO [88, 89]. Z kolei, N-metyloglicyna zwiększa w największym stopniu populację silnych wiązań wodorowych w grupie pochodnych glicyny. Ustalono, że mocznik jest związkiem, który w niewielkim stopniu wzmacnia strukturę wody. Stwierdzono, że woda zaburzona przez mocznik ma charakter zbliżony do wody czystej i prawdopodobnie przyczynia się do powstawania bezpośrednich oddziaływań w układzie białko-mocznik-woda [88].

Okazało się, że sfera hydratacyjna białek określana głównie przez hydratację szkieletu peptydowego jest uderzająco podobna do sfery hydratacyjnej osmolitów stabilizujących, a kompatybilność wzmocnionych sfer hydratacyjnych prowadzi, poprzez mechanizm kooperatywności wiązań wodorowych wody, do zwiększonej stabilności białek w roztworach tych osmolitów [87]. Osmolity stabilizujące przesuwają stałą równowagi denaturacji białka w kierunku stanu natywnego białka na drodze entalpowej i entropowej stabilizacji stanu zwiniętego w stosunku do rozwiniętego. Z kolei, osmolity destabilizujące wywierają odwrotny wpływ na stabilność białek. Wykazują one „strukturalnie różne” właściwości wody hydratacyjnej. Niekompatybilność tych sfer hydratacyjnych powoduje „rozpuszczanie” się sfery hydratacyjnej białka i w konsekwencji obniżenie stabilności białka. Zauważono, że nie ma wyraźnej zależności między oddziaływaniem białko-osmolit, tj. akumulacją/wykluczaniem cząsteczek osmolitu z powierzchni białka a stabilnością białek. Autorzy ukazali, że nie ma również bezpośredniej korelacji między właściwościami osmolitów tworzącymi/burzącymi strukturę wody a wpływem na stabilność białek. Okazało się,

że sposób hydratacji osmолitu, tj. podobieństwo/brak podobieństwa w sferach hydratacyjnych osmолitów i białka, jest kluczowym czynnikiem determinującym stabilność białka [87].

Zbadano oddziaływania między strukturalnie podobnymi osmолitami (tauryną i trimetylotauryną) a dwoma białkami (lizozymem i ubikwityną) za pomocą spektroskopii FTIR, skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) oraz obliczeń DFT [90]. Okazało się, że tauryna i trimetylotauryna (TMT) wywierają inny wpływ na białka. Tauryna działa jak stabilizator podwyższający temperaturę denaturacji (w przypadku lizozymu zwiększa temperaturę stopniowo wraz ze wzrostem molalności, w przypadku ubikwityny – stabilizuje najsilniej przy niskich molalnościach, dla wyższych molalności powoduje niewielki spadek termicznej stabilności). Z kolei, TMT zmniejsza stabilność białek. Co ciekawe, chociaż grupa sulfonowa zarówno tauryny, jak i TMT jest zdolna do tworzenia wiązań wodorowych z grupami powierzchniowymi protonów grup donorowych powierzchni białek to w rezultacie cząsteczki osmолitów nie oddziałują poprzez tą grupę z białkami. Zaobserwowano, że w otoczeniu tauryny występują dwie odrębne populacje cząsteczek wody: słabo związane cząsteczki wody wokół grupy sulfonowej oraz silnie związane cząsteczki wody z grupą aminową. Wywnioskowano zatem, że grupa aminowa wzmacnia strukturę wody, podczas gdy grupa sulfonowa ją osłabia [90]. Należy tu podkreślić, że struktura wody wokół białka jest wzmocniona i taki stan wody determinowany jest głównie przez łańcuch główny białka. Dodanie tauryny, która jest zorientowana grupą aminową w kierunku powierzchni białka, dodatkowo poprawia właściwości wzmocnionej sfery hydratacyjnej białka i stabilizuje natywną formę białka. Bezpośrednie oddziaływania tej grupy z powierzchniowymi łańcuchami bocznymi zapewniają właściwą orientację tauryny i zapobiegają negatywnemu wpływowi grupy SO_3^- . Z kolei, w przypadku TMT, osłabiona sfera hydratacyjna grupy SO_3^- burzy związaną wodorowo sieć wody wokół białka i destabilizuje ją. Co ciekawe, przy niskich stężeniach TMT stabilizuje w niewielkim stopniu oba białka. Efekt ten można przypisać rzeczywistemu efektowi osmofobowemu, który zostaje przezwyciężony, gdy stężenie osmолitu wzrasta, ponieważ efekt burzenia generowany przez TMT przewyżcza efekt stabilizujący spowodowany mechanizmem wykluczenia [90].

Rozdział 3

CELE I ZAŁOŻENIA

Celem niniejszej pracy doktorskiej było wyjaśnienie molekularnego mechanizmu wpływu osmolitów na stabilność białek z wykorzystaniem metody dynamiki molekularnej. Zastosowana metoda badawcza umożliwia opis zachowania układów bezpośrednio na poziomie molekularnym, przez co szczególnie dobrze nadaje się do badania mikroskopowych sił napędowych różnorodnych procesów (bio)molekularnych.

Aby osiągnąć cel główny postawiłam sobie następujące cele szczegółowe:

1. Wyjaśnienie dlaczego betaina jest wykluczana a mocznik akumulowany na powierzchni modelowego białka – lizozymu.
2. Zweryfikowanie hipotezy o wykluczaniu wszystkich osmolitów stabilizujących z powierzchni lizozymu.
3. Charakterystyka czynników wpływających na efekt stabilizujący osmolitów oraz ustalenie jak stabilizacja zależy od symulowanego momentu dipolowego cząsteczki osmolitu.
4. Wyjaśnienie mechanizmu za pośrednictwem którego osmolity wpływają na denaturację termiczną małego globularnego białka Trp-cage.
5. Przetestowanie założenia o addytywności elementarnych wkładów, w celu zbudowania modelu teoretycznego pozwalającego na przewidywanie dla zadanej sekwencji aminokwasowej wpływu wybranych osmolitów na równowagę konformacyjną kilku modelowych białek.

Rozdział 4

METODYKA BADAWCZA

4.1 Podstawy teoretyczne metody

4.1.1 Dynamika molekularna

W celu wyjaśnienia wpływu osmolitów na stabilność białek wykorzystałam metodę dynamiki molekularnej. Jest to podstawowa metoda obliczeniowa pozwalająca na badanie właściwości układów molekularnych w warunkach odzwierciedlających warunki fizjologiczne. Dynamika molekularna umożliwia wyznaczenie trajektorii (ewolucji w czasie) układu atomów na podstawie całkowania klasycznych równań ruchu. Uzyskujemy w ten sposób zestaw położeń atomów w przestrzeni odzwierciedlający własności i zachowanie układu w stanie równowagi [91, 92] a w niektórych przypadkach także w trakcie procesów nierównowagowych. Z teoretycznego punktu widzenia, podstawą dynamiki molekularnej jest przybliżenie Borna-Oppenheimera, które umożliwia rozdzielenie ruchu jąder oraz ruchu elektronów. Zakłada się, że elektrony nieskończenie szybko dostosowują się do nowych położeń jąder, ze względu na fakt iż masa elektronu jest 1836 razy mniejsza od masy protonu. Dzięki temu przybliżeniu możemy przyporządkować konkretnej konfiguracji układu określoną wartość energii potencjalnej.

W dynamice molekularnej do wyznaczenia zestawu kolejnych konfiguracji układu (tzw. trajektorii) stosuje się drugą zasadę dynamiki Newtona (Równanie 4.1):

$$F_i(t) = m \cdot a_i(t), \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (4.1)$$

gdzie:

F_i – siła działająca na i -ty atom w chwili t

m_i – masa i -ego atomu

$a_i = \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2}$ – przyspieszenie i -ego atomu w chwili t

$r_i(t)$ – położenie i -ego atomu w chwili t

N – całkowita liczba atomów w układzie

Różniczkując funkcję energii potencjalnej względem położenia możemy obliczyć siłę działającą na i -ty atom (Równanie 4.2):

$$F_i(r) = -\nabla_i \cdot V(r_i), \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (4.2)$$

gdzie:

$\nabla_i = \left(\frac{\partial}{\partial x_i}, \frac{\partial}{\partial y_i}, \frac{\partial}{\partial z_i} \right)$ – gradient (wektor pochodnych cząstkowych)

$V(r_i)$ – energia potencjalna, zależna od położenia wszystkich atomów, ($r_i = r_1, r_2, \dots, r_N$)

Scałkowanie tego układu $3N$ równań różniczkowych drugiego rzędu umożliwia wyznaczenie ewolucji czasowej dla układu N cząstek. Warto wspomnieć tutaj, że rozwiązanie takiego układu jest możliwe tylko wtedy gdy znamy położenie $r_i(t=0)$ i prędkość początkową $v_i(t=0)$ każdego atomu. Przyjmując skończony krok czasowy (Δt) oraz założenie, że w tym krótkim kroku czasowym siły działające na atomy pozostają stałe, otrzymujemy nowe położenia i prędkości w chwili $t + \Delta t$. Na ich podstawie obliczamy siły działające po kolejnym kroku czasowym, a co za tym idzie dostajemy kolejny zestaw współrzędnych i prędkości. Procedurę powtarzamy dla zadanej liczby kroków [91, 92].

4.1.2 Algorytmy całkowania równań ruchu

W dynamice molekularnej istnieje wiele algorytmów służących do wyznaczenia położenia i prędkości atomów układu w funkcji czasu [92]. Najczęściej stosowanym algorytmem jest algorytm Verleta, który polega na rozwinięciu zależności położenia i prędkości i -tego atomu od czasu w szereg Taylora (Równania 4.3 i 4.4):

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \frac{\partial r_i(t)}{\partial t} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 r_i(t)}{\partial t^2} \Delta t^2 + \frac{1}{6} \frac{\partial^3 r_i(t)}{\partial t^3} \Delta t^3 + \dots \quad (4.3)$$

$$r_i(t - \Delta t) = r_i(t) - \frac{\partial r_i(t)}{\partial t} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 r_i(t)}{\partial t^2} \Delta t^2 - \frac{1}{6} \frac{\partial^3 r_i(t)}{\partial t^3} \Delta t^3 + \dots \quad (4.4)$$



Po dodaniu i odjęciu stronami powyższych równań, a następnie uwzględnieniu tego, że prędkość jest pierwszą pochodną położenia po czasie, zaś przyspieszenie jest równe drugiej pochodnej po czasie otrzymujemy Równanie 4.5:

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i - r_i(t - \Delta t) + \frac{F_i(t)}{m_i} \Delta t^2 + \dots \quad (4.5)$$

Prędkość z kolei można otrzymać odejmując stronami Równania 4.3 i 4.4. Wówczas otrzymujemy Równanie 4.6:

$$v_i(t) = \frac{r_i(t + \Delta t) - r_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (4.6)$$

Stosowanie algorytmu Verleta jest stosunkowo proste, ponieważ liczymy tylko siły i przyspieszenia w układzie. Wadą tej metody jest fakt, iż prędkości są opóźnione o jeden krok w stosunku do położenia atomów. Aby temu zaradzić można zastosować prędkościowy algorytm Verleta, dla którego zależności położenia i prędkości od czasu dane są następującymi równaniami:

$$r_i(t + \Delta t) = r_i + v_i(t)\Delta t + \frac{1}{2} \frac{F_i(t)}{m_i} \Delta t^2 \quad (4.7)$$

$$v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) = v_i(t) + \frac{1}{2} \frac{F_i(t)}{m_i} \Delta t^2 \quad (4.8)$$

$$v_i(t + \Delta t) = v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) + \frac{1}{2} \frac{F_i(t + \Delta t)}{m_i} \Delta t \quad (4.9)$$

Najczęściej jednak stosowanym algorytmem jest tzw. algorytm „żabiego skoku” (z ang. leapfrog):

$$v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) = v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) + \frac{F_i(t)}{m_i} \Delta t \quad (4.10)$$

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i(t + \frac{\Delta t}{2})\Delta t \quad (4.11)$$

Wadą tego algorytmu jest to, że obliczone położenia i prędkości przesunięte są względem siebie o pół kroku całkowania. Możemy jednak prędkości $v_i(t)$ wyznaczyć jako średnie arytmetyczne dwóch prędkości w połowie kroku całkowania, uzyskując w ten sposób położenia i prędkości w tej samej chwili [92–94].

Opisane powyżej algorytmy to algorytmy symplektyczne. Ich cechą charakterystyczną jest to, że całkowita energia układu oscyluje wokół pewnej stałej wartości bliskiej początkowej energii całkowitej.



4.1.3 Krok czasowy

Ustalenie odpowiedniego kroku czasowego ma ogromne znaczenie w czasie prowadzenia symulacji, ponieważ określa on dokładność obliczanej trajektorii. Ważne, by krok czasowy był dostosowany do częstotliwości najszybszych ruchów w układzie. Zastosowanie zbyt długiego kroku czasowego, może spowodować silny dryf całkowitej energii układu oraz niestabilności algorytmów całkowania. Zbyt mały zaś krok czasowy, może wiązać się z tym, że uzyskamy niereprezentatywny rozkład konfiguracji. Krok czasowy powinien zatem wynosić ok. $1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$, ponieważ przy takiej długości kroku atomy powiązane w cząsteczkach powinny mieć pełną swobodę ruchu. Można wydłużyć krok czasowy do 2–4 fs, usztywniając długości wiązań oraz inne szybko oscylujące stopnie swobody [92, 93].

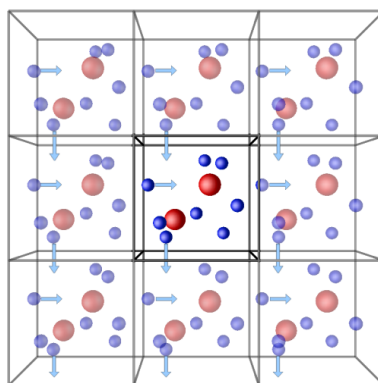
4.1.4 Temperatura, ciśnienie

W celu bliższego oddania warunków eksperymentalnych, w czasie prowadzenia obliczeń metodą dynamiki molekularnej istnieje możliwość utrzymywania stałej temperatury układu. Stosuje się tutaj m.in. metodę słabego sprzężenia (z ang. *weak-coupling method*) zaproponowaną przez Berendsena. W algorytmie tym skalujemy prędkości wszystkich atomów z odpowiednią stałą czasową tak, aby w kolejnych krokach symulacji temperatura nie odbiegała zanedo od zadanej wartości [92].

Aby utrzymać stałe ciśnienie w układzie można zastosować podobny algorytm. Różnicą jest jednak to, że w tym przypadku skalowane są położenia atomów zamiast prędkości. Prowadzi to do zmian objętości symulowanego układu [92, 93].

4.1.5 Periodyczne warunki brzegowe

Aby wyeliminować efekty brzegowe (niestandardowe zachowania atomów na brzegach pudła symulacyjnego) oraz aby umożliwić odpowiedni rozmiar przestrzeni, w której będzie się odbywać symulacja, wykorzystuje się periodyczne warunki brzegowe (z ang. *periodic boundary conditions* – PBC). Podejście takie powoduje, że symulowany przez nas układ powtarzany jest nieskończenie wiele razy, dzięki czemu zapewniona jest ciągłość symulowanego układu [92, 93]. Cząsteczki znajdujące się w danej komórce oddziałują zarówno z cząsteczkami z tej samej komórki, jak i z cząsteczkami z innych komórek, dzięki czemu układ symulacyjny lepiej odwzorowuje warunki rzeczywiste, co ukazano na Rysunku 4.1.



RYSUNEK 4.1: Schematyczny rysunek periodycznych warunków brzegowych [92, 95].

4.1.6 Pola siłowe

Aby opisać oddziaływania między atomami i wyznaczyć energię potencjalną układu, stosuje się tzw. pola siłowe (z ang. force field). Pola siłowe definiujemy jako funkcje matematyczne umożliwiające wyznaczenie przybliżonych wartości energii potencjalnej układu w zależności od położenia atomów [92–94]. Pola siłowe mają wiele zalet: są modelami prostymi, tanimi a dzięki odpowiedniej parametryzacji mogą dawać wyniki zbliżone do eksperymentalnych. Konieczność dobierania parametrów należy z kolei uznać za wadę takiego podejścia.

Podstawowe równanie definiujące energię potencjalną układu w przybliżeniu pola siłowego można przedstawić jako sumę wkładów wiążących (z ang. bonded terms) oraz sumę wkładów niewiążących (z ang. nonbonded terms):

$$V = V_w + V_{nw} \quad (4.12)$$

gdzie:

V – energia potencjalna

V_w – energia potencjalna wkładów wiążących

V_{nw} – energia potencjalna wkładów niewiążących

Wkłady wiążące odpowiadają za istnienie wiązań kowalencyjnych między atomami w cząsteczce. Energia tych oddziaływań wyrażana jest zwykle jest jako suma wkładów odpowiadających zmianom długości wiązań, kątów płaskich, kątów dwuściennych oraz niewłaściwych kątów dwuściennych:

$$V_w = V_b + V_\theta + V_\phi + V_{n\phi} \quad (4.13)$$

gdzie:

V_b – wkład odpowiadający zmianom długości wiązań

V_θ – wkład odpowiadający zmianom wartości kątów płaskich

V_ϕ – wkład odpowiadający zmianom wartości kątów dwuściennych

$V_{n\phi}$ – wkład odpowiadający zmianom wartości niewłaściwych kątów dwuściennych

Do opisu wkładu związanego ze zmianą długości wiązań stosuje się zwykle potencjał harmoniczny (Rysunek 4.2, Równanie 4.14):

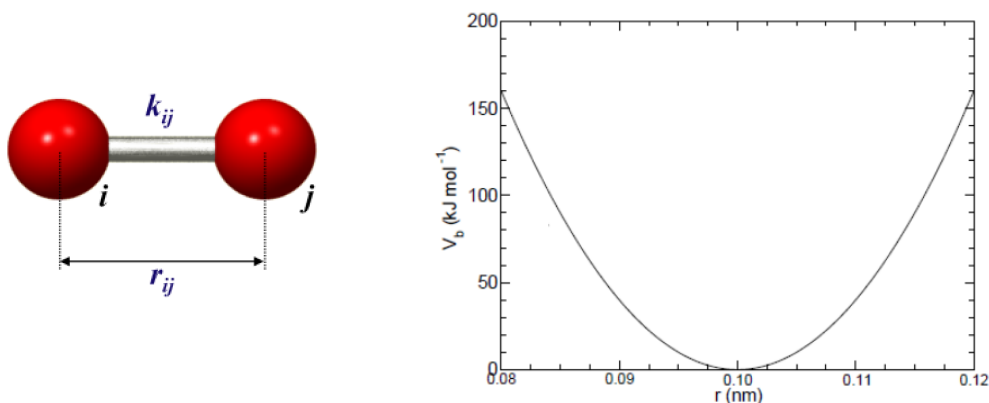
$$V_b = \sum \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad (4.14)$$

gdzie:

k_{ij}^b – stała siłowa, określa siłę wiązania między atomem i oraz j

r_{ij} – odległość między atomem i oraz j

r_{ij}^0 – równowagowa odległość między atomem i oraz j



RYSUNEK 4.2: Zależność energii potencjalnej od odległości dla oscylatora harmonicznego [92, 96].

W niektórych przypadkach przybliżenie harmoniczne nie jest wystarczające dla odpowiedniego opisu zmian energii w układzie. Trzeba wówczas zastosować potencjał anharmoniczny, na przykład tzw. zależność Morse'a (Rysunek 4.3, Równanie 4.15). Dla pojedynczego wiązania dana jest ona równaniem:

$$V_{ij}(r_{ij}) = D_{ij} \{1 - \exp[-B_{ij}(r_{ij} - r_{ij}^0)]\}^2 \quad (4.15)$$

gdzie:

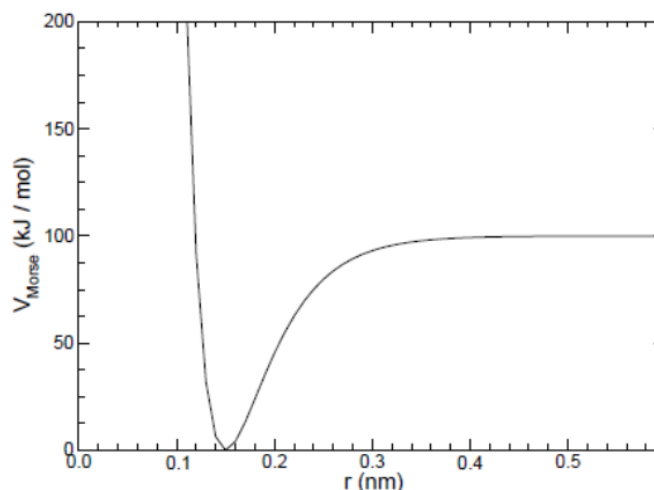
$V_{ij}(r_{ij})$ – energia potencjalna

D_{ij} – głębokość studni potencjału

B_{ij} – szerokość studni potencjału

r_{ij} – odległość między atomem i oraz j

r_{ij}^0 – równowagowa odległość między atomem i oraz j



RYSUNEK 4.3: Zależność energii potencjalnej od odległości dla oscylatora anharmonicznego [92, 96].

Drugi wkład w Równaniu 4.13 jest zwykle również opisywany przez potencjał harmoniczny. Odpowiada on za zmiany wartości kątów płaskich (Równanie 4.16, Rysunek 4.4):

$$V_{\theta} = \sum \frac{1}{2} k_{ijk}^{\theta} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (4.16)$$

gdzie:

k_{ijk}^{θ} – stała siłowa

θ_{ijk} – kąt płaski występujący między wiązaniem utworzonym przez atomy i oraz j , a wiązaniem utworzonym między atomami j oraz k

θ_{ijk}^0 – równowagowa wartość kąta płaskiego występującego między wiązaniem utworzonym przez atomy i oraz j , a wiązaniem utworzonym między atomami j oraz k

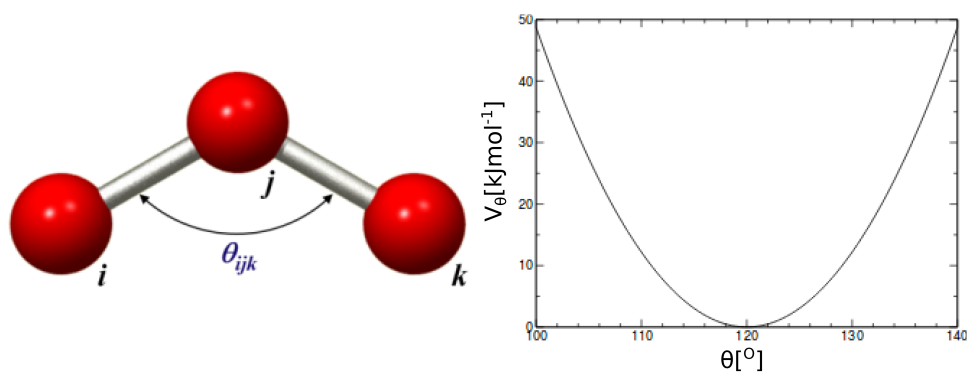
Kolejnym wkładem jest potencjał torsyjny związany ze zmianami wartości kątów dwuściennych (Równanie 4.17, Rysunek 4.5):

$$V_{\phi} = \sum_{n=0}^N \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^0)] \quad (4.17)$$

gdzie:

V_n – wysokość bariery rotacji

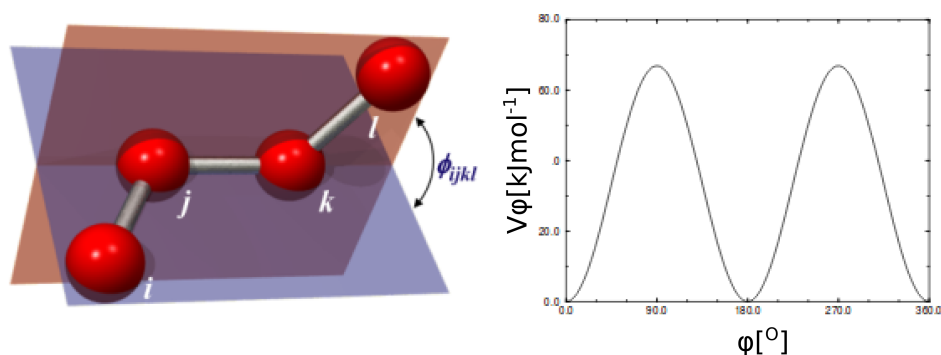
n – tzw. krotność, określająca liczbę minimów energetycznych podczas obrotu wokół wiązania od 0° do 360°



RYSUNEK 4.4: Schematyczny rysunek kąta płaskiego θ_{ijk} (patrząc od strony lewej) oraz wykres zależności energii potencjalnej od zmiany kąta θ_{ijk} (patrząc od strony prawej) [92, 96].

ϕ_{ijkl} – kąt dwuścienny występujący między płaszczyzną utworzoną przez atomy *i*, *j* oraz *k*, a płaszczyzną utworzoną przez atomy *j*, *k* oraz *l*

ϕ_{ijkl}^0 – równowagowa wartość kąta dwuściennego występującego między płaszczyzną utworzoną przez atomy *i*, *j* oraz *k*, a płaszczyzną utworzoną przez atomy *j*, *k* oraz *l*



RYSUNEK 4.5: Schematyczny rysunek kąta dwuściennego ϕ_{ijkl} (patrząc od strony lewej) oraz wykres zależności energii potencjalnej od zmiany kąta ϕ_{ijkl} (patrząc od strony prawej) [92, 96].

Aby zachować płaską geometrię wokół atomów o hybrydyzacji sp^2 oraz aby wyeliminować artefaktowe zachowanie się atomów stosuje się wkład odpowiadający zmianom niewłaściwych kątów dwuściennych (Równanie 4.18, Rysunek 4.6):

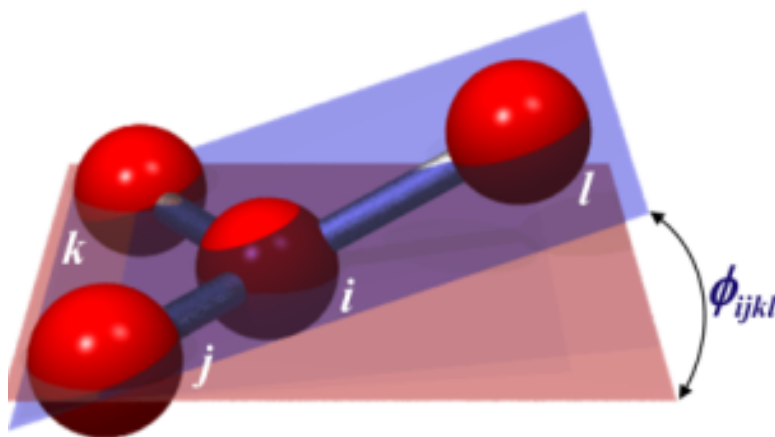
$$V_{n\phi} = \sum \frac{1}{2} k_{ijkl}^{n\phi} (\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^0)^2 \quad (4.18)$$

gdzie:

k_{ijkl}^ϕ – stała siłowa

ϕ_{ijkl} – niewłaściwy kąt dwuścienny występujący między płaszczyzną utworzoną przez atomy *i*, *j* oraz *k*, a płaszczyzną utworzoną przez atomy *j*, *k*, oraz *l*

ϕ_{ijkl}^0 – równowagowa wartość niewłaściwego kąta dwuściennego występującego między płaszczyzną utworzoną przez atomy i , j , oraz k , a płaszczyzną utworzoną przez atomy j , k oraz l



RYSUNEK 4.6: Schematyczny rysunek niewłaściwego kąta dwuściennego ϕ_{ijkl} [92, 96].

Energię potencjalną oddziaływań niewiążących wyraża się zwykle jako sumę energii oddziaływań van der Waalsa oraz energii oddziaływań elektrostatycznych:

$$V_{nw} = V_{vdW} + V_{el} \quad (4.19)$$

gdzie:

V_{vdW} – energia oddziaływań van der Waalsa

V_{el} – energia oddziaływań elektrostatycznych

W celu opisanego oddziaływań van der Waalsa stosuje się najczęściej tzw. potencjał Lennarda-Jonesa:

$$V_{vdW} = \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (4.20)$$

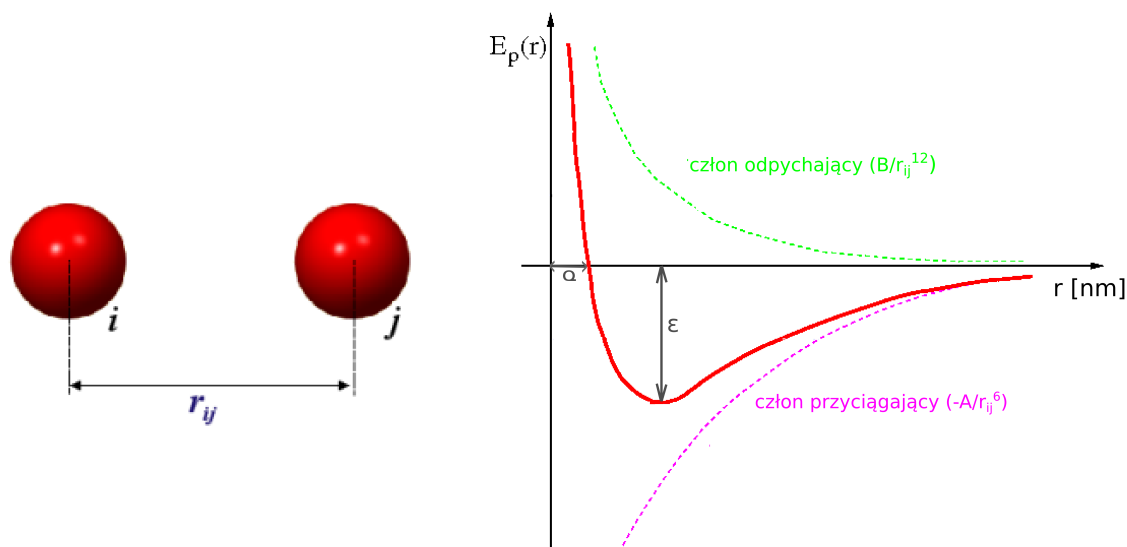
gdzie:

ε_{ij} – głębokość studni potencjału dla atomów i oraz j

σ_{ij} – położenie studni potencjału dla atomów i oraz j

r_{ij} – odległość między atomami i oraz j

Na podstawie Równania 4.20 oraz Rysunku 4.7 można zauważyć, że pierwszy człon w tym równaniu maleje z dwunastą potęgą odległości opisując silne odpychania między atomami dla małych odległości (tzw. odpychanie Pauliego). Drugi zaś człon maleje z szóstą potęgą i jest odpowiedzialny za przyciąganie się atomów wynikające z oddziaływań dyspersyjnych [92, 93].



RYSUNEK 4.7: Schematyczny rysunek potencjału Lennarda-Jonesa (linia czerwona). Dodatkowo przedstawiono człon odpychający (linia zielona) oraz człon przyciągający (linia różowa) [92, 96].

Wkład odpowiedzialny za oddziaływania elektrostatyczne (Rysunek 4.8) opisuje się równaniem Coulomba:

$$V_{el} = \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (4.21)$$

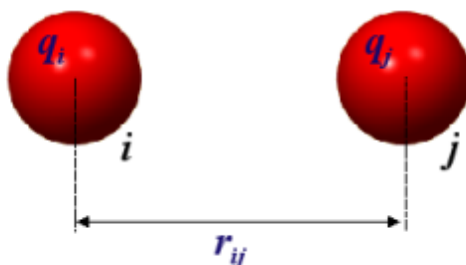
gdzie:

q_i, q_j – ładunki atomów i oraz j

ϵ_0 – przenikalność elektryczna próżni

ϵ_r – stała dielektryczna

r_{ij} – odległość między atomami i oraz j



RYSUNEK 4.8: Schematyczny rysunek oddziaływań elektrostatycznych [92, 96].

Jednakże obliczenie energii oddziaływań elektrostatycznych w oparciu o powyższe równanie byłoby bardzo czasochłonne. Dlatego stosuje się przybliżenie pozwalające relatywnie szybko wyznaczyć pełną elektrostatykę układu, przy zwykle zaniedbywalnych błędach wynikających ze sztucznej periodyczności – tzw. algorytm PME (z ang. Particle Mesh Ewald). Dzięki

temu algorytmowi jesteśmy w stanie uniknąć wprowadzania tzw. promień odcięcia (z ang. cut-off distance), czyli odległości, powyżej której zaniebujemy się wszelkie wkłady energetyczne w celu skrócenia czasu obliczeń. Jak wiadomo, promień odcięcia może prowadzić do pojawiających się w trakcie symulacji nieciągłości energii oraz sił, co z kolei może powodować niestabilności algorytmu całkowania równań ruchu [92, 93].

Dokładność i poprawność obliczeń dynamiki molekularnej zależy w dużej mierze od zastosowanego pola siłowego. Parametry pola siłowego wyznacza się eksperymentalnie (np. z danych krystalograficznych, neutronograficznych) lub teoretycznie na podstawie obliczeń kwantowo-mechanicznych. Istnieje wiele rodzajów pól siłowych. Do symulacji układów biologicznych najczęściej korzysta się z pól siłowych: CHARMM, AMBER, OPLS oraz GROMOS [92–94, 97].

4.2 Procedura symulacyjna

4.2.1 Wpływ osmolitów na stabilność białek na przykładzie mechanicznego rozwijania lizozymu

A. Molekularne układy i procedura symulacji.

Siedem podstawowych układów zbudowałam do zasymulowania mechanicznego rozwijania lizozymu umieszczonego w środowisku wodnym, a także w wodnym roztworze betainy oraz mocznika o różnych stężeniach tych osmolitów. Każdy układ, dwunastościenne pudło symulacyjne o długości 7.8 nm (odpowiadającej około 335 nm^3), zawierał pojedynczą cząsteczkę lizozymu oraz cząsteczki rozpuszczalnika odpowiadające trzem stężeniom betainy (1.0, 2.5 and 5.0 M), trzem stężeniom mocznika (3.5, 5.0 and 7.0 M) i czystej wodzie (0 M). W celu neutralizacji ładunku lizozymu do każdego układu dodałam po osiem jonów chlorkowych. Dokładne liczby cząsteczek wody oraz osmolitu przedstawiłam w Tablicy 4.1.

Układ/Stężenie	Liczba cząsteczek osmolitu	Liczba cząsteczek wody
mocznik 3.5 M	719	8917
mocznik 5.0 M	1025	7972
mocznik 7.0 M	1435	6768
betaina 1.0 M	206	9795
betaina 2.5 M	411	8311
betaina 5.0 M	718	6258
czysta woda	0	11275

TABLICA 4.1: Skład rozpuszczalnika we wszystkich badanych układach.

Parametry pola siłowego dla mocznika, N,N'-dimetylomocznika i sarkozyny (N-metyloglicyny) uzyskałam z uogólnionego pola siłowego CHARMM (CGenFF) [98], zaś parametry dla betainy zostały otrzymane przez analogię, korzystając z parametrów pola siłowego CHARMM27 dla fosfatydylocholiny (dla grupy trimetyloamoniowej i metylenowej) oraz dla fosfatydyloseryny (dla grupy karboksylowej) [99]. Dla wody użyłam model TIP3P [100]. Współrzędne początkowe dla lizozymu zostały wyznaczone na podstawie rentgenografii strukturalnej X-ray i pobrane z bazy danych PDB (kod:1AKI). Do zasymulowania białka użyłam pola siłowego CHARMM27 [101].

Wszystkie symulacje MD przeprowadziłam z wykorzystaniem pakietu GROMACS [97]. Zastosowałam periodyczne warunki brzegowe i metodę PME (Particle Mesh Ewald) [102, 103] z promieniem odcięcia 1.0 nm w celu uwzględnienia dalekozasięgowych oddziaływań elektrostatycznych. Symulacje wykonałam w temperaturze 300 K ze stałą sprężenia 0.1 ps oraz pod ciśnieniem 1 bara ze stałą sprężenia 2.0 ps w oparciu o metodę Berendsena, korzystając, odpowiednio, ze sprężenia z termostatem [104] oraz z barostatem [104]. Podczas symulacji, długości wiązań usztywniłam algorytmem LINCS [105], co pozwoliło na zastosowanie kroku całkowania równego 2.0 fs. Początkowo każdy system zrównoważyłam przez przeprowadzenie symulacji równowagowych o długości 1.0 μ s .

Aby rozwinąć lizozym w kontrolowany sposób, przyłożyłam zewnętrzny potencjał do promienia bezwładności białka (promienia żyracji, R_{gyr}), zdefiniowanego dla grupy referencyjnej zawierającej wszystkie atomy C_{α} z łańcucha głównego białka:

$$R_{gyr} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{C_{\alpha}} (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{COM})^2} \quad (4.22)$$

gdzie: N jest liczbą atomów C_α , \mathbf{r}_i – położenie i -tego węgla C_α , \mathbf{r}_{COM} – położenia środka ciężkości grupy referencyjnej.

B. Sterowana dynamika molekularna.

Podczas wymuszonego rozwijania R_{gyr} zmieniał się od wartości początkowej 1.4 nm dla stanu natywnego do wartości 3.0 nm, ze stałą siłową $7000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, i czterema różnymi prędkościami: $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ and $5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$. Układy z 2.5 M sarkozyną oraz 5.0 M N,N'-dimetylomocznikiem przygotowałam w analogiczny sposób dla najmniejszej prędkości rozciągania $5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$.

Aby zwiększyć istotność statystyczną uzyskanych wyników, dla każdego układu wykonałam pięć niezależnych symulacji rozwijania. Początkowe konfiguracje dla symulacji mechanicznego rozwijania wzięłam z trajektorii równowagowych po $0.92 \mu\text{s}$, $0.94 \mu\text{s}$, $0.96 \mu\text{s}$, $0.98 \mu\text{s}$, $1.00 \mu\text{s}$.

4.2.2 Czy wszystkie osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni białek?

A. Symulowane układy i procedura symulacji.

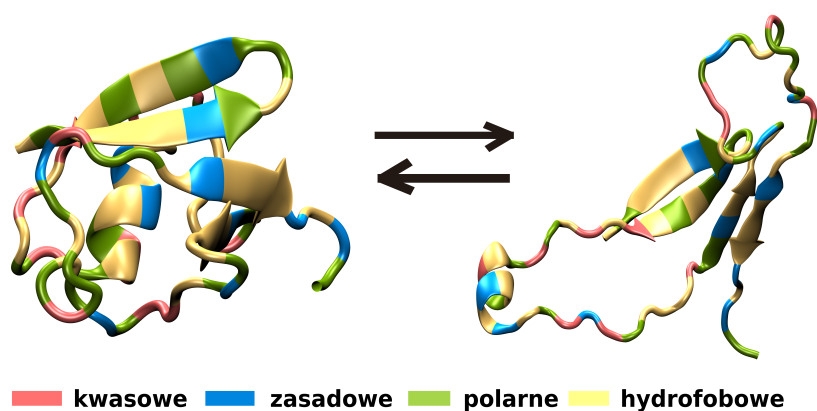
Do zbadania oddziaływań między cząsteczkami osmolitu (proliny lub TMAO) z lizozymem użyłam symulacji MD. Wszystkie symulacje wykonałam, używając pakietu GROMACS [97]. Parametry pola siłowego dla białka oraz dla jonów obojnaczych cząsteczek proliny uzyskałam z pola siłowego CHARMM27 [101] a dla cząsteczek TMAO z uogólnionego pola siłowego CHARMM (CGenFF) [98]. Dla wody użyłam model TIP3P [100]. Współrzędne początkowe dla lizozymu zostały wyznaczone na podstawie rentgenografii strukturalnej X-ray a następnie zostały pobrane z bazy danych PDB (kod:1AKI). Każdy układ, dwunastościenne pudło symulacyjne o długości 8.0 nm (odpowiadającej około 360 nm^3) zawierał pojedynczą cząsteczkę lizozymu oraz roztwory osmolitu o stężeniach (1.0, 2.0, 3.0 i 4.0 M). W celu neutralizacji ładunku tej makromolekuły do każdego układu dodałam po osiem jonów chlorkowych. Układy zminimalizowałam, używając metody najmniejszego spadku w dwóch etapach: w pierwszym wszystkie ciężkie atomy białka unieruchomiłam, w drugim pozwoliłam wszystkim atomom poruszać się swobodnie. Symulacje wykonałam w warunkach NPT w temperaturze 300 K ze stałą sprężenia 0.1 ps oraz pod ciśnieniem 1 bara ze stałą sprężenia 2.0 ps w oparciu o metodę słabego sprężenia Berendsena. Zastosowałam periodyczne warunki brzegowe i metodę PME (Particle Mesh Ewald) [102, 103] z

promieniem odcięcia 1.0 nm w celu uwzględnienia dalekozasięgowych oddziaływań elektrostatycznych. Podczas symulacji, usztywniłam długości wiązań za pomocą algorytmu P-LINCS [105], co umożliwiło zastosowanie typowego kroku całkowania równego 2.0 fs. Każdy układ symulowałam przez 1.0 μ s.

4.2.3 Wpływ osmolitów na stabilność białek na przykładzie mechanicznego rozwijania ubikwityny

A. Symulowane układy i procedura symulacji.

W celu zasymulowania mechanicznego rozwijania ubikwityny umieszczonej w środowisku wodnym, a także w wodnym roztworze 2.5 M cząsteczek betainy o zróżnicowanej polarności, zbudowałam osiem głównych modeli symulacyjnych. W celu zróżnicowania polarności cząsteczek betainy, ładunki cząstkowe na poszczególnych atomach przeskalowałam przez czynnik: 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 i 1.6. Na Rysunku 4.9 przedstawiłam przykładowe struktury ubikwityny w stanie zwiniętym i rozwiniętym. Dodatkowo kolorem czerwonym zaznaczyłam aminokwasy kwasowe, niebieskim – zasadowe, zielonym – polarne a pomarańczowym – hydrofobowe.



