

Imię i nazwisko autora rozprawy: **Michał Olewniczak**
Dyscyplina naukowa: **Nauki Chemiczne**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: **Mechanizm allosterycznej aktywacji białek Hsp70**

Tytuł rozprawy w języku angielskim: **Mechanism of allosteric activation of Hsp70s**

Promotor

podpis

Prof. dr hab. inż. Jacek Czub

Gdańsk, rok 2026



OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Michał Olewniczak

Ja, niżej podpisany(a), oświadczam, iż jestem świadomy(a), że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:
„Mechanizm allosterycznej aktywacji białek Hsp70”
do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem, prof. dr. hab. inż. Jackiem Czubem.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia 20.04.2026

.....
podpis doktoranta

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia 20.04.2026

.....
podpis doktoranta

¹Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotnić w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.



OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Michał Olewniczak

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Mechanizm allosterycznej aktywacji białek Hsp70

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Mechanism of allosteric activation of Hsp70s

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. inż. Jacek Czub

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: białka szoku cieplnego, allosteria, dynamika molekularna, DnaK, DnaJ, Hsp70, Hsp40

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: heat shock proteins, allostery, molecular dynamics, DnaK, DnaJ, Hsp70, Hsp40

Streszczenie rozprawy w języku polskim:

Rodzina białek szoku cieplnego Hsp70 stanowi jedną z najpowszechniej występujących grup białek wśród organizmów żywych. Odgrywają one kluczową rolę w zwijaniu nowo zsyntetyzowanych łańcuchów peptydowych i ponownym zwijaniu uszkodzonych białek. Cykl katalityczny Hsp70 jest koordynowany przez białka J, które stymulują hydrolizę ATP w obrębie Hsp70, wpływając tym samym na powinowactwo do wiążanego substratu, a także na wzajemne ułożenie domen Hsp70, NBD i SBD.

W mojej pracy scharakteryzowałem allosteryczną komunikację wewnątrz bakteryjnego Hsp70, DnaK, przy użyciu pełnoatomowego wariantu dynamiki molekularnej. Udało mi się wyznaczyć krajobraz energetyczny zmian konformacyjnych DnaK, będących rezultatem hydrolizy ATP oraz wytypowałem region białka sterujący wzajemnym powinowactwem domen DnaK, NBD i SBD. Zaproponowałem także mechanizm aktywacji DnaK przez białko J, który skutkuje bliskim kontaktem ATP z katalitycznie istotną resztą Thr199. Wyjaśniłem również indywidualną rolę aminokwasów wchodzących w skład zakonserwowanego motywu HPD w proces wiązania domeny J i aktywacji DnaK. Na koniec otrzymane wyniki porównałem z przypadkiem, gdy DnaK jest stymulowane przez obecność substratu w SBD. Otrzymane przeze mnie wyniki przemawiają za spójnym mechanizmem aktywacji DnaK, opartym o zmiany konformacyjne towarzyszące tworzeniu się kontaktu Thr199-ATP.



Streszczenie rozprawy w języku angielskim:

The catalytic cycle of Hsp70 proteins relies on the consecutive events of a nucleotide-dependent binding and release of misfolded substrates, by which Hsp70s facilitate their refolding to native conformation. This cycle is orchestrated by co-chaperone J-domain proteins (JDPs), which can deliver substrates to the Hsp70s' binding pocket and stimulate their ATPase activity. In my work I characterized the allosteric communication within bacterial Hsp70, DnaK, using all-atom molecular dynamics simulations. Specifically, I provided the description of the mechanism of activation of DnaK, which allows the protein to hydrolyze ATP. By studying the interactions on the NBD-SBD interface I suggested which residues may govern domain dissociation after ATP hydrolysis. Moreover, I demonstrated that activation of DnaK caused by JD binding is the result of the rearrangement of the ATP-binding pocket, which enables close contact between ATP and the residue responsible for hydrolysis, Thr199. Then, I dissected the individual roles of amino acids from conserved HPD motif in the process of JD binding and DnaK activation. Finally, I compared the obtained results with the stimulation of DnaK driven by the substrate binding. The outcomes of my work plead in favor of a coherent mechanism of DnaK activation, involving conformational changes related to the Thr199-ATP close contact formation.

Obliczenia zawarte w niniejszej pracy wykonano z wykorzystaniem komputerów Centrum Informatycznego Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej.

Computations presented in this work were carried out using the computers of the Center of Informatics Tricity Academic Supercomputer & Network.

Spis treści

1	Wprowadzenie	1
1.1	Allosteria	1
1.2	Szok cieplny	2
1.3	Budowa i funkcje białek Hsp70	3
1.3.1	Cykl katalityczny Hsp70	6
1.4	Budowa i funkcje białek J (Hsp40)	7
1.4.1	Mechanizm autoinhibicji białek J klasy B	9
1.5	Entropowe szarpanie	10
1.6	Białka DnaK i DnaJ	11
1.6.1	Hydroliza ATP przez DnaK	15
2	Cele i zakres pracy	17
3	Metodyka badań	19
3.1	Wprowadzenie do termodynamiki statystycznej	19
3.1.1	Rozkład Boltzmana	19
3.1.2	Entropia	20
3.1.3	Średnie po zespole	21
3.2	Równanie Schrödingera	22
3.3	Dynamika molekularna i pole siłowe	23
3.4	Temperatura i ciśnienie w symulacjach Dynamiki Molekularnej	27
3.5	Całkowanie równań ruchu. Algorytm Verleta	29
3.6	Periodyczne warunki brzegowe	31
3.7	Sumowanie Ewalda	32
3.8	Metody wzmocnionego próbkowania	34
3.8.1	Umbrella sampling	35
3.8.2	Metadynamika	36
3.9	Transformacje alchemiczne	38
3.9.1	Cykl termodynamiczny	41
3.10	Analiza głównych składowych	42
3.11	Dynamiczna analiza sieci	43
4	Procedura symulacyjna	45
4.1	Zmiany konformacyjne DnaK indukowane hydrolizą ATP	45
4.1.1	Równowagowe symulacje Dynamiki Molekularnej	45
4.1.2	Analiza trajektorii	46

4.1.3	Wyznaczanie profili energii swobodnej	46
4.1.4	Transformacje alchemiczne	47
4.2	Zmiany konformacyjne DnaK indukowane związaniem domeny J	48
4.2.1	Równowagowe symulacje Dynamiki Molekularnej	48
4.2.2	Analiza trajektorii	48
4.2.3	Wyznaczanie profili energii swobodnej	49
4.3	Zmiany konformacyjne DnaK indukowane obecnością substratu w SBD	51
4.3.1	Równowagowe symulacje Dynamiki Molekularnej	51
4.3.2	Analiza trajektorii	52
4.3.3	Wyznaczanie profili energii swobodnej	52
4.3.4	Symulacje metadynamiki w wariacie OPES	53
5	Wyniki i dyskusja	54
5.1	Zmiany konformacyjne DnaK indukowane hydrolizą ATP	54
5.1.1	Zmiany konformacyjne NBD	54
5.1.2	Dysocjacja SBD β z powierzchni NBD	59
5.2	Zmiany konformacyjne DnaK indukowane związaniem domeny J	65
5.2.1	Zmiany konformacyjne NBD	65
5.2.2	Obecność domeny J umożliwia kontakt Thr199 z ATP	68
5.2.3	Sygnalizacja allosteryczna pomiędzy domeną J a kieszenią katalityczną DnaK	72
5.2.4	Rola motywu HPD w stymulacji aktywności DnaK	74
5.2.5	Dysocjacja domeny J pod wpływem Hsp70	77
5.2.6	Sterylny nacisk umożliwia aktywację DnaK przez domenę J	78
5.3	Zmiany konformacyjne DnaK indukowane związaniem substratu przez SBD	80
5.3.1	Obecność substratu faworyzuje katalitycznie aktywny stan DnaK	80
5.3.2	Zamknięta konformacja SBD jest faworyzowana w obecności substratu	84
5.3.3	Podatność na "łamanie" SBD α w obecności czynników allosterycznych	87
6	Podsumowanie	91
	Załącznik	93
	Bibliografia	100
	Dorobek naukowy	117

Lista skrótów

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Kwas asparaginowy
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan
BAR	Bennett Acceptance Ratio
CFT	Relacja Crooksa (ang. <i>Crooks Fluctuation Theorem</i>)
CGI	Crooks Gaussian Intersection
cryo-EM	Kriomikroskopia elektronowa (ang. <i>Cryogenic electron microscopy</i>)
CTD	C-terminalna domena
Cys (C)	Cysteina
EP	Entropowe szarpanie (ang. <i>Entropic Pulling</i>)
FRET	Försterowski rezonansowy transfer energii (ang. <i>Förster resonance energy transfer</i>)
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Kwas glutaminowy
Gly (G)	Glicyna
HDXMS	Spektrometria mas sprzężona z techniką wymiany wodorów-deuter (ang. <i>Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry</i>)
His (H)	Histydyna
Hsp	Białka szoku cieplnego (ang. <i>Heat shock proteins</i>)
Ile (I)	Izoleucyna
JD	Domena J
Leu (L)	Leucyna
Lys (K)	Lizyna
MD	Dynamika Molekularna (ang. <i>Molecular Dynamics</i>)
NBD	Domena wiążąca nukleotyd (ang. <i>Nucleotide Binding Domain</i>)
NMR	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PBC	Periodyczne warunki brzegowe (ang. <i>Periodic Boundary Conditions</i>)
PCA	Analiza głównych składowych (ang. <i>Principal Component Analysis</i>)
PDB	Protein Data Bank
Phe (F)	Fenylalanina
Pro (P)	Prolina
RMSD	Średnie odchylenie kwadratowe położenia (ang. <i>Root Mean Square Displacement</i>)
RMSF	Średnie odchylenie kwadratowe fluktuacji (ang. <i>Root Mean Square Fluctuation</i>)
SBD	Domena wiążąca substrat (ang. <i>Substrate Binding Domain</i>)
Ser (S)	Seryna
Thr (T)	Treonina
TI	Całkowanie termodynamiczne (ang. <i>Thermodynamic Integration</i>)
Tyr (Y)	Tyrozyna
US	Technika <i>Umbrella Sampling</i> (pol. "próbkiowanie parasolowe")
Val (V)	Walina
WHAM	Metoda ważonych histogramów (ang. <i>Weighted Histogram Analysis Method</i>)
WT	Szczep dziki (ang. <i>Wild-Type</i>)