RYSUNEK 4.9: **Struktura ubikwityny w stanie zwiniętym i rozwiniętym.** Kolor czerwony odpowiada aminokwasom kwasowym, niebieski – zasadowym, zielony – polarnym a pomarańczowy – hydrofobowym.

Wszystkie ładunki na poszczególnych atomach cząsteczek betainy przeskalowałam przez wspólny czynnik: 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 i 1.6. Współrzędne początkowe dla ubikwityny zostały wyznaczone na podstawie rentgenografii strukturalnej X-ray a następnie zostały pobrane z bazy danych PDB (kod:1ubq). Do zasymulowania białka użyłam pola siłowego CHARMM27 [101]. Każdy układ, dwunastościenne pudło symulacyjne o długości 6.8 nm (odpowiadającej około

222 nm³), zawierał pojedynczą cząsteczkę ubikwityny oraz cząsteczki rozpuszczalnika odpowiadające 2.5 M roztworowi betainy i czystej wodzie (0 M). W celu neutralizacji ładunku białka do każdego układu dodałam odpowiednią liczbę jonów sodowych i chlorkowych tak, aby zachowane były warunki fizjologiczne (150 mM NaCl). Parametry pola siłowego dla cząsteczek betainy zostały otrzymane, korzystając z parametrów pola siłowego CHARMM27 dla fosfatydylocholin (dla grupy trimetyloamoniowej i metylenowej) oraz dla fosfatydyloseryny (dla grupy karboksylowej) [99]. Dla wody użyłam model TIP3P [100].

Wszystkie symulacje MD przeprowadziłam z wykorzystaniem pakietu GROMACS [97]. Zastosowałam periodyczne warunki brzegowe oraz metodę PME (Particle Mesh Ewald) [102, 103] z promieniem odcięcia 1.0 nm w celu uwzględnienia dalekozasięgowych oddziaływań elektrostatycznych. Symulacje wykonałam w temperaturze 300 K ze stałą sprężenia 0.1 ps oraz pod ciśnieniem 1 bara ze stałą sprężenia 2.0 ps w oparciu o metodę słabego sprężenia Berendsena [104]. Podczas symulacji, usztywniłam długości wiązań przy pomocy algorytmu LINCS [105], co pozwoliło na zastosowanie kroku całkowania o długości 2.0 fs. Początkowo każdy układ zrównoważyłam przez przeprowadzenie 2 μ s symulacji równowagowych.

B. Sterowana dynamika molekularna.

Aby rozwinąć ubikwitynę w kontrolowany sposób, przyłożyłam zewnętrzny potencjał do promienia bezwładności (R_{gyr}), który dla prędkości rozwijania $5 \cdot 10^{-6}$ nm ps⁻¹ zmieniał się od wartości początkowej 1.16 nm dla stanu natywnego do wartości 1.9 nm dla stanu rozwiniętego.

Układy z 5.0 M „przeskalowaną” betainą (o czynnik 1.2, 1.4 i 1.6) w układzie zawierającym lizozym-betaina-woda przygotowałam w analogiczny sposób jak dla ubikwityny.

Aby zwiększyć istotność statystyczną uzyskanych wyników, dla każdego układu wykonałam pięć niezależnych symulacji rozwijania. Początkowe konfiguracje dla symulacji mechanicznego rozwijania wzięłam z trajektorii równowagowych po 1.0 μ s, 1.25 μ s, 1.5 μ s, 1.75 μ s, 2.0 μ s.

C. Wyznaczanie ciśnienia osmotycznego.

Osiem układów z różnymi stężeniami cząsteczek betainy (0.5 M, 0.685 M, 1.0 M, 1.37 M, 1.5 M, 2.0 M, 3.0 M, 4.0 M) zbudowałam zgodnie z procedurą opisaną przez Luo and Roux [106]. Stężenia i inne szczegółowe parametry zestawiałam w Rozdziale 5 w Tablicy 5.4. Przestrzeń dostępną dla cząsteczek betainy została ograniczona przez wirtualną membranę półprzepuszczalną, poprzez przyłożenie potencjału harmonicznego z stałą siłową równą 1000 kJ mol⁻¹nm⁻². Każdy

układ (osiem różnych stężeń i osiem różnych symulowanych momentów dipolowych) symulowałam przez $1.0 \mu\text{s}$, uzyskując trajektorie o łącznej długości $64 \mu\text{s}$.

4.2.4 Wpływ osmolitów na termiczną stabilność białek

A. Molekularne układy i procedura symulacji.

Współrzędne początkowe dla białka Trp-cage o sekwencji NLYIQ WLKDG GPSSG RPPPS (wersja TC5b) składającego się z 20 aminokwasów zostały pobrane z danych pochodzących z eksperymentu spektroskopii NMR (PDB kod 1L2Y). Znacząca stabilność wersji TC5b białka Trp-cage [107], jego niewielki rozmiar i szybka kinetyka zwijania sprawiają, że białko to jest przedmiotem licznych badań dotyczących procesu fałdowania białek, m. in. z wykorzystaniem symulacji biomolekularnych [28, 108–111]. Każdy układ, dwunastościenne pudło symulacyjne zawierał pojedynczą cząsteczkę Trp-cage oraz cząsteczki rozpuszczalnika odpowiadające dwóm stężeniom betainy (1.5 i 3.5 M), dwóm stężeniom mocznika (3.5 i 5.0 M) oraz czystej wodzie (0 M). Dokładne liczby cząsteczek wody oraz osmolitu przedstawiłam w Tabelicy 4.2.

Układ/Stężenie	Liczba cząsteczek osmolitu	Liczba cząsteczek wody
0 M	—	3988
B 1.5 M	112	3152
B 3.5 M	262	2088
U 3.5 M	262	3099
U 5.0 M	374	2736

TABLICA 4.2: Skład rozpuszczalnika we wszystkich badanych układach.

Jony Cl^- oraz Na^+ zostały dodane w celu zneutralizowania układu i osiągnięcia fizjologicznego stężenia (150 mM NaCl). Parametry pola siłowego dla mocznika zostały uzyskane z uogólnionego pola siłowego CHARMM (CGenFF) [98], zaś parametry dla betainy zostały otrzymane przez analogię, korzystając z parametrów pola siłowego CHARMM27 dla fosfatydylocholine (dla grupy trimetyloamoniowej i metylenowej) oraz dla fosfatydyloseryny (dla grupy karboksylowej) [99]. Parametry pola siłowego dla białka i jonów zostały uzyskane z pola siłowego CHARMM36 [99].

Każdy układ był równoważony przez 10 ns w warunkach NPT w temperaturze 300 K i pod ciśnieniem 1.0 atm. Następnie, dla każdego z przygotowanych układów przeprowadzono symulację REMD z zastosowaniem 50 replik w zakresie temperatury od 300 do 510 K. Temperatury pośrednie zostały wybrane tak aby uzyskać jednolitą częstotliwość wymian. Każda replika

była symulowana przez 600 ns. Wszystkie symulacje zostały przeprowadzone z użyciem pakietu GROMACS 4.6.5 [112]. Zostały zastosowane periodyczne warunki brzegowe w 3D a oddziaływania elektrostatyczne zostały obliczone korzystając z metody PME (z ang. Particle Mesh Ewald) z promieniem odcięcia równym 1.0 nm i siatką Fouriera 0.12 nm. Promień odcięcia równy 1.0 nm został użyty także dla oddziaływań Lennarda-Jonesa. Długości wiązań zostały usztywnione, korzystając z algorytmu P-LINCS dla białka [112] oraz SETTLE [113] dla wody. Równania ruchu były całkowane z wykorzystaniem algorytmu żabiego skoku (z ang. leap-frog algorithm) z krokiem czasowym 2.0 fs.

B. Termodynamika oddziaływania białko–osmolit.

W celu zbadania wpływu temperatury na preferencyjne oddziaływania między cząsteczkami osmolitu a powierzchnią białka Trp-cage, zostały obliczone profile entalpii swobodnej w funkcji temperatury $\Delta G(r, T) = -kT \ln g(r, T)$, gdzie: $g(r, T)$ jest funkcją rozkładu radialnego między cząsteczkami osmolitu a powierzchnią białka (z ang. minimum-distance distribution function) obliczoną w temperaturze T . Wkłady entalpowe (ΔH) i entropowe ($-T\Delta S$) do entalpii swobodnej asocjacji cząsteczek osmolitu do powierzchni białka (ΔG) zostały otrzymane przez dopasowanie do otrzymanych profili entalpii swobodnych wyrażen analitycznych:

$$\begin{aligned} \Delta G(r, T) = & \Delta H(r, T_0) + \Delta C_p(r)(T - T_0) \\ & - T \left[\Delta S(r, T_0) + \Delta C_p(r) \ln \left(\frac{T}{T_0} \right) \right] \end{aligned} \quad (4.23)$$

gdzie: dwa parametry dopasowania $\Delta H(r, T_0)$ i $\Delta S(r, T_0)$ są wkładami entalpowymi i entropowymi do profilu entalpii swobodnej w temperaturze odniesienia T_0 a trzeci parametr dopasowania ΔC_p jest odpowiednią zmianą pojemności cieplnej przy założeniu jej niezależności od temperatury. Odpowiednio, zależności wkładów entalpowych i entropowych od temperatury zostały wyznaczone następująco:

$$\Delta H(r, T) = \Delta H(r, T_0) + \Delta C_p(r) (T - T_0) \quad (4.24)$$

$$\Delta S(r, T) = \Delta S(r, T_0) + \Delta C_p(r) \ln \left(\frac{T}{T_0} \right) \quad (4.25)$$

4.2.5 Czy istnieje szansa wyznaczenia parametru charakteryzującego wpływ wybranych osmolitów na równowagę konformacyjną białka dla zadanej sekwencji aminokwasowej w oparciu o sumowanie elementarnych wkładów?

A. Molekularne układy i procedura symulacji – modelowe heptapeptydy.

W celu wyznaczenia wkładów do współczynnika preferencyjnego oddziaływania Γ pochodzących od poszczególnych elementów strukturalnych białek, wykonałam symulacje MD dla modelowych, w pełni hydratowanych heptapeptydów, po jednym dla każdego z dwudziestu naturalnych aminokwasów. W celu zapewnienia lepszego próbkowania oraz w celu ułatwienia zbieżności wartości Γ , użyłam heptapeptydy zawierające po trzy aminokwasy danego typu, oddzielone przez fragmenty GlyGly. Poszczególne heptapeptydy zawierające po trzy izolowane przestrzenie łańcuchy boczne wszystkich kodowanych aminokwasów utrzymywałam w konformacji rozciągniętej. Wszystkie heptapeptydy wygenerowałam przy użyciu programu Pymol [114] i symulowałam przez 1 μ s. Każdy układ, dwunastościenne pudło symulacyjne o długości 4.9 nm (odpowiadającej około 91 nm^3), zawierał pojedynczą cząsteczkę heptapeptydu oraz cząsteczki rozpuszczalnika odpowiadające 2.5 M roztworowi TMAO, 5.0 M roztworowi mocznika i czystej wodzie (0 M). W celu neutralizacji ładunku i zapewnienia fizjologicznego stężenia (150 mM), do każdego układu dodałam odpowiednią liczbę jonów sodowych (Na^+) oraz chlorkowych (Cl^-). Parametry pola siłowego dla heptapeptydów oraz dla jonów zostały uzyskane z pola siłowego CHARMM36, zaś dla cząsteczek mocznika oraz TMAO z uogólnionego pola siłowego CHARMM (CGenFF) [101]. Dla wody użyłam model TIP3P [100].

Wszystkie symulacje MD przeprowadziłam z wykorzystaniem pakietu GROMACS [97] w warunkach NPT. Symulacje wykonałam w temperaturze 300 K ze stałą sprężenia 0.1 ps oraz pod ciśnieniem 1 bara ze stałą sprężenia 2.0 ps w oparciu o metodę Berendsena [104]. W celu przewidzenia zależności temperaturowej profili entalpii swobodnej dla asocjacji cząsteczek osmolytu z powierzchnią białka, układy symulowałam także w czterech dodatkowych temperaturach (280, 290, 310 and 320 K). Zastosowałam periodyczne warunki brzegowe i metodę PME (z ang. Particle Mesh Ewald) [102, 103] z promieniem odcięcia 1.0 nm, w celu uwzględnienia dalekozasięgowych oddziaływań elektrostatycznych. Podczas symulacji, długości wiązań usztywniłam przy pomocy algorytmu P-LINCS [105], co pozwoliło na całkowanie równań ruchu z krokiem czasowym 2.0 fs.

B. Molekularne układy i procedura symulacji – modelowe białka.

W celu przetestowania założenia o addytywności współczynnika $\Delta\Gamma$, przeprowadziłam symulacje MD wybranych białek modelowych, zarówno w stanie natywnym jak i zdenaturowanym, z wykorzystaniem zwielokrotnionej metadynamiki (β -spinka), wymiany replik temperaturowych (ubikwityna) oraz nierównowagowej denaturacji mechanicznej (lizozym).

Trzyp symulowałam w 5.0 M roztworze mocznika, 2.5 M roztworze TMAO oraz w układzie niezawierającym cząsteczek osmolitu. W celu przewidzenia współczynników preferencyjnego oddziaływania Γ w stanie zwiniętym i rozwiniętym białka wykonałam po dziesięć niezależnych symulacji metadynamiki (z ang. multiple-walker metadynamics simulations) [115], które polegają na dynamicznym aktualizowaniu potencjału w celu doprowadzenia układu do równomiernego rozkładu wzdłuż wybranych współrzędnych. Jako współrzędne reakcji użyłam zmienne opisujące stopień zwinięcia białka, takie jak: promień bezwładności i liczba wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Symulacje MD wykonałam z wykorzystaniem pola siłowego CHARMM36 [101] zgodnie z powyższym opisem.

Dla lizozymu i ubikwityny wykonałam symulacje mechanicznego rozwijania z zewnętrznym potencjałem przyłożonym do promienia bezwładności (dokładny opis znajduje się w podrozdziale 4.2.1 i 4.2.3). Układy symulowałam przez 1.0 μs w 5.0 M roztworze mocznika oraz 2.5 M roztworze TMAO.

4.3 Analiza danych

4.3.1 Średnie odchylenie kwadratowe (z ang. root-mean square deviation, RMSD)

Średnie odchylenie kwadratowe jest metryką pozwalającą porównywać między sobą dwie konformacje tej samej cząsteczki i jest zdefiniowane następująco:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N |r_i - r_i^0|^2}, \quad (4.26)$$

gdzie:

N – całkowita liczba atomów ciężkich

r_i – wektor położenia i -tego atomu ze struktury odnośnej

r_i^0 – wektor położenia i -tego atomu ze struktury porównywanej

4.3.2 Wiązania wodorowe (z ang. hydrogen bonds)

W tej pracy wiązania wodorowe definiowane były w oparciu o kryterium geometryczne, w którym zakłada się, że wiązanie wodorowe istnieje, jeśli odległość akceptor–donor jest mniejsza niż 0.35 nm a kąt akceptor–donor–wodór jest mniejszy niż 40°.

4.3.3 Liczba cząsteczek w kontakcie z białkiem

Liczby cząsteczek osmolitu w kontakcie z białkiem obliczyłam w Rozdziale 5.4 przyjmując, że cząsteczki są w kontakcie jeżeli centralny atom osmolitu (metylenowy atom węgla betainy oraz atom węgla mocznika) jest w odległości mniejszej niż 0.45 nm od dowolnego atomu białka.

4.3.4 Lokalny współczynnik podziału dla osmolitu – C_O

Lokalny współczynnik podziału dla osmolitu, C_O , definiuje się następującym wzorem:

$$C_O = \frac{N_O}{N_W} \cdot \frac{M_W}{M_O}, \quad (4.27)$$

gdzie: N_O oraz N_W są to liczby cząsteczek, odpowiednio, osmolitu lub wody w kontakcie z białkiem, M_O i M_W są to całkowite liczby cząsteczek osmolitu i wody w układzie.

Jeżeli lokalny współczynnik podziału przyjmuje wartość powyżej 1.0 oznacza to, że cząsteczki osmolitu preferencyjnie oddziałują z białkiem, jeżeli zaś przyjmuje wartość poniżej 1.0 oznacza to, że cząsteczki osmolitu nie oddziałują korzystnie z białkiem. Z kolei, jeżeli przyjmuje wartość równą 1.0 oznacza to, że nie ma preferencyjnych oddziaływań zarówno z cząsteczkami wody jak i cząsteczkami osmolitu.

A. W Rozdziale 5.1 i 5.3 zastosowałam kryterium, że cząsteczki są w kontakcie jeżeli centralny atom osmolitu (metylenowy atom węgla betainy oraz atom węgla mocznika) jest w odległości mniejszej niż 0.55 nm od dowolnego atomu białka (łańcucha głównego i łańcuchów bocznych).

B. Zgodnie z pracą Stumpe i Grubmullera [56], w Rozdziale 5.2 zastosowałam kryterium, że cząsteczki są w kontakcie jeżeli są w odległości mniejszej niż 0.35 nm. Lokalne współczynniki podziału obliczyłam dla każdego typu aminokwasu znajdującego się na powierzchni białka (łańcuchów bocznych i łańcucha głównego) i dla różnych możliwych oddziaływań: białko (grupa NH) i atom tlenu z cząsteczki osmolitu (proliny i TMAO), atom tlenu z białka i grupa aminowa z cząsteczek proliny.

4.3.5 Współczynnik preferencyjnego oddziaływania – Γ

Współczynnik Γ przedstawia preferencje oddziaływań osmolitów z białkiem w zależności od odległości od powierzchni białka. Definiuje się go następująco: [68, 116, 117]

$$\Gamma(r) = \langle N_B(r) - \left(\frac{N_B^{bulk}}{N_W^{bulk}} \right) \cdot N_W(r) \rangle, \quad (4.28)$$

gdzie: N_W and N_B są liczbami cząsteczek wody i betainy w domenie lokalnej wokół białka (region do odległości r), zaś N_W^{bulk} i N_B^{bulk} są tymi liczbami w głębi roztworu. $\langle \rangle$ oznacza uśrednianie po trajektorii. Jeżeli współczynnik Γ przyjmuje wartości ujemne oznacza to, że osmolit jest wykluczany z domeny lokalnej wokół białka, z kolei gdy jest on dodatni oznacza to, że osmolit jest tam akumulowany.

4.3.6 Radialna funkcja preferencji – $f_O(r)$

Radialną funkcję preferencji (uogólnienie współczynnika C_O) zdefiniowałam jako stosunek liczby cząsteczek osmолitu i cząsteczek wody znajdujących się w pewnej odległości r od powierzchni białka do ich stosunku w wodzie objętościowej, zgodnie ze wzorem:

$$f_O(r) = \frac{N_O(r)}{N_W(r)} \cdot \frac{M_W}{M_O} \quad (4.29)$$

gdzie: $N_O(r)$ oraz $N_W(r)$ są to liczby cząsteczek, odpowiednio, osmолitu lub wody w domenie lokalnej wokół białka, M_O i M_W są to całkowite liczby cząsteczek osmолitu i wody w układzie.

4.3.7 Średnia ważona funkcja preferencji

W celu pełniejszego opisu rozkładu osmолitów względem białka, funkcje $f_O(r)$ uśredniłam dla każdego analizowanego obszaru powierzchni:

$$P(r) = \frac{\sum f_O(r)_i \cdot A_i}{\sum A_i}, \quad (4.30)$$

gdzie: A_i jest wagą tj. procentem powierzchni odpowiadającym poszczególnym resztom aminokwasowym z Tablicy 5.3. Średnia ważona daje globalny obraz rozkładu cząsteczek osmолitu w pobliżu powierzchni białka.

4.3.8 Powierzchnie dostępne dla rozpuszczalnika (z ang. solvent accessible surface area, SASA)

Powierzchnie dostępne dla rozpuszczalnika dla poszczególnych aminokwasów znajdujących się na powierzchni lizozymu obliczyłam na podstawie struktury 1AKI.pdb metodą podwójnej sześciennej siatki z promieniem sondy 0.14 nm.

4.3.9 Współczynniki $\Delta\Gamma$ dla modelowych białek

W celu obliczenia współczynnika preferencyjnego oddziaływania $\Delta\Gamma$ dla modelowych białek (lizozym, ubikwityna, trpzip) założyłam jego addytywność i zsumowałam wkłady policzone przy pomocy heptapeptydów w sposób ważony, zgodnie ze wzorem:

$$\Delta\Gamma = \sum_i^N \Delta x_i \Delta\Gamma_i, \quad (4.31)$$

gdzie: $\Delta\Gamma_i$ są wkładami pochodzącymi do współczynnika preferencyjnego oddziaływania od poszczególnych aminokwasów a suma została obliczona dla wszystkich N aminokwasów wchodzących w skład danego białka modelowego. Jako wagi zastosowałam względne zmiany w ekspozycji na rozpuszczalnik dla danej reszty Δx_i obliczone jako: $\Delta s_i/s_i$, gdzie: Δs_i jest różnicą w powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika dla i -tego aminokwasu między stanem rozwiniętym i zwiniętym białka a s_i jest maksymalną wartością SASA dla danej reszty (w pełni eksponowanej na rozpuszczalnik).

4.4 Sprzęt i oprogramowanie komputerowe

Obliczenia w ramach pracy wykonywałam za pomocą klastrów obliczeniowych (Galera, Tryton) w centrum obliczeniowym TASK (Trójmiejska Akademicka Sieć Komputerowa) [118]. Korzystałam również z superkomputerów Zeus i Prometheus, które znajdują się w centrum obliczeniowym w Krakowie [119].

Symulacje MD przeprowadziłam przy użyciu pakietu obliczeniowego Gromacs [97]. Do wizualizacji trajektorii (Rysunki 4.9, 5.1 i 5.4) posłużyłam się programem VMD (z ang. Visual Molecular Dynamic) [120]. Rysunki 5.1 i 10.2 wykonałam w Matlabie przy pomocy skryptu

[121]. Rysunki 5.15 i 5.29 wykonałam przy pomocy skryptów autorstwa Miłosza Wieczora. Rysunek 5.25 wykonałam przy pomocy skryptu autorstwa Mateusza Koguta [122]. Wszystkie rysunki wykonałam za pomocą programów Matlab [123], Gimp [124] oraz Inkscape [125].

Rozdział 5

WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie na poziomie molekularnym oddziaływań międzycząsteczkowych w układach białko-osmolit-woda, co mogłoby przybliżyć poznanie molekularnego mechanizmu wpływu osmolitów na stabilność białek. Aby osiągnąć cel główny postawiłam sobie pięć celi szczegółowych (patrz: Rozdział 3). W związku z tym prezentację wyników również podzieliłam na pięć podrozdziałów, które odpowiadają wskazanym przeze mnie celom szczegółowym w Rozdziale 3.

W części pierwszej przedstawiłam opis mechanicznego rozwijania lizozymu w obecności typowego osmolitu stabilizującego (betainy) i destabilizującego (mocznika). Efektem tej części pracy było obliczenie wartości pracy potrzebnej do rozwinięcia lizozymu w obecności obydwu osmolitów: mocznika i betainy oraz przy braku osmolitów. Aby wyjaśnić różnice w wartościach pracy potrzebnych do rozwinięcia lizozymu obliczyliśmy w ramach współautorskiej pracy [81] różne molekularne parametry charakterystyki badanych układów, między innymi, liczby wiązań wodorowych, lokalne współczynniki podziału w układzie: białko-osmolit-woda, profile entalpii swobodnych, entalpii oraz entropii dla pojedynczych cząsteczek rozpuszczalnika w funkcji odległości od powierzchni białka. Na podstawie uzyskanych wyników wyjaśniliśmy, dlaczego cząsteczki betainy są wykluczane z powierzchni lizozymu, zaś cząsteczki mocznika są na jej powierzchni akumulowane.

W drugim podrozdziale, zweryfikowałam hipotezę o tym czy wszystkie osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni lizozymu. Okazało się, że w przypadku TMAO, wykluczanie cząsteczek osmolitu jest bezsprzeczne. Zaś, w przypadku proliny, zaobserwowałam bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami osmolitu i białkiem. Wyniki, które uzyskałam za pomocą symulacji MD były zgodne z uzyskanymi równoległe wynikami eksperymentalnymi.

W trzeciej części pracy, opisałam mechaniczne rozwijanie na przykładzie mniejszego białka – ubikwityny. Aby sprawdzić hipotezę o entalpowym pochodzeniu stabilizacji białek przez cząsteczki betainy, przeskalowałam cząstkowe ładunki wszystkich atomów cząsteczek betainy przez wspólny czynnik w zakresie od 0.4 do 1.6. Na podstawie uzyskanych wyników ustaliłam jak stabilizacja zależy od symulowanego momentu dipolowego cząsteczek osmolitu. Dokonałam także walidacji modelu cząsteczek betainy oraz zdekomponowałam wartości prac rozwijania na wkłady pochodzące z wykluczania cząsteczek osmolitu z powierzchni białka, różnic w solwatacji oraz wpływu ciśnień osmotycznych.

W kolejnej części pracy przedstawiłam molekularny mechanizm wyjaśniający jak osmoly wpływają na denaturację termiczną małego białka globularnego Trp-cage. Ze względu na fakt, że wcześniej badacze koncentrowali się przede wszystkim na bezpośrednim oddziaływaniu cząsteczek osmolitów z białkami [28], w ramach współautorskiej pracy, która jest w trakcie realizacji [122] skupiliśmy się na określeniu głównych termodynamicznych sił napędowych odpowiedzialnych za zmianę stabilności białka.

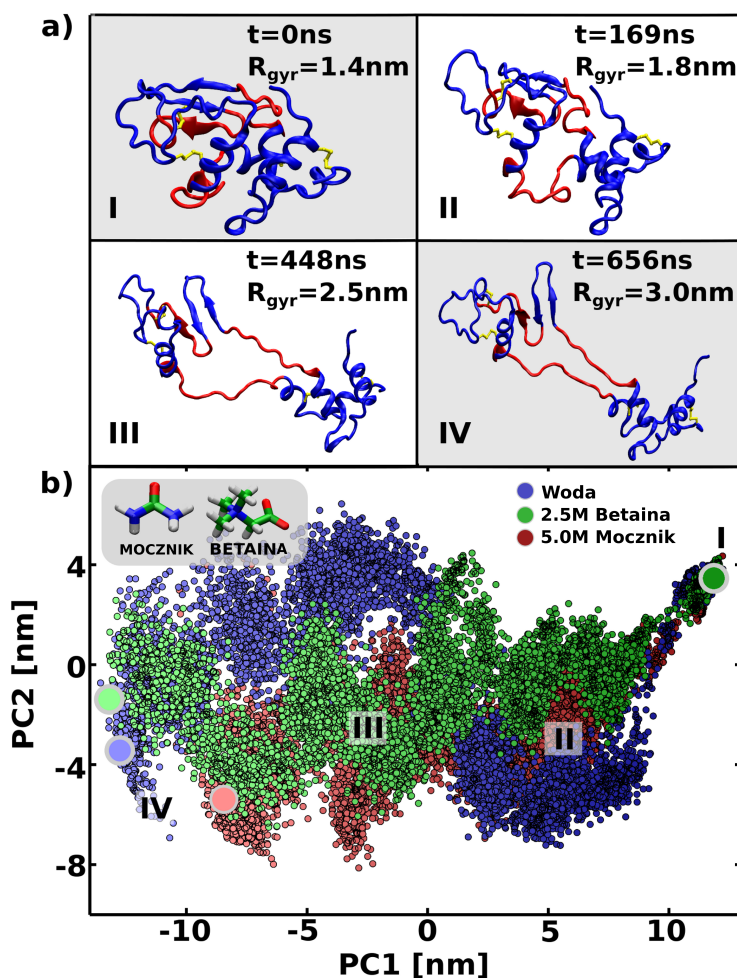
Ostatni podrozdział poświęcony jest sprawdzeniu czy możliwe jest przewidywanie dla zadanej sekwencji aminokwasowej parametru charakteryzującego wpływ wybranych osmolitów na równowagę konformacyjną białka poprzez sumowanie elementarnych wkładów pochodzących od poszczególnych elementów strukturalnych białka. Dodatkowo zbadałam mechanistyczne aspekty wpływu osmolitów na stabilność białek, m.in. wyznaczyłam entalpie swobodne asocjacji cząsteczek osmolitów z poszczególnymi elementami strukturalnymi białek, a następnie zdekomponowałam je na wkład entalpowy i entropowy w oparciu o zależność temperaturową.

5.1 Wpływ osmolitów na stabilność białek na przykładzie mechanicznego rozwijania lizozymu

5.1.1 Wspólna ścieżka wymuszonego rozwijania

W celu zbadania wpływu typowych osmolitów stabilizujących i destabilizujących na stabilność białek, użyłam nierównowagowej dynamiki molekularnej do zasymulowania mechanicznego rozwijania lizozymu w obecności osmolitów: mocznika, betainy oraz przy ich braku. W tym celu zewnętrzne siły sterujące przyłożyłam do promienia bezwładności (promienia żyracji, R_{gyr}), zdefiniowanego dla referencyjnej grupy zawierającej wszystkie atomy C_α w łańcuchu

głównym białka. Promień bezwładności zmieniał się od wartości 1.4 nm dla stanu natywnego do wartości 3.0 nm (szczegółowy opis w rozdziale 4.2.1A).



RYSUNEK 5.1: Mechaniczne rozwijanie białka a) Wykresy rozwijania lizozymu ukazane zostały dla najmniejszej prędkości rozciągania $5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$. Wartości promienia bezwładności (R_{gyr}) na kolejnych rysunkach są równe: 1.4 nm – stan natywny; 1.8 nm – punkt zerwania głównych oddziaływań stabilizujących strukturę białka; 2.0 nm – największe zmiany w strukturze lizozymu, tj. fragmenty schowane w stanie natywnym, a po rozwinięciu białka – eksponowane na rozpuszczalnik zaznaczono kolorem czerwonym, 3.0 nm – arbitralnie przyjęty stan zdenaturowany. b) Trajektorie rozwijania lizozymu w układzie niezawierającym cząsteczek osmolitu (kolor niebieski), w obecności cząsteczek betainy (kolor zielony) i w obecności cząsteczek mocznika (kolor czerwony). Początkowe i końcowe stany są pokazane dużymi kółkami.

Aby sprawdzić czy droga przejścia od stanu zwiniętego do rozwiniętego zależy od składu rozpuszczalnika, na podstawie danych symulacyjnych obliczyłam i zdiagnozowałam macierz kowariancji dla wszystkich atomów C_{α} białka podczas jego rozciągania w roztworze wodnym przy braku cząsteczek osmolitu. Jako współrzędną zbiorową opisującą przejście lizozymu ze stanu natywnego do rozwiniętego zastosowałam projekcję na pierwszy i drugi wektor własny (ev) macierzy kowariancji. Wyniki rzutowania trajektorii uzyskanych w obecności cząsteczek mocznika

i betainy na te dwa wektory własne wraz z trajektorią otrzymaną przy braku cząsteczek osmolitów przedstawiłam na Rysunku 5.1b. Zgodnie z oczekiwaniami, stany początkowe wszystkich badanych układów znajdują się w tym samym miejscu ($ev1=13$ nm, $ev2=4$ nm). Po rozciągnięciu lizozymu wartości głównych składowych dla układu lizozym-mocznik-woda wynoszą $ev1 = -8$ nm oraz $ev2 = -5$ nm, dla układu lizozym-betaina-woda: $ev1 = -13$ nm oraz $ev2 = -2$ nm a dla lizozymu niezawierającego cząsteczek osmolitu: $ev1 = -13$ nm oraz $ev2 = -3.5$ nm. Widać zatem, że stany końcowe badanych układów również są do siebie dosyć podobne a proces rozwijania we wszystkich przypadkach przebiega w sposób porównywalny tj. polega na dysocjacji dwóch globularnych subdomen, z których każda utrzymywana jest przez mostki disiarczkowe. W wyniku tej dysocjacji wyeksponowaniu na rozpuszczalnik ulegają w każdym przypadku dwie antyrównoległe nici peptydowe łączące subdomeny. Można zatem domniemywać, że różnice w pracach potrzebnych do rozwinięcia białka nie wynikają z istotnych różnic w stanach końcowych procesu rozwijania.

Wniosek ten znajduje dodatkowe potwierdzenie na wykresach zależności powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika (SASA) i średnich odchyleniach kwadratowych (RMSD) w funkcji promienia bezwładności (R_{gyr}), które pokazałam w Rozdziale 10 – Załączniki, Rysunki 10.1 i 10.2.

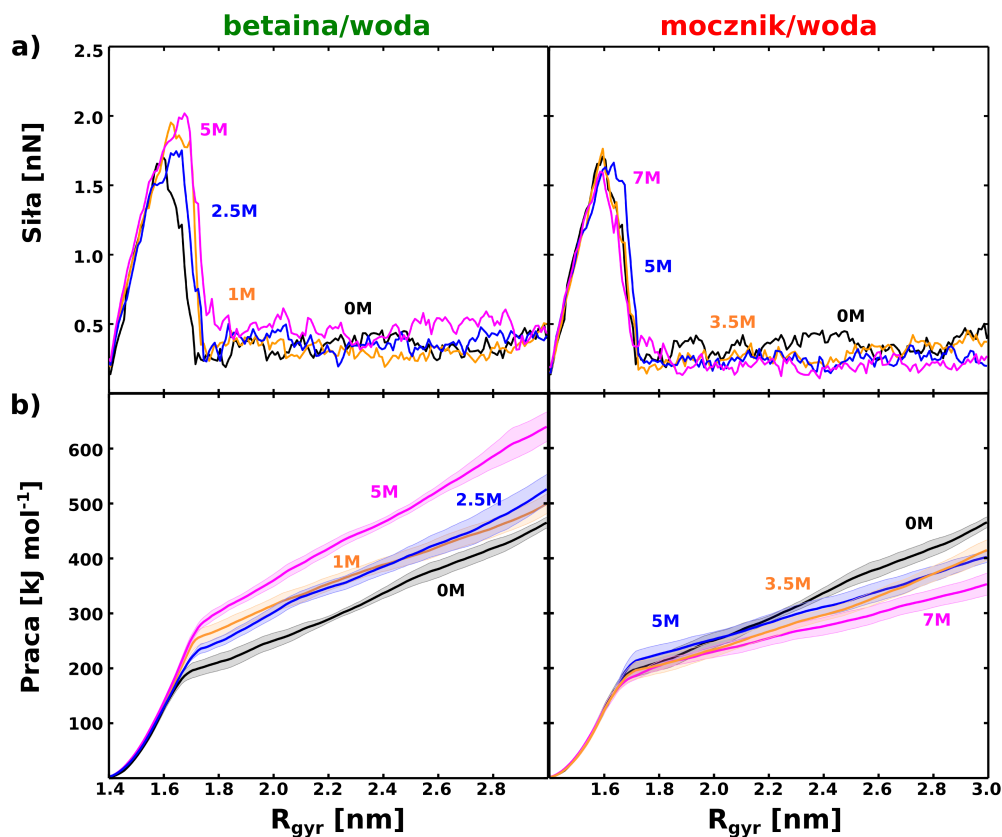
5.1.2 Praca rozwijania jako miara przesunięcia równowagi denaturacji wywołanej przez cząsteczki osmolitu

W celu zoobrazowania podobieństw i różnic w wartościach sił potrzebnych do rozwinięcia białka w obecności cząsteczek mocznika oraz betainy, na Rysunku 5.2a przedstawiłam wykresy zależności siły przyłożonej do lizozymu od promienia bezwładności dla różnych prędkości rozwijania.

Na podstawie wykresu zależności siły przyłożonej do lizozymu od promienia bezwładności (Rysunek 5.2a) można zauważyć, że początkowo, w zakresie promienia bezwładności od 1.4 do ok. 1.7 nm–1.8 nm, przykładana siła szybko wzrasta a struktura białka poddana jest silnym naprężeniom. W okolicy 1.8 nm siła uzyskuje maksimum (z ang. rupture force) i dochodzi do tzw. pęknięcia struktury białka, które charakteryzuje się zerwaniem głównych oddziaływań stabilizujących strukturę natywną. Powyżej tego punktu rozwijanie przebiega łatwiej, pod wpływem dużo mniejszych sił zdominowanych przez tarcie.

Wysoki koszt energetyczny rozwijania lizozymu podczas początkowego etapu jest spowodowany ekspozycją poprzednio schowanych hydrofobowych łańcuchów bocznych i innych niepolarnych fragmentów, na co wskazuje duża zmiana SASA (Rysunek 10.1).

Po przekroczeniu bariery ograniczającej szybkość, dalszy wzrost SASA jest mniej zauważalny i siły sterujące spadają do wartości znacznie niższych, chociaż efekt wysokiego stężenia roztworów mocznika i betainy, odpowiednio, ułatwiający i przeciwstawiający się rozwijaniu, jest nadal widoczny.



RYSUNEK 5.2: Siły i prace rozwijania w sterowanych symulacjach MD. a) Siły potrzebne do rozciągnięcia lizozymu w obecności wzrastających stężeń roztworów betainy i mocznika oraz przy braku osmotów b) Praca potrzebna do rozwinięcia lizozymu jako funkcja promienia bezwładności R_{gyr} . Wykresy wykonane są dla prędkości rozciągania $5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$; dla większych prędkości rozciągania – Rysunki 10.3 i 10.4. Pokazano paski błędów.

Na Rysunku 5.2b przedstawiłam wartości pracy potrzebne do rozwinięcia lizozymu w obecności cząsteczek osmotu: betainy i mocznika oraz przy ich braku, uzyskane dla najmniejszej prędkości rozciągania $5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$. Ze względu na podobną dyssypację energii, różnice w pracach rozwijania w stosunku do czystej wody mogą odzwierciedlać rzeczywisty (zakłócający strukturę białka) wpływ cząsteczek osmotu na równowagę zwijania białka.

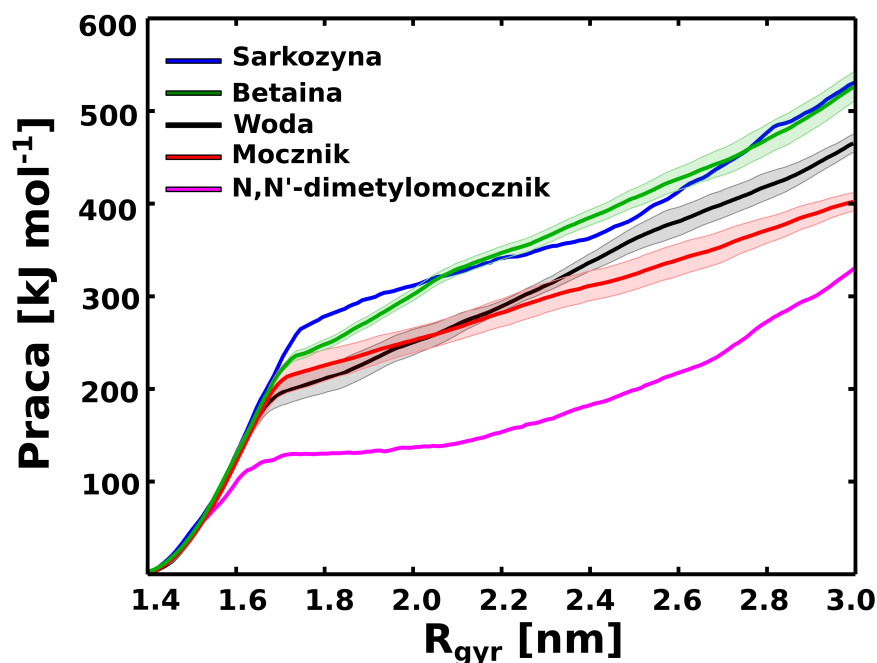
Okazało się, że w porównaniu do układu niezawierającego cząsteczek osmotu, więcej pracy jest potrzebne do rozwinięcia lizozymu w obecności cząsteczek betainy aż do 40% w 5.0 M

roztworze. Zaś odwrotny efekt obserwujemy w przypadku cząsteczek mocznika – lizozym staje się bardziej wrażliwy na naprężenia mechaniczne i w związku z tym praca rozwijania jest mniejsza nawet o 20 % dla 7.0 M roztworu mocznika.

Na podstawie uzyskanych wyników widać, że zarejestrowane wartości pracy rozwijania uzyskane za pomocą tego modelu są skorelowane ze znanym z doświadczenia sposobem działania cząsteczek mocznika i betainy na stabilność białek. Zgodność ta daje zatem punkt wyjścia do analizy molekularnego podłoża zróżnicowanego efektu cząsteczek osmolitu na zachowanie białek. W związku z tym, głównym celem dalszych badań było wyjaśnienie dlaczego więcej pracy potrzebujemy do rozwinięcia lizozymu w obecności cząsteczek betainy niż w obecności cząsteczek mocznika. Co istotne, ustalenie tej przyczyny mogłoby pomóc w poznaniu mechanizmu wpływu cząsteczek osmolitu na stabilność białek.

W przypadku obydwu roztworów osmolitu, praca wzrasta szybciej przy wyższych prędkościach rozciągania niż w czystej wodzie – destabilizujący wpływ cząsteczek mocznika jest efektywnie odwrócony w granicach szybkiego rozwijania (Rysunek 10.3). Ze względu na to, że roztwory mocznika i betainy mają większą lepkość niż roztwór czystej wody [126–128], na podstawie tej tendencji można wywnioskować, że podczas gdy dla wyższych prędkości siła zdominowana jest przez opór lepkości, przy najniższej prędkości – dyssypowana energia jest na tyle niska, że obliczona praca odzwierciedla rzeczywisty wpływ cząsteczek osmolitów na równowagę zwijania/rozwijania białka.

Aby dodatkowo przetestować adekwatność stosowanego modelu, przeprowadziłam również symulacje ukazujące rozwijanie lizozymu w obecności dwóch innych osmolitów: N-metyloglicyny (sarkozyny) oraz N,N'-dimetylomocznika. Według autorów pracy [127], cząsteczki sarkozyny stabilizują białka silniej niż cząsteczki betainy, przy jednoczesnej niższej lepkości roztworów sarkozyny w stosunku do roztworów betainy. Dimetylomocznik jest z kolei silniejszym denaturantem niż sam mocznik a jednocześnie roztwory zawierające N,N'-dimetylomocznika są bardziej lepkie niż roztwory mocznika [126–128]. Na podstawie Rysunku 5.3 można zauważyć, że do rozwinięcia lizozymu w obecności cząsteczek N,N'-dimetylomocznika potrzeba mniej pracy niż do rozwinięcia lizozymu w obecności cząsteczek mocznika. Z kolei, do rozwinięcia lizozymu w obecności cząsteczek sarkozyny potrzebujemy więcej pracy niż do rozwinięcia lizozymu w obecności cząsteczek betainy. Obserwacje te są zatem zgodne z doświadczalnie potwierdzonym wpływem osmolitów stabilizujących i destabilizujących na białka, a nie wynikają z wpływu lepkości rozpuszczalnika.

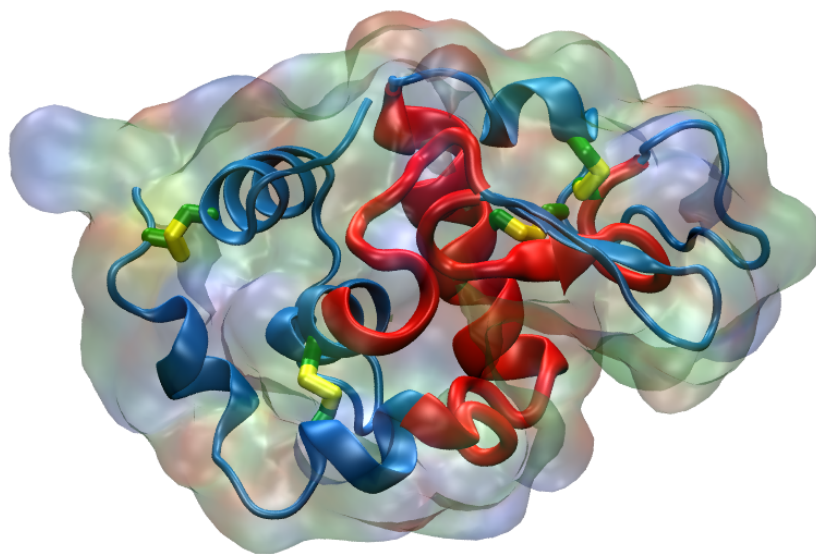


RYSUNEK 5.3: Zależności pracy potrzebnej do rozciągnięcia lizozymu w czystej wodzie (kolor czarny) oraz w obecności cząsteczek osmolitu: sarkozyny (kolor niebieski), betainy (kolor zielony), mocznika (kolor czerwony) oraz N,N'-dimetylomocznika (kolor różowy) w funkcji R_{gyr} dla prędkości rozciągania $5 \times 10^{-6} \text{ nm} \cdot \text{ps}^{-1}$. Stężenia roztworów osmolitu w poszczególnych układach zostały wybrane w taki sposób, aby wszystkie roztwory miały podobne frakcje objętościowe osmolitu. Pokazano paski błędów.

5.1.3 Analiza wiązań wodorowych ujawnia istotne różnice między rozwijaniem lizozymu w obecności cząsteczek betainy i mocznika

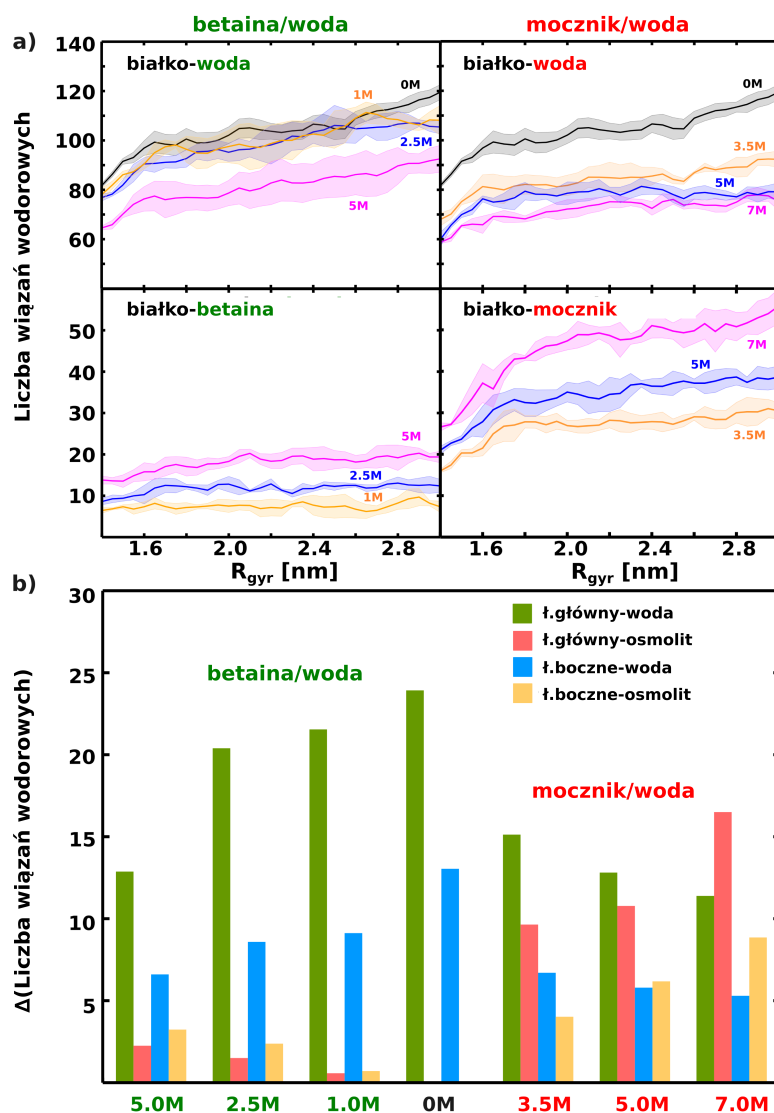
Należy oczekiwać, że wraz ze wzrostem stężenia roztworu osmolitu, ilość wody dostępnej do solwowania białka maleje zarówno w stanie rozwiniętym, jak i zwiniętym. Hydrofilowe cząsteczki osmolitu mogą skompensować ten spadek przez dostarczenie dodatkowych wiązań wodorowych z białkiem. Jednak, ze względu na to, że cząsteczki osmolitów mogą tworzyć silniejsze lub słabsze wiązania wodorowe w porównaniu z wodą, to ich obecność prowadzi do dodatnich lub ujemnych entalpii przeniesienia białka z wody do roztworu osmolitu. Ponieważ liczba miejsc mogących tworzyć wiązania wodorowe na powierzchni białka ogólnie zwiększa się podczas rozwijania, niezerowe entalpie przeniesienia mogą przełożyć się na stabilizację lub destabilizację stanu natywnego. W związku z tym wyznaczyłam liczby wiązań wodorowych utworzonych między lizozymem i cząsteczkami osmolitu oraz wody w funkcji promienia bezwładności, R_{gyr}

(Rysunek 5.5a) – szczegółowy opis dotyczący wyznaczenia liczby wiązań wodorowych przedstawiłam w rozdziale 4.3.2. Ze względu na to, że praca rozwijania w każdym układzie zależy od różnic w liczbie wiązań wodorowych między stanem rozwiniętym i natywnym białka, na Rysunku 5.5b porównałam całkowite zmiany liczby wiązań wodorowych. Aby uzyskane wyniki były mniej czułe na fluktuacje konformacyjne naładowanych łańcuchów bocznych znajdujących się na powierzchni białka, uwagę skoncentrowałam na analizie wiązań wodorowych między dwoma antyrównoległymi niemi (Glu35–Asn65 and Ile88–Ala110) łączącymi dwie subdomeny lizozymu, które rozpadają się w czasie rozwijania (Rysunek 5.4). W celu zaś ułatwienia porównania, wykluczyłam fragment beta-kartki (Thr43–Gly54), który inaczej zachowuje się w roztworach betainy i mocznika. Na Rysunku 5.4 zaznaczyłam na czerwono fragmenty eksponowane jako ciągłe reprezentatywne łańcuchy polipeptydowe dla regionów, które są schowane w zwiniętych białkach i stają się eksponowane podczas rozwijania.



RYSUNEK 5.4: Struktura lizozymu. Na czerwono zaznaczone są fragmenty, które podlegają największej ekspozycji na rozpuszczalnik (tzw. fragmenty eksponowane, wychodzące na zewnątrz podczas rozciągania) i są one pokazane na tle reszty białka oznaczonej kolorem niebieskim. Dodatkowo pokazane są 4 mostki disiarczkowe. Powierzchnia lizozymu pokolorowana jest zgodnie z typami reszt (Rysunek 4.9).

Na lewym panelu Rysunku 5.5a można zauważyć, że w całym zakresie R_{gyr} , całkowita liczba wiązań wodorowych między białkiem a wodą w układzie zawierającym cząsteczki betainy jest tylko nieznacznie zmniejszona w stosunku do układu niezawierającego cząsteczek osmolitu (maksymalnie do 20% dla największego stężenia roztworu betainy). W tym samym czasie, chociaż cząsteczki betainy mogą potencjalnie tworzyć wiązania wodorowe z białkiem poprzez grupę karboksylową, liczba takich wiązań wodorowych jest relatywnie niewielka podczas rozwijania.



RYSUNEK 5.5: Zmiany liczby wiązań wodorowych wywołane rozwijaniem białka. a) Liczba wiązań wodorowych między białkiem a osmolitem lub wodą w funkcji R_{gyr} . Pokazano paski błędów. b) Różnica w liczbie wiązań wodorowych między stanem rozwiniętym i zwiniętym białka w obecności cząsteczek osmolitu oraz przy ich braku dla najmniejszej prędkości rozciągania ($5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$). Pokazane są cztery wkłady: łańcuch główny – woda (kolor zielony), łańcuch główny – osmolit (kolor czerwony), łańcuchy boczne – woda (kolor niebieski), łańcuchy boczne – osmolit (kolor pomarańczowy).

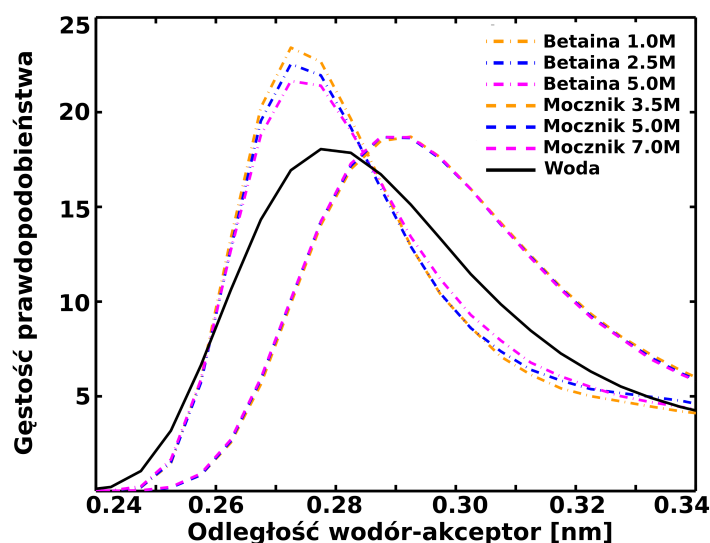
W rzeczywistości, wzrost liczby wiązań wodorowych między białkiem i cząsteczkami wody jest dużo większy niż między białkiem a cząsteczkami betainy, co widać na Rysunku 5.5b i jest porównywalny do wzrostu przy braku cząsteczek osmolitu, w szczególności dla łańcucha głównego białka dla których obserwuje się 80–90% wzrost w czystej wodzie. Na podstawie tych obserwacji widać, że nowo ekspozowane fragmenty są preferencyjnie solwatowane przez cząsteczki wody,

zaś cząsteczki betainy są wykluczane z powierzchni białka, co jest zgodne z danymi eksperymentalnymi [25, 55, 71–73]. Sam efekt wykluczania może być tłumaczony na drodze preferencyjnego oddziaływania wody z powierzchnią białka i/lub silną hydratacją betainy.

W przeciwieństwie do cząsteczek betainy, cząsteczki mocznika preferencyjnie akumuluje się na powierzchni białka (Rysunek 5.5b). Pomimo faktu, że liczba cząsteczek wody przewyższa liczbę cząsteczek mocznika 4.5- do 12-krotnie, na Rysunku 5.5b widać, że liczba nowych wiązań wodorowych między białkiem a cząsteczkami mocznika jest porównywalna do tych między białkiem a cząsteczkami wody (70–130 % tego drugiego w zależności od stężenia). Sugeruje to, że cząsteczki mocznika oddziałują z początkowo nieekspozowanymi resztami bardziej korzystnie niż z cząsteczkami wody, co obserwowane jest również doświadczalnie [55, 57, 73, 129]. Dokładny molekularny mechanizm tej preferencyjnej akumulacji nie jest jednak w pełni poznany [23, 129].

Aby zbadać ten mechanizm, po pierwsze należy zauważyć, że wzrost liczby wiązań wodorowych między białkiem a rozpuszczalnikiem jest tylko nieznacznie większy (4–6 %) w roztworze mocznika niż w układzie bez osmolitu (Rysunek 5.5). Jeżeli weźmiemy również pod uwagę, że wiązania wodorowe tworzone z białkiem przez cząsteczki mocznika są średnio dłuższe a tym samym energetycznie mniej korzystne niż te tworzone przez cząsteczki wody z białkiem (Rysunek 5.6), to można uważać, że w porównaniu do czystej wody, roztwory mocznika nie mają wyraźnie większej zdolności do stabilizowania rozwiniętych konformacji białka przez tworzenie bezpośrednich wiązań wodorowych. Dlatego też w przeciwieństwie do niektórych poprzednich wyników badań [30, 130, 131], na podstawie uzyskanych obecnie wyników można stwierdzić, że same oddziaływania polarne nie są wystarczające do wyjaśnienia zmniejszonej pracy rozwijania w roztworach mocznika. Najprawdopodobniej, destabilizacja wywołana obecnością cząsteczek mocznika wynika z korzystnych (niepolarnych) oddziaływań dyspersyjnych między cząsteczkami mocznika a białkiem [56, 66, 79] i/lub osłabieniem efektu hydrofobowego przez akumulację cząsteczek mocznika na powierzchni białka [65, 132–134].

Autorzy wcześniejszych prac zaproponowali, że wpływ cząsteczek betainy i innych cząsteczek metyloamin na stabilność białek ma częściowo charakter entalpowy, wynikający prawdopodobnie ze zmniejszonej solwatacji białka [135–137]. Dodatkowo, na podstawie danych przedstawionych na Rysunku 5.5b widać, że suma liczby nowych wiązań wodorowych utworzonych między cząsteczkami wody a białkiem oraz między cząsteczkami betainy a białkiem w 2.5 M roztworze betainy jest zmniejszona o około 10 % w porównaniu do roztworu bez osmolitu, bez wyraźnej zależności od stężenia roztworu betainy. Ten spadek – prowadzi do mniej korzystnej



RYSUNEK 5.6: Znormalizowane rozkłady długości wiązań wodorowych utworzonych pomiędzy lizozymem a cząsteczkami wody (w układzie z czystą wodą, czarna linia ciągła) a cząsteczkami betainy (w roztworach o różnych stężeniach betainy; linia kropka/kreska) a cząsteczkami mocznika (w roztworach o różnych stężeniach mocznika; linia przerywana).

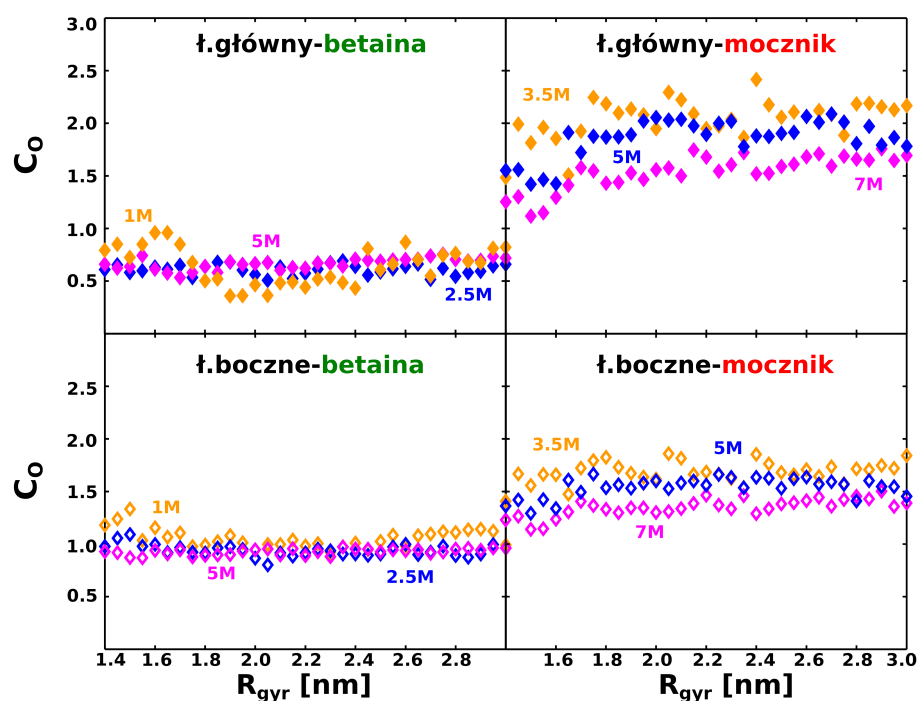
entalpii solwatacji stanu rozwiniętego – i może być uznawany za ważny wkład do entalpowych kosztów rozwijania w roztworach betainy.

5.1.4 Wykluczanie cząsteczek betainy i akumulacja cząsteczek mocznika jako zjawisko ogólne

Aby dostarczyć bardziej szczegółowego obrazu zjawiska wykluczania i akumulacji cząsteczek osmolitu na powierzchni białka, obliczyłam lokalne współczynniki podziału dla osmolitu (C_O). Współczynnik ten opisuje odchylenia od równomiernego rozkładu przestrzennego cząsteczek rozpuszczalnika w sąsiedztwie substancji rozpuszczonej a definicję jego przedstawiłam w Rozdziale 4.3.4.

Na Rysunku 5.7 przedstawiłam zmiany lokalnego współczynnika podziału dla osmolitu podczas rozwijania. Obliczyłam je oddzielnie dla łańcucha głównego i łańcuchów bocznych eksponowanych fragmentów w białku.

Można zauważyć, że cząsteczki betainy i mocznika wykazują inną preferencję do łańcucha głównego, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami [14, 55, 60, 73, 138]. W łańcuchu głównym białka, układy zawierające cząsteczki mocznika są wzbogacone ok. 1.5-(w stanie zwinionym) do 2-razy (w stanie rozwiniętym) bardziej w stosunku do sytuacji gdyby cząsteczki



RYSUNEK 5.7: Analiza wykluczania i akumulacji cząsteczek osmolitu na powierzchni białka. Lokalny współczynnik podziału został obliczony dla cząsteczek osmolitu w odniesieniu do białka w funkcji R_{gyr} , dla różnych stężeń roztworów mocznika i betainy.

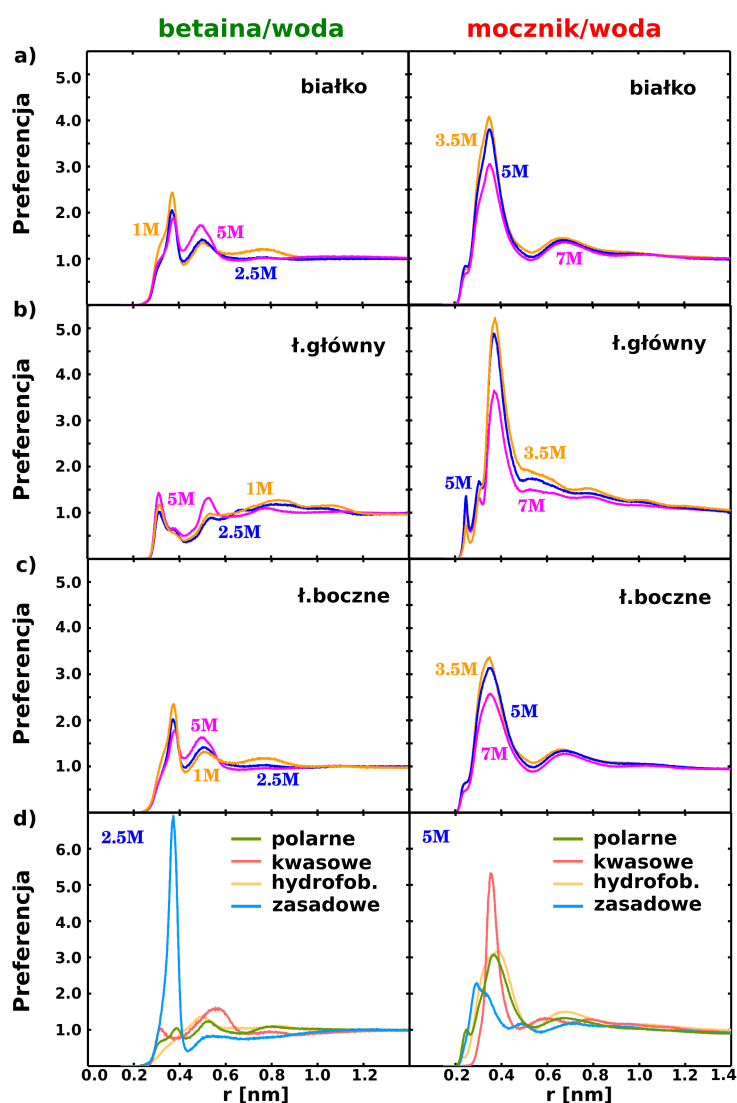
mocznika były rozłożone równomiernie w całym układzie. Z kolei w układach zawierających cząsteczki betainy zaobserwowałam zmniejszenie się stężenia nawet do 50 % w porównaniu do sytuacji gdyby cząsteczki betainy były rozłożone równomiernie w całym układzie.

Mniejsze różnice są obserwowane wokół łańcuchów bocznych, w przypadku cząsteczek mocznika ok. 1.5 razy więcej niż w sytuacji gdyby cząsteczki mocznika były rozłożone równomiernie w całym układzie. Zaś dla cząsteczek betainy, lokalny współczynnik podziału jest równy ok. 1.0 dla wszystkich stężeń. Te obserwacje wskazują, że cząsteczki betainy są preferencyjnie wykluczane z łańcuchów głównych w białku, zaś cząsteczki mocznika chętnie akumulują się przy powierzchni białka, najbardziej w pobliżu łańcuchów głównych, nieco zaś mniej w okolicy łańcuchów bocznych. Co ciekawe, ostatnio pomiary osmometryczne dla betainy i innych osmolitów stabilizujących (TMAO i sarkozyny) wskazują, że efekt stabilizujący osmolitów wynika raczej z ich wykluczania z powierzchni łańcucha głównego niż z łańcuchów bocznych [55, 73, 138], zgodnie z tym co obserwowałam w symulacjach. Na Rysunku 5.7 ukazałam także, iż w trakcie rozwijania (w szczególności w pobliżu miejsca zerwania głównych oddziaływań stabilizujących strukturę białka, $R_{gyr} = 1.7$ nm) cząsteczki mocznika coraz silniej akumulują się na powierzchni białka a lokalny współczynnik podziału jest większy o ok. 0.5 razy dla lizozymu w stanie rozwiniętym niż zwiniętym.

Na podstawie zaobserwowanych tendencji można stwierdzić, że podczas gdy cząsteczki mocznika mają silniejszą preferencję do regionów, które stają się eksponowane na rozpuszczalnik, przede wszystkim do łańcucha głównego i hydrofobowych łańcuchów bocznych – cząsteczki betainy wykazują podobną preferencję zarówno do stanu zwiniętego, jak i rozwiniętego.

W celu określenia preferencji oddziaływań, obliczyłam radialne funkcje preferencji cząsteczek osmolitu wokół stanu rozwiniętego lizozymu, dla całego białka, jak również oddzielnie dla łańcucha głównego i łańcuchów bocznych. Radialną funkcję preferencji – $f_O(r)$ definiuje się jako stosunek liczby cząsteczek osmolitu i cząsteczek wody znajdujących się w pewnej odległości r od powierzchni białka do ich stosunku w wodzie objętościowej (szczegółowy opis przedstawiłam w rozdziale 4.3.6). Odchylenia od jedności w funkcji preferencji interpretuje się tak samo jak dla lokalnego współczynnika podziału. Ponadto, w celu zbadania wykluczania i akumulacji cząsteczek osmolitu w pobliżu różnych typów aminokwasów obliczyłam funkcje preferencji oddzielnie dla fragmentów kwasowych, zasadowych, hydrofobowych o polarnych dla 2.5 M roztworu betainy oraz 5.0 M roztworu mocznika.

Jak widać na podstawie Rysunku 5.8, cząsteczki betainy są wykluczane z powierzchni eksponowanych łańcuchów głównych. Dla roztworów o stężeniu 1.0 i 2.5 M można zauważyć, że do odległości 0.5 nm od łańcucha głównego, stężenie betainy jest ok. 1.5 razy większe w porównaniu ze składem dwuskładnikowego rozpuszczalnika w głębi roztworu. Dodatkowo widać, że efekt wykluczania cząsteczek osmolitu z powierzchni białka jest mniej zauważalny dla 5.0 M roztworu betainy, wskazując, że przy wyższych stężeniach roztworów, cząsteczki betainy mają silniejszą tendencję do bardziej równomiernej dystrybucji. Z drugiej strony, cząsteczki betainy zbliżają się łatwo do eksponowanych łańcuchów bocznych, tworząc korzystne kontakty w dwóch różnych odległościach międzycząsteczkowych, które można przypisać dwóm różnym orientacjom cząsteczek względem powierzchni białka, co widać na Rysunku 5.8c. Po zdekomponowaniu radialnych funkcji dystrybucji (Rysunek 5.8d) widać, że najwyższy pik znajdujący się w odległości 0.3–0.4 nm odpowiada prawie wyłącznie bezpośrednim oddziaływaniom grupy karboksylowej cząsteczek betainy z zasadowymi łańcuchami bocznymi białka. Podobnie, drugi, znacznie mniejszy pik w odległości 0.5–0.6 nm można przypisać oddziaływaniom fragmentów kwasowych w białku z grupą aminową cząsteczek betainy poprzez cząsteczkę (cząsteczki) wody. Co ciekawe, rozkłady dla reszt polarnych mają dwa piki, które pokrywają się z tymi powyżej, są jednak zdecydowanie mniejsze. Ich wysokość sugeruje, że reszty polarne, jak i hydrofobowe nie mogą zmieniać skutecznie orientacji cząsteczek betainy. A to z kolei oznacza przestrzennie zróżnicowany i silnie



RYСУNEK 5.8: Radialne funkcje preferencji dla 2.5 M roztworu betajiny i 5.0 M roztworu mocznika w odniesieniu do białka. Radialne funkcje preferencji były obliczone w odniesieniu do: a) całej cząsteczki białka, b) łańcucha głównego w białku, c) łańcuchów bocznych w białku. d) Radialne funkcje preferencji zostały zdekomponowane na: polarne (zielony), kwasowe (czerwony), zasadowe (niebieski) oraz hydrofobowe (pomarańczowy) łańcuchy boczne dla średnich stężeń roztworów osmotu. W wybranych stężeniach roztworów, cząsteczki betajiny i mocznika zajmują porównywalne frakcje objętościowe rozpuszczalnika.

zależny od sekwencji rozkład cząsteczek betajiny na powierzchni rozwiniętego białka. Na podstawie powyższych obserwacji można wywnioskować, że na powierzchni białka jest stosunkowo mało miejsc z którymi cząsteczki betajiny mogą oddziaływać.

W przeciwieństwie do cząsteczek betajiny, cząsteczki mocznika silnie akumulują się na powierzchni białka (Rysunek 5.8 po prawej). Zgodnie z wcześniejszą dyskusją, cząsteczki mocznika najsilniej oddziałują z łańcuchem głównym w białku (lokalne stężenia 3.5–4.0 razy większe niż we wnętrzu roztworu). W przypadku zaś łańcuchów bocznych, wzbogacenie jest

tylko nieznacznie mniejsze (2.5–3.5 razy). Dodatkowo widać, że piki na funkcjach rozkładu radialnego w przypadku układów zawierających cząsteczki mocznika są szersze niż w przypadku układów zawierających cząsteczki betainy, co wskazuje na gorzej zdefiniowany sposób wiązania. Cząsteczki mocznika oddziałują z białkiem, przyjmując zdecydowanie więcej różnych orientacji niż cząsteczki betainy. Wiele czynników składa się na różnorodność tej orientacji, jak widać na podstawie radialnych funkcji dystrybucji zdekomponowanych na wkłady pochodzące od grup polarnych, kwasowych, zasadowych i hydrofobowych (Rysunek 5.8d). Warto zauważyć, że dla fragmentów zasadowych, szerszy rozkład odzwierciedla możliwość tworzenia wiązań wodorowych z naładowanymi grupami i/lub hydrofobowe kontakty z alifatycznymi częściami łańcucha bocznego. Z drugiej strony, ostre i wyższe piki dla kwasowych łańcuchów bocznych wynikają z faktu, że oddziałują one z cząsteczkami mocznika wyłącznie przez wiązania wodorowe. Są one entropowo preferowane ze względu na osiem różnych sposobów parowania: dwa atomy tlenu z karboksylowej grupy oraz cztery atomy wodoru z cząsteczek mocznika. Należy również zauważyć, że istnieją liczne kontakty między cząsteczkami mocznika i hydrofobowymi łańcuchami bocznymi. Kontakty te mają charakter niespecyficzny i są z natury przestrzennie heterogeniczne, co znajduje potwierdzenie w szerokości pików na funkcjach rozkładu radialnego. Ogólnie, na podstawie dobrze zdefiniowanych i szerokich pików dla nienaładowanych reszt (w szczególności dla reszt hydrofobowych) można wywnioskować, że cząsteczki mocznika rzeczywiście mają preferencję do reszt, które tworzą rdzeń białka, co zauważono już powyżej.

W powyższej dyskusji zostały rozważone dwa potencjalne mechanizmy prowadzące do denaturującego efektu cząsteczek mocznika: pierwszy z nich bazuje na osłabieniu efektu hydrofobowego, który jest jedną z głównych sił napędowych dla zwijania białek [88, 139, 140], w drugim zaś cząsteczki mocznika stabilizują stan rozwinięty białka przez korzystne oddziaływania van der Waalsa z eksponowanymi fragmentami białka [65–67, 141, 142].

5.1.5 Termodynamiczna analiza oddziaływań ujawnia istotę akumulacji i wykluczania cząsteczek osmolitu

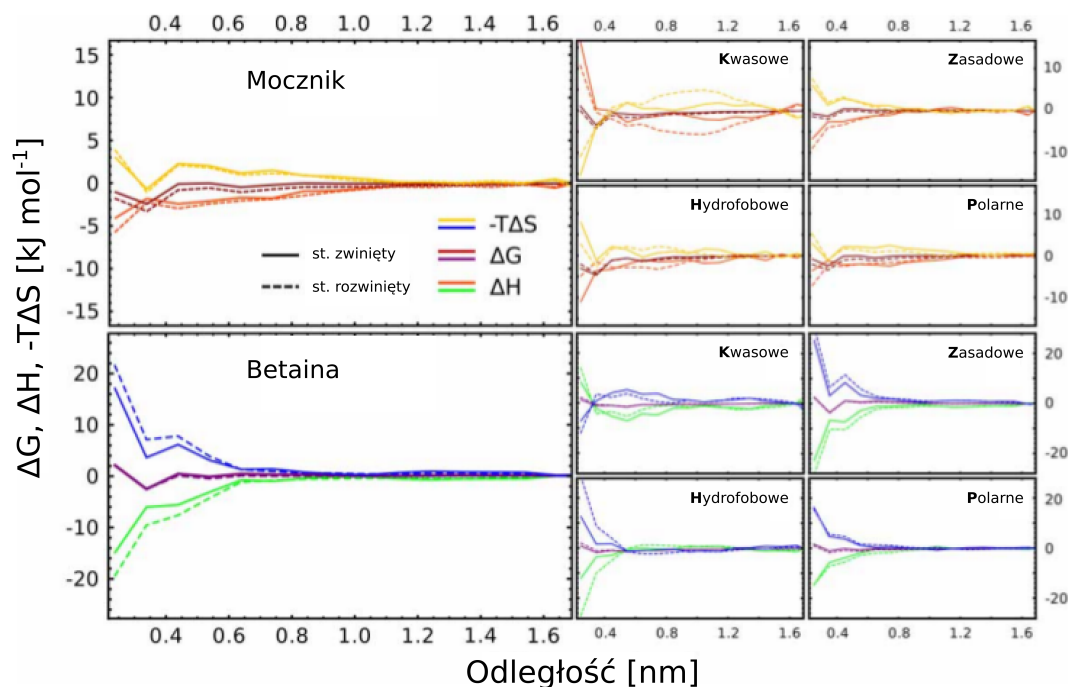
W celu zbadania charakteru sił napędowych wykluczania i akumulacji cząsteczek osmolitu, Miłosz Wieczór¹ w ramach naszej wspólnej pracy [81] obliczył entalpie oddziaływań między pojedynczą cząsteczką osmolitu lub wody [$\Delta H_o(r)$ i $\Delta H_w(r)$] i środowiskiem (białko oraz reszta rozpuszczalnika) w funkcji odległości cząsteczki od powierzchni białka, r (Rysunki 10.5 i 10.6).

¹Wyniki przedstawione w niniejszym podrozdziale wykonał Miłosz Wieczór w ramach naszej wspólnej pracy [81]. Wiele ciekawych wniosków wynika z tych badań, dlatego zestawiłam je w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Z tych profili, Miłosz Wieczór obliczył profile efektywnej entalpii oddziaływań przez włączenie efektu zastąpienia cząsteczek rozpuszczalnika, tj. biorąc pod uwagę fakt, że asocjacja cząsteczki osmolitu z powierzchnią powoduje przemieszczenie pewnej liczby cząsteczek wody i osmolitu które by tam przebywały do głębi roztworu. Dla betainy i mocznika, efektywna entalpia $\Delta H(r)$ została zatem obliczona jako: $\Delta H_o(r) (1 - y_o(r)) - q \Delta H_w(r)(1 - y_o(r))$, gdzie: $y_o(r)$ jest objętościowym udziałem osmolitu w danej odległości r od powierzchni białka, q jest stosunkiem średniej molowej objętości osmolitu i wody (4.17 w przypadku betainy i 2.53 w przypadku mocznika). Następnie zmiany te odniesione zostały do aktualnych rozkładów cząsteczek wokół białka poprzez obliczenie odpowiednich profili entalpii swobodnej dla asocjacji białko-rozpuszczalnik jako $\Delta G(r) = -kT \ln \rho(r)$, gdzie: $\rho(r)$ jest radialną funkcją dystrybucji białko-rozpuszczalnik. Wkład translacyjny do entalpii swobodnej został odjęty poprzez odpowiednią normalizację rozkładów na podstawie odległości od powierzchni białka r , co doprowadziło do profili entalpii swobodnej o stałych wartościach w dużej odległości od powierzchni białka. Ostatecznie, przez odjęcie $\Delta H(r)$ od $\Delta G(r)$, obliczony został wkład entropowy do entalpii swobodnej asocjacji (oznaczony jako $-T\Delta S(r)$), który zawiera zarówno wkład od oddziaływań hydrofobowych, jak i odzwierciedla liczbę miejsca wiązania osmolitu w odległości r , które odpowiadają średniej entalpii wiązania $\Delta H(r)$.

Rysunek 5.9 przedstawia profile entalpii swobodnej (ΔG) dla asocjacji cząsteczek osmolitu z powierzchnią białka w układach ze średnimi stężeniami roztworów osmolitu (2.5 M roztwór betainy and 5.0 M roztwór mocznika). W celu odróżnienia różnych typów aminokwasów na powierzchni białka, profile zostały wyznaczone również w odniesieniu do reszt kwasowych, zasadowych, polarnych i hydrofobowych oraz oddzielnie w odniesieniu do łańcucha głównego (5.10). Oryginalne profile ΔH_w oraz ΔH_o potrzebne do obliczenia $\Delta H(r)$ pokazałam w Rozdziale 10 (Rysunki 10.5 i 10.6).

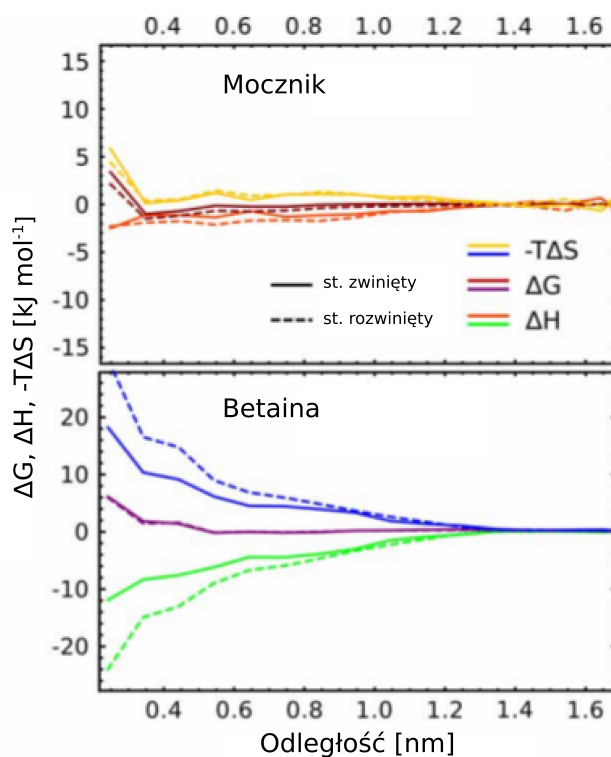
Jak można zobaczyć na podstawie Rysunków 5.9 i 5.10, asocjacja cząsteczki mocznika z powierzchnią białka jest entalpowo korzystna dla wszystkich typów reszt łańcucha bocznego oraz łańcucha głównego – z wyjątkiem kwaśnych łańcuchów bocznych, gdzie wysokie koszty desolvatacji nie sprzyjają bezpośrednim oddziaływaniom z osmolitem (warto spojrzeć również na Rysunek 10.5). Dla białka jako całości, średni entalpowy zysk (w przybliżeniu -4 do -6 kJ/mol) wynikający z oddziaływań van der Waalsa oraz wiązań wodorowych pozostaje korzystny pod względem entalpii swobodnej pomimo kosztu przemieszczania cząsteczek wody z powierzchni białka do wnętrza roztworu (~ 2.5 kJ/mol odpowiadającej ~ 2.5 cząsteczkom wody wymienionym przez pojedynczą cząsteczkę mocznika) oraz spadku entropii translacyjnej asocjującej cząsteczki mocznika (< 3 kJ/mol w zakresie badanych stężeń). W związku z tym korzystne bezpośrednie



RYSUNEK 5.9: Profile: ΔG , ΔH oraz $-T\Delta S$ dla asocjacji pojedynczej cząsteczki osmolytu z powierzchnią lizozymu (z lewej) oraz z poszczególnymi typami reszt występującej na jego powierzchni (z prawej). Profile entalpii swobodnej (ΔG) oraz entalpii oddziaływań ze środowiskiem (ΔH) a także wkład entropowy ($-T\Delta S$) w 2.5 M roztworze betainy oraz 5.0 M roztworze mocznika wykreślone w funkcji odległości od powierzchni białka.

oddziaływania z białkiem mogą być uważane za główną siłę napędową obserwowanej akumulacji cząsteczek mocznika przy powierzchni białka.

W celu zbadania tych oddziaływań w sposób bardziej szczegółowy, zbadalam ich rolę w procesie rozwijania białka i w związku z tym zdekomponowałam zmiany entalpii solwatacji po rozwinięciu na poszczególne wkłady pochodzące od oddziaływań między rozpuszczalnikiem i różnymi typami reszt. Na podstawie uzyskanych wyników (Rysunki 10.7 i 10.8) można zauważyć, że oddziaływania elektrostatyczne oraz van der Waalsa między cząsteczkami mocznika i białkiem sprzyjają procesowi rozwijania. Jak należy się spodziewać, ten ujemny przyrost energii, obserwowany jest w szczególności dla licznych reszt hydrofobowych i polarnych, które są wystawione na działanie rozpuszczalnika, co w dużej mierze jest kompensowane przez utratę oddziaływań typu mocznik-woda oraz mocznik-mocznik (Rysunek 10.9). Porównanie z czystą wodą (Rysunek 5.10), z jednej strony ukazuje, że wkład elektrostatyczny do entalpii solwatacji związany jest z siłą wiązań wodorowych utworzonych między białkiem a cząsteczkami rozpuszczalnika, niezależnie od obecności lub stężenia roztworów mocznika. Z drugiej strony, oddziaływania van der Waalsa z nowo eksponowanymi łańcuchami bocznymi i łańcuchem głównym białka są znacznie silniejsze dla układów zawierających cząsteczki mocznika niż dla układów zawierających tylko



RYSUNEK 5.10: **Profile: ΔG , ΔH and $-T\Delta S$ dla asocjacji pojedynczej cząsteczki osmolytu z eksponowanymi fragmentami łańcucha głównego białka.** Profile entalpii swobodnej (ΔG) oraz entalpii oddziaływań ze środowiskiem (ΔH) a także wkład entropowy ($-T\Delta S$) w 2.5 M roztworze betainy oraz 5.0 M roztworze mocznika wykreślone w funkcji odległości od łańcucha głównego białka.

cząsteczki wody. Ta różnica powoduje bardziej ujemną zmianę entalpii solwatacji w obecności cząsteczek mocznika. Obserwacja ta potwierdza argument, że oddziaływania van der Waalsa a nie wiązania wodorowe zapewniają krytyczną siłę napędową dla cząsteczek mocznika akumulującego się przy powierzchni białka. Na podstawie Rysunku 5.9 można zauważyć, że entalpową stabilizację wiązania cząsteczek mocznika do białka jest znacznie niższa (o ok. 5 kJ/mol) w sąsiedztwie reszt hydrofobowych w stanie rozwiniętym i, w tym przypadku, minimum dla krzywej $\Delta H(r)$ jest przesunięte o 0.4–0.6 nm w kierunku roztworu wody objętościowej. Mimo, że zastąpienie cząsteczek wody w pobliżu hydrofobowych fragmentów cząsteczkami mocznika jest wciąż energetycznie korzystne (o ok. 2.4 kJ/mol), całkowita zmiana entalpii nie jest wystarczająca, aby uzasadnić preferencję tych regionów dla cząsteczek mocznika (Rysunek 5.9). Rzeczywiście, wyraźne minimum dla krzywej $-T\Delta S(r)$ (Rysunek 5.9) zbiegło się z minimum dla entalpii swobodnej co sugeruje, że akumulacja cząsteczek mocznika wokół hydrofobowych fragmentów jest także napędzana entropowo.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników analizy oddziaływań można zauważyć, że zarówno korzystne oddziaływania van der Waalsa między cząsteczkami mocznika i

białkiem oraz osłabienie efektu hydrofobowego wpływa na zmniejszenie pracy rozwijania lizozymu w wykonanych symulacjach.