1 Wprowadzenie

1.1 Allosteria

Termin «allosteria» odnosi się do zjawiska, w którym związanie liganda w jednej części białka skutkuje zmianą aktywności katalitycznej lub powinowactwa względem substratu w innym jego regionie, często znacznie oddalonym od pierwotnego miejsca wiązania. Taka pośrednia regulacja aktywności wynika (najczęściej) ze zmian konformacyjnych zachodzących w obrębie białka. [1, 2]

Modelowym białkiem allosterycznym jest hemoglobina, symetryczny tetramer zdolny do wiązania tlenu. [3] Posiada ona cztery centra wiążące tlen, które są identyczne, ale wzajemnie zależne: przyłączenie cząsteczki O_2 do jednej z żelazoporfiryn drastycznie zmienia powinowactwo trzech pozostałych podjednostek do tlenu. Pierwsze próby wyjaśnienia tego fenomenu podjęto jeszcze przed otrzymaniem struktur krystalicznych hemoglobiny. Najbardziej rozpowszechnionymi modelami były propozycje wysunięte przez Monoda i współ. (tzw. model MWC) [4] oraz przez Koshlanda i współ. (tzw. model KNF) [5]. Oba modele zakładały, że białko może przyjmować dwie konformacje: R (o wysokim powinowactwie) i T (o niskim powinowactwie). Najważniejsza, choć nie jedyna różnica między tymi opisami dotyczy stanu o wysokim powinowactwie. Według modelu MWC związanie liganda przesuwaa stan równowagi między stanami T i R, które są spontanicznie przyjmowane także przez nieobsadzone białko (tzw. selekcja konformacyjna). Model KNF opiera się z kolei na mechanizmie indukowanego dopasowania i zakłada, że konformacja R pojawia się dopiero w następstwie związania liganda. [3] Pomimo różnic w przyjętych założeniach, oba modele wyjaśniały i przewidywały część aspektów allosterii, choć ograniczały się jedynie do opisu jakościowego. [1, 5, 6, 7, 8, 9]

W ciągu kolejnych dekad próby opisu zjawiska allosterii stawały się coraz bardziej złożone i nie ograniczały się jedynie do homooligomerów, ale dotyczyły także heterooligomerów i jednołańcuchowych białek. [10] Początkowo dominujące było podejście strukturalne, oparte na analizie zmian konformacyjnych między dwoma różnymi stanami białka. Tym samym próbowano powiązać odmienną organizację przestrzenną reszt aminokwasowych z istnieniem potencjalnych ścieżek sygnalizacyjnych w obrębie białka. Na ścieżki, wzdłuż których propagować miałyby się strukturalne zaburzenia, mogłyby się składać reszty silnie zakonserwowane lub wykazujące korelacje we wzajemnym położeniu lub ruchu. [11, 12, 13]

Ta perspektywa została jednak ponownie poddana pod rozprawę w latach osiemdziesiątych, kiedy to Cooper i Dryden zwrócili uwagę na entropowy wkład w allosterię i wykazali, że zjawisko to nie musi koniecznie łączyć się ze zmianami konformacyjnymi makromolekuł. [14] Zgodnie z ich tezą, obecność czynnika allosterycznego nie zmieniałaby pozycji minimum energetycznego w przestrzeni

konformacyjnej białka, a jedynie jego szerokość. Biorąc to pod uwagę, różne grupy badawcze proponowały szersze spojrzenia na allosterię z punktu widzenia krajobrazu energetycznego, uwzględniając selekcję konformacyjną i zmiany w obsadzeniach licznych stanów białka. [6, 15, 16, 17, 18, 19] Grupa Ruth Nussinov zapostulowała nawet, że wszystkie białka są allosteryczne. [20]

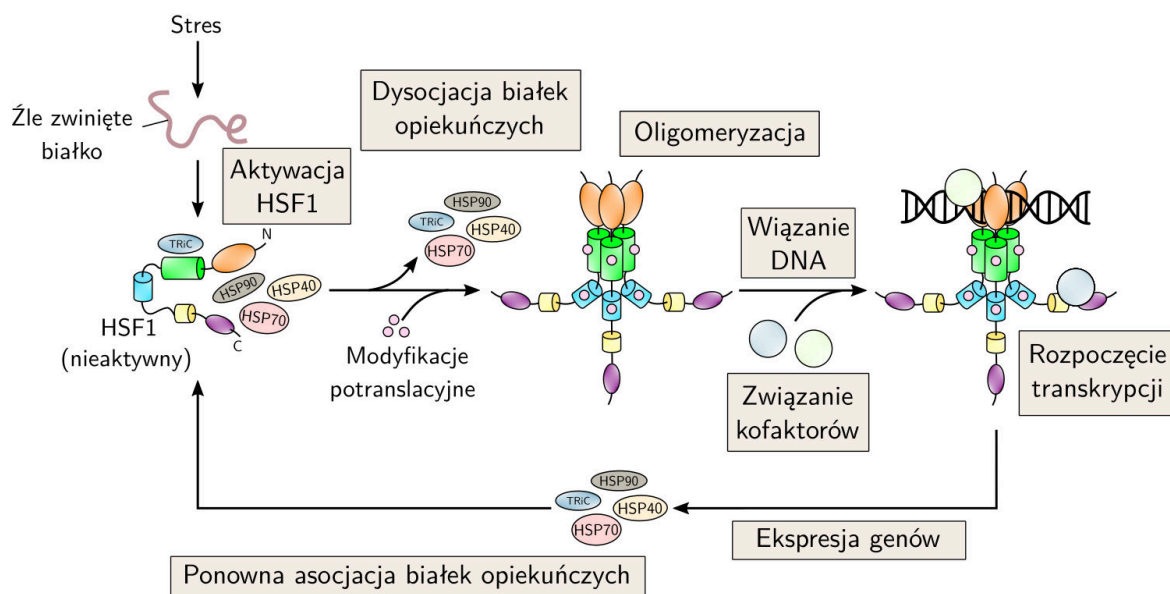
Ponad sześć dekad badań nad allosterią było możliwe dzięki rozwojowi różnych technik eksperymentalnych, pozwalających śledzić wpływ liganda na zachowanie białka. [11] Do uzyskania statycznych, wysokorozdzielczych struktur przyczyniły się techniki krystalograficzne. Z kolei na śledzenie dynamiki białek pozwoliły m.in. metody jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), spektroskopia mas uwzględniająca wymianę izotopową wodór-deuter (HDXMS) czy pomiary fluorescencyjne wykorzystujące mechanizm FRET (Försterowski rezonansowy transfer energii). Obecnie ogromną popularnością cieszy się metoda kriomikroskopii elektronowej (cryo-EM), która nie wymaga uprzedniego otrzymania kryształu próbki. Zamiast tego, badany układ jest gwałtownie zamrażany w roztworze skroplonego kriogenu, co umożliwia zachowanie natywnej struktury białka. Dzięki temu metoda cryo-EM może zostać użyta do uchwycenia zmienności konformacyjnej biomolekuł (łącznie ze stanami przejściowymi) z blisko atomową rozdzielczością. [21, 22] Nieocenionym wsparciem w interpretacji wyników badań eksperymentalnych na poziomie molekularnym są metody obliczeniowe, które dostarczają również narzędzi do identyfikacji centrów allosterycznych. [23, 24, 25]

Przełomowym efektem badań nad allosterią było dopuszczenie do leczenia nadczynności przytarczyc cynalkacetu- leku, który obniża stężenie parathormonu we krwi poprzez allosteryczną modyfikację receptora wapniowego. [11, 26] Projektowanie allosterycznych leków, które w przeciwieństwie do standardowych terapeutyków nie są analogami cząsteczki wiążącej się do centrum katalitycznego, otworzyło nowe możliwości w farmakoterapii i modulowaniu specyficzności leków. Jednocześnie wymaga dalszych, pogłębionych badań, pozwalających lepiej zrozumieć zjawisko allosterii.

1.2 Szok cieplny

Komórki są często wystawione na działanie czynników stresowych, takich jak podwyższona temperatura, obecność wolnych rodników, zmienne pH czy promieniowanie, które mogą zaburzać natywną strukturę białek i innych makromolekuł. Źle zwinięte białka mogą być nieaktywne, a w niektórych przypadkach mogą również wykazywać tendencję do tworzenia cytotoksycznych agregatów. W celu zapobiegania uszkodzeniom, rozwijaniu i agregacji białek, komórki dokonują ekspresji białek opiekuńczych (ang. *molecular chaperones*) [27, 28, 29, 30], do których zalicza się rodziny białek szoku cieplnego (ang. *Heat shock proteins*, Hsp): Hsp60, Hsp70, Hsp90 czy Hsp100 (liczby w nazwach wskazują na przybliżoną masę białek w kilodaltonach). [31]

U eukariontów czynnik transkrypcyjny HSF1 w normalnych warunkach pozostaje w nieaktywnej formie, tworząc kompleks z białkami opiekuńczymi (Rysunek 1.2.1). Stres komórkowy powoduje nagromadzenie źle zwiniętych białek, które są wiązane przez Hsp. Powoduje to uwolnienie HSF1, który trimeryzuje i jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie ulega modyfikacjom potranslacyjnym (hiperfosforylacja, sumoilaacja) i aktywuje transkrypcję genów kodujących białka opiekuńcze. [32, 33] Po ustaniu czynników stresowych nadmiar Hsp ponownie kompleksuje HSF1, powodując jego dezaktywację. W podobny sposób Hsp regulują transkrypcję genów w *E. coli* poprzez (dez)aktywację czynnika $\sigma 32$. [34]



Rysunek 1.2.1: Mechanizm regulacji odpowiedzi komórki na szok cieplny u eukariontów. Białka opiekuńcze takie jak Hsp40, Hsp70, Hsp90 czy TRiC tworząc kompleks z HSF1 sprawiając, że pozostaje on w formie nieaktywnej. Ich dysocjacja prowadzi do oligomeryzacji HSF1 i ekspresji genów kodujących białka opiekuńcze. Na podstawie [31] i [35].