Na podstawie termodynamicznej analizy oddziaływań wyjaśniliśmy także molekularne podstawy efektu stabilizującego cząsteczek betainy na białka, i ewentualnie innych metyloamin. Na podstawie Rysunku 5.10 można zauważyć, że chociaż cząsteczki betainy nie asocjują preferencyjnie do eksponowanych fragmentów łańcucha głównego białka (co widać również na Rysunku 5.9), to asocjacji towarzyszy korzystna zmiana entalpii (ΔH w zakresie -20 do -10 kJ/mol). Ten zysk entalpowy jest najwyraźniej mniejszy niż dodatni wkład $-T\Delta S$, co sprawia, że entalpia swobodna wiązania jest niekorzystna. Z oddziaływaniem cząsteczek betainy z białkiem związana jest zatem niekorzystna zmiana entropii wynikająca z konieczności przyjęcia przez cząsteczkę osmolitu konkretnej orientacji względem powierzchni białka. Przypomina to trochę układ trietyloamina-woda wykazujący dolną krytyczną temperaturę mieszalności z podobnej przyczyny. Powyższe obserwacje wspierają główny wniosek, iż wykluczanie cząsteczek betainy może wynikać z niedoboru miejsc wiążących, które są w stanie pomieścić w termodynamicznie korzystny sposób, blisko łańcucha głównego, cząsteczkę osmolitu w sposób analogiczny do specyficznego wiązania ligandów (także często niekorzystnego entropowo).

Na podstawie dekompozycji zmian entalpii solwatacji po rozwinięciu białka (Rysunek 5.9) można stwierdzić, że zwłaszcza oddziaływanie hydrofobowych łańcuchów bocznych białka z cząsteczkami betainy jest znacznie mniej korzystne w stanie zwiniętym niż w stanie rozwiniętym, gdyż są one bardziej eksponowane na działanie rozpuszczalnika.

Na podstawie analizy liczby wiązań wodorowych stwierdziliśmy, że cząsteczki betainy występujące jako współrozpuszczalnik znacznie zmniejszają skłonność cząsteczek wody do tworzenia wiązań wodorowych z białkiem, co jest szczególnie widoczne w przypadku łańcucha głównego.

Na Rysunku 10.6 widać, że entalpową siłą napędową dla asocjacji białko-woda jest znacznie mniejsza w obecności cząsteczek betainy ($\Delta H_w \approx 0$ kJ/mol) niż w roztworze niezawierającym cząsteczek osmolitu ($\Delta H_w \approx -4$ kJ/mol), co daje dodatkowy wgląd do obserwacji efektu zmniejszonej solwatacji.

5.1.6 Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników w ramach pierwszej części pracy stwierdziliśmy, że uzyskany model obliczonych prac rozwijania lizozymu w czystej wodzie oraz w wodnych

roztworach mocznika i betainy poprawnie odzwierciedla stabilizujący efekt cząsteczek betainy oraz denaturujący efekt cząsteczek mocznika.

W celu analizy wpływu cząsteczek osmolitu na obliczone prace rozwijania, zbadaliśmy molekularne uwarunkowania stabilności białek w badanych roztworach. W szczególności przeanalizowaliśmy, w trakcie rozwijania białka, tworzenie się nowych wiązań wodorowych między białkiem a cząsteczkami osmolitu oraz między białkiem a cząsteczkami wody. Dokonaliśmy również ilościowej oceny wielkości oraz rozmieszczenia przestrzennego wykluczanych i akumulowanych cząsteczek osmolitu na powierzchni białka, a następnie uzupełniliśmy te wyniki o szczegółowe analizy funkcji termodynamicznych oddziaływań dla poszczególnych elementów składowych badanych układów.

W naszych badaniach ustaliliśmy, że cząsteczki mocznika akumulują się w sąsiedztwie białka, co jest zgodne z wcześniejszymi eksperymentalnymi i obliczeniowymi wynikami wykorzystywanymi do tłumaczenia efektu denaturacji [23, 57, 71–73]. Okazało się, że stężenie roztworów mocznika wzrasta nie tylko przy powierzchni białka, lecz pozostaje również podwyższone w odległości 1.0–1.5 nm od powierzchni białka, wskazując na bogatą obecność cząsteczek mocznika w sferze solwatacyjnej wokół lizozymu. Akumulowanie się cząsteczek mocznika odgrywa także ważną rolę w solwatowaniu rdzenia białka, który zostaje bardziej eksponowany podczas denaturacji. Całkowita liczba nowo utworzonych wiązań wodorowych między białkiem a cząsteczkami mocznika oraz między białkiem a cząsteczkami wody jest w rzeczywistości podobna do tej obserwowanej w czystej wodzie. Na podstawie tych obserwacji widać, że w przeciwieństwie do niektórych ostatnich prac [30], wiązania wodorowe nie mogą wyjaśniać bezpośrednio denaturującego efektu cząsteczek mocznika. Na podstawie uzyskanych danych można natomiast stwierdzić, że dwie inne siły napędowe wywołują denaturację białka. Stan rozwinięty lizozymu jest stabilizowany przez korzystne bezpośrednie oddziaływania między cząsteczkami mocznika i resztami tworzącymi rdzeń białka. Cząsteczki mocznika są nie tylko donorami i akceptorami wiązań wodorowych, lecz także oddziałują korzystnie dyspersyjnie z niepolarnymi resztami białka, stabilizując jego rozwinięte konformacje. Cząsteczki mocznika wręcz akumulują się silniej przy niepolarnych fragmentach, co napędza rozwijanie się białka.

W przypadku betainy okazało się, że jej cząsteczki są wykluczane z powierzchni białka. Powszechnie uważa się, że efekt taki doprowadza do stabilizacji entropowej natywnej formy białek w przypadku osmolitów kompatybilnych. Zaobserwowaliśmy również, że wykluczanie jest ograniczone do sąsiedztwa łańcucha głównego białka oraz w pewnym stopniu, hydrofobowych łańcuchów bocznych. W tym samym czasie, stwierdziliśmy, że obojnacze jony betainy gromadzą



się w pobliżu naładowanych, głównie zasadowych reszt, co przyczynia się do nierównomiernego i zmiennego rozkładu cząsteczek osmolitu na powierzchni białka. Co interesujące, asocjacja między białkiem a cząsteczkami betainy jest korzystna entalpowo oraz niekorzystna entropowo – zatem oddziaływania są mało prawdopodobne i nie są liczne, ale gdy już się zdarzą to cząsteczki betainy zachowują się w takim oddziaływaniu podobnie jak wiążący się specyficznie ligand.

5.2 Czy wszystkie osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni białek?

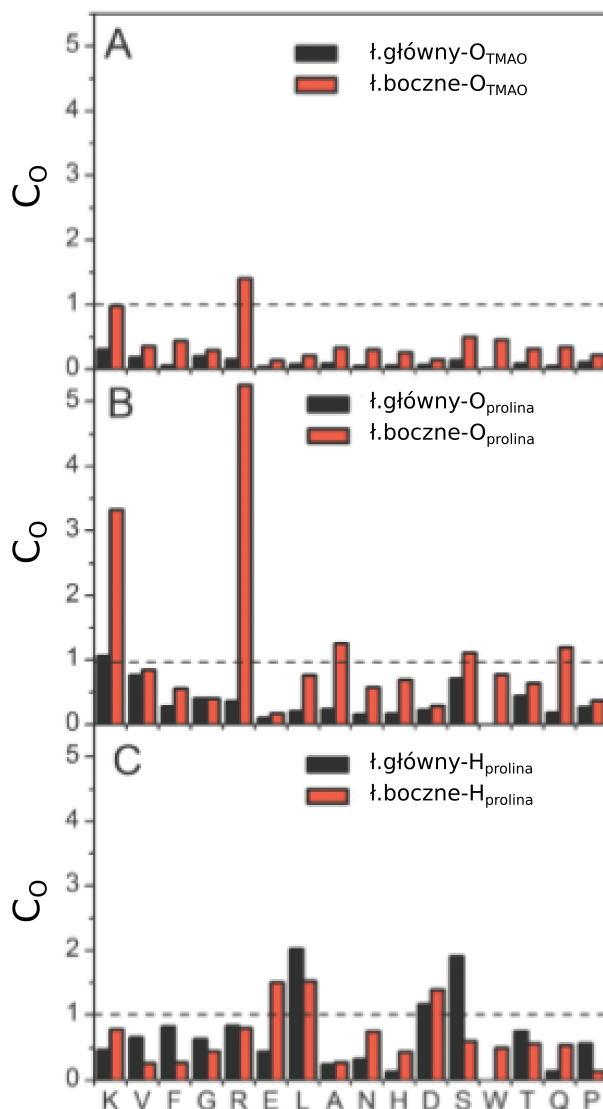
Na podstawie analizy lokalnych współczynników podziału (Rysunek 5.11) oraz powierzchni dostępnych dla rozpuszczalnika (z ang. solvent accessible surface area, SASA) (Tabela 5.1) w układach zawierających lizozym i 1.0 M roztwór proliny lub 1.0 M roztwór TMAO można zauważyć, że na powierzchni białka znajdują się dwa rodzaje reszt oddziałujących silnie z cząsteczkami proliny: reszty argininy (zajmujące ok. 22 % powierzchni białka) oraz reszty lizyny (zajmujące ok. 7 % powierzchni białka). Z kolei z cząsteczkami TMAO oddziałują silnie wyłącznie reszty argininy. Grupy aminowe i guanidynowe tych reszt mogą oddziaływać bezpośrednio z ujemnie naładowanymi grupami cząsteczek osmolitu i w rezultacie odpowiednie lokalne współczynniki podziału są większe niż 1.0. Inne typy reszt oddziałują z cząsteczkami proliny przez grupę OH lub COO⁻ (głównie Ser, Tyr, Asp i Glu) a z cząsteczkami TMAO przez grupę aminową (Lys), jednak oddziaływania te są wyraźnie mniej korzystne, gdyż obliczone lokalne współczynniki podziału są bliskie 1.0. Pozostałe aminokwasy wchodzące w skład lizozymu są preferencyjnie hydratowane i w związku z tym lokalne współczynniki podziału są mniejsze niż 1.0. Przy wyższych stężeniach roztworów osmolitu, lokalne współczynniki podziału są na ogół niższe, ale ogólny kształt histogramów jest w każdym przypadku podobny (Rozdział 10 – Załączniki: Rysunki 10.10–10.12).

Nazwa reszty	Skrót 1-lit.	Skrót 3-lit.	%SASA
Arginina	R	Arg	21.77
Asparagina	N	Asn	13.68
Lizyna	K	Lys	7.18
Glicyna	G	Gly	7.08
Kwas asparaginowy	D	Asp	6.57
Seryna	S	Ser	5.64
Treonina	T	Thr	5.31
Tryptofan	W	Trp	4.47
Alanina	A	Ala	4.11
Leucyna	L	Leu	3.97
Walina	V	Val	3.34
Glutamina	Q	Gln	3.20
Prolina	P	Pro	2.39
Kwas glutaminowy	E	Glu	2.17
Feniloalanina	F	Phe	1.87
Histydyna	H	His	0.91
Pozostałe			6.33

TABLICA 5.1: Powierzchnia dostępna dla rozpuszczalnika (SASA) odpowiadająca poszczególnym aminokwasom wchodzącym w skład lizozymu [%].

Całkowita powierzchnia lizozymu wykazująca korzystne oddziaływania między cząsteczkami proliny a białkiem jest stosunkowo wysoka (ok. 29 %) i może to wyjaśniać dużą liczbę cząsteczek proliny, które oddziałują korzystnie z białkiem, co zaobserwowano również w prowadzonym równolegle eksperymencie [86]. Warto zauważyć, że zgodnie z badaniami Diehl i współpracowników [76], reszty argininy preferencyjnie oddziałują z cząsteczkami proliny a oddziaływania między resztami lizyny i cząsteczkami proliny są tylko nieznacznie mniej korzystne. Jednak, w tym samym artykule, na podstawie pomiarów ciśnień osmotycznych stwierdzono, że oddziaływania między cząsteczkami proliny a innym globularnym białkiem – surowiczą albuminą wołową, BSA (z ang. bovine serum albumin) – są niekorzystne. W związku z tym obliczyłam procentowy udział Arg na powierzchni białka BSA i okazało się, że jest on znacznie niższy (ok. 5 %) niż w przypadku lizozymu (ok. 22 %). Z tego powodu rozbieżność wiązania cząsteczek proliny z tymi białkami może wynikać z ich różnego składu aminokwasowego. Co ciekawe, mniejsze stężenia roztworów osmolitu sprzyjają wyższym lokalnym współczynnikom podziału dla Arg

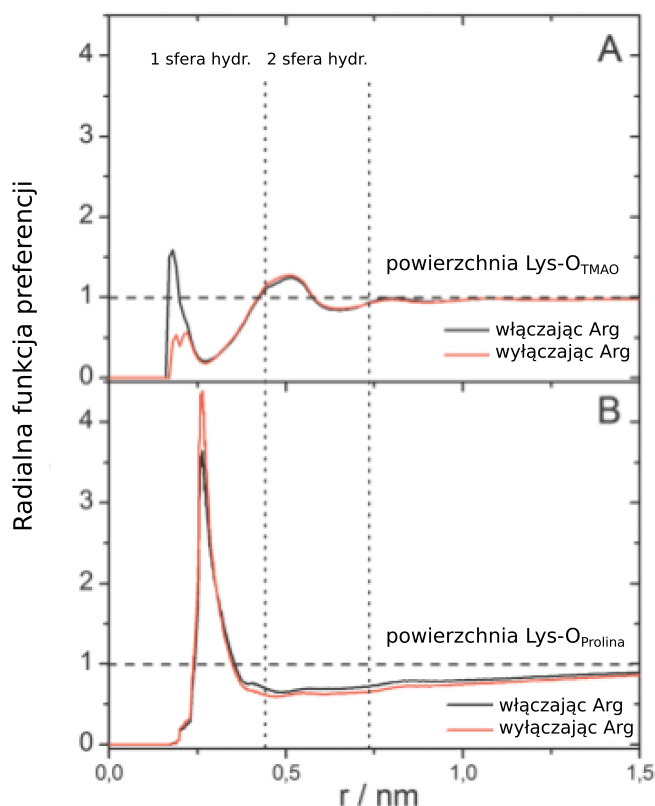




RYSUNEK 5.11: Analiza wykluczania i akumulacji cząsteczek osmolitu na powierzchni białka. Lokalny współczynnik podziału został obliczony na podstawie odległości międzyatomowych uzyskanych dla poszczególnych aminokwasów znajdujących się na powierzchni lizozymu dla 1.0M roztworów osmolitu A) lizozym – atomy tlenu z cząsteczek TMAO B) lizozym – karboksylowe atomy tlenu z cząsteczki prolina C) lizozym – atomy wodoru z grupy aminowej cząsteczki prolina. Lokalne współczynniki podziału zostały obliczone oddzielnie dla każdego aminokwasu z łańcucha głównego/łańcuchów bocznych białka. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym jednoliterowym skrótom znajdują się w Tabelcy 5.1.

i Lys. Uzyskane przeze mnie wyniki są wysoce spójne z danymi eksperymentalnymi [89] i na ich podstawie można zauważyć, że dostępność powierzchni lizozymu dla cząsteczek prolina jest ograniczona.

Na podstawie analizy radialnych funkcji preferencji można uzyskać lepszy wgląd w rozkład cząsteczek osmolitu na powierzchni białka. W związku z tym, aby uzyskać ogólny obraz



RYSUNEK 5.12: Średnie radialne funkcje preferencji – $P(r)$ uzyskane dla 1.0 M roztworów osmolitu: (A) powierzchnia lizozymu – atomy tlenu z cząsteczek TMAO, (B) powierzchnia lizozymu – karboksylowe atomy tlenu z cząsteczek prolina.

oddziaływań między białkiem a cząsteczkami osmolitu, obliczyłam średnie ważone funkcje preferencji ($P(r)$), gdzie wkłady od poszczególnych reszt ważone były przez odpowiadający im ułamek powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika, zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 4.3.7. Wyznaczone $P(r)$ przedstawiłam na Rysunku 5.12. W przypadku cząsteczek TMAO, na podstawie kształtu radialnych funkcji preferencji można zauważyć, że bezpośrednie oddziaływania między tymi cząsteczkami a białkiem nie są zbyt częste. Wąskie i stosunkowo niskie pikiny wskazują, że na powierzchni białka jest tylko kilka miejsc, gdzie cząsteczki TMAO mogą korzystnie oddziaływać z białkiem. Ponadto, można zauważyć, że w odległości 0.5 nm pojawia się drugi pik co wskazuje, że cząsteczki TMAO gromadzą się w zewnętrznej powłoce hydratacyjnej i oddzielone są od powierzchni białka warstwą cząsteczek wody. Wyniki te są spójne z spektroskopowymi lokalnymi współczynnikami podziału, gdzie stwierdzono, że oddziaływania między białkiem a cząsteczkami TMAO mają pośredni charakter [86] i są zgodne z hipotezą preferencyjnego wykluczania cząsteczek osmolitu z powierzchni białka.

Na podstawie wypadkowej funkcji $P(r)$ obliczonej bez wkładów pochodzących od Arg (Rysunek 5.12A) można zauważyć, że żadna inna reszta nie oddziałuje z cząsteczkami TMAO

tak znacząco. Pierwszy pik jest bardzo mały i na jego podstawie można zauważyć, że cząsteczki TMAO są silnie wykluczone z powierzchni białka niezawierających reszt Arg. Można zatem twierdzić, że jedynymi możliwymi centrami oddziaływań na powierzchni białka są bezpośrednio oddziaływania cząsteczek TMAO z łańcuchami bocznymi Arg. Preferencyjne wykluczanie cząsteczek TMAO z powierzchni białka jest również wyraźnie widoczne na funkcjach rozkładu radialnego cząsteczek wody i osmolitu w odniesieniu do powierzchni białka, co pokazałam w Rozdziale Załączniki na Rysunku 10.13.

Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć, że cząsteczki proliny zachowują się inaczej niż cząsteczki TMAO, co wydaje się być sprzeczne z hipotezą preferencyjnego wykluczania cząsteczek osmolitu z powierzchni białka. Na podstawie radialnych funkcji preferencji widać, że cząsteczki proliny oddziałują preferencyjnie z powierzchnią białka (wyższe wartości $P(r)$ i stosunkowo szersze piki niż w przypadku cząsteczek TMAO). Cząsteczki proliny są skoncentrowane w pierwszej sferze hydratacyjnej białka i nie są widoczne żadne zewnętrzne powłoki, jak w przypadku cząsteczek TMAO. Moje obserwacje potwierdzają wyniki badań spektroskopowych w układach prolina-woda-lizozym [89]. Podobne wnioski można wyciągnąć z radialnych funkcji dystrybucji dla cząsteczek wody i proliny w odniesieniu do powierzchni białka (Rysunek 10.13).

W przypadku cząsteczek proliny, radialne funkcje preferencji bez wkładu pochodzącego od Arg są prawie identyczne z obrazem całościowym (Rysunek 5.12B), na którym pokazałam, że bezpośrednie oddziaływania białko-prolina nie są ograniczone do obecności Arg i wydają się być uniwersalne dla całej powierzchni lizozymu. Co ważne, można ponownie zauważyć wyraźną różnicę w oddziaływaniach białko-osmolit pomiędzy obydwoma osmolitami stabilizującymi.

5.2.1 Podsumowanie

W tej części pracy pokazałam, że cząsteczki TMAO praktycznie nie oddziałują bezpośrednio z powierzchnią białka z wyjątkiem eksponowanych reszt argininy, a wszelkie inne możliwe oddziaływania między białkiem a osmolitem mają charakter pośredni. Stwierdziłam, że w odległości jednej cząsteczki wody od powierzchni białka stężenie TMAO jest wyższe niż w wodzie objętościowej tzn. cząsteczki wody pośredniczą w oddziaływaniach między białkiem a cząsteczkami TMAO. Zaobserwowałam także, że TMAO gromadzi się na powierzchni białka w większym stopniu przy niższych stężeniach roztworów osmolitu, co także wspiera hipotezę, że cząsteczki TMAO są preferencyjnie wykluczane z powierzchni białka.

W przypadku roztworów proliny ukazałam, że chociaż cząsteczki proliny są dobrymi stabilizatorami białek to oddziałują bezpośrednio z powierzchnią białka, a grupy karboksylowe cząsteczek proliny odgrywają dominującą rolę w tych oddziaływaniach. Prolina wciąż jest jednak wykluczana z obszarów łańcucha głównego białka, które zajmują ok. 25% powierzchni lizozymu dostępnej dla rozpuszczalnika.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że osmolity stabilizujące mogą oddziaływać bezpośrednio z powierzchnią białka (cząsteczki proliny) lub mogą być preferencyjnie wykluczane z powierzchni białka (cząsteczki TMAO). Widać zatem, że chociaż cząsteczki proliny i TMAO są osmolitami stabilizującymi to mechanizm stabilizacji nie jest jedynie związany z bezpośrednim/pośrednim oddziaływaniem z białkiem lub z preferencyjnym wykluczaniem cząsteczek osmolitu z powierzchni białka. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami eksperymentalnymi [86].

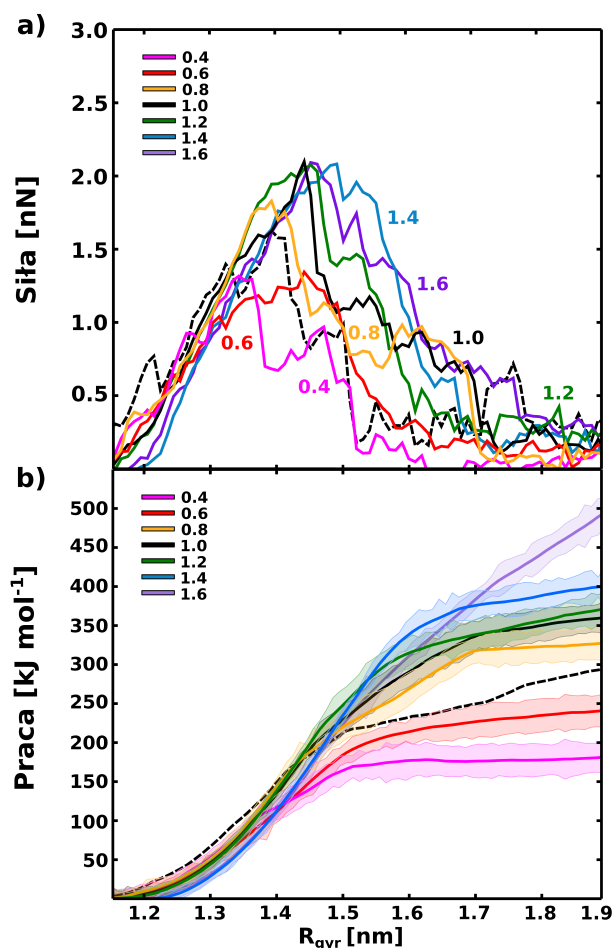
5.3 Wpływ osmolitów na stabilność białek na przykładzie mechanicznego rozwijania ubikwityny

5.3.1 Praca rozwijania jako miara przesunięcia stanu równowagi wywołanej przez cząsteczki osmolitu

W celu ustalenia, w jaki sposób polarność (scharakteryzowana np. przez moment dipolowy) cząsteczek osmolitu wpływa na działanie stabilizujące względem białek, w pierwszej kolejności wyznaczyłam wartości sił oraz pracy potrzebnych do rozwinięcia ubikwityny w obecności cząsteczek betainy o ładunkach cząstkowych przeskalowanych o stały czynnik w zakresie 0.4–1.6 (Rysunek 5.13).

Na podstawie wykresu zależności siły przyłożonej do ubikwityny w zależności od promienia bezwładności (Rysunek 5.13a) można zauważyć, że początkowo, w zakresie promienia bezwładności od 1.16 do ok. 1.4 nm–1.5 nm przykładana siła szybko wzrasta a struktura białka poddana jest silnym naprężeniom. W okolicy ok. 1.45 nm siła uzyskuje maksimum i dochodzi do tzw. pęknięcia struktury białka, które charakteryzuje się zerwaniem głównych oddziaływań stabilizujących strukturę natywną. Powyżej tego punktu rozwijanie przebiega łatwiej, pod wpływem dużo mniejszych sił zdominowanych przez tarcie.

Na podstawie Rysunku 5.13b widać, że praca potrzebna do rozwinięcia ubikwityny w obecności cząsteczek betainy o ładunkach przeskalowanych o czynnik 0.4 i 0.6 jest wyraźnie

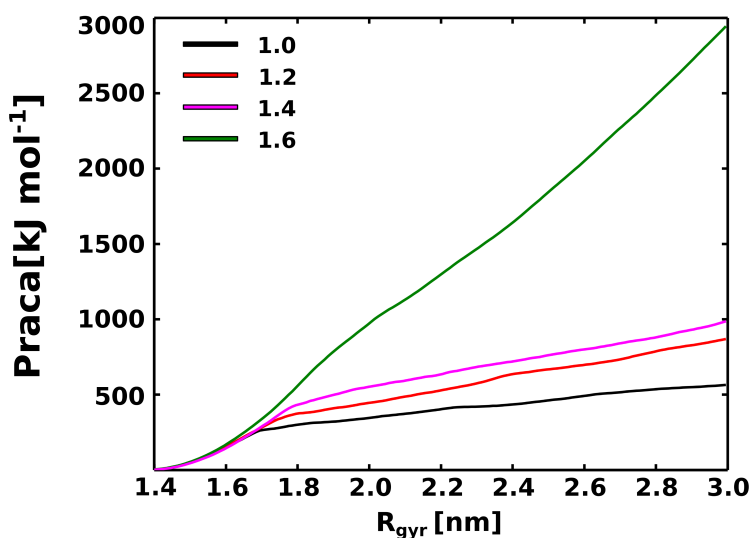


RYSUNEK 5.13: Siły i prace rozwijania w sterowanych symulacjach MD.

a) Siły potrzebne do rozciągnięcia ubikwityny w 2.5 M roztworze betainy z ładunkami przeskalowanymi o czynnik w zakresie (0.4–1.6) oraz przy braku osmolitów (czarna, przerywana linia) b) Praca potrzebna do rozwinięcia ubikwityny jako funkcja promienia bezwładności R_{gyr} . Wykresy wykonane są dla prędkości rozciągania $5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$. Pokazano paski błędów.

mniejsza niż przy braku osmolytu, co oznacza, że cząsteczki betainy o małym symulowanym momencie dipolowym destabilizują białka. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia w przypadku cząsteczek betainy o ładunkach przeskalowanych o czynnik 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 i 1.6 – praca rozwijania jest większa niż w wodzie, co oznacza, że cząsteczki betainy o większych symulowanych momentach dipolowych działają na białka stabilizująco. Można również zauważyć, że wraz ze wzrostem ładunków cząstkowych na cząsteczkach betainy monotonicznie rośnie praca potrzebna do rozwinięcia ubikwityny. Widać zatem, że najwięcej pracy potrzebujemy do rozwinięcia białka w obecności cząsteczek betainy o największym symulowanym momencie dipolowym (czynnik skalujący 1.6).

Aby sprawdzić, czy użyty model symulacyjny jest adekwatny, przeprowadziłam również symulacje mechanicznego rozwijania lizozymu w 5.0 M roztworze betainy o ładunkach cząstkowych przeskalowanych o stały czynnik w zakresie od 1.0 do 1.6. Symulacje wykonałam dla



RYSUNEK 5.14: Zmiany w pracach rozwijania dla przeskalowanych cząsteczek betainy. Na wykresie przedstawiono ilość pracy potrzebną do rozwinięcia lizozymu w 5.0 M roztworze betainy z ładunkami przeskalowanymi o czynnik w zakresie 1.0 do 1.6, dla prędkości rozciągania ($5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$).

prędkości rozciągania $5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$. Na Rysunku 5.14 ukazałam, że zwiększenie cząstkowych ładunków cząsteczek betainy prowadzi do znaczącej poprawy efektu stabilizującego cząsteczek osmolitu, co znajduje odzwierciedlenie we wzroście pracy rozwijania lizozymu.

Głównym celem dalszych badań było wyjaśnienie skąd biorą się obserwowane różnice w wartościach pracy.

5.3.2 Ciśnienia osmotyczne przyczyną stabilizacji? Walidacja modelu cząsteczki betainy.

Aby sprawdzić w jakim stopniu efekt stabilizujący cząsteczek osmolitu wynika z wywieranego przez nie ciśnienia osmotycznego, obliczyłam wartości tego parametru dla wszystkich badanych modeli cząsteczek betainy różniących się symulowanym momentem dipolowym. Następnie, na Rysunku 5.15, porównałam te wyniki z wynikami eksperymentalnymi (przerwana linia) i w ten sposób dokonałam walidacji modelu.

Ciśnienie osmotyczne jest to ciśnienie jakim należy działać na roztwór, aby powstrzymać przepływ rozpuszczalnika przez półprzepuszczalną membranę, która rozdziela roztwory o różnych stężeniach. Przyczyną pojawienia się ciśnienia osmotycznego jest różnica aktywności

substancji po obu stronach membrany. Dla dobrze rozpuszczalnych cząsteczek ciśnienie osmotyczne Π może być oszacowane przy pomocy równania van't Hoffa:

$$\Pi = c \cdot R \cdot T, \quad (5.1)$$

gdzie: c – stężenie osmolitu, R – stała gazowa, T – temperatura.

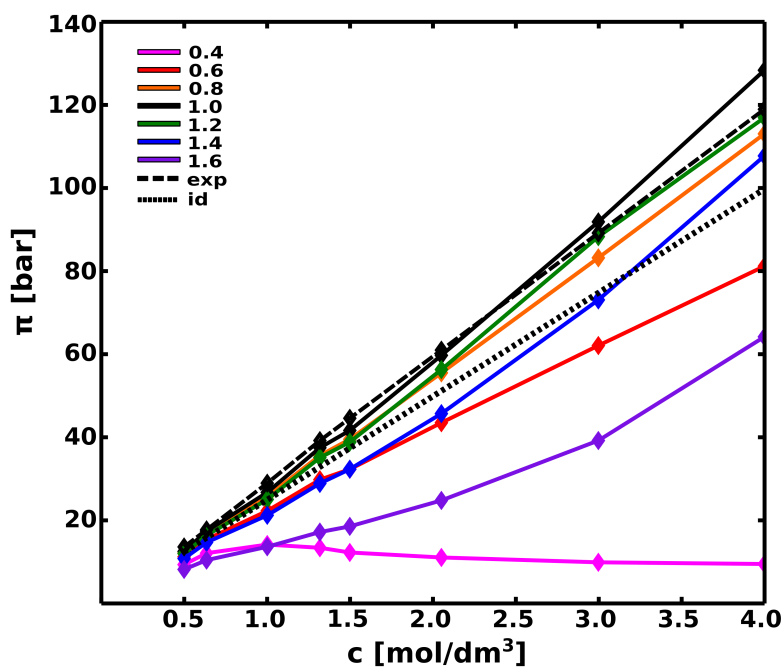
Równanie van't Hoffa jest ściśle spełnione tylko w przypadku roztworów doskonale rozcieńczonych. Odchylenia od doskonałości są uwzględniane we współczynniku osmotycznym, który zdefiniowany jest następująco:

$$\phi = \frac{\Pi_{\text{eksp}}}{\Pi_{\text{ideal}}} \quad (5.2)$$

Szczegółowy opis dotyczący zbudowania układów przedstawiłam w Rozdziale 4.2.3. W Tabelcy 5.2 zawarłam szczegółowe informacje dotyczące obliczonych ciśnień osmotycznych dla wszystkich symulowanych roztworów betainy w funkcji stężenia roztworu osmolitu. Na Rysunku 5.15 ukazałam zależności ciśnienia osmotycznego od stężenia roztworu osmolitu dla wszystkich badanych modeli.

Na podstawie Rysunku 5.15 oraz Tabelcy 5.2 można zauważyć, że ciśnienie osmotyczne rośnie dla cząsteczek betainy przeskalowanych o czynnik w zakresie 0.4 do 1.0, zaś dla cząsteczek betainy o większych symulowanych momentach dipolowych (współczynnik w zakresie 1.2–1.6) ciśnienie osmotyczne maleje. Widać także, że eksperymentalną wartość ciśnienia osmotycznego w całym zakresie stężeń najlepiej odzwierciedla model cząsteczki betainy przeskalowany o czynnik 1.2, z błędem nieprzekraczającym 14 % w 1.0 M roztworze.

Dyskusję na temat wpływu ciśnienia osmotycznego na efekt stabilizacyjny cząsteczek osmolitu przenieśliśmy do rozdziału 5.3.4.



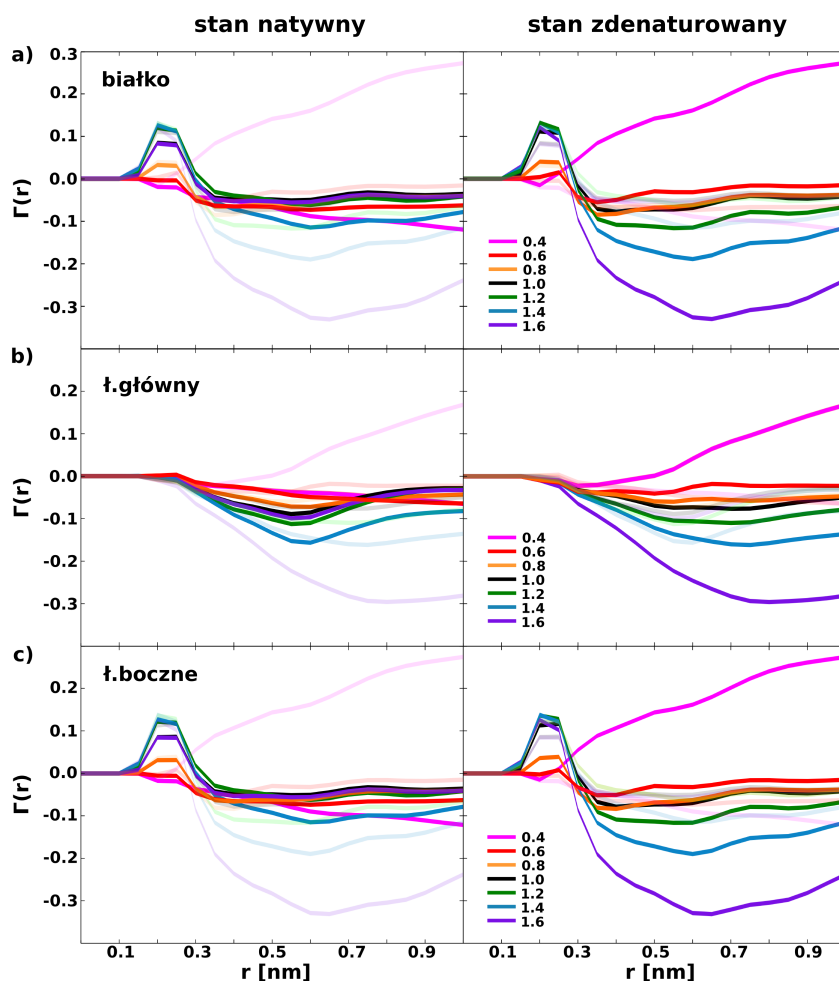
RYSUNEK 5.15: a) Ciśnienia osmotyczne w funkcji stężenia roztworów osmolytu dla cząsteczek betainy z ładunkami cząstkowymi przeskalanowanymi o stały czynnik: różowy (0.4), czerwony (0.6), pomarańczowy (0.8), czarny (1.0), zielony (1.2), niebieski (1.4), fioletowy (1.6). Dla porównania czarną linią kropkowaną zaznaczono ciśnienie idealne, a kreskowaną – ciśnienie eksperymentalne.

Stężenie	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	id	exp
0.50 M	9.35	11.22	12.16	12.52	12.00	10.80	8.19	12.47	13.72
0.63 M	12.10	15.40	16.91	17.40	16.36	14.69	10.43	16.96	19.27
1.00 M	14.17	22.28	25.74	26.74	25.03	21.22	13.64	24.94	29.93
1.32 M	13.40	29.79	35.62	37.47	35.10	28.89	17.18	43.53	43.53
1.50 M	12.27	32.30	39.51	41.64	38.84	32.32	18.55	48.64	48.64
2.00 M	11.07	43.50	55.50	59.72	56.30	45.69	24.80	49.88	69.84
3.00 M	9.90	62.08	83.19	91.85	88.29	73.06	39.21	74.83	119.72
4.00 M	9.50	81.18	113.04	128.35	116.94	107.73	64.18	99.77	179.58

TABLICA 5.2: Ciśnienia osmotyczne we wszystkich badanych roztworach betainy o ładunkach przeskalanowanych przez czynnik: 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 i 1.6. Dla porównania zestawiono również ciśnienie idealne (id) oraz ciśnienie eksperymentalne (exp).

5.3.3 Wykluczanie osmolitu jako funkcja symulowanego momentu dipolowego w przypadku cząsteczek betainy

Aby dostarczyć szczegółowego obrazu zjawiska wykluczania i akumulacji cząsteczek osmolitu na powierzchni białka, obliczyłam współczynniki preferencyjnego oddziaływania Γ (szczegółowy opis dotyczący wyznaczania tych współczynników przedstawiłam w rozdziale 4.3.5) w stanie zwiniętym i rozwiniętym.

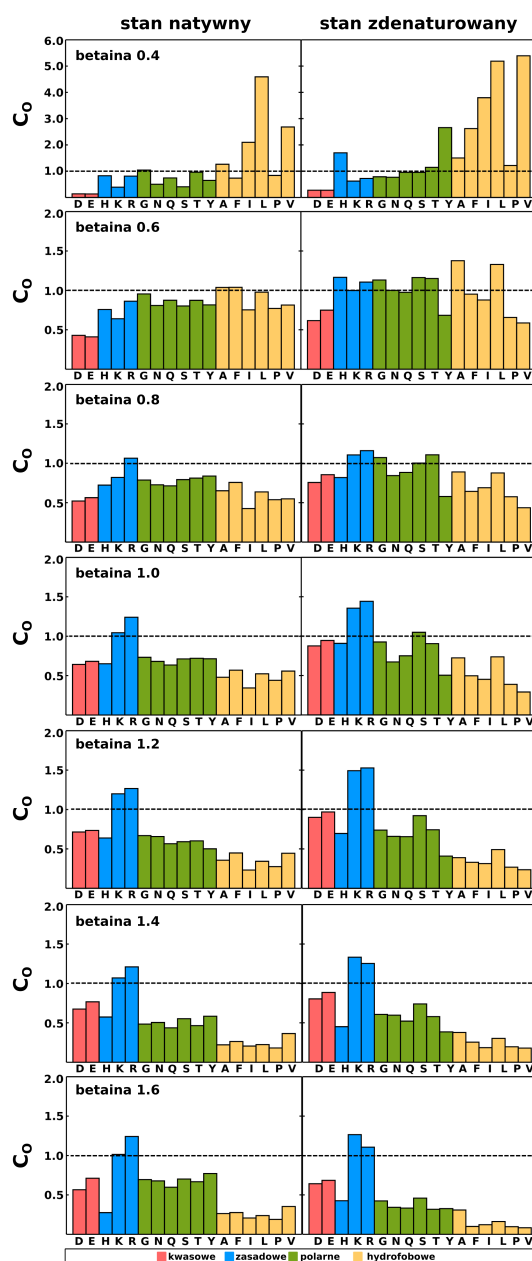


RYSUNEK 5.16: Analiza wykluczania i akumulacji cząsteczek betainy na powierzchni białka w funkcji odległości. Współczynnik preferencyjnego oddziaływania Γ został obliczony dla cząsteczek osmolitu w odniesieniu do a) białka jako całości b) łańcucha głównego w białku c) łańcuchów bocznych w białku, w każdym przypadku osobno w stanie zwiniętym i zdenaturowanym (rozwiniętym), dla cząsteczek betainy o ładunkach przeskalowanych o czynnik 0.4 (różowy), 0.6 (czerwony), 0.8 (pomarańczowy), 1.0 (czarny), 1.2 (zielony), 1.4 (niebieski) i 1.6 (fioletowy).

Na podstawie Rysunku 5.16 można zaobserwować zmiany współczynnika preferencyjnego oddziaływania w zależności od odległości od powierzchni białka podczas rozwijania.

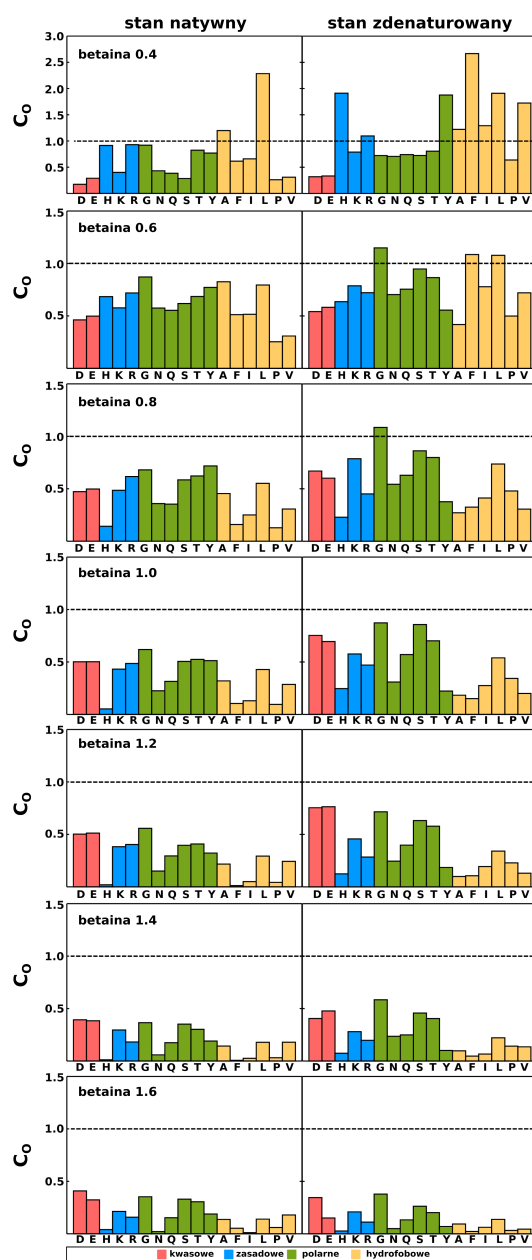
Widać, że zmiana cząstkowych ładunków na wszystkich atomach w cząsteczkach betainy znacznie różnicuje ich preferencję do oddziaływania z łańcuchem głównym i bocznymi, zwłaszcza w stanie rozwiniętym. Na podstawie tego Rysunku widać, że cząsteczki betainy są wykluczane z powierzchni łańcucha głównego zarówno w stanie zwiniętym jak i rozwiniętym, gdyż współczynnik preferencyjnego oddziaływania Γ przyjmuje wartości mniejsze niż zero. Wyjątek stanowią cząsteczki betainy przeskalowane o czynnik 0.4, dla której współczynnik Γ przyjmuje wartości większe niż zero i w związku z tym są one akumulowane na powierzchni łańcucha głównego. Co ciekawe, im bardziej polarne są cząsteczki betainy (większe cząstkowe ładunki na ich atomach, większe symulowane momenty dipolowe) tym wartości współczynników Γ są bardziej ujemne, a w związku z tym cząsteczki betainy są bardziej wykluczane z powierzchni łańcucha głównego, co szczególnie widać w stanie zdenaturowanym. Z kolei, dla całego białka i jego łańcuchów bocznych, dla niewielkich odległości (0.1–0.3 nm) współczynnik Γ przyjmuje wartości dodatnie, co oznacza, że cząsteczki betainy są akumulowane na powierzchni białka. Dla większych odległości od powierzchni białka (0.3–1.0 nm) współczynnik Γ przyjmuje wartości mniejsze niż zero i w związku z tym cząsteczki betainy są wykluczane z powierzchni białka. Podobnie, jak w przypadku łańcucha głównego, wyjątkiem są cząsteczki betainy przeskalowane o czynnik 0.4, gdzie współczynnik Γ przyjmuje wartości większe niż zero i w związku z tym cząsteczki betainy o niewielkiej polarności i akumulują się na powierzchni białka.

Dodatkowo obliczyłam lokalne współczynniki podziału dla cząsteczek betainy o ładunkach przeskalowanych o czynnik w zakresie 0.4–1.6 względem wszystkich rodzajów reszt aminokwasowych ubikwityny, osobno dla łańcuchów bocznych (Rysunek 5.17) oraz łańcucha głównego (Rysunek 5.18), zarówno w stanie natywnym jak i zdenaturowanym. Na podstawie Rysunków 5.17 i 5.18 można zauważyć, że cząsteczki betainy o większych symulowanych momentach dipolowych oddziałują korzystnie jedynie z fragmentami zasadowymi, dla których lokalne współczynniki podziału przyjmują wartości większe niż 1.0. Jest to efekt oddziaływania cząsteczek betainy poprzez grupę karboksylową z grupami guanidynowymi reszt Arg oraz grupami aminowymi reszt Lys. Z kolei cząsteczki betainy o mniejszych symulowanych momentach dipolowych oddziałują korzystnie również z niektórymi aminokwasami polarnymi czy hydrofobowymi. Dodatkowo, można zaobserwować pewne monotoniczne trendy w zachowaniu się lokalnego współczynnika podziału: wraz ze wzrostem cząstkowych ładunków na cząsteczkach betainy zmniejsza się lokalny współczynnik podziału dla aminokwasów hydrofobowych oraz polarnych. Odwrotną sytuację obserwujemy w przypadku aminokwasów zasadowych, gdzie wraz ze wzrostem polarności cząsteczek betainy zwiększa się lokalny współczynnik podziału, a co za tym idzie cząsteczki betainy akumulują się przy powierzchni fragmentów zasadowych.



RYSUNEK 5.17: Analiza wykluczania i akumulacji cząsteczek osmolitu na powierzchni białka. Lokalny współczynnik podziału został obliczony dla cząsteczek betajiny (o ładunkach przeskalowanych o czynnik zmieniający się w zakresie 0.4–1.6) w odniesieniu do poszczególnych łańcuchów bocznych występujących na powierzchni ubikwityny. Kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy kwasowe, niebieskim – zasadowe, zielonym – polarne a pomarańczowym – hydrofobowe. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym jednoliterowym skrótom znajdują się w Tabelcy 5.1.

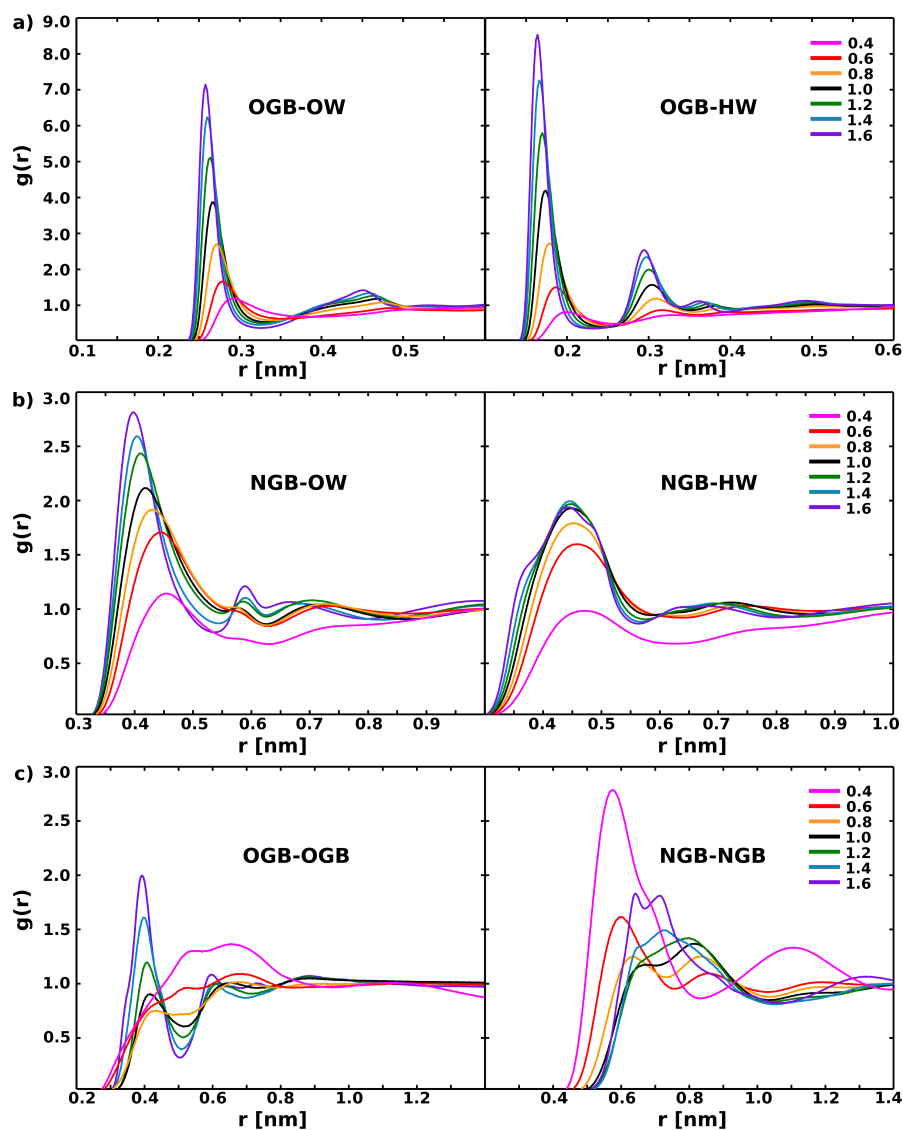
Dodatkowo, obliczyłam radialne funkcje rozkładu cząsteczek osmolitu (OGB – atom tlenu z cząsteczki betajiny, NGB – atom azotu z cząsteczki betajiny) wokół cząsteczek wody (OW – atom tlenu, HW – atom wodoru z cząsteczki wody), a także radialne funkcje rozkładu cząsteczek betajiny względem siebie nawzajem (OGB–OGB, NGB–NGB). Radialne funkcje rozkładu charakteryzują relatywne zmiany gęstości danego typu cząsteczek w funkcji odległości r



RYSUNEK 5.18: **Analiza wykluczenia i akumulacji cząsteczek betajny na powierzchni białka.** Lokalny współczynnik podziału został obliczony dla cząsteczek betajny (o ładunkach przeskalowanych o czynnik zmieniający się w zakresie 0.4–1.6) w odniesieniu do elementów łańcucha głównego ubikwityny odpowiadających poszczególnym rodzajom reszt. Kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy kwasowe, niebieskim – zasadowe, zielonym – polarne, pomarańczowym – hydrofobowe. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym jednoliterowym skrótom znajdują się w Tabelicy 5.1.

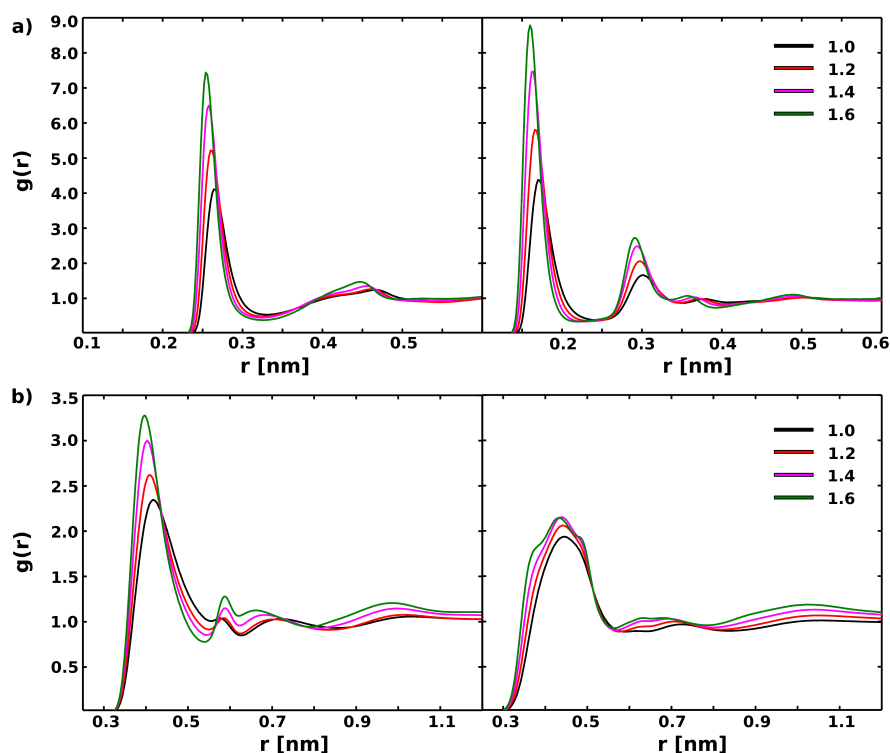
od cząsteczki odniesienia.

Na Rysunku 5.19a, b widać, że wraz ze wzrostem polarności cząsteczek betajny, cząsteczki wody są coraz silniej wiązane przez cząsteczki osmolitu. Na Rysunku 5.19c przedstawiłam wzajemne oddziaływania cząsteczek betajny. Na podstawie tego Rysunku można zauważyć, że



RYSUNEK 5.19: Radialne funkcje rozkładu cząsteczek betajny o różnych symulowanych momentach dipolowych. Radialne funkcje rozkładu cząsteczek betajny były obliczone w odniesieniu do: a), b) cząsteczek wody, c) innych cząsteczek betajny w funkcji odległości r , dla cząsteczek betajny o ładunkach przeskalowanych o czynnik 0.4 (różowy), 0.6 (czerwony), 0.8 (pomarańczowy), 1.0 (czarny), 1.2 (zielony), 1.4 (niebieski) i 1.6 (fioletowy).

dla cząsteczek betajny o większym symulowanym momencie dipolowym (1.2, 1.4, 1.6) maksimum funkcji rozkładu tlen-tlen występuje przy odległości 0.4 nm, co oznacza, że średnio rzecz biorąc, grupy karboksylowe znajdują się względem siebie w odległości, w której odpychają się elektrostatycznie. U podłoża tego nieco zaskakującego efektu leży mostek wodny tworzony pomiędzy grupami karboksylowymi przez pojedynczą cząsteczkę wody, co było obserwowane także wcześniej [86]. Mniej polarne cząsteczki betajny (1.0) nie oddziałują już tak korzystnie ze sobą poprzez atomy tlenu (OGB–OGB), a maksimum piku przyjmuje wartości mniejsze niż 1.0. W tym



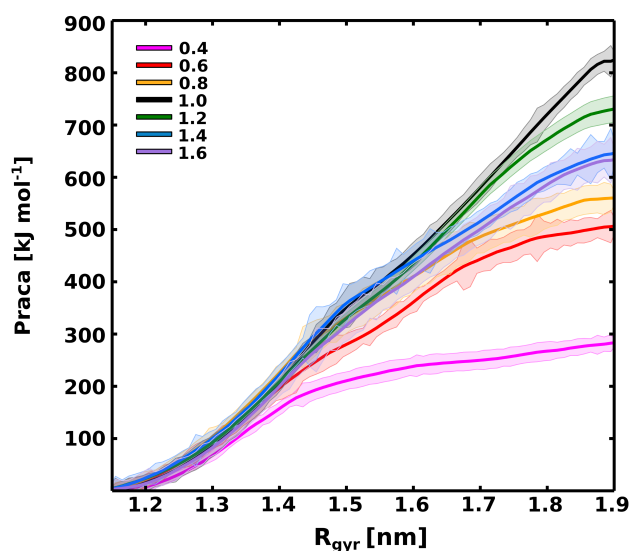
RYSUNEK 5.20: Radialne funkcje rozkładu atomów tlenu (na lewo) oraz atomów wodoru (na prawo) z cząsteczki wody w obecności rozwiniętego lizozymu, obliczone w odniesieniu do atomu: a) tlenu b) azotu cząsteczek betainy z ładunkami częściowymi przeskalowanymi o współczynnik: 1.0 (czarny), 1.2 (czerwony), 1.4 (różowy), 1.6 (zielony).

zakresie polarności cząsteczki betainy odpychają się wzajemnie najsilniej. Dodatkowo, można zauważyć, że cząsteczki betainy o jeszcze mniejszych symulowanych momentach dipolowych mają dosyć szerokie piki odpowiadające oddziaływaniom (OGB–OGB). Warto również zauważyć, że cząsteczki betainy o najmniejszym symulowanym momencie dipolowym (0.4 i 0.6) bardzo silnie oddziałują z innymi cząsteczkami betainy poprzez grupy trimetyloamoniowe (NGB–NGB), a oddziaływanie to ma charakter hydrofobowy.

Dodatkowo, na podstawie Rysunku 5.20 widać, że w przypadku lizozymu (podobnie jak dla ubikwityny – Rysunek 5.19a i Rysunek 5.19b), zdolność wiązania cząsteczek wody zwiększa się wraz z polarnością cząsteczek osmolitu a zwiększenie cząstkowych ładunków na cząsteczkach betainy prowadzi do znaczącej poprawy efektu stabilizującego cząsteczek osmolitu.

5.3.4 Czy efekt stabilizacyjny jest związany ze zmniejszeniem solwatacji?

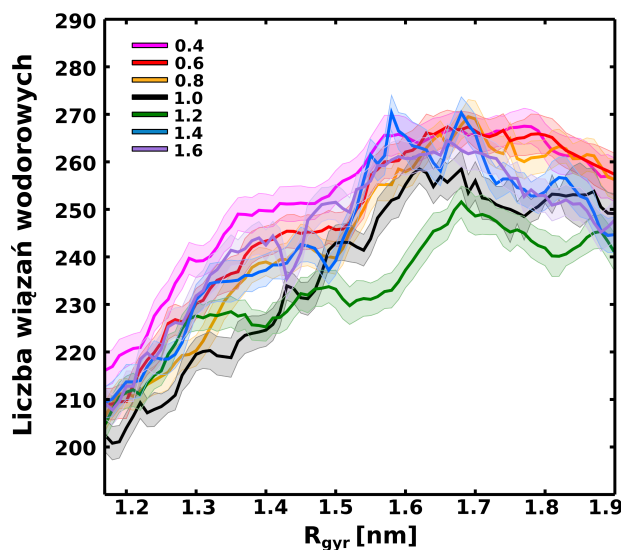
Jak już wcześniej wspomniałam, efekt stabilizacyjny cząsteczek osmolitu może wynikać z niekorzystnych bezpośrednich oddziaływań cząsteczek osmolitu z powierzchnią białka, prowadzących do wykluczania cząsteczek osmolitu, ale może mieć również na niego wpływ sposób hydratacji osmolitu, jego wpływ na hydratację białka oraz konieczność wykonania pracy przeciwko ciśnieniu osmotycznemu wywieranemu przez cząsteczki osmolitu. Aby zatem sprawdzić, który z wymienionych powyżej efektów jest dominujący, wykonałam symulacje mechanicznego rozwijania ubikwityny w obecności cząsteczek betainy o różnych symulowanych momentach dipolowych, w których objętość wykluczania była identyczna dla każdego z osmolitów (atomy C_α cząsteczek betainy utrzymywane były w w trakcie rozciągania w odległości co najmniej 0.8 nm od powierzchni białka). Na Rysunku 5.21 przedstawiłam wykresy zależności prac potrzebnych do rozwinięcia ubikwityny w obecności cząsteczek betainy przeskalowanych o czynnik w zakresie 0.4–1.6 od promienia bezwładności.



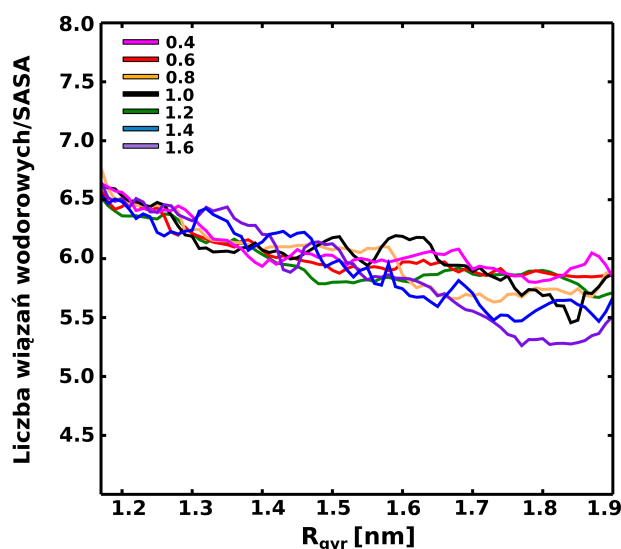
RYSUNEK 5.21: Prace rozwijania ubikwityny w sterowanych symulacjach MD, w trakcie których cząsteczki betainy były wykluczone na odległość 0.8 nm od powierzchni białka. Praca jest przedstawiona jako funkcje promienia bezwładności R_{gyr} , dla cząsteczek betainy o ładunkach przeskalowanych przez czynnik w zakresie 0.4–1.6. Wykresy wykonane są dla prędkości rozciągania $5 \cdot 10^{-6} \text{ nm ps}^{-1}$. Pokazano paski błędów.

Na podstawie Rysunku 5.21 widać, że zmienił się nieco trend w porównaniu do prac, w przypadku gdy objętości wykluczania różniły się między sobą. Można zauważyć, że praca potrzebna do rozwinięcia ubikwityny rośnie wraz ze wzrostem czynnika skalującego od 0.4 do 1.0, gdzie osiąga największe wartości, po czym dla bardziej polarnych cząsteczek betainy (czynnik skalujący 1.2, 1.4 i 1.6) maleje. Koreluje to z wartościami ciśnienia osmotycznego, co sugeruje,

że w tym przypadku praca rozwijania może w dużym stopniu zależeć od ciśnienia osmotycznego wywieranego przez cząsteczki osmolitu.



RYSUNEK 5.22: Liczba wiązań wodorowych między białkiem a cząsteczkami wody w funkcji R_{gyr} wyznaczone podczas rozwijania ubikwityny w obecności cząsteczek betainy o ładunkach przeskalowanych o czynnik 0.4 (różowy), 0.6 (czerwony), 0.8 (pomarańczowy), 1.0 (czarny), 1.2 (zielony), 1.4 (niebieski) i 1.6 (fioletowy). Pokazano paski błędów.



RYSUNEK 5.23: Liczba wiązań wodorowych między białkiem a cząsteczkami wody przypadająca na powierzchnię hydrofilową w funkcji R_{gyr} wyznaczone podczas rozwijania ubikwityny w obecności cząsteczek betainy o ładunkach przeskalowanych o czynnik 0.4 (różowy), 0.6 (czerwony), 0.8 (pomarańczowy), 1.0 (czarny), 1.2 (zielony), 1.4 (niebieski) i 1.6 (fioletowy).

Ze względu na to, że objętości wykluczania są teraz identyczne, prace potrzebne do rozwinięcia ubikwityny w obecności cząsteczek betainy zdekomponowałam na wkład pochodzący od ciśnień osmotycznych oraz na wkład pochodzący od hydratacji białka. Okazało się, że prace wynikające z różnych ciśnień osmotycznych stanowią do ok. 30 % całkowitego wkładu do pracy

potrzebnej do rozwinięcia ubikwityny i są wprost proporcjonalne do ciśnień osmotycznych. Z kolei wkład pracy związany z solwatacją jest wkładem dominującym. Na Rysunku 5.22 przedstawiłam wykres zależności liczby wiązań wodorowych między białkiem a wodą w zależności od promienia bezwładności R_{gyr} . Na podstawie tego Rysunku można zauważyć, że mniej wiązań wodorowych tworzy się między białkiem a cząsteczkami wody w obecności cząsteczek betainy o największych symulowanych momentach dipolowych (1.2–1.6). Z kolei, w obecności cząsteczek betainy o mniejszych symulowanych momentach dipolowych cząsteczki wody tworzą nieco więcej wiązań wodorowych z białkiem. Różnice w liczbach wiązań wodorowych mogą wynikać z różnej struktury białka lub ze zmniejszonej/zwiększonej solwatacji białka. Aby sprawdzić, który efekt ma wpływ na różnice w liczbie wiązań wodorowych na Rysunku 5.23 przedstawiłam liczby wiązań wodorowych przypadających na powierzchnię hydrofilową. Po pomnożeniu tych liczb przez średnią powierzchnię dostępną dla rozpuszczalnika okazało się, że różnice w liczbie wiązań wodorowych wynikają ze zmniejszonej hydratacji białka przez cząsteczki betainy o dużych symulowanych momentach dipolowych.

5.3.5 Podsumowanie

W tej części pracy pokazałam w jaki sposób stabilizacja zależy od symulowanego momentu dipolowego cząsteczki osmolitu. Dodatkowo, dokonałam walidacji modelu cząsteczek betainy oraz dokonałam dekompozycji efekt stabilizacyjnego.

W celu analizy wpływu cząsteczek osmolitu na obliczone prace rozwijania, zbadalam molekularne uwarunkowania stabilności białek w badanych roztworach. W szczególności, obliczyłam lokalne współczynniki podziału. Na ich podstawie dokonałam ilościowej oceny wielkości oraz rozmieszczenia przestrzennego wykluczanych i akumulowanych cząsteczek osmolitu na powierzchni białka. Dodatkowo obliczyłam również radialne funkcje rozkładu cząsteczek osmolitu wokół cząsteczek rozpuszczalnika.

Zaobserwowałam, że praca potrzebna do rozwinięcia ubikwityny w obecności cząsteczek betainy o ładunkach przeskalowanych o czynnik w zakresie 0.4–1.6 rośnie wraz ze wzrostem cząstkowych ładunków na atomach cząsteczek betainy. Dodatkowo zaobserwowałam, że cząsteczki betainy o małej polarności, małym symulowanym momencie dipolowym (czynnik skalityngujący równy 0.4 i 0.6) destabilizują białka. Zaś cząsteczki betainy o większych symulowanych momentach dipolowych, większej polarności (czynnik przeskalowania 0.8–1.6) stabilizują białka i efekt jest tym silniejszy im bardziej polarne są cząsteczki betainy.

Zaobserwowałam, że cząsteczki betainy są wykluczane z powierzchni ubikwityny, zarówno z sąsiedztwa łańcucha głównego, jak i łańcuchów bocznych. Dodatkowo zauważyłam, że im bardziej polarne są cząsteczki betainy tym są silniej one wykluczane z powierzchni białka (fragmentów polarnych i hydrofobowych). Stwierdziłam także, że obojnacze jony betainy gromadzą się w pobliżu naładowanych, zasadowych reszt, co daje powody do nierównomiernego i zmiennego rozkładu na powierzchni białka. Można zatem powiedzieć, że cząsteczki betainy – dość duże cząsteczki z dużym momentem dipolowym – wykazują działanie podobne jak ligand, tzn. oddziałują korzystnie ze stosunkowo niewielu miejscami na powierzchni białka. Obserwowane efektywne wykluczanie cząsteczek betainy z powierzchni łańcucha głównego przekłada się na efekt stabilizujący cząsteczek osmolitu.

Pokazałam również, że wraz ze wzrostem polarności cząsteczek betainy, cząsteczki wody są coraz silniej wiązane przez cząsteczki osmolitu. Stwierdziłam, że cząsteczki betainy o małych symulowanych momentach dipolowych (0.4, 0.6 i 0.8) oddziałują ze sobą hydrofobowo, cząsteczki betainy o większych symulowanych momentach dipolowych (1.0) są silnie hydratowane. Zaś cząsteczki betainy o największych symulowanych momentach dipolowych (1.2, 1.4 i 1.6) oddziałują ze sobą przez wiązania wodorowe mediowane przez jedną cząsteczkę wody.

Zaobserwowałam, że prace potrzebne do rozwinięcia ubikwityny, w symulacjach w których objętość wykluczania cząsteczek osmolitu jest identyczna, są wprost proporcjonalne do ciśnień osmotycznych. Zauważyłam, że ciśnienie osmotyczne rośnie dla cząsteczek betainy przeskalowanych o czynnik w zakresie 0.4 do 1.0, zaś dla cząsteczek betainy bardziej polarnych 1.2–1.6 ciśnienie osmotyczne maleje i w związku z tym zmniejsza się efekt stabilizujący związany z wykluczaniem cząsteczek betainy.

Ukazałam, że model cząsteczek betainy przeskalowany o czynnik 1.2 najlepiej odzwierciedla wyniki eksperymentalne dotyczące ciśnień osmotycznych oraz współczynników Γ .

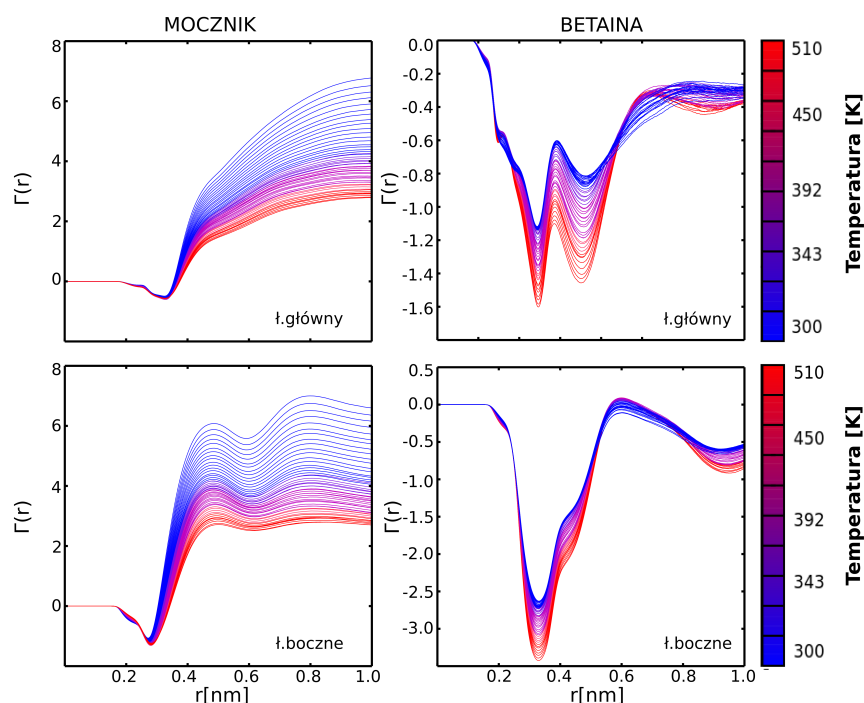
Pokazałam, że efekt stabilizacyjny wynika z wykluczania cząsteczek osmolitu z powierzchni białka, ze sposobu hydratacji osmolitu, wpływu osmolitu na hydratację białka oraz wpływu ciśnienia osmotycznego.

5.4 Wpływ osmolitów na termiczną stabilność białek – symulacje białka Trp-cage w roztworach mocznika i betainy metodą replik temperaturowych (REMD)

5.4.1 Wzrost temperatury przyczyną zwiększenia wykluczania cząsteczek betainy oraz zmniejszenia akumulacji cząsteczek mocznika na powierzchni białka Trp-cage

Podjęłam próbę zidentyfikowania molekularnych czynników determinujących wpływ osmolitów na termiczną denaturację białka Trp-cage. Na wstępie obliczyłam temperaturową zależność współczynnika preferencyjnego oddziaływania Γ , którego definicję przedstawiłam w Rozdziale 4.3.5. Na Rysunku 5.24 przedstawiłam odpowiednie zależności dla 3.5 M roztworu betainy i 5.0 M roztworu mocznika w funkcji odległości od powierzchni białka. Zależności te zostały obliczone oddzielnie dla łańcucha głównego i łańcuchów bocznych. Dla układów zawierających cząsteczki mocznika można zauważyć, że wartość Γ jest dodatnia w całym zakresie odległości, co wskazuje na typowe dla denaturantów gromadzenie się cząsteczek osmolitu na powierzchni białka [60]. Ponadto, akumulacja cząsteczek mocznika wokół łańcuchów bocznych białka jest nieznacznie większa niż wokół łańcucha głównego, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami [60, 66, 80]. Co istotne, liczba cząsteczek mocznika zgromadzonych na powierzchni białka Trp-cage wyraźnie zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury.

W przeciwieństwie do roztworów zawierających cząsteczki mocznika, na podstawie ujemnych wartości Γ uzyskanych dla roztworów betainy widać, że cząsteczki tego osmolitu są efektywnie wykluczane z powierzchni białka Trp-cage, przy czym wykluczanie jest najbardziej widoczne w bezpośrednim sąsiedztwie łańcuchów bocznych ($\Gamma = -3.5$ dla $r = 0.4$ nm). Uzyskane przeze mnie wyniki są zgodne z współczynnikami preferencyjnego oddziaływania Γ uzyskanymi z pomiarów osmometrycznych [55, 78], które ukazują wykluczanie osmolitów stabilizujących z powierzchni białka. Można również zauważyć, że liczba cząsteczek betainy obecnych na powierzchni białka zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury, co sugeruje, że obserwowany wzrost stabilizacji białka wraz ze wzrostem temperatury wywołany obecnością cząsteczek betainy może wynikać z ich silniejszego wykluczania z powierzchni Trp-cage. Jak wspominałam, jest to zgodne z szeroko akceptowanym mechanizmem działania osmolitów stabilizujących [46–48, 52].

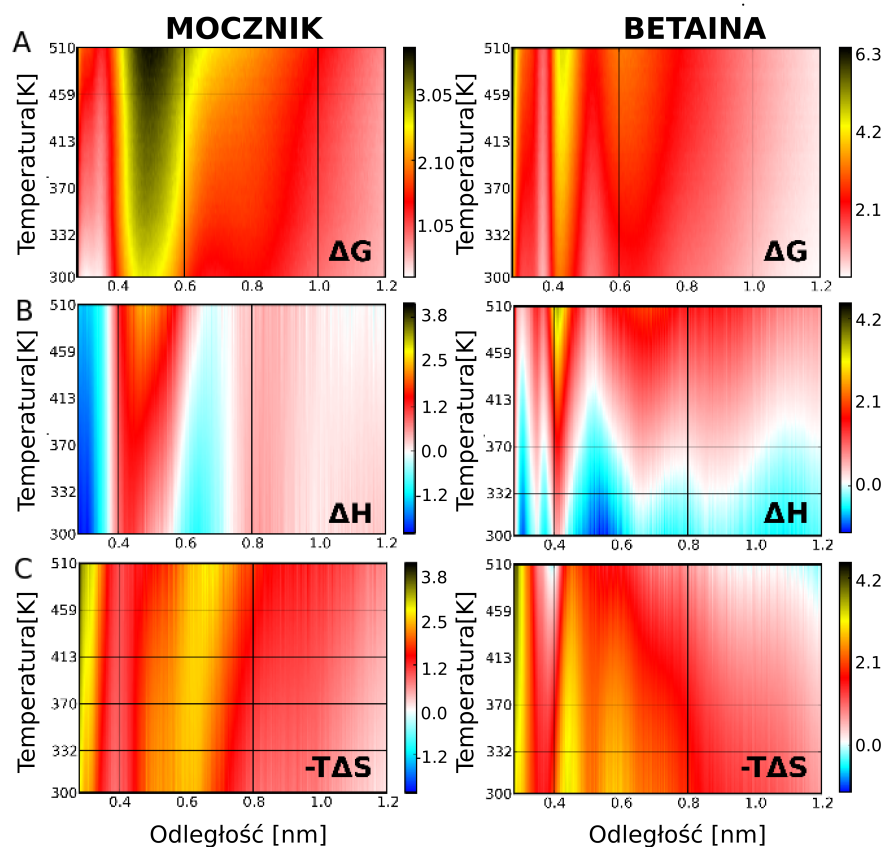


RYSUNEK 5.24: Współczynnik preferencyjnego oddziaływania (Γ) obliczony dla 5.0 M roztworu mocznika oraz 3.5 M roztworu betainy w odniesieniu do powierzchni białka (osobno łańcucha głównego i łańcuchów bocznych) w funkcji temperatury i odległości od powierzchni białka.

5.4.2 Entalpową siłą napędową dla asocjacji cząsteczek mocznika i betainy do powierzchni białka Trp-cage zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury

Aby zrozumieć dlaczego wzrost temperatury powoduje zwiększenie wykluczania cząsteczek betainy oraz zmniejszenie akumulacji cząsteczek mocznika na powierzchni białka obliczyłam, w jaki sposób profile entalpii swobodnej dla asocjacji obydwu osmolitów do powierzchni białka Trp-cage zależą od temperatury. Na Rysunku 5.25A ukazałam odpowiednie profile entalpii swobodnej, obliczone jako $\Delta G(r, T) = -kT \ln g(r, T)$, gdzie $g(r, T)$ jest funkcją rozkładu radialnego między cząsteczkami osmolitu a powierzchnią białka Trp-cage (z ang. minimum-distance distribution function) w funkcji temperatury T . Następnie, na Rysunku 5.25BC, profile entalpii swobodnej zostały zdekomponowane na wkłady entalpowe (ΔH) oraz entropowe ($-T\Delta S$), co szczegółowo opisałam w Rozdziale 4.2.4.

Widoczne na Rysunku 5.25A minimum energii swobodnej dla mocznika w zakresie 0.2–0.4 nm wskazuje na akumulację cząsteczek tego osmolitu na powierzchni białka. Widać także, że głębokość tego minimum zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury, co potwierdza, że asocjacja cząsteczek mocznika z powierzchnią białka Trp-cage jest mniej korzystna w wyższych



RYSUNEK 5.25: Termodynamiczna charakterystyka oddziaływań między cząsteczkami osmolitu a powierzchnią białka Trp-cage. A, Temperaturowa zależność profili entalpii swobodnej (w kJ/mol) dla asocjacji cząsteczek osmolitu do powierzchni białka Trp-cage w 5.0 M roztworze mocznika i 3.5 M roztworze betainy. BC, Entalpowe (ΔH) oraz entropowe ($-T\Delta S$) wkłady do profili entalpii swobodnej pokazanych na panelu A.

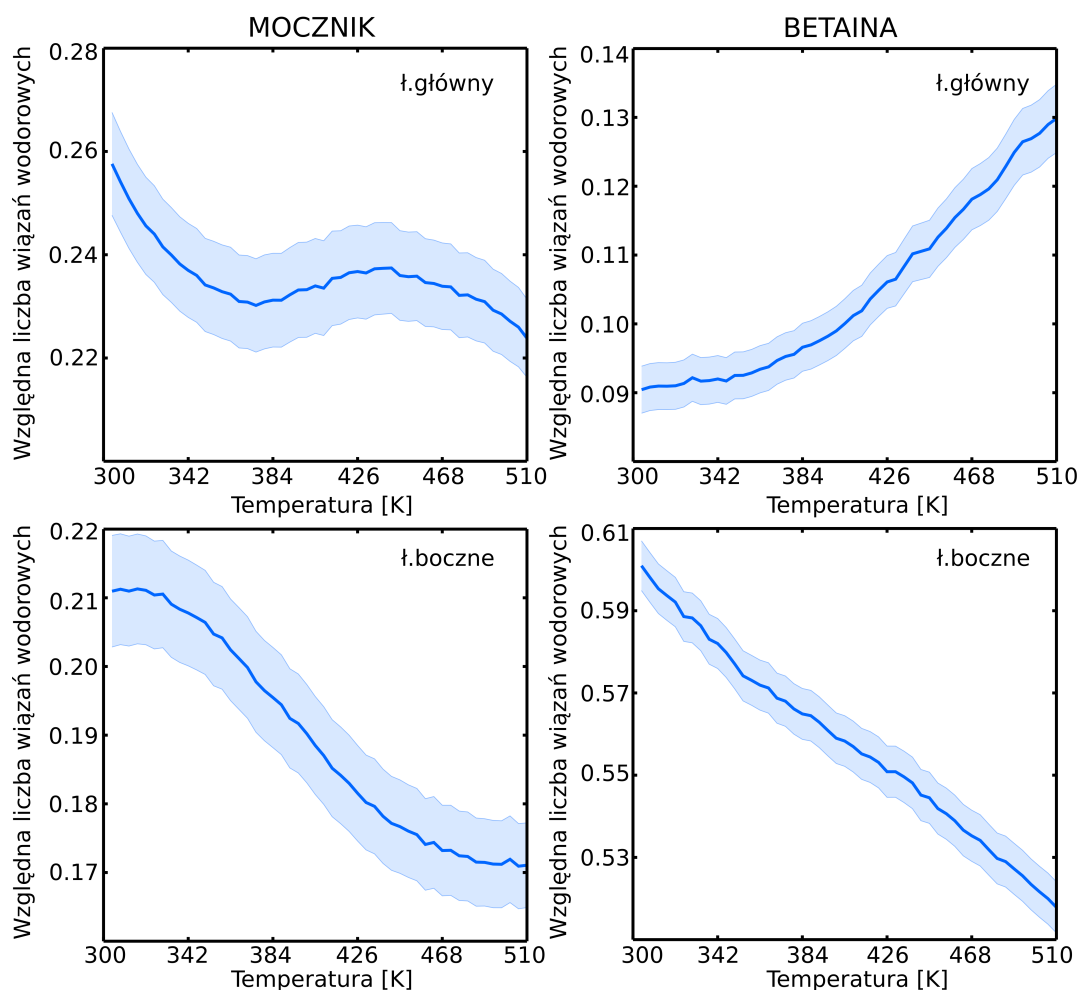
temperaturach. Podobnie, dla układu zawierającego cząsteczki betainy, entalpia swobodna asocjacji, która jest niekorzystna już w 300 K, staje się jeszcze bardziej dodatnia wraz ze wzrostem temperatury, co po raz kolejny wskazuje, że wzrost temperatury powoduje zwiększenie wykluczenia cząsteczek tego osmolitu z powierzchni białka.