1.3 Budowa i funkcje białek Hsp70

W wyniku ekspozycji na czynniki stresowe komórki dokonują zwiększonej ekspresji Hsp70, jednak białka te pełnią ważne funkcje także w normalnych warunkach fizjologicznych: biorą udział w zwijaniu nowo zsyntezowanych łańcuchów polipeptydowych, regulacji aktywności białek czy ich transporcie przez błonę. [36, 37, 38] Wszystkie te funkcje Hsp70 opierają się na rozpoznawaniu i wiązaniu krótkich, hydrofobowych fragmentów łańcuchów polipeptydowych. [39, 40]

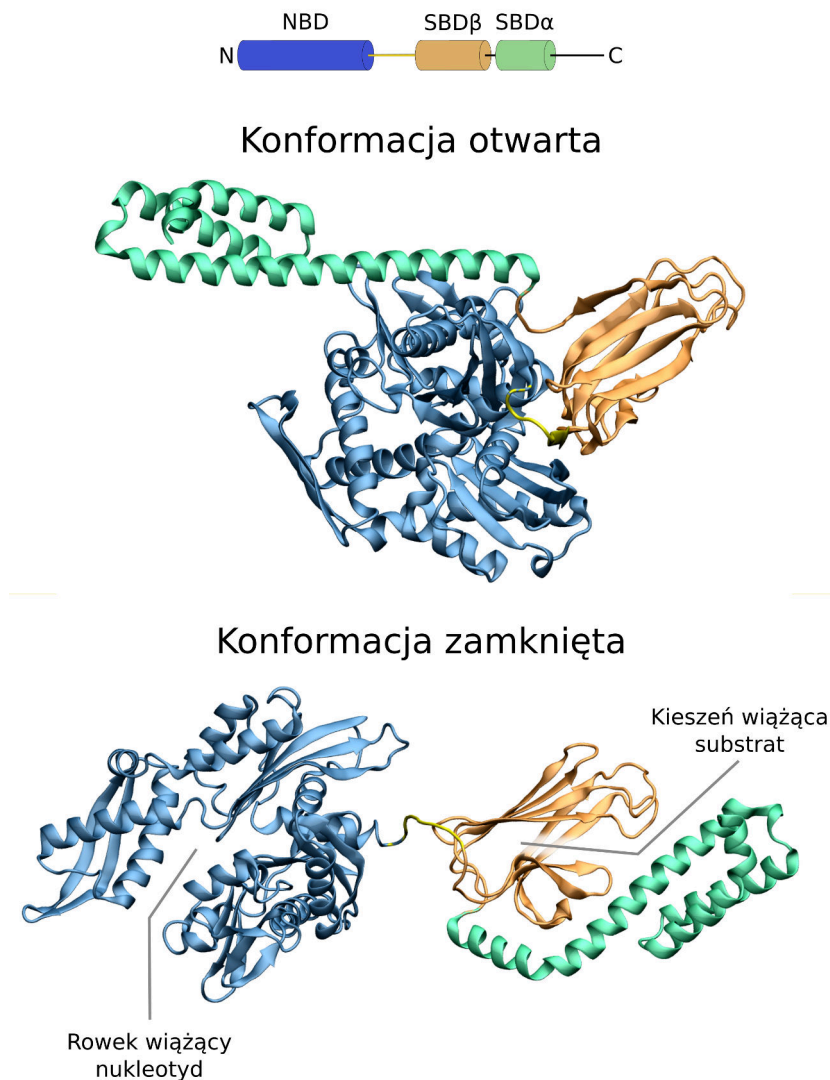
Szacuje się, że Hsp70 bierze udział w zwijaniu *de novo* 10–20% bakteryjnych białek, a zależność poprawnego zwijania od udziału Hsp70 koreluje z rozmiarem białka. [41, 42] Ze względu na to, że

Średni rozmiar białek w komórkach eukariotycznych jest większy (dla porównania, średni rozmiar białek *E. coli* wynosi 35 kDa, a u ludzi – 52 kDa [43]), można spodziewać się, że białka opiekuńcze koordynują w nich zwijanie się jeszcze większej części proteomu. Liczba kodowanych w genomie Hsp70 jest charakterystyczna dla danego gatunku (*E. coli* – 3, *S. cerevisiae* – 11, *H. sapiens* – 13), a same białka mogą być zlokalizowane w różnych strukturach komórkowych (retikulum endoplazmatyczne, cytozol, mitochondria, jądro). [38]

W budowie Hsp70 można wyróżnić dwie domeny: (i) domenę wiążącą nukleotyd (ang. *nucleotide binding domain*, NBD) o masie 45 kDa oraz (ii) domenę wiążącą substrat (ang. *substrate binding domain*, SBD) o masie 25 kDa. Obie domeny są połączone ze sobą krótkim, zakonserwowanym łącznikiem (Rysunek 1.3.1). [44] NBD wykazuje strukturalne podobieństwo do aktyny i heksokinazy i złożona jest z dwóch płatów (I, II) podzielonych na cztery subdomeny (IA, IB, IIA, IIB), pomiędzy którymi wiąże się nukleotyd. NBD cechuje się niską bazową aktywnością ATP-azową, a wiązanie ATP powoduje rotację płatów I i II względem siebie. [45, 46]

SBD składa się z części α -helikalnej (SBD α) oraz części zbudowanej w oparciu o strukturę typu β -kartki (SBD β). Fragment SBD β złożony jest z dwóch zestawów czterech β -nici, które ułożone są warstwowo, tworząc hydrofobową kieszeń wiążącą substrat. Kieszeń ta jest w stanie związać rozwinięty, hydrofobowy fragment polipeptydu. Największym powinowactwem względem SBD β charakteryzują się sekwencje złożone z ok. pięciu hydrofobowych aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach bocznych znajdujących się w sąsiedztwie argininy lub lizyny [49, 50, 51], choć część Hsp70 potrafi także rozpoznawać fragmenty wzbogacone w reszty aromatyczne i prolinę. [52, 53, 54] W większości białek wspomniane sekwencje aminokwasowe są zlokalizowane w hydrofobowym rdzeniu białka, przez co ich ekspozycja świadczy o niepoprawnej strukturze przestrzennej. [55] Rozbudowana sieć wiązań wodorowych i kontaktów hydrofobowych sprawia, że kieszeń wiążąca SBD β nie wykazuje preferencji względem orientacji łańcucha polipeptydowego substratu, jednak rozpoznaje jedynie L-aminokwasy. [39, 56, 57, 58]

SBD może przyjmować dwie główne konformacje, otwartą i zamkniętą (Rysunek 1.3.1). W konformacji otwartej SBD α i SBD β są związane z NBD, pozostawiając tym samym swobodny dostęp do kieszeni wiążącej substrat. W tej sytuacji stałe szybkości asocjacji i dysocjacji substratu są wysokie, co skutkuje niskim powinowactwem substratu do kieszeni wiążącej. W konformacji zamkniętej SBD α przesuwa się na powierzchnię SBD β i pełni rolę wieka, które zamyka dostęp do kieszeni wiążącej substrat. Przy takim ułożeniu SBD α stała szybkości asocjacji wyraźnie przewyższa stałą dysocjacji, co przekłada się na wysokie powinowactwo substratu do kieszeni wiążącej. [39, 59, 60] Co ciekawe, pomimo wpływu na kinetykę procesów wiązania i dysocjacji substratów, sam fragment SBD α nie jest



Rysunek 1.3.1: (Góra) Schemat sekwencji białka Hsp70. W eukariotycznych wariantach Hsp70 zlokalizowanych w cytozolu lub jądrze nieustrukturyzowany fragment C-końcowy często zawiera motyw Glu-Glu-Val-Asp (EEVD), który stanowi miejsce wiązania białek współopiekuńczych (np. BAG-1, Hsp90 czy Hsp40). [38] (Środek, dół) Hsp70 (DnaK z *E. coli*) w konformacji otwartej i zamkniętej (kody struktur w bazie PDB: 4B9Q [47] i 2KHO [48]).

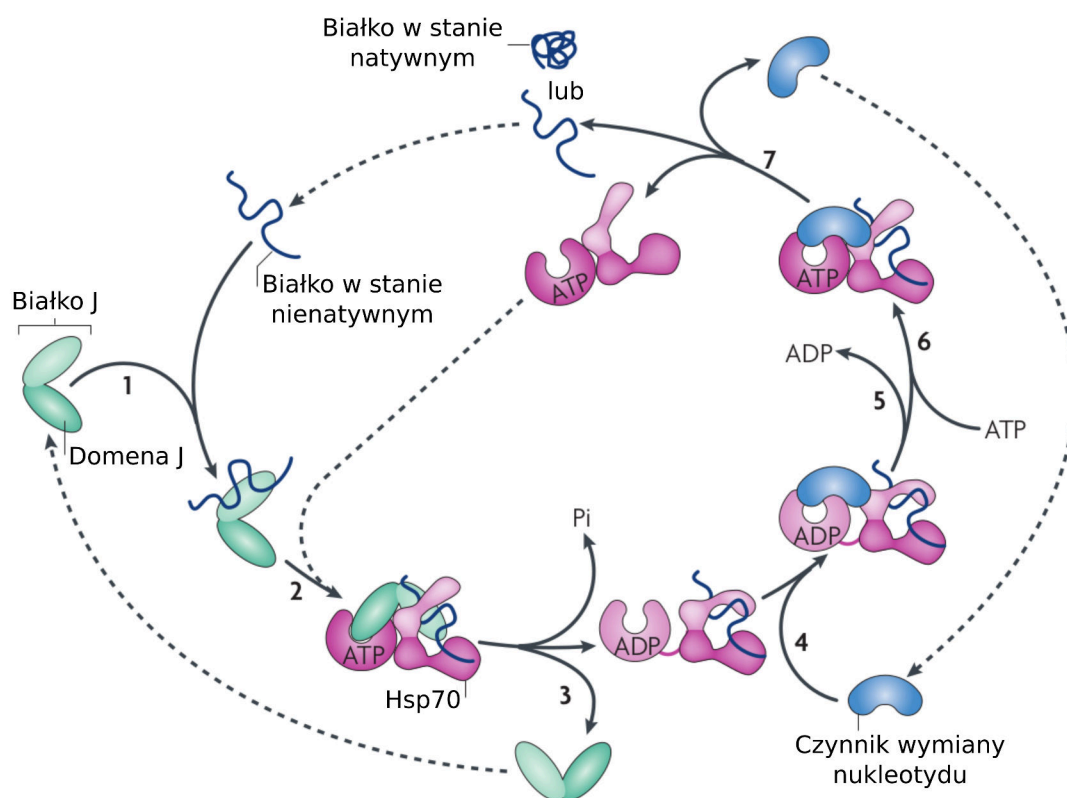
niezbędny do pełnienia przez Hsp70 swoich funkcji, włączając w to indukcję ponownego zwijania się białek (ang. *refolding*). [61, 62] Ta subdomena odgrywa jednak ważną rolę w oddziaływaniu Hsp70 z białkami współopiekuńczymi oraz z lipidami. [63]