Wkład entalpowy do profili entalpii swobodnej (Rysunku 5.25B) pokazuje, że entalpia asocjacji cząsteczek mocznika z powierzchnią białka (do odległości 0.4 nm) przyjmuje wartości ujemne w całym zakresie badanych temperatur, zmieniając się od wartości $\Delta H = -2.1$ kJ/mol w temperaturze $T = 300$ K do wartości $\Delta H = -0.4$ kJ/mol w temperaturze $T = 510$ K. Ponieważ odpowiadający wkład entropowy (Rysunek 5.25C) jest niekorzystny, ale nie na tyle by przewyciężyć korzystny wkład entalpowy [28, 60, 143] można wywnioskować, że obserwowana akumulacja cząsteczek mocznika na powierzchni białka jest napędzana entalpowo. Warto podkreślić, że korzyść entalpowa maleje wraz ze wzrostem temperatury, co sugeruje, że zmniejszająca

się w tym samym czasie akumulacja cząsteczek mocznika wynika z ich coraz słabszych oddziaływań z białkiem. Rzeczywiście, na Rysunku 5.26 pokazałam, że obserwowanemu spadkowi entalpii asocjacji towarzyszy znaczny spadek liczby wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami mocznika a łańcuchem głównym i łańcuchami bocznymi białka. Ustaliłam, że wraz ze wzrostem temperatury od 300 do 510 K zrywaniu ulega 13 i 18 % wiązań wodorowych mocznik-białko, odpowiednio, dla łańcucha głównego i łańcuchów bocznymi białka. Mniejszy spadek liczby wiązań w pierwszym przypadku wynika z wyraźnej preferencji cząsteczek mocznika do tworzenia wiązań wodorowych z grupami amidowymi łańcucha głównego białka, które stają się bardziej eksponowane podczas termicznego rozwinięcia białka. Na Rysunkach 5.27 i 5.28 ukazałam, że w wyższych temperaturach osłabieniu ulegają także oddziaływania elektrostatyczne między cząsteczkami mocznika a łańcuchem głównym i łańcuchami bocznymi (odpowiednio, o 18 i 15 %), jak również oddziaływania van der Waalsa (odpowiednio, o 10 i 13 %).

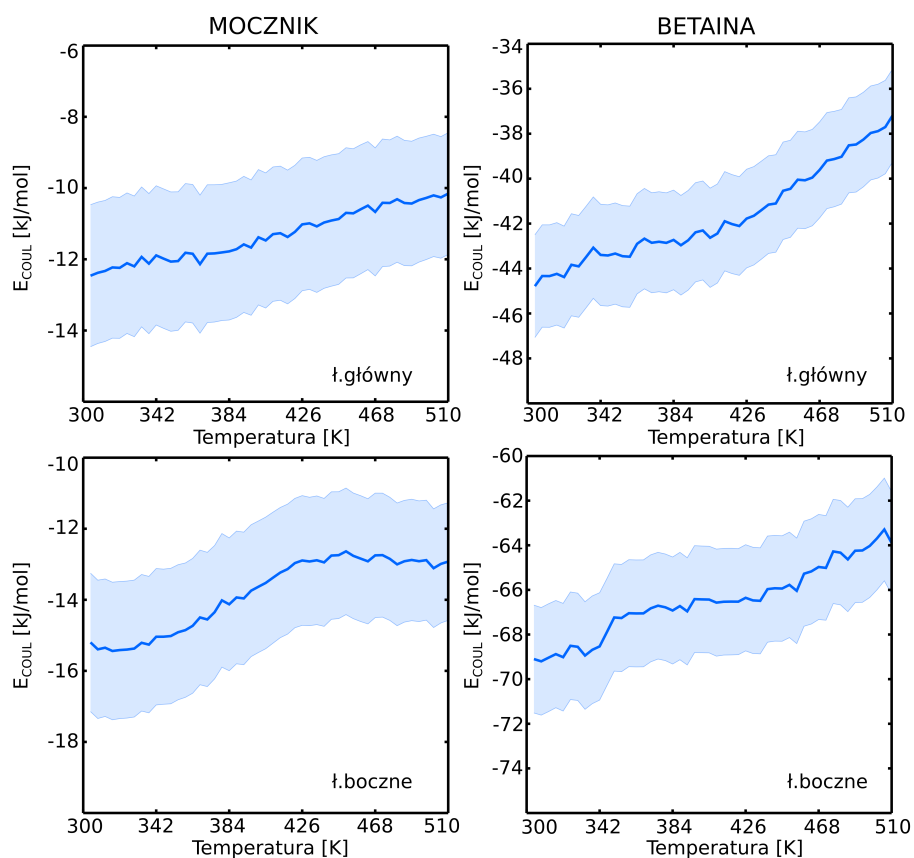
Na Rysunku 5.25B pokazałam, że entalpową siłą napędzająca asocjację betainy z powierzchnią białka Trp-cage jest wyraźnie słabsza niż w przypadku cząsteczek mocznika. Jednak, w niskich temperaturach, asocjacja ta jest również marginalnie korzystna entalpowo. Dodatkowo, na podstawie Rysunku 5.25BC można zauważyć dwa wyraźne minima o równej głębokości, węższe przy 0.3 nm i szersze przy 0.5–0.6 nm. Na podstawie danych symulacyjnych widać, że minima odpowiadają dwóm preferencyjnym orientacjom cząsteczek betainy względem powierzchni białka: pierwsze minimum odpowiada kontaktowi przez grupę COO^- betainy, zaś drugie przez grupę aminową. Ze względu na fakt, że nawet w niskich temperaturach, entalpia asocjacji cząsteczek osmolitu z powierzchnią białka jest niewielka (> -0.4 kJ/mol), można twierdzić, że obserwowane efektywne odpychanie cząsteczek betainy z powierzchni białka jest zdominowane przez niekorzystny entropowy wkład (aż do 2.5 kJ/mol). Obserwacja ta jest zgodna ze sterycznym modelem wykluczania cząsteczek osmolitu z powierzchni białka [85].

Na podstawie Rysunku 5.25B można ponadto stwierdzić, że obserwowane przeze mnie zwiększone wykluczanie cząsteczek betainy z powierzchni białka w wyższych temperaturach jest spowodowane stosunkowo szybkim wzrostem wkładu entalpowego wraz z temperaturą. Ponieważ czynnik entropowy (Rysunek 5.25C) w tym samym czasie staje się korzystniejszy, można wywnioskować, że za zwiększającą się wykluczanie cząsteczek betainy z powierzchni białka Trp-cage odpowiada wkład entalpowy. Podobnie, jak w przypadku układu zawierającego cząsteczki mocznika, obserwowany wzrost ΔH wynika prawdopodobnie ze zmniejszającej się liczby wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami betainy a łańcuchami bocznymi białka. Rzeczywiście, na podstawie Rysunku 5.26 można zauważyć, że całkowita liczba wiązań wodorowych między cząsteczkami betainy a białkiem zmniejsza się o 6 %, co jest głównie spowodowane spadkiem liczby



RYSUNEK 5.26: Zależność liczby wiązań wodorowych między cząsteczkami osmolitu (mocznik lub betaina) a powierzchnią białka Trp-cage (łańcuch główny lub łańcuchy boczne) od temperatury w przeliczeniu na pojedynczą cząsteczkę osmolitu w pierwszej sferze solwatacyjnej (tj. będących w kontakcie z białkiem) w danej temperaturze. Pokazano paski odchyłeń standardowych.

wiązań pomiędzy łańcuchem bocznym białka a cząsteczkami betainy (od 0.6 do 0.52 wiązania na jedną cząsteczkę osmolitu wraz ze wzrostem temperatury od 300 do 510 K). Co ciekawe, liczba wiązań wodorowych między cząsteczkami betainy a łańcuchem głównym nieznacznie zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury (od 0.09 do 0.12 wiązań na cząsteczkę osmolitu), co wynika ze zwiększającej się ekspozycji łańcucha w trakcie termicznej denaturacji. Jednak efekt ten jest znikomy w porównaniu do zmniejszającej się liczby wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami betainy a łańcuchami bocznymi w białku. Dodatkowo, na podstawie analizy energii oddziaływań elektrostatycznych oraz van der Waalsa (Rysunki 5.27 i 5.27), można zauważyć, że oddziaływania elektrostatyczne między cząsteczkami betainy a łańcuchem głównym i łańcuchami bocznymi białka ulegają osłabieniu (odpowiednio, o 17 i 8 %), podobnie jak oddziaływania van der Waalsa (odpowiednio o 9 i 6%), co wskazuje, że asocjacja cząsteczek betainy do powierzchni łańcuchów

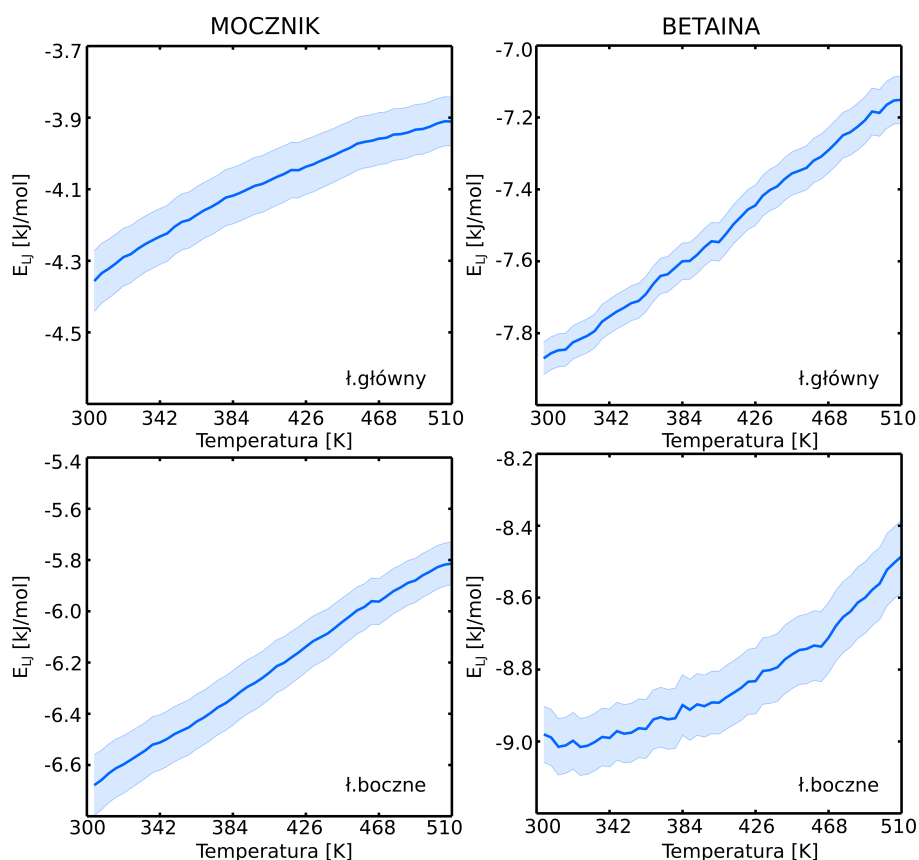


RYSUNEK 5.27: Zależność energii oddziaływań elektrostatycznych między cząsteczkami osmolitu (mocznik lub betaina) a powierzchnią białka Trp-cage (łańcuch główny lub łańcuchy boczne) od temperatury w przeliczeniu na pojedynczą cząsteczkę osmolitu w pierwszej sferze solwatacyjnej (tj. będących w kontakcie z białkiem) w danej temperaturze. Pokazano paski odchyłeń standardowych.

głównych i bocznych białka jest mniej energetycznie korzystna w wyższych temperaturach.

5.4.3 Słabsze oddziaływania białko-osmolit w wyższych temperaturach są odpowiedzialne za zmniejszoną akumulację cząsteczek osmolitu na powierzchni białka

W celu dokładniejszego zbadania molekularnych czynników wpływających na zmniejszenie akumulacji cząsteczek mocznika i zwiększenie wykluczania cząsteczek betainy z powierzchni białka Trp-cage wraz ze wzrostem temperatury zdekomponowałam wartości entalpii asocjacji osmolitów na wkłady pochodzące od poszczególnych składników układu poprzez uśrednienie odpowiednich energii oddziaływań wzdłuż trajektorii w każdej badanej temperaturze. Na Rysunku 5.29 wkłady te pokazałam w funkcji odległości pomiędzy cząsteczkami osmolitu a powierzchnią białka dla pięciu różnych temperatur.



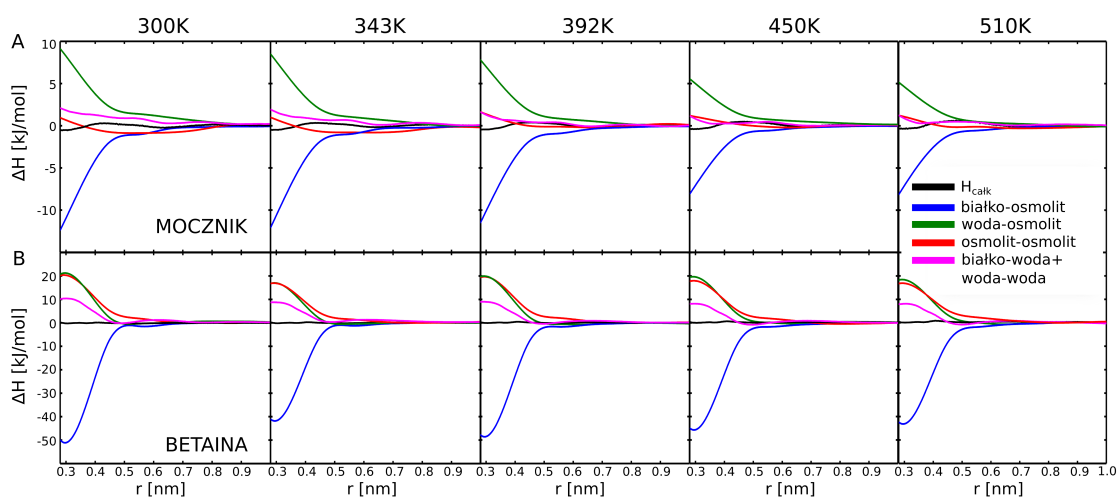
RYSUNEK 5.28: Zależność energii oddziaływań van der Waalsa między cząsteczkami osmolitu (mocznik lub betaina) a powierzchnią białka Trp-cage (łańcuch główny lub łańcuchy boczne) od temperatury w przeliczeniu na pojedynczą cząsteczkę osmolitu w pierwszej sferze solwatacyjnej (tj. będących w kontakcie z białkiem) w danej temperaturze. Pokazano paski odchyłeń standardowych.

	mocznik	betaina
białko-osmolit	4.0	8.0
woda-osmolit	-4.0	-2.0
osmolit-osmolit	0.1	-3.2
woda-woda oraz białko-woda	-0.8	-2.0

TABLICA 5.3: Zmiany wkładów do entalpii asocjacji cząsteczek osmolitu z powierzchnią białka Trp-cage ($\Delta\Delta H$ w kJ/mol) w odpowiedzi na wzrost temperatury od 300 do 510 K.

Na podstawie Rysunku 5.29 można zauważyć, że wartości entalpii asocjacji (ΔH , czarne krzywe) są wynikiem kompensacji dużych wkładów o przeciwnych znakach. Co interesujące, dla obu roztworów osmolitów asocjacja cząsteczek osmolitu do powierzchni białka Trp-cage jest korzystna entalpowo ze względu na przyciągające oddziaływania białko-osmolit. Ponadto, te korzystne oddziaływania są niemal całkowicie kompensowane przez utratę oddziaływań między osmolitem a wodą, jak również pomiędzy białkiem a wodą.

Na podstawie Rysunku 5.29 oraz Tablicy 5.3 widać, że wraz ze wzrostem temperatury



RYSUNEK 5.29: Dekompozycja zmian entalpii asocjacji cząsteczek mocznika i betainy z powierzchnią białka Trp-cage (ΔH) na poszczególne wkłady: białko-osmolit, białko-woda, woda-osmolit, osmolit-osmolit oraz woda-woda.

od 300 do 510 K wkład białko-osmolit do $\Delta\Delta H$ staje się znacznie mniej korzystny (o 4.0 i 8.0 kJ/mol, odpowiednio, dla roztworów mocznika i betainy). Ponieważ w tym samym czasie inne wkłady entalpowe wyraźnie maleją (odpowiednio, o -4.6 i -7.2 kJ/mol) można wywnioskować, że zmniejszona akumulacja cząsteczek mocznika i zwiększone wykluczenie cząsteczek betainy w wyższych temperaturach wynika z ich słabszego oddziaływania z powierzchnią białka.

5.4.4 Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych symulacji zaobserwowałam, że destabilizujący wpływ mocznika wynika z jego entalpowo sterowanej akumulacji na powierzchni białka. Dodatkowo, okazało się, że akumulacja cząsteczek mocznika na powierzchni białka zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury ze względu na słabsze oddziaływanie z białkiem. Spadek energii oddziaływania w wyższych temperaturach wynika ze zmniejszającej się liczby wiązań wodorowych oraz energii oddziaływań elektrostatycznych oraz van der Waalsa pomiędzy cząsteczkami osmolitu a białkiem, w szczególności z łańcuchami bocznymi.

Okazało się, że działanie protekcyjne betainy przed termiczną denaturacją wynika z jej wykluczenia z powierzchni białka. Co interesujące, efekt ten zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury. Na podstawie analizy termodynamicznej pokazałam, że w niskich temperaturach, wkład entropowy jest na tyle niekorzystny, że dominuje nad korzystną entalpią zaś spadek energii oddziaływania w wyższych temperaturach wynika ze zmniejszającej się liczby wiązań wodorowych oraz energii oddziaływań van der Waalsa pomiędzy cząsteczkami osmolitu a białkiem.

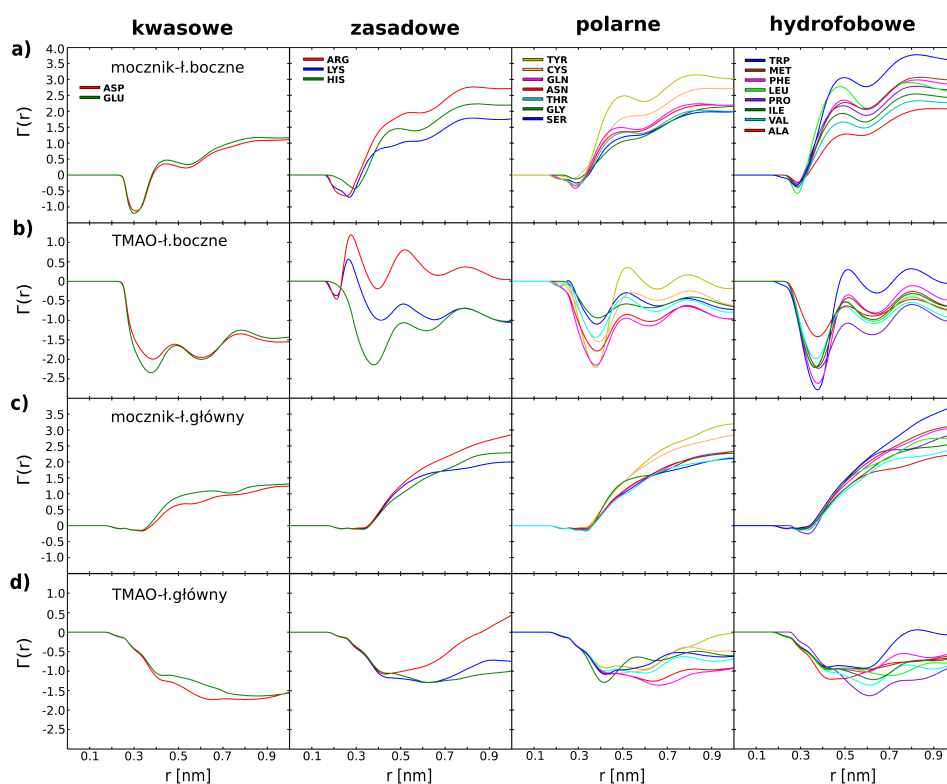
5.5 Czy istnieje szansa wyznaczenia parametru charakteryzującego wpływ wybranych osmolitów na równowagę konformacyjną białka dla zadanej sekwencji aminokwasowej w oparciu o sumowanie wkładów elementarnych?

Najpowszechniej akceptowany model działania osmolitów na białka zakłada, że u podłoża efektu stabilizującego lub destabilizującego leży, odpowiednio, wykluczanie lub akumulowanie osmolitu na powierzchni białka [23, 65–67]. Ponieważ denaturacji białka na ogół towarzyszy zwiększanie jego powierzchni eksponowanej na rozpuszczalnik, niekorzystne oddziaływanie z osmolitami stabilizującymi prowadzi do powstania efektywnej siły przeciwdziałającej rozwijaniu. I odwrotnie, jeśli cząsteczki osmolitu oddziałują z powierzchnią białka korzystnie, równowaga konformacyjna przesuwana się w kierunku formy rozwiniętej. Ilościowo można te zależności wyrazić następująco:

$$\frac{\partial \Delta \Delta G}{\partial c} = RT \Delta \Gamma_h \frac{c}{m_w}, \quad (5.3)$$

gdzie: $\Delta \Delta G$ to zmiana entalpii swobodnej towarzyszącej fałdowaniu białka pod wpływem dodania osmolitu o stężeniu c , m_w to molalność czystej wody, zaś $\Delta \Gamma_h$ to różnica współczynnika preferencyjnej hydratacji pomiędzy stanem natywnym a stanem rozwiniętym [136]. Ta ostatnia wielkość przyjmuje wartości ujemne dla osmolitów wykluczanych z powierzchni (nadmiar wody w sąsiedztwie białka jest wyższy w stanie większej powierzchni kontaktu z rozpuszczalnikiem) i w konsekwencji entalpia swobodna zwijania przyjmuje wartości bardziej ujemne a równowaga konformacyjna białka przesuwana się w kierunku stanu natywnego. Z odwrotnym efektem mamy do czynienia w przypadku osmolitów akumulowanych na powierzchni białka. Ponieważ stwierdzono doświadczalnie, że pochodna w Równaniu (5.3) jest często stała w szerokim zakresie stężeń osmolitu, określa się ją zwykle jako tzw. parametr m (ang. m -value) [136, 144, 145].

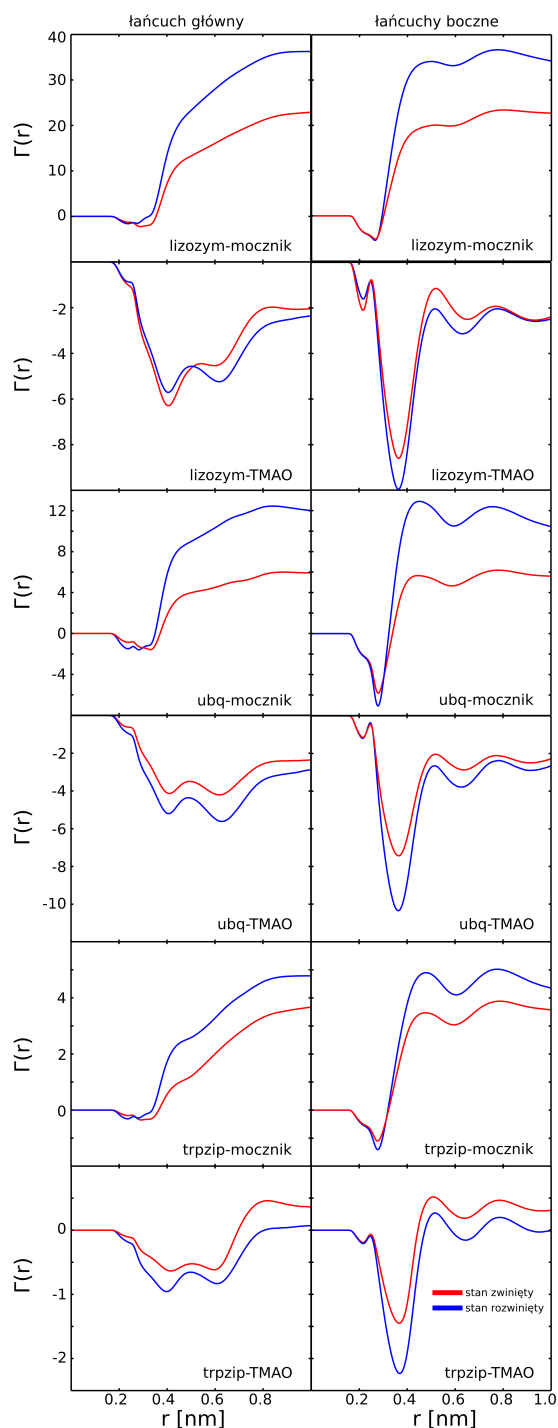
Ze względu na to, że preferencja do oddziaływania z powierzchnią białka, zwłaszcza w przypadku wykluczania, jest silnie zależna od typu aminokwasu, prowadząc do heterogenicznego rozkładu osmolitów wokół białka oraz do zróżnicowanej czułości białek na działanie osmolitów, podjęłam próbę opracowania modelu teoretycznego pozwalającego na przewidywanie dla zadanej sekwencji aminokwasowej parametru m , charakteryzującego wpływ wybranych osmolitów na równowagę konformacyjną białka. W celu skonstruowania i przetestowania tego modelu, w pierwszej kolejności wyznaczyłam wkłady do współczynnika preferencyjnego oddziaływania dla dwudziestu reszt aminokwasowych występujących w obrębie modelowanych, w pełni



RYSUNEK 5.30: Współczynniki preferencyjnego oddziaływania (Γ) obliczone dla łańcucha głównego i łańcucha bocznego wszystkich reszt aminokwasowych w modelowych heptapeptydów w obecności 5.0 M roztworu mocznika oraz 2.5 M roztworu TMAO w funkcji odległości od powierzchni heptapeptydu. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym 3-literowym skrótom znajdują się w Tabelcy 5.1

hydratowanych heptapeptydów, symulowanych w obecności TMAO (jako przykładu osmolitu stabilizującego) oraz mocznika (jako przykładu osmolitu destabilizującego). Na Rysunku 5.30 pokazałam uzyskane profile Γ pochodzące od poszczególnych elementów strukturalnych białek: dwadzieścia różnych łańcuchów bocznych oraz dwadzieścia elementów szkieletu peptydowego (odpowiadających różnym resztom).

Na podstawie Rysunku 5.30 można zauważyć, że w przypadku mocznika współczynniki Γ są, ogólnie rzecz biorąc, nieco bardziej dodatnie dla elementów łańcucha głównego niż dla łańcuchów bocznych, co odzwierciedla obserwowaną przeze mnie wcześniej preferencję mocznika do oddziaływania ze szkieletem białka. Dodatkowo można zauważyć, że cząsteczki mocznika najchętniej gromadzą się w sąsiedztwie reszt tryptofanu a nieco mniej w sąsiedztwie reszt tyrozyny, cysteiny i argininy. Na Rysunku 5.30 widać również, że najmniej korzystnie mocznik oddziałuje z aminokwasami kwasowymi. Z kolei, współczynniki Γ dla asocjacji cząsteczek TMAO z resztami aminokwasowymi przyjmują w większości przypadków wartości mniejsze niż zero, co oznacza, że cząsteczki TMAO są wykluczane z powierzchni praktycznie wszystkich elementów strukturalnych występujących na powierzchni białka.



RYSUNEK 5.31: Współczynniki preferencyjnego oddziaływania (Γ) obliczone dla łańcucha głównego i łańcuchów bocznych lizozymu, ubikwityny (ubq) oraz peptydu trp-zip w 5.0 M roztworze mocznika oraz 2.5 M roztworze TMAO w funkcji odległości od powierzchni białka.

Na Rysunku 5.30 widać, że cząsteczki TMAO są silnie wykluczane z sąsiedztwa grup aminowych łańcucha głównego, w dużej mierze niezależnie od rodzaju łańcucha bocznego, jak należało się tego spodziewać. Z kolei spośród wszystkich wszystkich łańcuchów bocznych TMAO wykluczone jest najbardziej z otoczenia aromatycznych reszt tryptofanu i fenyloalaniny a nieco

mniej z sąsiedztwa reszt glutaminianu, metioniny, proliny, izoleucyny, leucyny, glutaminy, tyrozyny i histydyny. Wyjątek stanowią reszty argininy, wokół których niewielką akumulację cząstek osmolitu ($\Gamma > 0$), zgodnie z tym, co obserwowałam wcześniej dla lizozymu.

Następnie, wyznaczyłam współczynniki preferencyjnego oddziaływania (Γ) dla wybranych modelowych białek (lizozymu, ubikwityny oraz peptydu trp-*zip*), zarówno w stanie natywnym jak i zdenaturowanym, co pokazałam na Rysunku 5.31. W celu przetestowania założenia o addytywności $\Delta\Gamma$ dla wybranych modelowych białek, wyznaczyłam również zmiany ekspozycji poszczególnych aminokwasów na rozpuszczalnik pod wpływem rozwijania. Zmiany te wraz z wkładami do Γ od poszczególnych elementów strukturalnych posłużyły mi do oszacowania $\Delta\Gamma$ przy założeniu addytywności (szczegółowy opis procedury znajduje się w rozdziale 4.2.5). Uzyskane w ten sposób oszacowania porównałam z wartościami $\Delta\Gamma$ obliczonymi dla pełnych struktur białek bezpośrednio na podstawie przeprowadzonych symulacji (Rysunek 5.31 i Tablica 5.4).

Nazwa białka	TMAO-bb	TMAO-sc	mocznik-bb	mocznik-sc
Lizozym	-0.85 (-0.20)	-0.83 (-0.02)	8.59 (13.2)	8.1 (11.0)
Ubikwityna	-0.93 (-0.55)	-1.03 (-0.36)	7.84 (6.00)	7.35 (4.90)
Trpzip	-0.69 (-0.29)	-0.79 (-0.30)	8.81 (1.15)	8.26 (0.75)

TABLICA 5.4: Obliczone wartości $\Delta\Gamma$ dla oddziaływań między cząsteczkami osmolitu (mocznik, TMAO) oraz powierzchnią białek (łańcuchami głównymi-bb, łańcuchami bocznymi-sc) przy założeniu addytywności poszczególnych wkładów. W nawiasie podano wartości wyznaczone bezpośrednio dla trzech białek na podstawie symulacji w ich stanie zwiniętym i rozwiniętym.

Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników można zauważyć, że wartości $\Delta\Gamma$, które obliczyłam dla pełnych struktur białek bezpośrednio na podstawie przeprowadzonych przeze mnie symulacji wyraźnie różnią od wartości $\Delta\Gamma$, które wyznaczyłam przez zsumowanie wkładów od poszczególnych elementów strukturalnych przy założeniu addytywności. O ile znaki przewidywanych $\Delta\Gamma$ zgadzają się z uzyskanymi z bezpośrednich obliczeń, czyli model poprawnie przewiduje stabilizację lub destabilizację, to stopień przesunięcia równowagi nie jest oddany wystarczająco dokładnie, w szczególności dla TMAO. Oznacza, to że działanie osmolitów na białko nie ma charakteru addytywnego i nie może być przewidziane przez sumowanie lokalnych wkładów do $\Delta\Gamma$. Poprawny model wymagałby uwzględnienia co najmniej parowych korelacji pomiędzy resztami.

Dodatkowo, zbadalam molekularne podłoże obserwowanego wykluczania lub akumulacji osmolitów w bezpośrednim sąsiedztwie poszczególnych elementów strukturalnych obecnych na powierzchni białka. W tym celu, na podstawie odpowiednich radialnych funkcji rozkładu, wyznaczyłam profile entalpii swobodnej dla asocjacji cząsteczek osmolitów (TMAO oraz mocznika) z dwudziestoma typami łańcuchów bocznych oraz z odpowiadającymi im elementami szkieletu

peptydowego. Co więcej, powtórzenie symulacji dla kilku innych temperatur pozwoliło mi następnie na zdekomponowanie tych profili na wkłady entalpowe i entropowe w oparciu o zależność entalpii swobodnej od temperatury. Na Rysunku 5.32 i Rysunku 5.33 pokazałam wyznaczone profile dla asocjacji, odpowiednio, cząsteczek TMAO i mocznika z poszczególnymi elementami strukturalnymi występującymi na powierzchni białek.

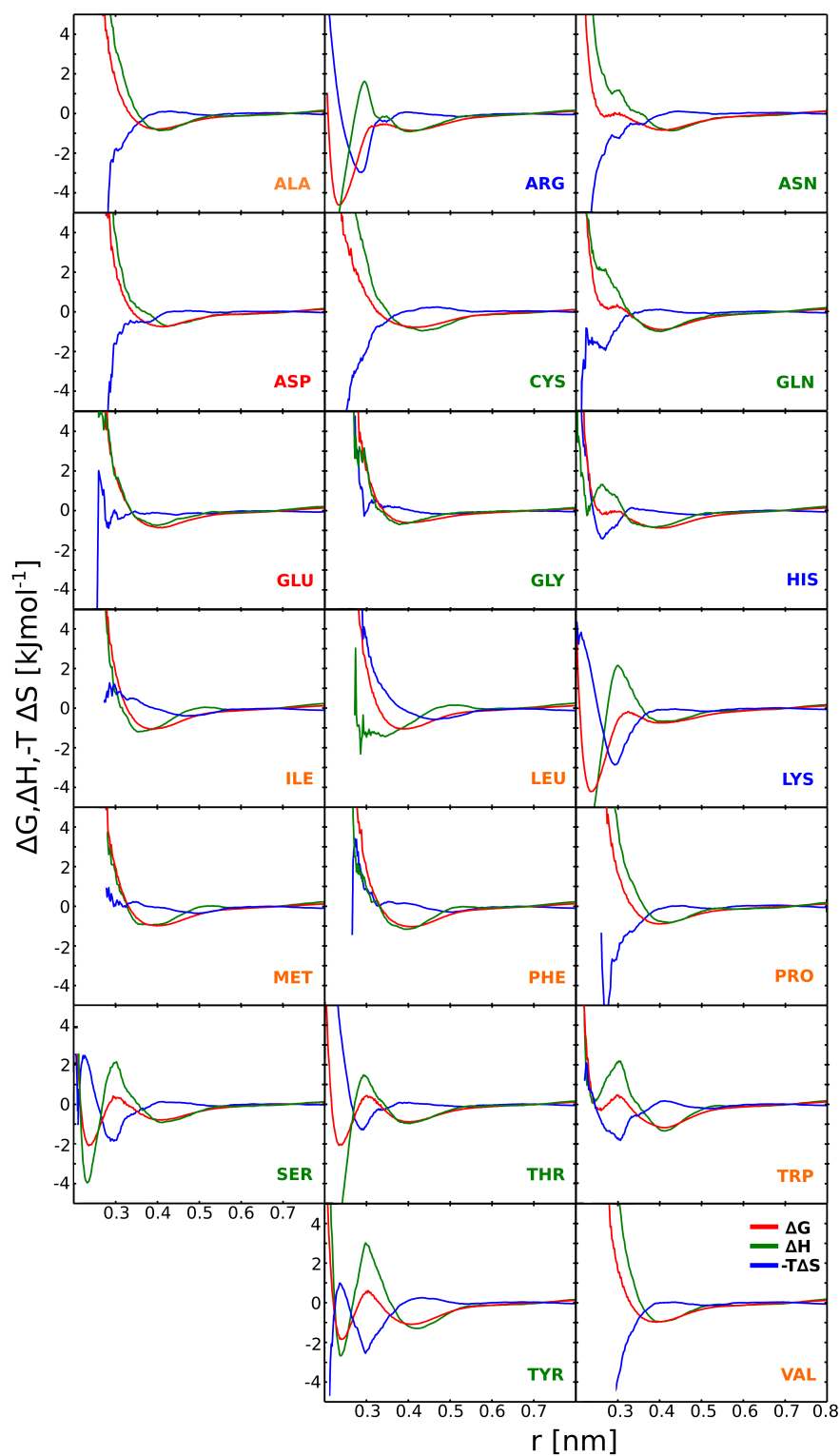
Minima entalpii swobodnej w ok. 0.3 nm dla mocznika na Rysunku 5.33 wskazują na akumulację cząsteczek osmolitu w sąsiedztwie reszt każdego aminokwasu. Najgłębsze minimum zaobserwowałam dla asocjacji cząsteczek mocznika w sąsiedztwie reszt aminokwasów zasadowych (lizyn i arginin). Z drugiej strony, dla TMAO (Rysunek 5.32) minima są bardzo płytkie (≈ 1.0 kJ/mol) i odsunięte od powierzchni reszt, co przy wzięciu pod uwagę wkładu translacyjnego do entropii promującego dysocjację, wskazuje na wykluczanie cząsteczek TMAO z powierzchni białek, z wyjątkiem reszt zasadowych, tak jak to obserwowałam wcześniej.

Na podstawie dekompozycji profili entalpii swobodnej ukazanej na Rysunku 5.33 można zauważyć, że entalpia asocjacji cząsteczek mocznika w sąsiedztwie reszt każdego peptydu przyjmuje wartości ujemne, co oznacza, że akumulacja cząsteczek mocznika w sąsiedztwie wszystkich badanych aminokwasów jest napędzana entalpowo. Z drugiej strony, dla TMAO (Rysunek 5.32), entalpia asocjacji tych cząsteczek osmolitu przyjmuje wartości dodatnie, co oznacza, że wykluczanie cząsteczek TMAO z powierzchni badanych aminokwasów, z wyjątkiem reszt zasadowych (arginin i lizyn) oraz aminokwasów zawierających grupy hydroksylowe (seryny, treoniny i tyrozyny), ma także podłoże entalpowe, prawdopodobnie związane z silną solwatacją osmolitu. Co ciekawe, w przypadku reszt aminokwasów, z których cząsteczki TMAO są wykluczane zaobserwowałam pojawienie się minimum w ok. 0.4–0.5 nm, co oznacza, że cząsteczki TMAO oddziałują korzystnie z tymi resztami aminokwasów za pośrednictwem cząsteczek wody, co także potwierdza hipotezę o dużym koszcie desolvatacji towarzyszącym bezpośredniej asocjacji z powierzchnią białka.

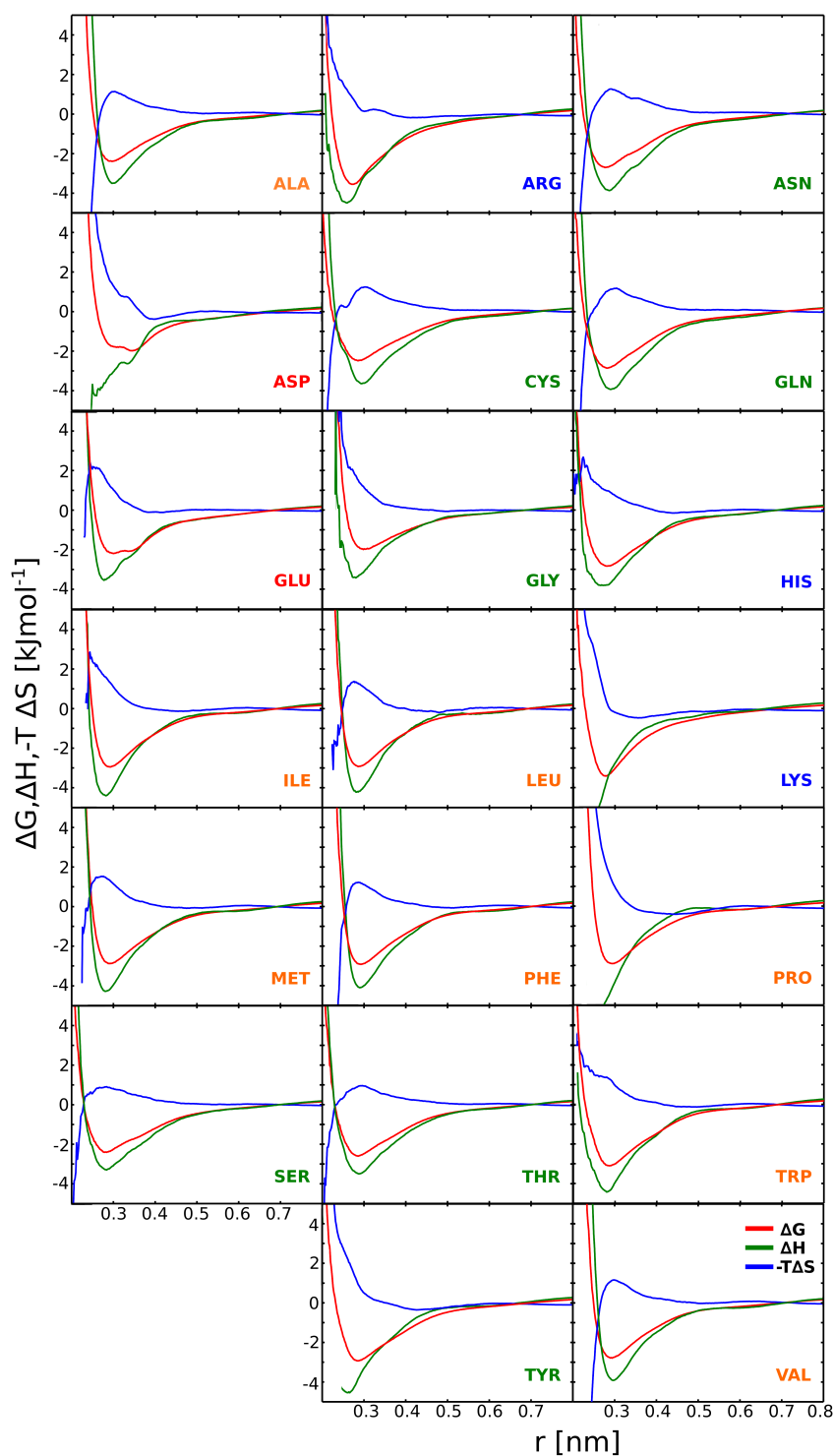
5.5.1 Podsumowanie

Uzyskany szczegółowy opis energetyki preferencyjnego oddziaływania pomiędzy osmotami a białkiem pozwolił mi na zaproponowanie, że akumulacja cząsteczek mocznika ma charakter entalpowy, zaś wykluczanie cząsteczek TMAO ma charakter zależny od rodzaju aminokwasu (albo entalpowy albo entropowy).