U podstaw aktywności Hsp70 leżą następujące po sobie procesy związania i uwalniania białkowego substratu, zależne od obsadzenia wnęki wiążącej nukleotyd. [64, 65] W obecności ATP SBD

przyjmuje konformację otwartą, natomiast w obecności ADP (lub gdy brak jest nukleotydu w kieszeni wiążącej) – konformację zamkniętą. Wzajemne sprzężenie konformacji NBD i SBD jest możliwe dzięki międzysdomenowemu łącznikowi, który w obecności ADP jest nieustrukturyzowany, a w obecności ATP współtworzy β -karkowy fragment NBD. [66, 67, 68]

1.3.1 Cykl katalityczny Hsp70

Zależny od ATP cykl katalityczny Hsp70 pozwiązany jest z szeregiem zmian konformacyjnych, które modyfikują oddziaływania Hsp70-substrat, a ich koordynowanie zachodzi przy udziale białek współopiekuńczych: tzw. białek J oraz czynnika wymiany nukleotydu (Rysunek 1.3.2). [69]



Rysunek 1.3.2: Cykl katalityczny Hsp70 (opis w tekście); rysunek zapożyczono z [69]

Początkowo Hsp70 w stanie ze związanym ATP znajduje się w konformacji otwartej. Białko J rekrutuje źle zwinięty białkowy substrat (1) i dostarcza go do Hsp70, z którym oddziałuje poprzez domenę J (2). Substrat przejściowo oddziałuje z domeną SBD znajdującą się w konformacji otwartej. Następnie hydroliza ATP wewnątrz NBD, stymulowana synergistycznie przez domenę J i związany substrat [70], powoduje zmianę konformacyjną Hsp70 i przyjęcie przez nie konformacji zamkniętej.

W przypadku kiedy substrat jest wiązany bezpośrednio przez Hsp70 rola białek J ogranicza się jedynie do stymulowania hydrolizy ATP. [37, 69] Warto zaznaczyć, że synergistyczne działanie substratu i białka J pozwala na zwiększenie szybkości reakcji hydrolizy ponad tysiąckrotnie. [70, 71]

W kolejnym kroku SBD α oddysocjuje od NBD i wiąże się na powierzchni SBD β , stabilizując oddziaływanie Hsp70 z substratem. Na tym etapie prawdopodobnie następuje również oddysocjowanie białka J (3). W dalszej kolejności czynnik wymiany nukleotydu, charakteryzujący się wysokim powinowactwem do Hsp70 ze związanym ADP, przyłącza się do Hsp70 (4). Powstaniu kompleksu białkowego towarzyszy zmiana konformacyjna w obrębie NBD, która umożliwia uwolnienie ADP (5), a następnie związanie cząsteczki ATP i ponowne przyjęcie konformacji otwartej przez Hsp70 (6). Udział białek współopiekuńczych sprawia, że to właśnie proces dysocjacji ADP (a nie sama hydroliza ATP) jest etapem limitującym szybkość cyklu katalitycznego. [44, 72] Niskie powinowactwo Hsp70 w konformacji otwartej względem substratu powoduje jego dysocjację (7), która umożliwia ponowne zwinięcie i osiągnięcie funkcjonalnej konformacji białka.

Sprężenie obsadzenia kieszeni wiążącej nukleotyd z konformacją domeny wiążącej substrat powoduje, że w wyniku hydrolizy ATP powinowactwo substratu względem SBD wzrasta 10–50 krotnie. Towarzyszy temu spadek stałych szybkości asocjacji i dysocjacji substratu, odpowiednio, 100- i 1000-krotny. [40, 70, 73] Należy zaznaczyć, że SBD może okresowo otwierać się i zamykać niezależnie od nukleotydu obecnego w kieszeni wiążącej NBD, jednak obsadzenie NBD determinuje stałe szybkości z jaką zachodzą te procesy, a co za tym idzie, bardziej prawdopodobną konformację domeny. [74, 75]

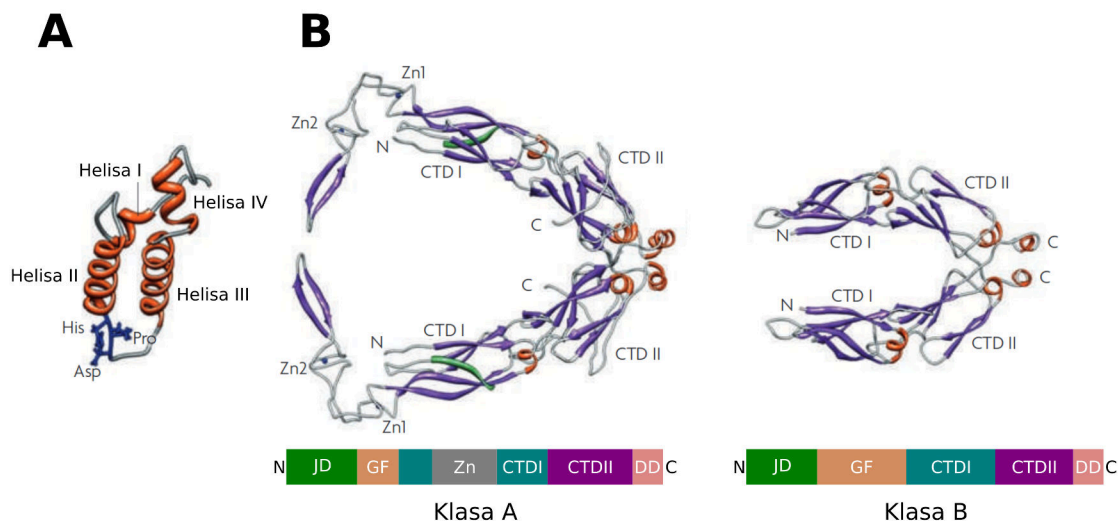
Wydajność zależnego od ATP cyklu Hsp70 – koordynowanego przez białko J i czynnik wymiany nukleotydu – pozwala na nierównowagową konwersję nieaktywnych białek (źle zwiniętych lub zagregowanych) w funkcjonalne białka o natywnej strukturze, pomimo denaturujących czynników. [76, 77] Jeśli po uwolnieniu substrat nie osiągnie swojej natywnej konformacji może on zostać ponownie zarekrutowany przez białko J i cykl katalityczny rozpoczyna się na nowo. Niemniej, niedawno opublikowane wyniki symulacji dynamiki molekularnej sugerują, że substrat rozpoczyna ponowne zwijanie będąc w bezpośrednim sąsiedztwie Hsp70 w konformacji otwartej. [78] Dzięki oddziaływaniom Hsp70-substrat krajobraz energetyczny przestrzeni konformacyjnej białka zostaje zmieniony, co faworyzuje przyjęcie stanu natywnego i zmniejsza szansę na nieprawidłowe zwinięcie białka.

1.4 Budowa i funkcje białek J (Hsp40)

Kluczową rolę w regulowaniu cyklu katalitycznego Hsp70 pełnią białka J (znane także jako Hsp40), które zarówno stymulują aktywność ATP-azową Hsp70, jak i odpowiadają za dostarczanie do nich

białkowych substratów. [38, 79] Białka J charakteryzują się obecnością w swojej strukturze domeny J, fragmentu o długości ~ 70 aminokwasów złożonego z czterech α -helis, w którym silnie zakonserwowany motyw His-Pro-Asp (HPD), niezbędny do stymulowania aktywności ATP-azowej Hsp70, zlokalizowany jest na pętli między helisą II a III (Rysunek 1.4.1 A). [69, 80, 81] Fragment domeny J obejmujący helisę II, pętlę HPD oraz helisę III bezpośrednio oddziałuje z Hsp70. [82, 83] Pomimo tego, że domena J jest zakonserwowana między organizmami, reszty tworzące interfejs Hsp40/Hsp70 są zmienne i koewoluowały [84], co w niektórych przypadkach umożliwia działanie białek J, mimo mutacji w obrębie motywu HPD. [85]

Białka J dzieli się na trzy klasy, a ta klasyfikacja opiera się na podobieństwie względem DnaJ, pierwszego białka z tej rodziny opisanego w literaturze. W budowie białek J klasy A można wyróżnić: N-terminalną domenę J, region G/F bogaty w reszty glicyny i fenyloalaniny oraz dwie C-terminalne, β -beczkowe domeny (CTD I i II; Rysunek 1.4.1 B). [80] W obrębie CTD I znajdują się z kolei cztery powtórzenia motywu palca cynkowego, Cys-X-X-Cys-X-Gly-X-Gly. Wyłączając obecność motywu palca cynkowego, białka J klasy B mają identyczną budowę, co białka J klasy A. Ponadto, wszystkie białka klasy A oraz część białek klasy B tworzą homodimery poprzez krótką domenę dimeryzacyjną zlokalizowaną na końcu CTD II. [69, 86]



Rysunek 1.4.1: (A) Budowa domeny J. Aminokwasy należące do zakonserwowanego motywu HPD zostały przedstawione kolorem niebieskim. (B) Budowa białek J klasy A i B – Ydj1 oraz Sis1 pochodzących z *S. cerevisiae*. Oznaczenia: JD – domena J, GF – region G/F, Zn – motyw palca cynkowego, CTD – C-terminalna domena, DD – domena dimeryzacyjna. Zaadaptowano z [69].