Ukazałam także, że działanie osmolitów na białko nie ma charakteru addytywnego i nie może być przewidziane przez sumowanie lokalnych wkładów do $\Delta\Gamma$ obliczonych dla poszczególnych rodzajów reszt aminokwasowych. Nie wszystkie wnioski wysnute w oparciu o metodę osmometryczną [57, 73, 75, 76, 78] muszą być zatem poprawne. Można natomiast spodziewać się, że model będzie działał poprawnie gdy zostanie rozbudowany o korelacje między wkładami wynikającymi z wpływu sąsiednich aminokwasów.



RYSUNEK 5.32: Charakterystyka termodynamiczna oddziaływania między białkiem a cząsteczkami TMAO: profile entalpii swobodnej (ΔG), entalpii (ΔH) oraz entropii ($-T\Delta S$) dla asocjacji cząsteczek TMAO z poszczególnymi resztami aminokwasowymi wyznaczone na podstawie symulacji modelowych heptapeptydów. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym 3-literowym skrótom znajdują się w Tabelcy 5.1.



RYSUNEK 5.33: Charakterystyka termodynamiczna oddziaływania między białkiem a cząsteczkami mocznika: profile entalpii swobodnej (ΔG), entalpii (ΔH) oraz entropii ($-T\Delta S$) dla asocjacji cząsteczek mocznika z poszczególnymi resztami aminokwasowymi wyznaczone na podstawie symulacji modelowych heptapeptydów. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym 3-literowym skrótom znajdują się w Tabelcy 5.1.

Rozdział 6

PODSUMOWANIE

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiłam wyniki badań dotyczących różnych aspektów oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy rozpuszczalnikiem i substancją rozpuszczoną w wodnych roztworach związków o biologicznym znaczeniu. W badaniach wykorzystałam metodę dynamiki molekularnej, która umożliwia opis zachowania układu bezpośrednio na poziomie molekularnym.

Z analizy otrzymanych rezultatów wynika, że odtworzyłam efekt stabilizujący betainy oraz destabilizujący mocznika, obserwując odpowiednio wzrost i spadek mierzonej pracy rozwijania białek. Okazało się, że cząsteczki mocznika korzystnie oddziałują ze wszystkimi rodzajami aminokwasów na powierzchni białka poprzez wiązania wodorowe z grupami aminowymi i karbonyłowymi szkieletu peptydowego, jak również poprzez oddziaływania dyspersyjne, głównie z niepolarnymi łańcuchami bocznymi. W efekcie, mocznik poprzez entalpową stabilizację stanu rozwiniętego i osłabienie efektu hydrofobowego promuje rozwijanie białka. W przypadku roztworów betainy zaobserwowano wykluczanie cząsteczek osmolitu z powierzchni białka, w szczególności z łańcucha głównego i hydrofobowych łańcuchów bocznych. Cząsteczki betainy gromadzą się natomiast w pobliżu reszt zasadowych, dając silnie nierównomierny rozkład osmolitu na powierzchni białka. Na podstawie analiz energetycznych zaobserwowano, że wykluczanie betainy z powierzchni białka wynika głównie z braku korzystnych miejsc akceptorowych. Należy dodać, że silne wiązanie wody przez betainę wpływa na zmniejszoną zdolność cząsteczek wody do solwatowania białka w obecności osmolitu.

W wyniku analizy rezultatów otrzymanych dla TMAO i proliny okazało się, że osmolity stabilizujące mogą oddziaływać bezpośrednio z powierzchnią białka głównie przez grupę

karboksylową (prolina) lub mogą być preferencyjnie wykluczane z powierzchni białka, a wszelkie możliwe oddziaływania między białkiem a osmolitem mają charakter pośredni w którym uczestniczą cząsteczki wody (TMAO). Widać zatem, że chociaż prolina i TMAO są osmolitami stabilizującymi, to mechanizm stabilizacji nie zawsze wynika wprost z preferencyjnego wykluczenia cząsteczek osmolitu z powierzchni białka.

Pokazałam, że cząsteczki betainy o małym symulowanym momencie dipolowym destabilizują białka, zaś cząsteczki betainy o większych symulowanych momentach dipolowych stabilizują białka i efekt jest tym silniejszy, im cząsteczki betainy mają większy symulowany moment dipolowy. Okazało się, że im cząsteczki betainy mają większe symulowane momenty dipolowe tym są silniej wykluczane z powierzchni białka (fragmentów polarnych i hydrofobowych) oraz silniej akumulowane w okolicach fragmentów zasadowych. Pokazałam również, że wraz ze wzrostem symulowanego momentu dipolowego cząsteczek betainy, cząsteczki wody coraz silniej oddziałują z cząsteczkami osmolitu. Stwierdziłam, że cząsteczki betainy o małych symulowanych momentach dipolowych oddziałują ze sobą hydrofobowo, cząsteczki betainy o większych symulowanych momentach dipolowych są silnie hydratowane, zaś cząsteczki betainy o największych symulowanych momentach dipolowych oddziałują ze sobą przez wiązania wodorowe z jedną cząsteczką wody. Okazało się, że efekt stabilizacyjny cząsteczek osmolitu zależy od sposobu hydratacji osmolitu, wpływu osmolitu na hydratację białka oraz konieczności wykonania pracy przeciwko ciśnieniu osmotycznemu, wynikającego z obecności cząsteczek osmolitu. Pokazałam również, że model cząsteczek betainy przeskalowany o czynnik 1.2 najlepiej odzwierciedla wyniki eksperymentalne.

Z analizy wyników ukazujących wpływ temperatury na stabilność białek wynika, że mocznik destabilizuje Trp-cage w wyniku entalpowej akumulacji na powierzchni białka a działanie stabilizujące betainy wynika z jej wykluczenia z powierzchni białka. Dodatkowo, akumulacja cząsteczek mocznika zmniejsza się a wykluczanie cząsteczek betainy z powierzchni białka zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury ze względu na słabsze oddziaływanie z białkiem. Co interesujące spadek energii oddziaływania w wyższych temperaturach wynika ze zmniejszającej się liczby wiązań wodorowych oraz energii oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy cząsteczkami osmolitu a białkiem.

W ostatniej części pracy dokonałam próby zbudowania prostego modelu teoretycznego pozwalającego na przewidywanie wpływu osmolitów na stabilność białek w oparciu o ich sekwencję aminokwasową. Okazało się, że działanie osmolitów na białko nie ma charakteru addytywnego i nie może być przewidziane przez sumowanie lokalnych wkładów do $\Delta\Gamma$ pochodzących

od poszczególnych aminokwasów. Zasugerowałam zatem, że aby takie podejście dawało ilościowo poprawne wyniki niezbędne jest rozbudowanie modelu o korelacje wynikające z obecności sąsiednich aminokwasów.

Na podstawie badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej można sformułować następujące wnioski:

1. Stabilizacja białek przez osmolity wynika: (a) z preferencyjnego wykluczania osmolitu z powierzchni białka, (b) ze sposobu hydratacji osmolitu, (c) z wpływu osmolitu na sferę hydratacyjną białka w stanie natywnym i rozwiniętym, (d) z wpływu ciśnienia osmotycznego wywieranego przez osmolit.
2. Mocznik akumulowany jest na powierzchni białek, ponieważ oddziałuje korzystnie ze wszystkimi rodzajami aminokwasów na powierzchni białka poprzez wiązania wodorowe oraz oddziaływania dyspersyjne. Oddziaływania zaś betainy nie są preferowane termodynamicznie na skutek niekorzystnej entropii.
3. Akumulacja mocznika ma charakter entalpowy zaś wykluczanie TMAO ma charakter zależny od rodzaju aminokwasów (entropowy/entalpowy).
4. Wzrost temperatury powoduje zwiększenie wykluczania betainy i zmniejszenie akumulacji mocznika, ponieważ entalpia asocjacji cząsteczek osmolitu do powierzchni białka staje się mniej korzystna w wyższych temperaturach: zmniejsza się liczba wiązań wodorowych oraz energia oddziaływań elektrostatycznych i van der Waalsa.
5. Działanie osmolitów na białko nie ma charakteru addytywnego ze względu na korelacje pomiędzy sąsiednimi aminokwasami.

Rozdział 7

STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było zbadanie molekularnego mechanizmu wpływu biologicznie znaczących związków, tzw. osmolitów na stabilność białek. Aby zweryfikować istniejące hipotezy i dostarczyć spójnego obrazu działania osmolitów na poziomie molekularnym, wykorzystano metodę dynamiki molekularnej do zasymulowania mechanicznej denaturacji modelowych białek – lizozymu i ubikwityny. W tym podejściu odtworzony został efekt stabilizujący betainy oraz destabilizujący mocznika. Aby wyjaśnić różnice w wartościach pracy potrzebnych do rozwinięcia białek zostały obliczone różne molekularne parametry charakterystyki badanych układów, między innymi, liczby wiązań wodorowych, współczynniki preferencyjnego oddziaływania w układzie: białko-osmolit-woda, profile entalpii swobodnych, entalpii oraz entropii dla pojedynczych cząsteczek rozpuszczalnika w funkcji odległości od powierzchni białka. Na podstawie uzyskanych wyników wyjaśniono dlaczego betaina jest wykluczana z powierzchni białek, zaś mocznik jest na jej powierzchni akumulowany. Dodatkowo, zweryfikowana została hipoteza o tym czy wszystkie osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni białek. Ustalono również jak stabilizacja zależy od polarności stabilizatorów oraz zdekomponowano wartości prac rozwijania na wkłady pochodzące z wykluczania osmolitów z powierzchni białka, różnic w solwatacji oraz wpływu ciśnień osmotycznych. Zbadano także molekularny mechanizm wyjaśniający dlaczego w wyższych temperaturach betaina zwiększa stabilność białek a mocznik wykazuje mniejszy efekt destabilizujący. W tym celu skupiono się na określeniu głównych sił napędowych odpowiedzialnych za zmianę stabilności białek na poziomie termodynamicznym. Na koniec sprawdzono czy możliwe jest przewidywanie dla zadanej sekwencji aminokwasowej parametru charakteryzującego wpływ wybranych osmolitów na równowagę konformacyjną białka poprzez sumowanie elementarnych wkładów pochodzących od poszczególnych elementów strukturalnych białka.

Rozdział 8

SUMMARY

The main goal of the doctoral thesis was to study the molecular mechanism by which biologically relevant osmolytes, denaturing (urea) and stabilizing (betaine, proline, TMAO), affect the protein stability. To verify existing hypotheses and to provide a complete picture of the effect of osmolytes on protein stability at the molecular level, the molecular dynamics simulations were used to simulate the mechanical denaturation of model proteins – lysozyme and ubiquitin. In this approach, the stabilizing effect of betaine and the denaturing effect of urea were reproduced. To explain the differences in the unfolding work with respect to pure water, the various molecular parameters of the systems studied, such as the number of hydrogen bonds, preferential interaction coefficient between solvent molecules and protein, the free enthalpy, enthalpy and entropy profiles for a single solvent molecule as a function of the distance from the protein surface were calculated. Based on the results, it was explained why betaine is excluded from and urea accumulated at the protein surface. Additionally, the hypothesis that the all stabilizing osmolytes are preferentially excluded from the protein surface was tested. It has been also determined that stabilization depends on the polarity of osmoprotectant molecules. Further, the unfolding work were decomposed into contributions from: the exclusion of osmolyte from the protein surface, the differences in solvation and the effect of osmotic pressures. Moreover, the molecular mechanism was studied to explain why in high temperature betaine increases the stability of protein structure and urea has a greater destabilizing effect. Therefore, this work focused on determining of main driving forces responsible for the change in protein-solution stability at the thermodynamic level. Finally, it has been determined whether it is possible to predict, for a given amino acid sequence, a parameter characterizing the effect of selected osmolytes on the protein folding equilibrium by summing up the local residue-specific contributions.

Rozdział 9

DOROBEK NAUKOWY

9.1 Publikacje

1. **Adamczak B.**, Wieczór M., Kogut M., Stangret J., Czub J., *Molecular basis of the osmolyte effect on protein stability: a lesson from the mechanical unfolding of lysozyme*, *Biochem J.* (2016), 473, 3705–3724, IF=3.797 [81]
2. Bruździak P., **Adamczak B.**, Kaczkowska E., Czub J., Stangret J., *Are stabilizing preferentially excluded from the protein surface? FTIR and MD studies*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2015), 17(35), 23155–64, IF=4.449 [86]
3. Panuszko A., **Adamczak B.**, Czub J., Gojło E., Stangret J., *Hydration of amino acids: FTIR spectra and molecular dynamics studies*, *Amino Acids* (2015) 47(11), 2265–78, IF=3.196 [146]
4. **Adamczak B.**, Kogut M., Czub J., *Effect of osmolytes on the thermal stability of proteins: replica exchange simulations of Trp-cage in urea and betaine solutions*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (na etapie odpowiedzi do recenzentów) [122]

9.2 Doniesienia konferencyjne

1. **Adamczak B.**, Wieczór M., Kogut M., Stangret J., Czub J., *The origin of the effect of osmolytes on protein stability*, 10th European Biophysics Congress (EBSA 2015), 18–22 lipca 2015, Drezno, Niemcy

2. **Adamczak B.**, Wieczór M., Stangret J., Czub J., *How does betaine stabilize the folded state of proteins?*, 58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku, 21–25 września 2015, Gdańsk

9.3 Udział w projektach badawczych

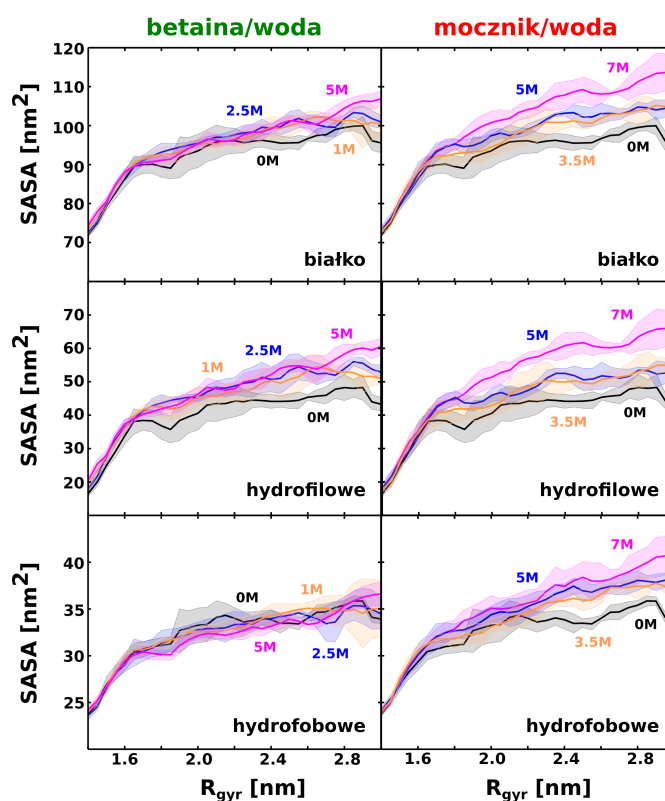
1. Projekt badawczy NCN typu OPUS: Stabilność białek w wodnych roztworach osmolitów w oparciu o komplementarne podejście eksperymentalne i teoretyczne (projekt 2013/11/B/NZ1/02258). Kierownik – prof. dr hab. inż. Janusz Stangret (Katedra Chemii Fizycznej, Politechnika Gdańska). Część badań została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach powyższego projektu.

9.4 Szkoły letnie

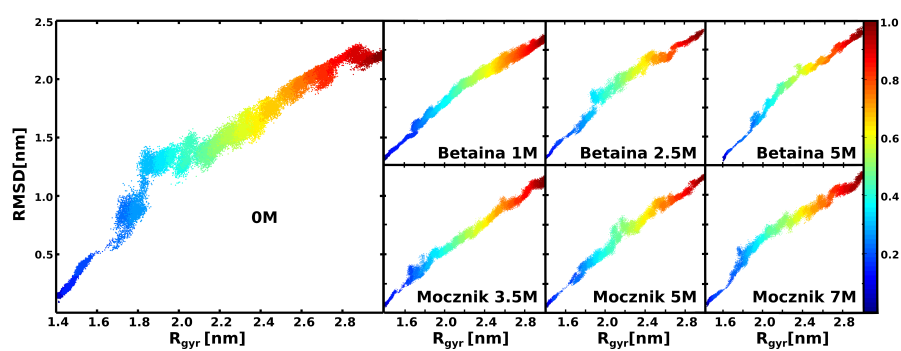
1. New diagnostics and new materials Summer School in Biotechnology, Conference and Rehabilitation Center Eureka 14–15.09.2015, Sopot

Rozdział 10

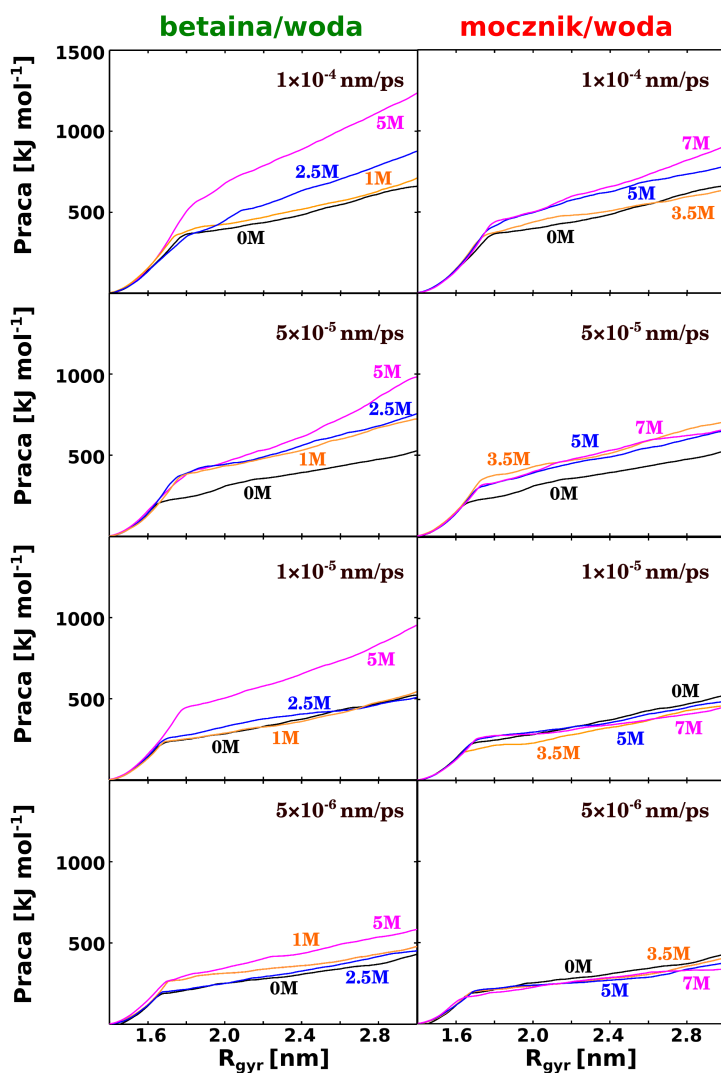
ZAŁĄCZNIKI



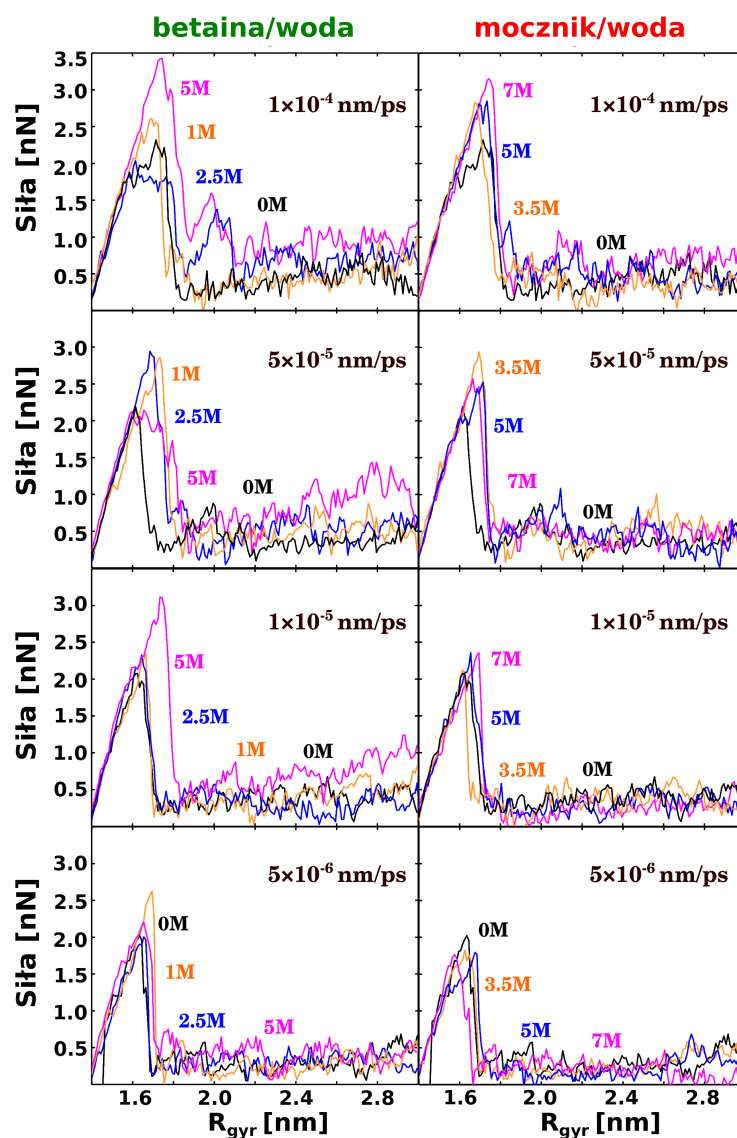
RYSUNEK 10.1: Zależność powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika (SASA) od promienia żyracji R_{gyr} dla lizozymu w obecności mocznika i betainy oraz przy ich braku dla prędkości rozciągania $5 \times 10^{-6} \text{ nm}\cdot\text{ps}^{-1}$. Na panelu górnym przedstawiono SASA dla całej cząsteczki lizozymu, natomiast na panelu środkowym i dolnym, SASA została zdekomponowana na wkład hydrofilowy oraz hydrofobowy. Największy wzrost SASA występuje w punkcie zerwania głównych oddziaływań stabilizujących strukturę białka, i odpowiada solwatowaniu wcześniej schowanego rdzenia białka. Krzywe, które są w tym samym kolorze odpowiadają podobnym frakcjom objętościowym osmolytu w poszczególnych układach. Pokazano paski błędów.



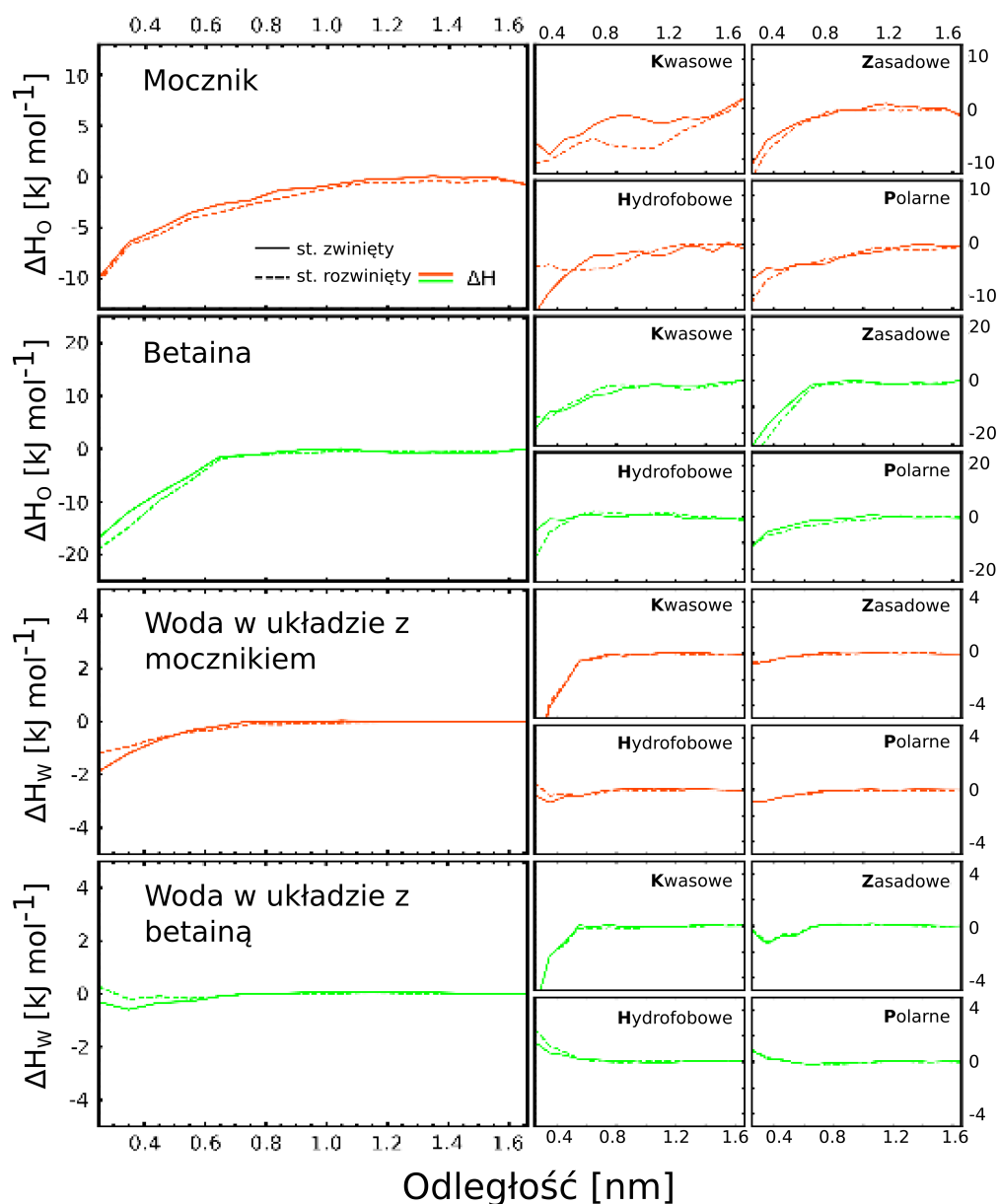
RYSUNEK 10.2: Zmiany rozkładu średniego odchylenia kwadratowego (RMSD) względem struktury wyjściowej wraz ze wzrostem promienia żyrcji dla lizozymu podczas rozciągania w obecności mocznika, betainy oraz przy braku osmolytu dla prędkości rozciągania $5 \times 10^{-6} \text{ nm}\cdot\text{ps}^{-1}$. Skala kolorów odpowiada znormalizowanemu czasowi symulacji.



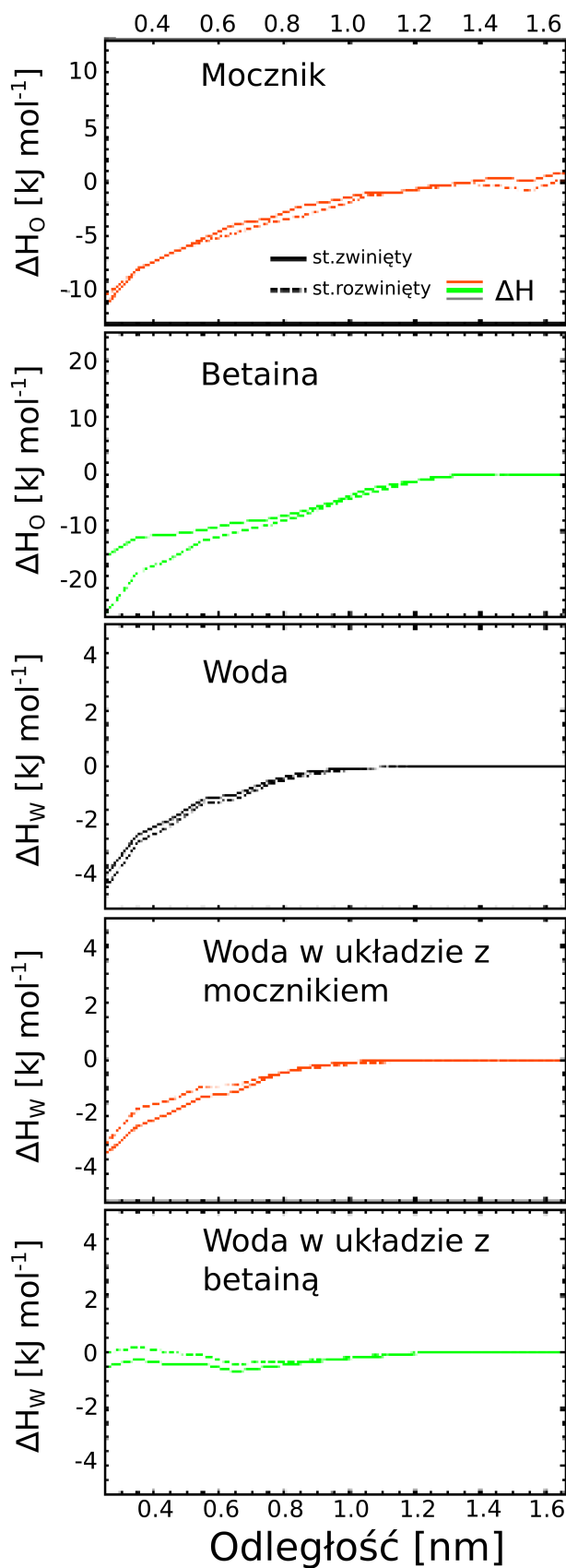
RYSUNEK 10.3: Prace potrzebne do rozciągnięcia lizozymu od stanu natywnego do rozwiniętego w obecności betajiny i mocznika oraz przy braku osmolitów (prędkości rozciągania: 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} nm·ps $^{-1}$). Krzywe, które są w tym samym kolorze odpowiadają podobnym frakcjom objętościowym osmolytu w poszczególnych układach.



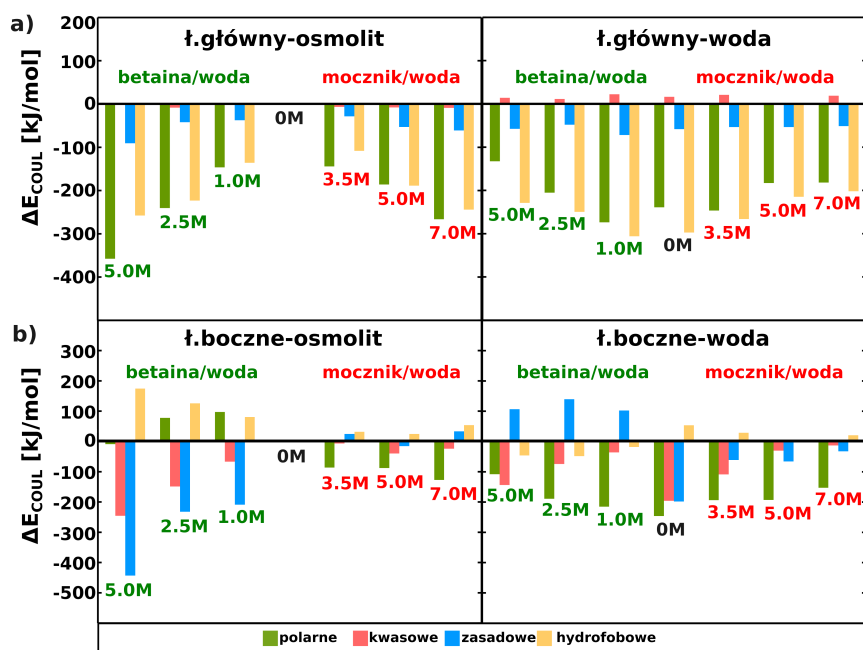
RYSUNEK 10.4: Siły potrzebne do rozciągnięcia lizozymu od stanu natywnego do rozwiniętego w obecności betainy i mocznika oraz przy braku osmolitów (prędkości rozciągania: 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} nm·ps⁻¹). Krzywe, które są w tym samym kolorze odpowiadają podobnym frakcjom objętościowym osmolitu w poszczególnych układach.



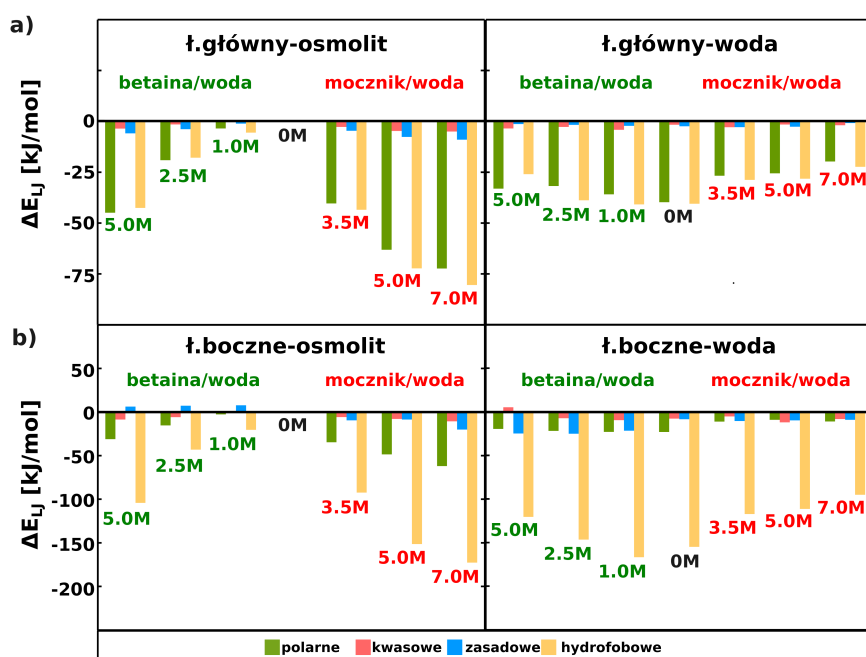
RYSUNEK 10.5: Profile entalpii oddziaływań między pojedynczą cząsteczką osmolitu (ΔH_o) oraz wody (ΔH_w) w odniesieniu do powierzchni białka. Profile entalpii oddziaływań zostały uśrednione dla 200 pojedynczych cząsteczek rozpuszczalnika (woda lub osmolit) w 2.5 M roztworze betainy oraz 5.0 M roztworze mocznika i wykreślone w funkcji odległości od powierzchni białka. Dodatkowo wkłady entalpowe zostały zdekomponowane na wkłady pochodzące od różnych typ reszt: kwasowe, zasadowe, polarne i hydrofobowe.



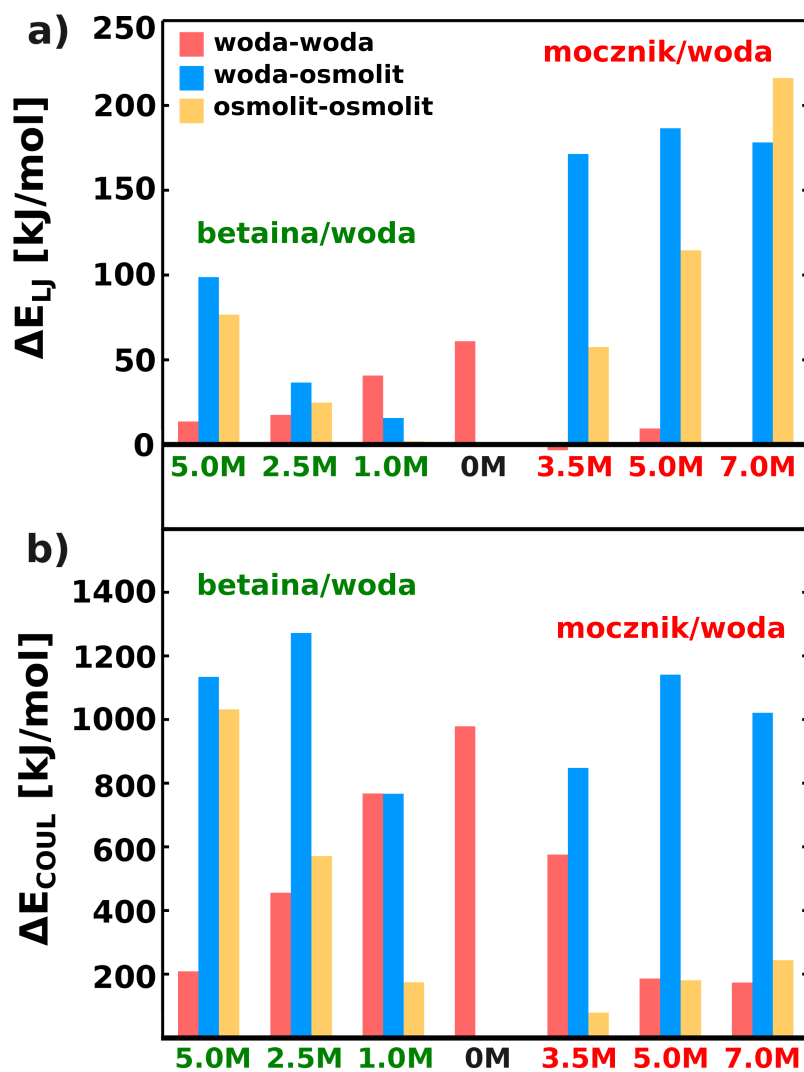
RYSUNEK 10.6: Profile entalpii oddziaływań między pojedynczą cząsteczką osmolitu (ΔH_o) oraz wody (ΔH_w) w odniesieniu do powierzchni łańcucha głównego białka. Profile entalpii oddziaływań zostały uśrednione dla 200 pojedynczych cząsteczek rozpuszczalnika (woda lub osmolit) w czystej wodzie, 2.5 M roztworze betainy oraz 5.0 M roztworze mocznika i wykreślone w funkcji odległości od powierzchni białka.



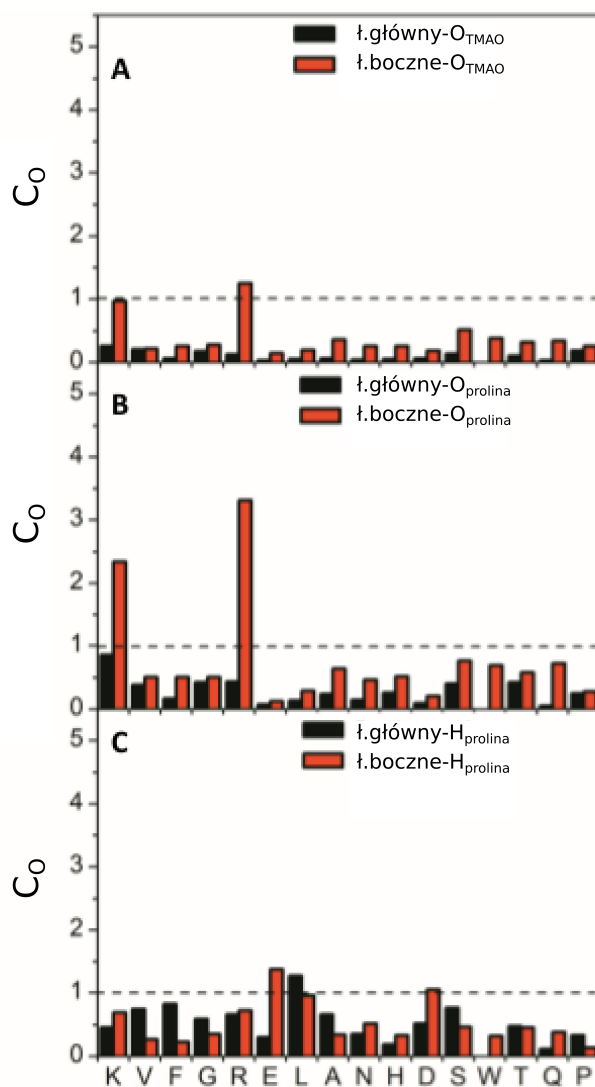
RYSUNEK 10.7: Zmiany między stanem natywnym a rozwiniętym w energiach oddziaływań kulombowskich między białkiem (łańcuch główny oraz łańcuchy boczne) i rozpuszczalnikiem (mocznik/betaina i woda) dla różnych stężeń osmolitu. Zmiany zostały również zdekomponowane na wkłady: polarny (kolor zielony), kwasowy (kolor czerwony), zasadowy (kolor niebieski) oraz hydrofobowy (kolor pomarańczowy).



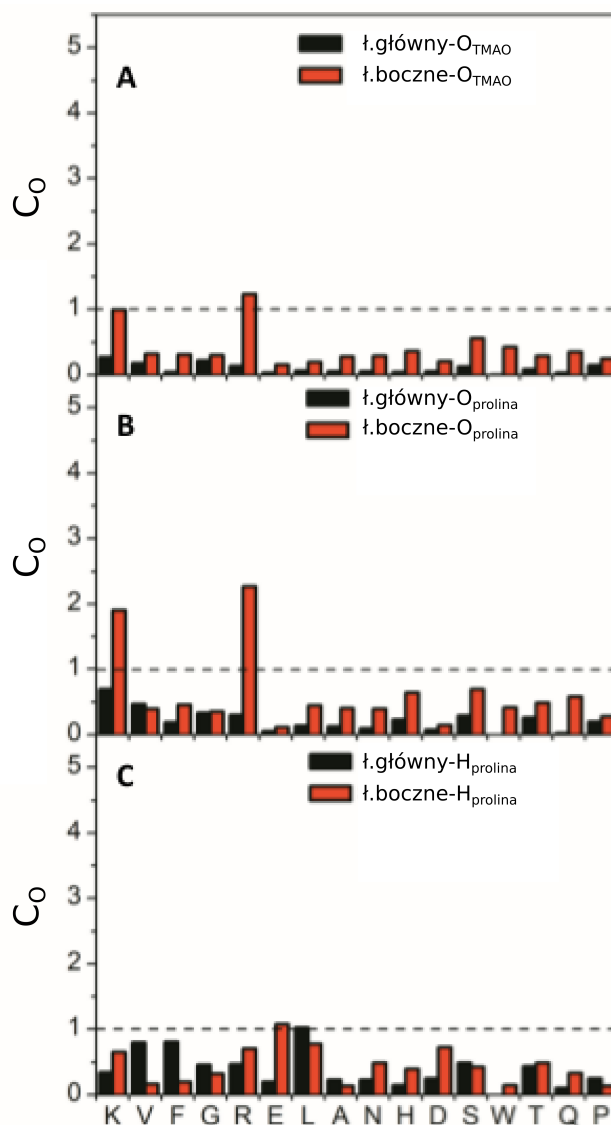
RYSUNEK 10.8: Zmiany między stanem natywnym a rozwiniętym w energiach oddziaływań van der Waals między białkiem (łańcuch główny oraz łańcuchy boczne) i rozpuszczalnikiem (mocznik/betaina i woda) dla różnych stężeń osmolitu. Zmiany zostały również zdekomponowane na wkłady: polarny (kolor zielony), kwasowy (kolor czerwony), zasadowy (kolor niebieski) oraz hydrofobowy (kolor pomarańczowy).