Początkowo pozostałe białka J, które nie posiadały w swojej budowie regionu G/F zostały zgrupowane w klasę C, obejmującą obecnie wszystkie białka J nienależące do klasy A lub B. [86] Klasa

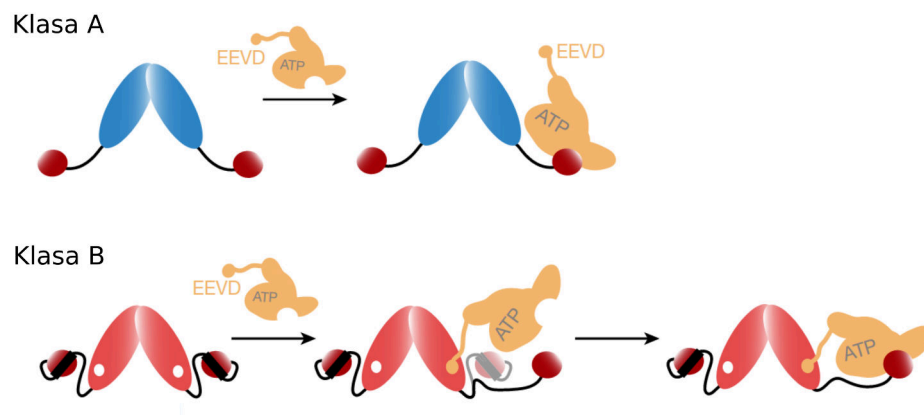
C stanowi zatem najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną pod względem strukturalnym klasę białek J, a ich jedyną cechą wspólną jest obecność domeny J, która może znajdować się w dowolnym miejscu w ich sekwencji. Ten stosunkowo arbitralny podział nie uwzględnia zatem biochemicznych funkcji czy też mechanizmu działania białek, choć badania z użyciem uczenia maszynowego wykazały słuszność podziału na klasy A i B na tle ewolucyjnym. [87, 88, 89]

Liczba genów kodujących białka J jest charakterystyczna dla danego organizmu i koreluje z ogólną złożonością genomu. [86, 90] Ogromna różnorodność dodatkowych domen obecnych w sekwencjach białek J, jak np. układ tioredoksynowy, domena kinazowa czy region wiążący klatrynę, umożliwia im oddziaływanie z licznymi substratami i zaangażowanie Hsp70 w kluczowe procesy komórkowe. Zróżnicowane sekwencje sygnałowe powodują natomiast, że białka J obecne są w różnych częściach komórki: jądrze, retikulum endoplazmatycznym, mitochondriach czy cytozolu. [69, 86] Białka J są zdolne do rozpoznawania rozwiniętych, źle sfałdowanych lub zagregowanych substratów i rzadko wykazują specyficzność – do tych ściśle wyspecjalizowanych wyjątków należą m.in. Hsc20, uczestniczące w przenoszeniu centrów żelazowo-siarkowych [91] czy auksylina, zaangażowana w rozpad płaszczka klatrynowego. [92] Część Hsp40 zaangażowana jest również w funkcje niezależne od Hsp70, takie jak kontrolowanie homeostazy wapnia czy rozpad spliceosomu podczas wycinania intronów. [93, 94]

1.4.1 Mechanizm autoinhibicji białek J klasy B

Przez długi czas region G/F był uważany za nieustrukturyzowany łącznik o nieznannej funkcji, choć postulowano jego udział w modulowaniu zdolności Hsp70 do wiązania substratów i stymulacji aktywności ATP-azowej DnaK. [71, 95, 96, 97] Niemniej, w przypadku białek J klasy B, niedawne badania wskazują na jego funkcję autoinhibycyjną, nieobecną u innych klas białek J (Rysunek 1.4.2). [98]

W białkach J klasy B ok. 15 aminokwasów regionu G/F tworzy krótką α -helisę (helisę V), która jest zadokowana na powierzchni helis II i III domeny J, blokując tym samym miejsce wiązania Hsp70. Oddysocjowanie domeny J od helisy V następuje dopiero po związaniu przez CTD I nieuporządkowanego C-końca Hsp70 zawierającego motyw EEVD. [98] Pomimo tego, że hydrofobowa kieszeń w obrębie domeny CTD I może służyć jako miejsce wiązania białkowych substratów [99, 100], oddysocjowanie helisy V jest niezależne od wiązania substratu, a sam region G/F nie oddziałuje bezpośrednio z Hsp70. [98] Wykazano również, że usunięcie motywu EEVD z sekwencji Hsp70 uniemożliwia jego oddziaływanie z białkiem J typu B, natomiast brak motywu EEVD nie wpływa na oddziaływanie między Hsp70 a białkiem J typu A. [98] Choć pozornie taki sposób regulacji uwalniania domeny J nie oferuje żadnej funkcjonalnej korzyści względem działania białek klasy A, jest on



Rysunek 1.4.2: Mechanizm autoinhibicji białek J klasy B. Zapożyczono z [98].

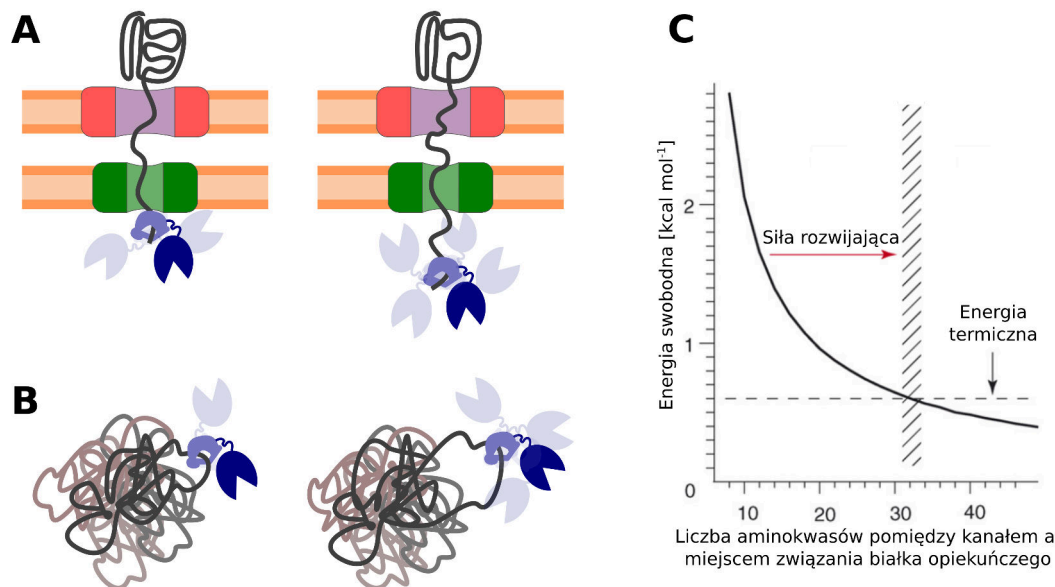
kluczowy w procesie dezagregacji włókien amyloidowych, do którego zdolne są tylko białka klasy B. [101, 102, 103]

1.5 Entropowe szarpanie

Niezależnie od tego, czy Hsp70 biorą udział w rozwijaniu źle zwiniętego białka, uwalnianiu monomerów z agregatu białkowego lub transporcie białek przez błonę, sposób ich działania jest jednaki i określany jest jako „entropowe szarpanie” (ang. *entropic pulling*, EP). [104, 105] Mechanizm ten można prześledzić na przykładzie translokacji białek przez błonę mitochondrialną.

W macierzy mitochondrialnej Hsp70 i Hsp40 są zakotwiczone do błonowego kanału, a fragment polipeptydowy stopniowo przechodzi przez translokazy zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej. Gdy w matriks znajdzie się fragment mogący związać się z Hsp70, następuje utworzenie kompleksu Hsp70 z białkowym substratem. Wówczas znajdująca się w pobliżu domena J stymuluje hydrolizę ATP w obrębie Hsp70, stabilizując powstały kompleks Hsp70-substrat, który odłącza się od powierzchni błony (Rysunek 1.5.1 A).

Wyłaniający się fragment polipeptydowy może przyjmować różne konformacje, a związanie dużego objętościowo Hsp70, który pełni funkcję zawady sterycznej, skutkuje utratą jego swobody konformacyjnej. Samorzutne dążenie układu do zwiększenia entropii jest źródłem szarpającej siły, która – działając na polipeptyd – powoduje jego wymuszone przejście przez kanał błonowy. Mechanizm EP indukuje średnią siłę rzędu 10–20 pN, która jest największa po związaniu polipeptydu przy powierzchni błony i maleje odwrotnie proporcjonalnie do liczby aminokwasów pomiędzy miejscem związania białka opiekuńczego a kanałem błonowym (Rysunek 1.5.1 C). Powstający w ten sposób gradient energii swobodnej jest w stanie zapewnić przejście przez błonę ok. 30 reszt aminokwasowych zanim stanie się zaniedbywalny (< 0.6 kcal/mol). Co ciekawe, transportowane białka posiadają



Rysunek 1.5.1: (A,B) Schematyczne przedstawienie mechanizmu entropowego szarpania. Dążenie do zwiększenia swobody konformacyjnej Hsp70 powoduje transport polipeptydu przez kanały błonowe lub uwalnianie monomeru i rozluźnianie struktury agregatu białkowego. Półprzezroczyste kształty obrazują konformacje, jakie może przyjmować Hsp70. (C) Zależność siły generowanej przez EP w zależności od liczby reszt aminokwasowych pomiędzy kanałem błonowym a miejscem związania białka opiekuńczego. Zaadaptowano z [104, 105]

w swojej sekwencji fragment rozpoznawany przez Hsp70 średnio co 35–40 reszt aminokwasowych. [51] W ten sposób kolejne białko Hsp70 może związać się do transportowanego polipeptydu zaraz przed tym jak pierwsze Hsp70 całkowicie wykorzysta swój „szarpiący” potencjał. Dzięki temu EP może w ciągły sposób zapewnić siłę potrzebną do rozwinięcia całego polipeptydu po stronie cytoplazmy i przeniesienia go do macierzy mitochondrialnej.