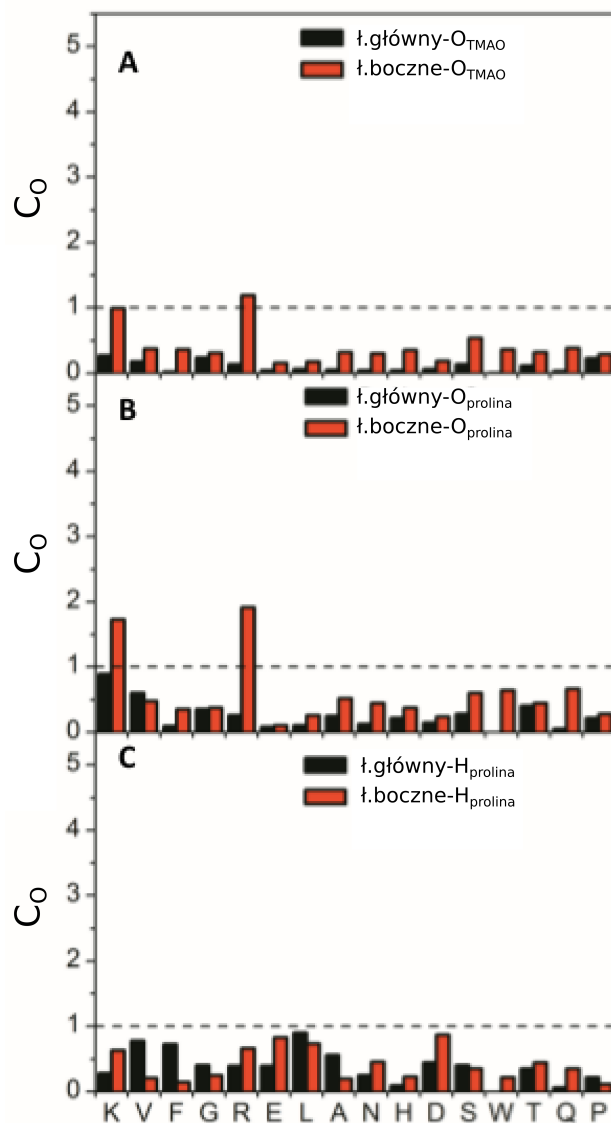
RYSUNEK 10.9: Zmiany między stanem natywnym a rozwiniętym w energiach oddziaływań: a) kulombowskich i b) van der Waalsa między poszczególnymi rozpuszczalnikami: woda-woda (kolor czerwony), woda-osmolit (kolor niebieski), osmolit-osmolit (kolor pomarańczowy) dla różnych stężeń osmolitu.



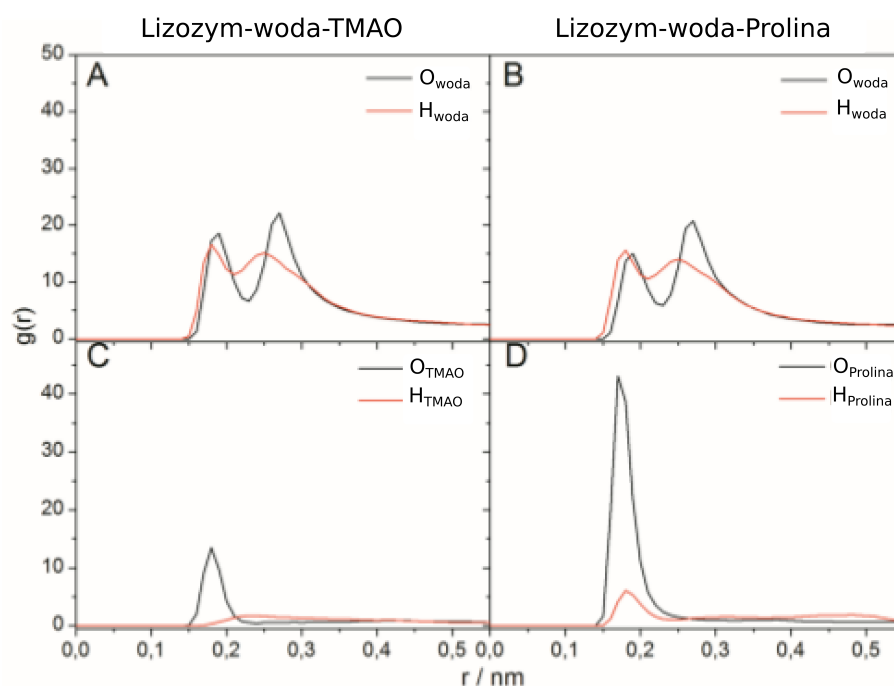
RYSUNEK 10.10: **Analiza wykluczenia i akumulacji cząsteczek osmolitu na powierzchni białka.** Współczynnik preferencyjnego oddziaływania został obliczony na podstawie odległości międzyatomowych uzyskanych dla poszczególnych aminokwasów znajdujących się na powierzchni lizozymu dla 2.0 M roztworów osmolitu A) lizozym – tleny z cząsteczek TMAO B) lizozym – tleny karboksylowe z cząsteczki prolina C) lizozym – wodory z grupy aminowej cząsteczki prolina. Współczynniki preferencyjnego oddziaływania zostały obliczone oddzielnie dla każdego aminokwasu z łańcucha głównego/łańcuchów bocznych białka. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym jednoliterowym skrótom znajdują się w Tabelicy 5.1.



RYSUNEK 10.11: **Analiza wykluczenia i akumulacji cząsteczek osmolitu na powierzchni białka.** Współczynnik preferencyjnego oddziaływania został obliczony na podstawie odległości międzyatomowych uzyskanych dla poszczególnych aminokwasów znajdujących się na powierzchni lizozymu dla 3.0 M roztworów osmolitu A) lizozym – tleny z cząsteczek TMAO B) lizozym – tleny karboksylowe z cząsteczki prolina C) lizozym – wodory z grupy aminowej cząsteczki prolina. Współczynniki preferencyjnego oddziaływania zostały obliczone oddzielnie dla każdego aminokwasu z łańcucha głównego/łańcuchów bocznych białka. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym jednoliterowym skrótom znajdują się w Tabelicy 5.1.



RYSUNEK 10.12: **Analiza wykluczenia i akumulacji cząsteczek osmolitu na powierzchni białka.** Współczynnik preferencyjnego oddziaływania został obliczony na podstawie odległości międzyatomowych uzyskanych dla poszczególnych aminokwasów znajdujących się na powierzchni lizozymu dla 4.0 M roztworów osmolitu A) lizozym – tleny z cząsteczek TMAO B) lizozym – tleny karboksylowe z cząsteczki prolina C) lizozym – wodory z grupy aminowej cząsteczki prolina. Współczynniki preferencyjnego oddziaływania zostały obliczone oddzielnie dla każdego aminokwasu z łańcucha głównego/łańcuchów bocznych białka. Nazwy aminokwasów odpowiadające poszczególnym jednoliterowym skrótom znajdują się w Tabelicy 5.1.



RYSUNEK 10.13: Radialne funkcje rozkładu dla cząsteczek wody obliczone w odniesieniu do powierzchni lizozymu w układach zawierających 1.0 M roztwór TMAO (A) oraz 1.0 M roztwór prolina (B). Radialne funkcje rozkładu dla cząsteczek osmolitu (atomów centralnych: azotu z cząsteczek TMAO i węgla α z cząsteczek prolina) w odniesieniu do powierzchni białka w układach zawierających 1.0 M roztwór TMAO (C) oraz 1.0 M roztwór prolina (D).

Bibliografia

- [1] W. Kauzmann. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, 14:1–63, 1959. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60608-7. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323308606087>.
- [2] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 48:545–600, 1997. doi: 10.1146/annurev.physchem.48.1.545. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.48.1.545>.
- [3] J. N. Onuchic and P. G. Wolynes. Theory of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14(1):70–75, Feb 2004. doi: 10.1016/j.sbi.2004.01.009. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2004.01.009>.
- [4] V. Daggett. Protein folding–simulation. *Chem. Rev.*, 106(5):1898–1916, May 2006. doi: 10.1021/cr0404242. URL <http://dx.doi.org/10.1021/cr0404242>.
- [5] K. A. Dill, S. B. Ozkan, M. S. Shell, and T. R. Weikl. The protein folding problem. *Annu. Rev. Biophys.*, 37:289–316, 2008. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.092707.153558. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.092707.153558>.
- [6] X. Chen, I. Weber, and R. W. Harrison. Hydration water and bulk water in proteins have distinct properties in radial distributions calculated from 105 atomic resolution crystal structures. *J. Phys. Chem. B*, 112(38):12073–12080, Sep 2008. doi: 10.1021/jp802795a. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp802795a>.
- [7] M. Tarek and D. J. Tobias. The dynamics of protein hydration water: a quantitative comparison of molecular dynamics simulations and neutron-scattering experiments. *Biophys J.*, 79(6):3244–3257, Dec 2000. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76557-X. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76557-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76557-X).

- [8] D. Russo, J. Ollivier, and J. Teixeira. Water hydrogen bond analysis on hydrophilic and hydrophobic biomolecule sites. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10(32):4968–4974, Aug 2008. doi: 10.1039/b807551b. URL <http://dx.doi.org/10.1039/b807551b>.
- [9] U. Mayor, C. M. Johnson, V. Daggett, and A. R. Fersht. Protein folding and unfolding in microseconds to nanoseconds by experiment and simulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25):13518–13522, Dec 2000. doi: 10.1073/pnas.250473497. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.250473497>.
- [10] K. B. Storey. Organic solutes in freezing tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 117(3):319–326, Jul 1997. doi: 10.1016/S0300-9629(96)00270-8. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00270-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00270-8).
- [11] M. Gross and R. Jaenicke. Proteins under pressure. the influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.*, 221:617–630, 1994. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18774.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18774.x>.
- [12] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, and C. Balny. High pressure effects on protein structure and function. *Proteins*, 24(1):81–91, Jan 1996. doi: 3.0.CO;2-R. URL <http://dx.doi.org/3.0.CO;2-R>.
- [13] T. Y. Lin and S. N. Timasheff. Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine n–oxide interactions with protein. *Biochemistry*, 33(42):12695–12701, Oct 1994. doi: 10.1021/bi00208a021. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi00208a021>.
- [14] A. Wang and D. W. Bolen. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry*, 36(30):9101–9108, Jul 1997. doi: 10.1021/bi970247h. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi970247h>.
- [15] P. H. Yancey. Water stress, osmolytes and proteins. *Amer. Zool.*, 41:699–709, 2001. doi: 10.1093/icb/41.4.699. URL <http://dx.doi.org/10.1093/icb/41.4.699>.
- [16] T. Civera. Species identification and safety of fish products. *Vet. Res. Commun.*, 27 Suppl 1:481–489, Sep 2003. URL <https://link.springer.com/article/10.1023/B%3AVERC.0000014205.87859.ab>.

- [17] P. H. Yancey. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.*, 208(Pt 15):2819–2830, Aug 2005. doi: 10.1242/jeb.01730. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.01730>.
- [18] S. H. Khan, N. Ahmad, F. Ahmad, and R. Kumar. Naturally occurring organic osmolytes: from cell physiology to disease prevention. *IUBMB Life*, 62(12):891–895, Dec 2010. doi: 10.1002/iub.406. URL <http://dx.doi.org/10.1002/iub.406>.
- [19] P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, and G. N. Somero. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566):1214–1222, Sep 1982. doi: 10.1126/science.7112124. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.7112124>.
- [20] B. J. Bennion and V. Daggett. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100(9):5142–5147, Apr 2003. doi: 10.1073/pnas.0930122100. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0930122100>.
- [21] T. O. Street, D. W. Bolen, and G. D. Rose. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103(38):13997–14002, Sep 2006. doi: 10.1073/pnas.0606236103. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0606236103>.
- [22] S. Milev, H. R. Bosshard, and I. Jelesarov. Enthalpic and entropic effects of salt and polyol osmolytes on site-specific protein-dna association: the integrase Tn916-DNA complex. *Biochemistry*, 44(1):285–293, Jan 2005. doi: 10.1021/bi048907n. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi048907n>.
- [23] D. R. Canchi and A. E. García. Cosolvent effects on protein stability. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 64:273–293, 2013. doi: 10.1146/annurev-physchem-040412-110156. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physchem-040412-110156>.
- [24] P. H. Yancey, A. L. Fyfe-Johnson, R. H. Kelly, V. P. Walker, and M. T. Auton. Trimethylamine oxide counteracts effects of hydrostatic pressure on proteins of deep-sea teleosts. *J. Exp. Zool.*, 289(3):172–176, Feb 2001. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170013>.
- [25] S. N. Timasheff. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22:67–97, 1993. doi: 10.1146/annurev.bb.22.060193.000435. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bb.22.060193.000435>.

- [26] M. Auton and D. W. Bolen. Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102(42):15065–15068, Oct 2005. doi: 10.1073/pnas.0507053102. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507053102>.
- [27] D. W. Bolen and G. D. Rose. Structure and energetics of the hydrogen-bonded backbone in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.*, 77:339–362, 2008. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.131357. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.131357>.
- [28] D. R. Canchi, D. Paschek, and A. E. García. Equilibrium study of protein denaturation by urea. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(7):2338–2344, Feb 2010. doi: 10.1021/ja909348c. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja909348c>.
- [29] P. H. Yancey and G. N. Somero. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem. J.*, 183(2): 317–323, Nov 1979. doi: 10.1042/bj1830317. URL <http://www.biochemj.org/content/183/2/317>.
- [30] J. Rös gen, B. M. Pettitt, and D. W. Bolen. Protein folding, stability, and solvation structure in osmolyte solutions. *Biophys. J.*, 89(5):2988–2997, Nov 2005. doi: 10.1529/biophysj.105.067330. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.067330>.
- [31] D. W. Bolen. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. *Methods*, 34(3):312–322, Nov 2004. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.022. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.022>.
- [32] L. R. Singh, T. A. Dar, I. Haque, F. Anjum, A. A. Moosavi-Movahedi, and F. Ahmad. Testing the paradigm that the denaturing effect of urea on protein stability is offset by methylamines at the physiological concentration ratio of 2:1 (urea:methylamines). *Biochim. Biophys. Acta*, 1774(12):1555–1562, Dec 2007. doi: 10.1016/j.bbapap.2007.09.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.09.006>.
- [33] P. Venkatesu, M.J. Lee, and H.M. Lin. Osmolyte counteracts urea-induced denaturation of alpha-chymotrypsin. *J. Phys. Chem. B*, 113(15):5327–5338, Apr 2009. doi: 10.1021/jp8113013. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp8113013>.
- [34] P. Ganguly, T. Hajari, J. Shea, and N. F. A. van der Vegt. Mutual exclusion of urea and trimethylamine noxide from amino acids in mixed solvent environment. *J. Phys. Chem. Lett.*, 6:581–585, 2015. doi: 10.1021/jz502634k. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jz502634k>.

- [35] T. Arakawa, K. Tsumoto, Y. Kita, B. Chang, and D. Ejima. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids*, 33(4):587–605, Nov 2007. doi: 10.1007/s00726-007-0506-3. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-007-0506-3>.
- [36] Z. Ignatova and L. M. Gierasch. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(36):13357–13361, Sep 2006. doi: 10.1073/pnas.0603772103. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0603772103>.
- [37] B. J. Bennion, M. L. DeMarco, and V. Daggett. Preventing misfolding of the prion protein by trimethylamine N-oxide. *Biochemistry*, 43(41):12955–12963, Oct 2004. doi: 10.1021/bi0486379. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi0486379>.
- [38] W. Zhu, J. C. Gregory, E. Org, J. A. Buffa, N. Gupta, Z. Wang, L. Li, X. Fu, Y. Wu, M. Mehrabian, R. B. Sartor, T. M. McIntyre, R. L. Silverstein, W. H. W. Tang, J. A. DiDonato, J. M. Brown, A. J. Lusic, and S. L. Hazen. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell*, 165(1):111–124, Mar 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.011>.
- [39] J. H. Roh, J. E. Curtis, S. Azzam, V. N. Novikov, I. Peral, Z. Chowdhuri, R. B. Gregory, and A. P. Sokolov. Influence of hydration on the dynamics of lysozyme. *Biophys J.*, 91(7):2573–2588, Oct 2006. doi: 10.1529/biophysj.106.082214. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.082214>.
- [40] B. Lai, A. Cao, and L. Lai. Organic cosolvents and hen egg white lysozyme folding. *Biochim. Biophys. Acta*, 1543(1):115–122, Nov 2000. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00189-8. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00189-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00189-8).
- [41] K. Gołąb and M. Warwas. Białka jaja kurzego– właściwości biochemiczne i zastosowania. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 14:1001–1010, 2005. URL http://www.dbc.wroc.pl/Content/2061/b20_Gola.pdf.
- [42] W. W. Streicher and G. I. Makhatadze. Unfolding thermodynamics of Trp-cage, a 20 residue miniprotein, studied by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry*, 46(10):2876–2880, Mar 2007. doi: 10.1021/bi602424x. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi602424x>.
- [43] C. A. English and A. E. García. Folding and unfolding thermodynamics of the Tc10b Trp-cage miniprotein. *Phys Chem Chem Phys*, 16(7):2748–2757, Feb 2014. doi: 10.1039/c3cp54339k. URL <http://dx.doi.org/10.1039/c3cp54339k>.

- [44] M. Carrion-Vazquez, H. Li, H. Lu, P. E. Marszalek, A. F. Oberhauser, and J. M. Fernandez. The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent. *Nat Struct Biol*, 10(9):738–743, Sep 2003. doi: 10.1038/nsb965. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nsb965>.
- [45] S. Taneja and F. Ahmad. Increased thermal stability of proteins in the presence of amino acids. *Biochem. J.*, 303:147–153, 1994. doi: 10.1042/bj3030147. URL <http://www.biochemj.org/content/303/1/147>.
- [46] I. M. Plaza del Pino and J. M. Sanchez-Ruiz. An osmolyte effect on the heat capacity change for protein folding. *Biochemistry*, 34:8621–8630, 1995. URL <http://europepmc.org/abstract/med/7542026>.
- [47] S. Knapp, R. Ladenstein, and E. A. Galinski. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles*, 3(3):191–198, Aug 1999. URL <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs007920050116?LI=true>.
- [48] F. Anjum, V. Rishi, and F. Ahmad. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1476:75–84, 2000. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00215-0. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483899002150>.
- [49] N.C. Pace and C. Tanford. Thermodynamics of the unfolding of β -lactoglobulin a in aqueous urea solutions between 5 and 55. *Biochemistry*, 7:198–207, 1968. doi: 10.1021/bi00841a025. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00841a025>.
- [50] F. Ahmad and P. McPhie. Thermodynamics of the denaturation of pepsinogen by urea. *Biochim. Biophys.*, 17:241–245, 1978. URL http://www.academia.edu/9629632/Thermodynamics_of_the_denaturation_of_pepsinogen_by_urea.
- [51] T. Q. Faria, J. C. Lima, M. Bastos, A. L. Macanita, and H. Santos. Protein stabilization by osmolytes from hyperthermophiles: effect of mannosylglycerate on the thermal unfolding of recombinant nuclease a from staphylococcus aureus studied by picosecond time-resolved fluorescence and calorimetry. *J. Biol. Chem.*, 279:48680–48691, 2004. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347691>.
- [52] G. Xie and S. N. Timasheff. Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Sci.*, 6:211–221, 1997. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.5560060123/pdf>.

- [53] L. R. Singh, N. K. Poddar, T. A. Dar, R. Kumar, and F. Ahmad. Protein and DNA destabilization by osmolytes: the other side of the coin. *Life sciences*, 88:117–125, 2011. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320510004819>.
- [54] L. R. Singh, T. A. Dar, S. Rahman, S. Jamal, and F. Ahmad. Glycine betaine may have opposite effects on protein stability at high and low pH values. *Biochim Biophys Acta*, 1794:929–935, 2009. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.02.005. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254782>.
- [55] M. Auton, L. Marcelo, F. Holthausen, and D. W. Bolen. Anatomy of energetic changes accompanying urea-induced protein denaturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104:15317–15322, 2007. doi: 10.1073/pnas.0706251104. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0706251104>.
- [56] M. C. Stumpe and H. Grubmüller. Interaction of urea with amino acids: implications for urea-induced protein denaturation. *J. Am. Chem. Soc.*, 129:16126–16131, 2007. doi: 10.1021/ja076216j. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja076216j>.
- [57] E. J. Guinn, L. M. Pegram, M. W. Capp, M. N. Pollock, and M. T. Record. Quantifying why urea is a protein denaturant, whereas glycine betaine is a protein stabilizer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 108:16932–16937, 2011. doi: 10.1073/pnas.1109372108. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1109372108>.
- [58] A. Berteotti, A. Barducci, and M. Parrinello. Effect of urea on the β -hairpin conformational ensemble and protein denaturation mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(43):17200–17206, Nov 2011. doi: 10.1021/ja202849a. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja202849a>.
- [59] D. Horinek and R. Netz. Can simulations quantitatively predict peptide transfer free energies to urea solutions? Thermodynamic concepts and force field limitations. *J. Phys. Chem. A*, 115(23):6125–6136, Jun 2011. doi: 10.1021/jp1110086. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp1110086>.
- [60] D. R. Canchi and A. E. García. Backbone and side-chain contributions in protein denaturation by urea. *Biophys. J.*, 100(6):1526–1533, Mar 2011. doi: 10.1016/j.bpj.2011.01.028. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.01.028>.
- [61] M. Candotti, A. Pérez, C. Ferrer-Costa, M. Rueda, T. Meyer, J. L. Gelpí, and M. Orozco. Exploring early stages of the chemical unfolding of proteins at the proteome scale. *PLoS Comput. Biol.*, 9(12):e1003393, Dec 2013. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003393. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003393>.

- [62] A. K. Soper, E. W. Castner, and Alenka Luzar. Impact of urea on water structure: a clue to its properties as a denaturant? *Biophys. Chem.*, 105(2-3):649–666, Sep 2003. doi: 10.1016/S0301-4622(03)00095-4. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622\(03\)00095-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00095-4).
- [63] A. Das and Ch. Mukhopadhyay. Urea-mediated protein denaturation: a consensus view. *J. Phys. Chem. B*, 113(38):12816–12824, Sep 2009. doi: 10.1021/jp906350s. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp906350s>.
- [64] H. Wei, Y. Fan, and Y. Q. Gao. Effects of urea, tetramethyl urea, and trimethylamine N-oxide on aqueous solution structure and solvation of protein backbones: a molecular dynamics simulation study. *J. Phys. Chem. B*, 114(1):557–568, Jan 2010. doi: 10.1021/jp9084926. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp9084926>.
- [65] M. C. Stumpe and H. Grubmüller. Polar or apolar—the role of polarity for urea-induced protein denaturation. *PLoS Comput. Biol.*, 4:e1000221, 2008. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000221. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000221>.
- [66] L. Hua, R. Zhou, D. Thirumalai, and B. J. Berne. Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105(44):16928–16933, Nov 2008. doi: 10.1073/pnas.0808427105. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0808427105>.
- [67] S. Lee, Y. L. Shek, and T. V. Chalikian. Urea interactions with protein groups: a volumetric study. *Biopolymers*, 93(10):866–879, Oct 2010. doi: 10.1002/bip.21478. URL <http://dx.doi.org/10.1002/bip.21478>.
- [68] D. R. Canchi, P. Jayasimha, D. C. Rau, G. I. Makhatadze, and A. E. García. Molecular mechanism for the preferential exclusion of TMAO from protein surfaces. *J. Phys. Chem. B*, 116(40):12095–12104, Oct 2012. doi: 10.1021/jp304298c. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp304298c>.
- [69] T. Arakawa and S. N. Timasheff. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 224(1):169–177, Jul 1983. doi: 10.1016/0003-9861(83)90201-1. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90201-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(83)90201-1).
- [70] T. Arakawa and S. N. Timasheff. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.*, 47(3):411–414, Mar 1985. doi: 10.1016/S0006-3495(85)83932-1. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83932-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83932-1).

- [71] T. Arakawa, R. Bhat, and S. N. Timasheff. Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins. *Biochemistry*, 29(7):1924–1931, Feb 1990. doi: 10.1021/bi00459a037. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi00459a037>.
- [72] S. N. Timasheff. Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry*, 31(41):9857–9864, Oct 1992. doi: 10.1021/bi00156a001. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi00156a001>.
- [73] M. Auton, J. Rösgen, M. Sinev, L. Marcelo, L. F. Holthauzen, and D. W. Bolen. Osmolyte effects on protein stability and solubility: a balancing act between backbone and side-chains. *Biophys. Chem.*, 159(1):90–99, Nov 2011. doi: 10.1016/j.bpc.2011.05.012. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2011.05.012>.
- [74] J. K. Myers, C. N. Pace, and J. M. Scholtz. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.*, 4(10):2138–2148, Oct 1995. doi: 10.1002/pro.5560041020. URL <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560041020>.
- [75] M. W. Capp, L. M. Pegram, R. M. Saecker, M. Kratz, D. Riccardi, T. Wendorff, J. G. Cannon, and M. T. Record. Interactions of the osmolyte glycine betaine with molecular surfaces in water: thermodynamics, structural interpretation, and prediction of m-values. *Biochemistry*, 48(43):10372–10379, Nov 2009. doi: 10.1021/bi901273r. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi901273r>.
- [76] R. C. Diehl, E. J. Guinn, M. W. Capp, O. V. Tsodikov, and M. T. Record. Quantifying additive interactions of the osmolyte proline with individual functional groups of proteins: comparisons with urea and glycine betaine, interpretation of m-values. *Biochemistry*, 52: 5997–6010, 2013. doi: 10.1021/bi400683y. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi400683y>.
- [77] E. Schneck, D. Horinek, and R. R. Netz. Insight into the molecular mechanisms of protein stabilizing osmolytes from global force-field variations. *J. Phys. Chem. B*, 117(28):8310–8321, Jul 2013. doi: 10.1021/jp400790f. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp400790f>.
- [78] L. M. F. Holthauzen, J. Rösgen, and D. W. Bolen. Hydrogen bonding progressively strengthens upon transfer of the protein urea-denatured state to water and protecting osmolytes. *Biochemistry*, 49(6):1310–1318, Feb 2010. doi: 10.1021/bi9015499. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi9015499>.

- [79] M. Lee and N. F. A. van der Vegt. Does urea denature hydrophobic interactions? *J. Am. Chem. Soc.*, 128:4948–4949, 2006. doi: 10.1021/ja058600r. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja058600r>.
- [80] R. Zangi, R. Zhou, and B. J. Berne. Urea's action on hydrophobic interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(4):1535–1541, Feb 2009. doi: 10.1021/ja807887g. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja807887g>.
- [81] B. Adamczak, M. Wieczór, M. Kogut, J. Stangret, and J. Czub. Molecular basis of the osmolyte effect on protein stability: a lesson from the mechanical unfolding of lysozyme. *Biochem. J.*, 473:3705–3724, 2016. doi: 10.1042/BCJ20160604. URL <http://www.biochemj.org/content/473/20/3705>.
- [82] D. J. Felitsky and M. T. Record. Application of the local-bulk partitioning and competitive binding models to interpret preferential interactions of glycine betaine and urea with protein surface. *Biochemistry*, 43(28):9276–9288, Jul 2004. doi: 10.1021/bi049862t. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi049862t>.
- [83] S. Asakura and F. Oosawa. On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *J. Chem. Phys.*, 22:1255, 1954. doi: 10.1063/1.1740347. URL <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.1740347>.
- [84] L. Sapir and D. Harries. Origin of enthalpic depletion forces. *J Phys Chem Lett*, 5(7):1061–1065, Apr 2014. doi: 10.1021/jz5002715. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jz5002715>.
- [85] L. Sapir and D. Harries. Is the depletion force entropic? Molecular crowding beyond steric interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 20:3–10, 2015. doi: 10.1016/j.cocis.2014.12.003. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029414001484>.
- [86] P. Bruździak, B. Adamczak, E. Kaczkowska, J. Czub, and J. Stangret. Are stabilizing osmolytes preferentially excluded from the protein surface? FTIR and MD studies. *Phys Chem Chem Phys*, 17(35):23155–23164, Sep 2015. doi: 10.1039/c5cp03065j. URL <http://dx.doi.org/10.1039/c5cp03065j>.
- [87] A. Panuszko, P. Bruździak, E. Kaczkowska, and J. Stangret. General mechanism of osmolytes' influence on protein stability irrespective of the type of osmolyte cosolvent. *J. Phys. Chem. B*, 120:11159–11169, 2016. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10119.
- [88] A. Panuszko, P. Bruździak, J. Zielkiewicz, D. Wyrzykowski, and J. Stangret. Effects of urea and trimethylamine N-oxide on the properties of water and the secondary structure

- of hen egg white lysozyme. *J. Phys. Chem. B*, 113(44):14797–14809, Nov 2009. doi: 10.1021/jp904001m. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp904001m>.
- [89] P. Bruździak, A. Panuszko, and J. Stangret. Influence of osmolytes on protein and water structure: a step to understanding the mechanism of protein stabilization. *J. Phys. Chem. B*, 117(39):11502–11508, Oct 2013. doi: 10.1021/jp404780c. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp404780c>.
- [90] P. Bruździak, A. Panuszko, E. Kaczkowska, B. Piotrowski, A. Dagher, S. Demkowicz, and J. Stangret. Taurine as a water structure breaker and protein stabilizer. *Amino acids*, 2017. doi: 10.1007/s00726-017-2499-x. URL <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00726-017-2499-x.pdf>.
- [91] H. H. Berendsen. Interactions between 5-hydroxytryptamine receptor subtypes: Is a disturbed receptor balance contributing to the symptomatology of depression in humans? *Pharmacol. Ther.*, 66(1):17–37, Apr 1995. doi: 10.1016/0163-7258(94)00075-E. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016372589400075E>.
- [92] B. Hess, D. van der Spoel, and E. Lindahl. Gromacs user manual 4.6. 2012.
- [93] A. R. Leach. *Molecular modelling principles and applications*. Pearson Education EMA, 2001.
- [94] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, 102(18):3586–3616, Apr 1998. doi: 10.1021/jp973084f. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp973084f>.
- [95] 10 2017. URL <https://sage2.icse.us.edu.pl/home/pub/677/>.
- [96] 09 2017. URL <http://cbio.bmt.tue.nl/pumma/index.php/Theory/Potentials>.
- [97] E. Lindahl, B. Hess, and D. van der Spoel. Gromacs 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.*, 7:306–317, 2001. doi: 10.1007/s008940100045. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s008940100045>.
- [98] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, and A. D. Mackerell. Charmm general force field: A

- force field for drug-like molecules compatible with the charmm all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem*, 31(4):671–690, Mar 2010. doi: 10.1002/jcc.21367. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21367>.
- [99] R. B. Best, X. Zhu, J. Shim, P. E. M. Lopes, J. Mittal, M. Feig, and A. D. Mackerell. Optimization of the additive charmm all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *J Chem Theory Comput*, 8(9):3257–3273, Sep 2012. doi: 10.1021/ct300400x. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ct300400x>.
- [100] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79:926, 1983. doi: 10.1063/1.445869. URL <http://dx.doi.org/10.1063/1.445869>.
- [101] A. D. Mackerell, M. Feig, and C. L. Brooks. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem*, 25(11):1400–1415, Aug 2004. doi: 10.1002/jcc.20065. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20065>.
- [102] T. Darden, D. York, and L. Pedersen. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98:10089–10092, 1993. doi: 10.1063/1.464397. URL <http://dx.doi.org/10.1063/1.464397>.
- [103] U. Essmann, L. Perera M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.*, 103:8577–8593, 1995. doi: 10.1063/1.470117. URL <http://dx.doi.org/10.1063/1.470117>.
- [104] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak. Molecular dynamics with a coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, 81:3684–3690, 1984. doi: 10.1063/1.448118. URL <http://dx.doi.org/10.1063/1.448118>.
- [105] B. Hess, H. Bekker, H. Berendsen, and J. Fraaije. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.*, 18:1463–1472, 1997. URL <http://www.cs.rug.nl/~bekker/publications/lincs.pdf>.
- [106] Y. Luo and B. Roux. Simulation of osmotic pressure in concentrated aqueous salt solutions. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1(1):183–189, 2010. doi: 10.1021/jz900079w. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jz900079w>.

- [107] J. W. Neidigh, R. M. Fesinmeyer, and N. H. Andersen. Designing a 20-residue protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 9:425–430, 2002. doi: 10.1038/nsb798. URL <https://www.nature.com/nsmb/journal/v9/n6/full/nsb798.html>.
- [108] S. Chowdhury, M. C. Lee, and Y. Duan. Characterizing the rate-limiting step of Trp-cage folding by all-atom molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B*, 108:13855–13865, 2004. doi: 10.1021/jp0478920. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0478920>.
- [109] S. Kannan and M. Zacharias. Folding of Trp-cage mini protein using temperature and biasing potential replica–exchange molecular dynamics simulations. *Int. J. Mol. Sci.*, 10:1121–1137, 2009. doi: 10.3390/ijms10031121. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19399241>.
- [110] R. Day, D. Paschek, and A. E. Garcia. Microsecond simulations of the folding/unfolding thermodynamics of the Trp-cage miniprotein. *Proteins*, 78:1889–1899, 2010. doi: 10.1002/prot.22702. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20408169>.
- [111] D. Paschek, R. Day, and A. E. Garcia. Influence of water–protein hydrogen bonding on the stability of Trp-cage miniprotein. A comparison between the tip3p and tip4p-ew water models. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13:19840–19847, 2011. doi: 10.1039/c1cp22110h. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845272>.
- [112] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, and E. Lindahl. Gromacs 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, 4: 435–447, 2008.
- [113] S. Miyamoto and P. A. Kollman. Settle: An analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, 13:952–962, 1992.
- [114] Rachel E Rigsby and Alison B Parker. Using the PyMol application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochem Mol Biol Educ*, May 2016. doi: 10.1002/bmb.20966. URL <http://dx.doi.org/10.1002/bmb.20966>.
- [115] Alessandro Laio and Michele Parrinello. Escaping free-energy minima. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20):12562–12566, Oct 2002. doi: 10.1073/pnas.202427399. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.202427399>.
- [116] M. T. Record and C. F. Anderson. Interpretation of preferential interaction coefficients of nonelectrolytes and of electrolyte ions in terms of a two-domain model. *Biophys J*, 68(3):

- 786–794, Mar 1995. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80254-7. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80254-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80254-7).
- [117] V. A. Parsegian, R. P. Rand, and D. C. Rau. Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8): 3987–3992, Apr 2000. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18129/>.
- [118] URL <http://task.gda.pl/kdm/sprzet/>.
- [119] URL <https://kdm.cyfronet.pl/portal>.
- [120] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*, 14(1):8–33, Feb 1996. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](http://dx.doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [121] URL <https://stackoverflow.com/questions/13302623/matlab-scatter-plots-with-high-number-of-datapoints>.
- [122] B. Adamczak, M. Kogut, and J. Czub. Effect of osmolytes on the thermal stability of proteins: replica exchange simulations of Trp-cage in urea and betaine solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*
- [123] URL <https://www.mathworks.com/products/matlab.html>.
- [124] URL <https://www.gimp.org/>.
- [125] URL <https://inkscape.org/en/>.
- [126] D. V. Beauregard and R. E. Barrett. Ultrasonics and water structure in urea solutions. *J. Phys. Chem.*, 49:5241, 1968. doi: 10.1063/1.1670040. URL <http://dx.doi.org/10.1063/1.1670040>.
- [127] H. J. V. Tyrrell and M. Kennerley. Viscosity beta-coefficients between 5° and 20° for glycolamide, glycine, and N-methylated glycines in aqueous solution. *J. Chem. Soc. A*, pages 2724–2728, 1968. doi: 10.1039/J19680002724. URL <http://dx.doi.org/10.1039/J19680002724>.
- [128] M. Singh and A. Kumar. Hydrophobic interactions of methylureas in aqueous solutions estimated with density, molal volume, viscosity and surface tension from 293.15 to 303.15 K. *J. Solution Chem.*, 35:567–582, 2006. doi: 10.1007/s10953-005-9008-7. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10953-005-9008-7>.

- [129] W. K. Lim, J. Rösgen, and S. W. Englander. Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 106(8):2595–2600, Feb 2009. doi: 10.1073/pnas.0812588106. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0812588106>.
- [130] G. I. Makhatadze and P. L. Privalov. Protein interactions with urea and guanidinium chloride — a calorimetric study. *J. Mol. Biol.*, 226(2):491–505, 1992. doi: 10.1016/0022-2836(92)90963-K. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90963-K](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(92)90963-K).
- [131] A. Caballero-Herrera, K. Nordstrand, K. D. Berndt, and L. Nilsson. Effect of urea on peptide conformation in water: molecular dynamics and experimental characterization. *Biophys J.*, 89(2):842–857, Aug 2005. doi: 10.1529/biophysj.105.061978. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.061978>.
- [132] J. A. Rupley. The effect of urea and amides upon water structure. *J. Phys. Chem.*, 68 (7):2002–2003, 1964. doi: 10.1021/j100789a503. URL <http://dx.doi.org/10.1021/j100789a503>.
- [133] H. S. Frank and F. Franks. Structural approach to the solvent power of water for hydrocarbons; urea as a structure breaker. *J. Chem. Phys.*, 48:4746, 1968. doi: 10.1063/1.1668057. URL <http://dx.doi.org/10.1063/1.1668057>.
- [134] F. Vanzi, B. Madan, and K. Sharp. Effect of the protein denaturants urea and guanidinium on water structure: A structural and thermodynamic study. *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (41):10748–10753, 1998. doi: 10.1021/ja981529n. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja981529n>.
- [135] Q. Zou, B. J. Bennion, V. Daggett, and K. P. Murphy. The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(7):1192–1202, Feb 2002. doi: 10.1021/ja004206b. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja004206b>.
- [136] R. Gilman-Politi and D. Harries. Unraveling the molecular mechanism of enthalpy driven peptide folding by polyol osmolytes. *J. Chem. Theory Comput.*, 7:3816–3828, 2011. doi: 10.1021/ct200455n. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ct200455n>.
- [137] J. Ma, I. M. Pazos, and F. Gai. Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 111(23):8476–8481, Jun 2014. doi: 10.1073/pnas.1403224111. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1403224111>.

- [138] B. Moeser and D. Horinek. Unified description of urea denaturation: backbone and side chains contribute equally in the transfer model. *J. Phys. Chem. B*, 118(1):107–114, Jan 2014. doi: 10.1021/jp409934q. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp409934q>.
- [139] S. Funkner, M. Havenith, and G. Schwaab. Urea, a structure breaker? Answers from THz absorption spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 116(45):13374–13380, Nov 2012. doi: 10.1021/jp308699w. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp308699w>.
- [140] J. K. Carr, L. E. Buchanan, J. R. Schmidt, M. T. Zanni, and J. L. Skinner. Structure and dynamics of urea/water mixtures investigated by vibrational spectroscopy and molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B*, 117(42):13291–13300, Oct 2013. doi: 10.1021/jp4037217. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp4037217>.
- [141] D. Klimov, J. Straub, and D. Thirumalai. Aqueous urea solution destabilizes Aβ (16–22) oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:14760–14765, 2004. doi: 10.1073/pnas.0404570101. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404570101>.
- [142] E. P. O’Brien, R. Dima, B. Brooks, and D. Thirumalai. Interactions between hydrophobic and ionic solutes in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: Lessons for protein denaturation mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 129:7346–7353, 2007. doi: 10.1021/ja069232+. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja069232+>.
- [143] Q. Zou, S. M. Habermann-Rottinghaus, and K. P. Murphy. Urea effects on protein stability: hydrogen bonding and the hydrophobic effect. *Proteins*, 31(2):107–115, May 1998. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19980501)31:2<107::AID-PROT1>3.0.CO;2-J. URL [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980501\)31:2<107::AID-PROT1>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980501)31:2<107::AID-PROT1>3.0.CO;2-J).
- [144] D. J. Felitsky, J. G. Cannon, M. W. Capp, J. Hong, A. W. Wynsberghe, C. F. Anderson, and M. T. Record. The exclusion of glycine betaine from anionic biopolymer surface: why glycine betaine is an effective osmoprotectant but also a compatible solute. *Biochemistry*, 43(46):14732–14743, Nov 2004. doi: 10.1021/bi049115w. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi049115w>.
- [145] E. S. Courtenay, M. W. Capp, C. F. Anderson, and M. T. Record. Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of osmotic stress experiments in vitro. *Biochemistry*, 39(15):4455–4471, Apr 2000. doi: 10.1021/bi992887l. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi992887l>.

- [146] A. Panuszko, B. Adamczak, J. Czub, E. Gojło, and J. Stangret. Hydration of amino acids: FTIR spectra and molecular dynamics studies. *Amino Acids*, 47:2265–2278, May 2015. doi: 10.1007/s00726-015-2005-2. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-015-2005-2>.