W analogiczny sposób działa Hsp70 związane do eksponowanych hydrofobowych fragmentów na powierzchni agregatów (Rysunek 1.5.1 B). W celu zwiększenia swobody konformacyjnej, Hsp70 wyszarpuje związany monomer, rozluźniając strukturę agregatu. Postępujące lokalne rozwijanie białka umożliwia stopniową dezagregację, a uwolnione monomery po dysocjacji Hsp70 mają szansę na przyjęcie natywnej struktury. Warto zaznaczyć, że w przypadku źle zwiniętego białkowego monomeru kilka równocześnie związanych Hsp70 potęguje efekt zawady sterycznej i zwiększa efektywność działania EP. [106]

1.6 Białka DnaK i DnaJ

Bakteryjne białka *E. coli* – DnaK i DnaJ – stanowią najlepiej poznany kompleks Hsp70-Hsp40. Dysponując szeregiem danych biochemicznych i strukturalnych dla tego kompleksu można dostrzec

allosteryczny charakter aktywacji Hsp70: zarówno miejsce związania białka J, które znajduje się na interfejsie NBD-SBD β , jak i kieszeń wiążąca substrat zlokalizowane są w znacznej odległości od kieszeni wiążącej nukleotyd (Rysunek 1.6.1).

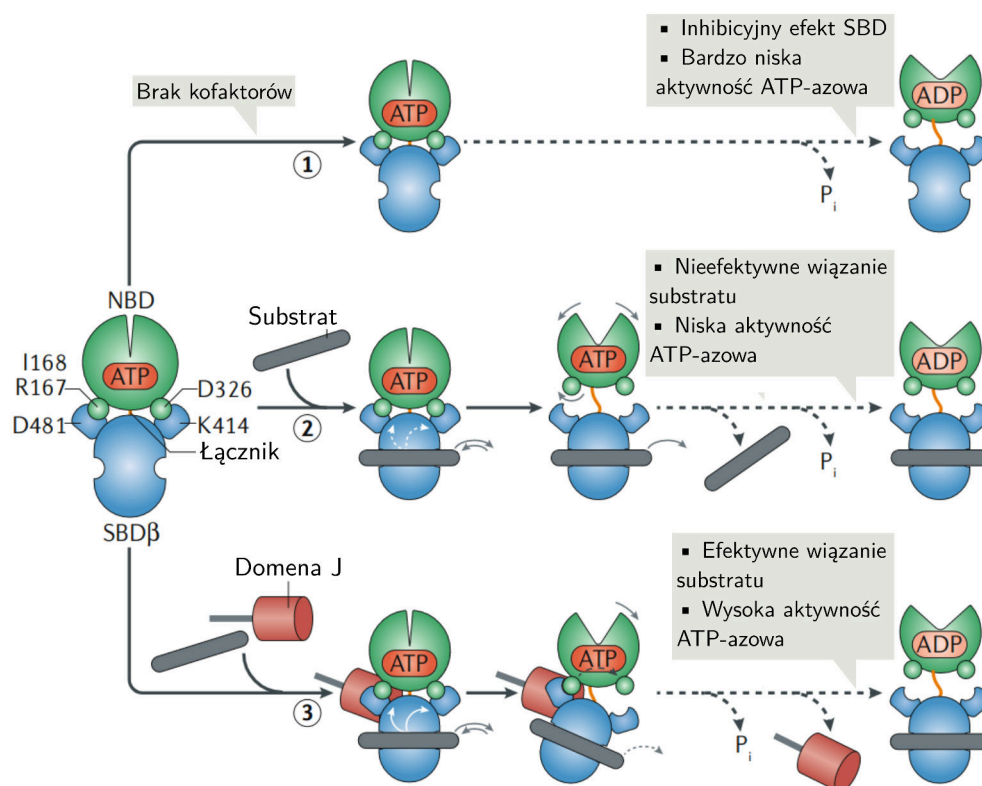


Rysunek 1.6.1: DnaK w kompleksie z domeną J DnaJ na podstawie struktury 5NRO z bazy PDB. [83] NBD została przedstawiona kolorem niebieskim, SBD α – kolorem zielonym, SBD β – kolorem pomarańczowym, a domena J – kolorem czarnym.

Pomimo rozległych badań prowadzonych w tym obszarze, mechanizm tej aktywacji na poziomie molekularnym nadal pozostaje niewyjaśniony. Dzięki mutacjom punktowym udało się jednak zidentyfikować liczne reszty aminokwasowe zaangażowane w stymulowanie aktywności ATP-azowej DnaK. [67, 68, 107, 108, 109]

W oczywisty sposób ważną rolę w transmisji sygnału allosterycznego między SBD a NBD pełni międzydomenowy łącznik (reszty Val386–Asp393). Modyfikacje wprowadzane w obrębie silnie zakonserwowanego motywu VLLL łącznika (reszty 389-392) całkowicie uniemożliwiały komunikację między NBD i SBD, zarówno jeśli chodzi o stymulowanie hydrolizy po związaniu substratu lub DnaJ, jak również uwalnianie substratu po związaniu ATP. [70] Co więcej, konstrukt DnaK (reszty 1–393) cechuje się blisko 40-krotnie większą aktywnością ATP-azową niż izolowane NBD (reszty 1–385), co podkreśla rolę oddziaływań NBD-łącznik w stymulowaniu hydrolizy. [67]

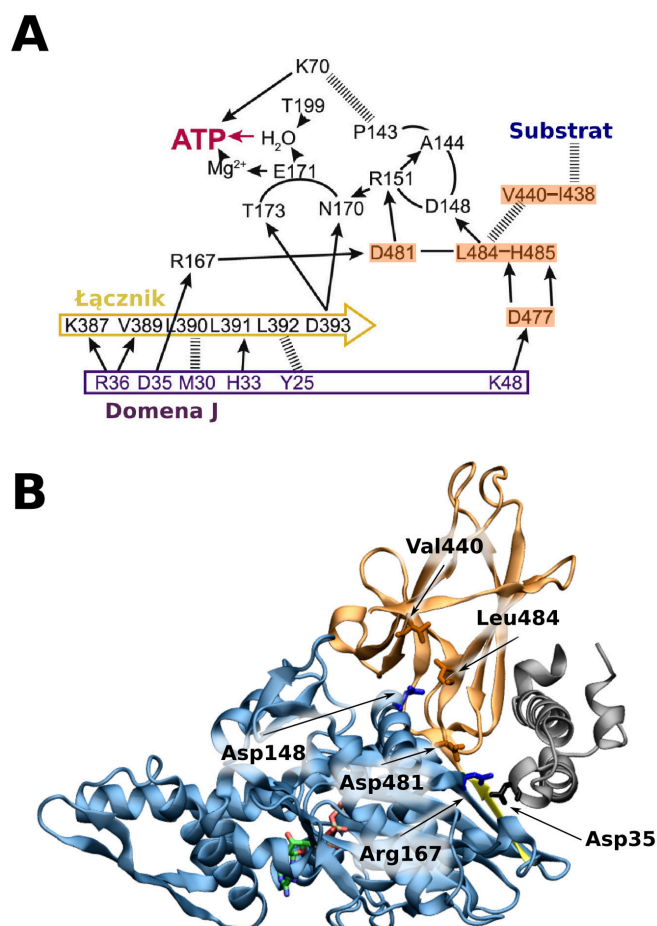
Porównując struktury Hsp70 z ATP i ADP, Kityk i współpracownicy zauważyli, że towarzysząca związaniu ATP rotacja płatów NBD względem siebie umożliwia zadokowanie SBD β na powierzchni NBD. [110] Powoduje to przyjęcie przez DnaK konformacji, która nie sprzyja hydrolizie ATP, a która to stabilizowana jest przez oddziaływania reszt SBD β (Asp481, Lys414) z resztami NBD (Arg151, Ile168, Asp326). Przy braku efektorów allosterycznych, SBD β jest w stanie sporadycznie oddysocjować od NBD, umożliwiając rotację płatów NBD, co odpowiada za niską bazową aktywność ATP-azową DnaK (Rysunek 1.6.2, "1"). Dysocjację domen ułatwiały natomiast mutacje alaninowe reszt Lys414 i Asp481: zwiększały one aktywność ATP-azową DnaK odpowiednio 25- i 80-krotnie.



Rysunek 1.6.2: Proponowany mechanizm aktywacji DnaK. Zaadaptowano z [38].

Obecność substratu stymuluje oddysocjowanie SBDβ od NBD, co podwyższa aktywność ATP-azową DnaK (2–5 krotnie). Niemniej międzydomenowy łącznik często wyslizguje się z rowka NBD, co nie sprzyja utrzymaniu wzajemnego położenia płatów NBD optymalnego do hydrolizy ATP i może skutkować niepożądaną dysocjacją substratu (Rysunek 1.6.2, "2"). Aktywność zaprojektowanych przez badaczy zmutowanych wariantów DnaK sugerowałyby natomiast, że w stymulowanie hydrolizy ATP w obecności substratu zaangażowane są reszty Val440, Leu484 oraz Asp148. [110] Mutanty V440A, L484A i D148A potrafiły bowiem przenosić sygnał z NBD do SBD (uwolnienie substratu na skutek związania ATP), natomiast nie propagowały sygnału z SBD do NBD (stymulowanie hydrolizy po związaniu substratu; hydroliza w tych wariantach DnaK nadal mogła być stymulowana domeną J). Ta obserwacja przemawiała zatem za istnieniem dwóch różnych ścieżek sygnałowych w obrębie białka i w naturalny sposób rodziła pytanie o istnienie mutacji DnaK, które wykazywałyby odwrotne zachowanie. Poszukiwaną mutacją okazała się mutacja reszty Phe146, zlokalizowanej na pętli koordynującej ATP. Pomimo tego, że Phe146 nie współtworzy interfejsu NBD-SBDβ, prawdopodobnie odpowiada ona za sprzężenie wiązania ATP z rotacją I płata NBD, umożliwiając przyjęcie geometrii sprzyjającej zadokowaniu SBDβ. [110]

Związanie domeny J wzmacnia stymulowaną przez substrat dysocjację SBD β i jednocześnie zapewnia utrzymanie łącznika w rowku NBD – pozwala to na rotację płatów NBD, która zapewnia konformację kompetentną do hydrolizy ATP i prowadzi do efektywnego związania substratu (Rysunek 1.6.2, "3"). Domena J pozycjonuje się na interfejsie NBD-SBD β dzięki hydrofobowym i polarnym oddziaływaniom, wśród których znajdują się wiązania wodorowe tworzone przez reszty motywu HPD, His33 i Asp35 z, odpowiednio, Leu391 międzydomenowego łącznika i Arg167 NBD. Pod nieobecność DnaJ, Arg167 tworzy mostki solne z dwiema resztami: Asp393 (łącznik) i Asp481 (SBD β), a wymiana tej reszty na alaninę powoduje, że wariant DnaK R167A hydrolizuje ATP z podobną szybkością jak dziki szczep DnaK stymulowany przez DnaJ i substrat. [47, 84] Przemieszczenie arginyiny powinno zatem w istotny sposób wpływać na koordynowanie cyklu katalitycznego DnaK. Otrzymana struktura krystaliczna DnaK ze związaną domeną J pozwoliła na zaproponowanie przez grupę badawczą Mayera ścieżek allosterycznych w obrębie kompleksu (Rysunek 1.6.3 A). [83]

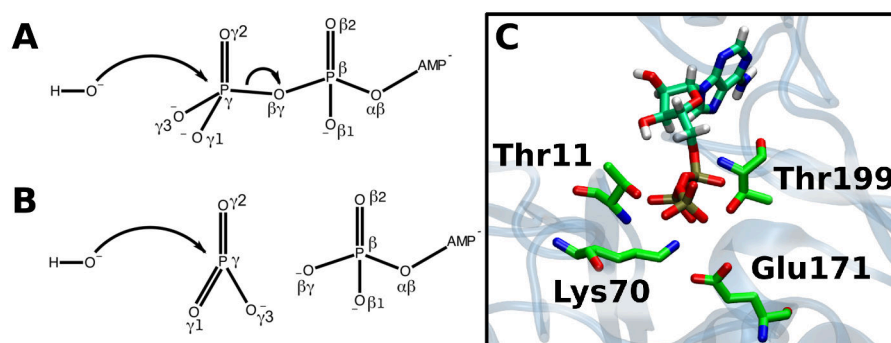


Rysunek 1.6.3: (A) Sieć polarnych i niepolarnych kontaktów między domeną J a DnaK. Strzałki odpowiadają polarnym oddziaływaniom, a przerywane linie – kontaktom hydrofobowym. Zapożyczono z [83]. (B) Struktura kompleksu DnaK-domena J [83] z zaznaczonymi wybranymi resztami pojawiającymi się na górnym panelu.

Taka sieć kontaktów umożliwiałaby pośrednie oddziaływanie reszt motywu HPD na reszty zlokalizowane w wiążącej NBD (Lys70, Glu171) oraz sprzęganie przez domenę J sygnałów inicjujących hydrolizę i wiązanie substratu. Ze względu na to, że mutacje w obrębie motywu HPD skrajnie obniżają zdolność DnaJ do stymulowania DnaK, podejrzewa się, że to właśnie te oddziaływania odgrywają pierwszorzędą rolę w przekazywaniu sygnału allosterycznego. Niemniej, najnowsze badania nad drożdżowym kompleksem Hsp70-Hsp40 pokazały, że mutacje alaninowe w obrębie motywu HPD nie powodują całkowitej utraty zdolności białka J do stymulowania Hsp70, co podważa obecny stan wiedzy dotyczący allosterycznej aktywacji Hsp70 przez białka J. [85]

1.6.1 Hydroliza ATP przez DnaK

Centralną rolę w procesie hydrolizy ATP przez DnaK odgrywa reszta Thr199. Mutacja Thr199Ala jest rutynowo stosowana w badaniach krystalograficznych do ustalenia struktury białka ze związanym ATP, ponieważ powoduje ona znaczne zahamowanie hydrolizy ATP, nie wpływając przy tym na zmiany konformacyjne białka. [111] Niemniej, stosowanie tej mutacji powoduje, że dokładny opis organizacji kieszeni wiążącej ATP i co za tym idzie, mechanizm hydrolizy jest niejasny. Zamiana treoniny na serynę nie wiąże się z drastycznym spadkiem aktywności ATP-azowej [111], co może sugerować istotną rolę grupy hydroksylowej łańcucha bocznego w koordynowaniu nukleotydu.



Rysunek 1.6.4: Porównanie asocjacyjnego (A) i dysocjacyjnego (B) mechanizmu hydrolizy ATP. W mechanizmie asocjacyjnym nukleofilowy atak jonu hydroksylowego na terminalny fosforan (P_{γ}) zachodzi równocześnie ze zrywaniem wiązania $P_{\gamma}-O_{\beta\gamma}$. Zapożyczono z [112]. (C) Reszty DnaK znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie terminalnego fosforanu ATP.

Zazwyczaj hydroliza ATP w układach biologicznych zachodzi według mechanizmu dysocjacyjnego S_N2 (Rysunek 1.6.4) złożonego z następujących etapów [113]: (i) początkowej dysocjacji terminalnego fosforanu z ATP i utworzeniu ADP oraz anionu metafosforanowego; (ii) utworzeniu hydra-

towanego kompleksu metafosforanu z wodą, który dalej zostaje zdeprotonowany przez białko; (iii) sprotonowaniu powstałego wodorofosforanu przez białko.

Poza Thr199, kluczową resztą w procesie hydrolizy jest Lys70, której mutacja alaninowa hamuje aktywność ATP-azową DnaK i uniemożliwia zajście zmian konformacyjnych związanych z uwolnieniem substratu. [111] Pokazano również, że reszta Glu171 tworząca mostek solny z Lys70, jest niezbędna do sprzęgania aktywności ATP-azowej z wiązaniem i uwalnianiem substratu. Pomimo tego, że warianty E171A, E171L oraz E171K DnaK były w stanie hydrolizować ATP, to nie były one funkcjonalne *in vivo*. [114]

2 Cele i zakres pracy

Allosteryczny charakter aktywacji Hsp70 był wielokrotnie udowodniony, jednak jej mechanizm na poziomie molekularnym pozostaje niewyjaśniony, mimo rozległych badań prowadzonych w tym obszarze. W ramach niniejszej dysertacji planuję opisać z rozdzielczością atomową mechanizmy allosterycznej komunikacji wewnątrz białek Hsp70 oraz z ich partnerami wiązania: substratem i współopiekuńczym białkiem J. Zamierzam skupić się na przykładzie pary białek DnaK i DnaJ, które stanowią najlepiej poznany kompleks Hsp70-białko J, posługując się przy tym pełnoatomowymi symulacjami Dynamiki Molekularnej (MD), wspieranymi przez metody wzmocnionego próbkowania. W szczególności, moje badania mają na celu opisanie mechanizmu aktywacji Hsp70, która prowadzi do przyjęcia przez białko konformacji kompetentnej do hydrolizy ATP. Ten nadrzędny cel podzieliłem na trzy zadania szczegółowe, skupiające się na zmianach konformacyjnych odpowiadających różnym etapom cyklu katalitycznego Hsp70.

1. Opis zmian konformacyjnych indukowanych hydrolizą ATP.

Hydroliza ATP w DnaK powoduje zmiany w ułożeniu interfejsu SBD β -NBD, prowadząc do odłączenia się jednej domeny od drugiej w obecności ADP. W pierwszej części szczegółowo scharakteryzuję stany NBD przed i po hydrolizie, uwzględniając opis trwałych wewnątrzdomenowych kontaktów właściwych każdemu ze stanów. Następnie opiszę jak obsadzenie NBD wpływa na powinowactwo obu domen. Ponadto, analizując interfejs SBD β -NBD, planuję zidentyfikować reszty aminokwasowe, które mają największy wkład w koordynowanie dysocjacji SBD β pod wpływem hydrolizy ATP.

2. Opis zmian konformacyjnych indukowanych związaniem domeny J.

Związanie domeny J przez DnaK stymuluje hydrolizę ATP w kieszeni wiążącej NBD. W tej części badań planuję opisać cechy aktywnego stanu DnaK, ze szczególnym uwzględnieniem roli reszty Thr199, która umożliwia hydrolizę nukleotydu. Następnie zbadam jak obecność domeny J wpływa na przebieg profili energii swobodnej związanych ze zidentyfikowanymi zmianami konformacyjnymi. Co więcej, wobec doniesień o tym, że niektóre mutacje w obrębie silnie zakonserwowanego motywu HPD domeny J nie powodują całkowitej utraty zdolności białek J do stymulowania Hsp70, zamierzam dokładnie określić rolę poszczególnych aminokwasów tego motywu w procesie wiązania domeny J do NBD i aktywacji DnaK.

3. Opis zmian konformacyjnych indukowanych obecnością substratu w SBD.

Aktywność ATP-azowa Hsp70 może być stymulowana, choć w mniejszym stopniu, również przez

samo związanie białkowego substratu. W tej części badań spróbuje wyjaśnić w jaki sposób obsadzenie SBD wpływa na możliwość przyjmowania stanu stymulowanego przez DnaK. Korzystając z wniosków z poprzedniego punktu, porównam czy stymulacja DnaK przez substrat wykazuje te same cechy charakterystyczne, co stymulacja przez domenę J. Na koniec przyjrę się także temu, jak obecność czynników allosterycznych wpływa na zmiany konformacyjne SBD α .

W każdym przypadku uzyskane wyniki skonfrontuję z danymi biochemicznymi, wskazującymi na liczne mutacje punktowe, które zaburzają aktywność Hsp70. Opublikowane w ostatnich latach struktury DnaK w kompleksie z domeną J bądź peptydem stanowią doskonały punkt wyjścia do przeprowadzenia badań metodami MD, które umożliwiają opis dynamicznego zachowania białek. Dzięki silnie zakonserwowanej sekwencji, bakteryjne Hsp70 stanowią uniwersalny model do badania podstaw aktywności innych białek z tej rodziny, w tym także ludzkich Hsp70. Ze względu na zaangażowanie w liczne ścieżki komunikacji komórkowej, Hsp70 stają się atrakcyjnym celem terapeutycznym w leczeniu nowotworów czy chorób neurodegeneracyjnych. [115, 116] Szczegółowy opis aktywności Hsp70, którego się podejmuje, może być zatem przydatny przy projektowaniu allosterycznych leków modulujących działanie tej grupy białek.

3 Metodyka badań

3.1 Wprowadzenie do termodynamiki statystycznej

3.1.1 Rozkład Boltzmana

Termodynamika statystyczna operuje prawdopodobieństwem w celu scharakteryzowania własności układu, takich jak jego entropia czy energia swobodna. W celu scharakteryzowania kryteriów warunkujących obsadzenie poszczególnych mikrostanów pomocne będzie zdefiniowanie funkcji obsadzeń, W , która mówi nam o liczbie możliwości zrealizowania konkretnego obsadzenia k różnych mikrostanów w zespole $\mathcal{N}$ układów (liczba kombinacji bez powtórzeń):

$$W(\mathcal{N}_1, \mathcal{N}_2, \dots, \mathcal{N}_k) = \binom{\mathcal{N}}{\mathcal{N}_1} \binom{\mathcal{N} - \mathcal{N}_1}{\mathcal{N}_2} \dots \binom{\mathcal{N} - \sum_{i=1}^{k-1} \mathcal{N}_i}{\mathcal{N}_k} = \frac{\mathcal{N}!}{\prod_{i=1}^k \mathcal{N}_i!}, \quad (3.1.1)$$

gdzie zmienne $\mathcal{N}_i$ oznaczają liczby obsadzeń poszczególnych mikrostanów, sumujące się do całkowitej liczby układów $\sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i = \mathcal{N}$. Zakładając, że układ znajduje się w równowadze termicznej z otoczeniem, można zapisać spełnianie przez niego warunku stałej średniej energii jako: $E = \sum_{i=1}^k \varepsilon_i \mathcal{N}_i$, gdzie ε_i oznacza energię i -tego mikrostanu. Ze względów praktycznych, zamiast funkcji W można rozpatrywać jej logarytm naturalny (który jest monotoniczny) i zastosować przybliżenie Stirlinga:

$$\ln(W) = \ln(\mathcal{N}!) - \sum_{i=1}^k \ln(\mathcal{N}_i!) = \sum_{i=1}^{\mathcal{N}} \ln(\mathcal{N}_i) - \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{\mathcal{N}_i} \ln(\mathcal{N}_i) \simeq \int_1^{\mathcal{N}} \ln(x) dx - \sum_{i=1}^k \int_1^{\mathcal{N}_i} \ln(x) dx \quad (3.1.2)$$

$$\ln(W) \simeq \mathcal{N}(\ln(\mathcal{N}) - 1) - \sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i(\ln(\mathcal{N}_i) - 1) \quad (3.1.3)$$

Chcąc znaleźć najbardziej prawdopodobny rozkład, który będzie determinował właściwości układu, konieczne jest znalezienie takiej konfiguracji, dla której funkcja $\ln(W)$ będzie osiągała maksimum. Ekstremum spełniające warunki zadane na $\mathcal{N}$ oraz E można wyznaczyć stosując metodę mnożników Lagrange'a, gdzie α i β są nieoznaczonymi współczynnikami wprowadzonymi w celu uwzględnienia narzuconych warunków:

$$\begin{aligned} G &= \mathcal{N} \cdot \ln(\mathcal{N}) - \mathcal{N} - \sum_{i=1}^k (\mathcal{N}_i \cdot \ln(\mathcal{N}_i) - \mathcal{N}_i) + \alpha \sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i + \beta \sum_{i=1}^k \varepsilon_i \mathcal{N}_i \\ G &= \mathcal{N} \cdot \ln(\mathcal{N}) - \mathcal{N} - \sum_{i=1}^k (\mathcal{N}_i \cdot \ln(\mathcal{N}_i) - \mathcal{N}_i + \alpha \cdot \mathcal{N}_i + \beta \cdot \varepsilon_i \mathcal{N}_i) \end{aligned} \quad (3.1.4)$$

Zgodnie z warunkiem $dG = 0$, po zróżniczkowaniu obu stron równania i uporządkowaniu wyrazów podobnych otrzymuje się wyrażenie:

$$dG = \sum_{i=1}^k d\mathcal{N}_i (\ln(\mathcal{N}_i) - \alpha - \beta \cdot \varepsilon_i) = 0 = \frac{\partial G}{\partial \mathcal{N}_1} \cdot d\mathcal{N}_1 + \dots + \frac{\partial G}{\partial \mathcal{N}_k} \cdot d\mathcal{N}_k, \quad (3.1.5)$$

które sprowadza się do pojedynczego równania:

$$\frac{\partial G}{\partial \mathcal{N}_i} = \ln(\mathcal{N}_i) - \alpha - \beta \cdot \varepsilon_i = 0 \quad (3.1.6)$$

Obsadzenie i -tego mikrostanu równe jest zatem:

$$\mathcal{N}_i = \exp(\alpha + \beta \cdot \varepsilon_i) \quad (3.1.7)$$

Przy dokładnej analizie wyniku można dostrzec, że czynnik $\exp(\alpha)$ odpowiada za unormowanie prawdopodobieństwa, tj. spełnienia warunku $\sum_i^k p_i = 1$. Wartość parametru β można z kolei otrzymać korzystając z zerowej zasady termodynamiki, co ostatecznie prowadzi do zależności:

$$p_i \propto \exp\left(-\frac{1}{k_B T} \cdot \varepsilon_i\right), \quad (3.1.8)$$

gdzie p_i oznacza prawdopodobieństwo obsadzenia i -tego mikrostanu w stanie równowagi termicznej w temperaturze T , a k_B – stałą Boltzmanna. Otrzymana relacja pomiędzy prawdopodobieństwem obsadzenia mikrostanu a jego energią nosi nazwę rozkładu Boltzmanna i stanowi fundament mechaniki statystycznej.

3.1.2 Entropia

Zdefiniowaną wcześniej funkcję W można powiązać z miarą nieuporządkowania, czyli z entropią:

$$S(N, V, E) = k_B \ln W(N, V, E), \quad (3.1.9)$$

gdzie wielkości N , V i E oznaczają stałą liczbę cząstek, objętość oraz energię całkowitą w układzie (zespół mikrokanoniczny). Korzystając z zależności (3.1.3) można zapisać wzór na entropię $\mathcal{N}$ układów:

$$\begin{aligned}
S &= k_B [\mathcal{N}(\ln(\mathcal{N}) - 1) - \sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i(\ln(\mathcal{N}_i) - 1)] \\
S &= k_B [\mathcal{N} \ln(\mathcal{N}) - \mathcal{N} - \sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i \ln(\mathcal{N}_i) + \sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i] = k_B [\mathcal{N} \ln(\mathcal{N}) - \sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i \ln(\mathcal{N}_i)] \\
S &= k_B [\sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i \ln(\mathcal{N}) - \sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i \ln(\mathcal{N}_i)] = -k_B \sum_{i=1}^k \mathcal{N}_i \ln\left(\frac{\mathcal{N}_i}{\mathcal{N}}\right)
\end{aligned} \tag{3.1.10}$$

Pojedynczy układ będzie z kolei charakteryzował się entropią równą:

$$S = -k_B \sum_{i=1}^k \frac{\mathcal{N}_i}{\mathcal{N}} \ln\left(\frac{\mathcal{N}_i}{\mathcal{N}}\right) = -k_B \sum_{i=1}^k p_i \ln(p_i) \tag{3.1.11}$$

Zgodnie z drugą zasadą termodynamiki, warunek maksymalizacji entropii może posłużyć do wyznaczenia rozkładów prawdopodobieństwa wystąpienia poszczególnych stanów w układach o innych zadanych parametrach (jak np. zespół izobaryczno-izotermiczny, NPT).

3.1.3 Średnie po zespole

Hamiltonian, $H(\mathbf{r}, \mathbf{p})$, określający całkowitą energię układu można zapisać jako:

$$H(\mathbf{r}, \mathbf{p}) = V(\mathbf{r}) + \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i}, \tag{3.1.12}$$

gdzie $3N$ -wymiarowe wektory $\mathbf{r}$ oraz $\mathbf{p}$ reprezentują położenia oraz pędy wszystkich cząstek w układzie i razem tworzą przestrzeń fazową. Znormalizowane prawdopodobieństwo $\pi(\mathbf{r}, \mathbf{p})$ znalezienia się układu w stanie określonym przez położenia $\mathbf{r}$ i pędy $\mathbf{p}$ jest proporcjonalne do czynnika boltzmannowskiego i dla zespołu kanonicznego wynosi:

$$\pi(\mathbf{r}, \mathbf{p}) = \frac{\exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]} = \frac{\exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{h^{3N} N! \cdot Q(N, V, T)} \tag{3.1.13}$$

Współczynnik β równy jest $(k_B T)^{-1}$, a wielkość Q obecna we wzorze (3.1.13) to tzw. suma statystyczna, która dana jest równaniem:

$$Q(N, V, T) = \frac{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{h^{3N} N!}, \tag{3.1.14}$$

w przypadku gdy N atomów w układzie jest nierozróżnialnych – w przeciwnym wypadku w mianowniku nie pojawia się czynnik $N!$. Dla zespołu izobaryczno-izotermicznego to prawdopodobieństwo wynosi:

$$\pi(\mathbf{r}, \mathbf{p}) = \frac{\int_0^\infty dV \exp[-\beta(H(\mathbf{r}, \mathbf{p}) + PV)]}{h^{3N} N! \cdot Q(N, P, T)} \quad (3.1.15)$$

$$Q(N, P, T) = \frac{\int_0^\infty dV \int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} \exp[-\beta(H(\mathbf{r}, \mathbf{p}) + PV)]}{h^{3N} N!} \quad (3.1.16)$$

Zależności te umożliwiają obliczenie średniej po zespole obserwowanej wielkości makroskopowej $q(\mathbf{r}, \mathbf{p})$, która jest definiowanej jako:

$$\langle q(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \rangle \equiv \int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} q(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \pi(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \quad (3.1.17)$$

Ponadto, możliwe jest zdefiniowanie wszystkich funkcji termodynamicznych układu jako funkcji Q , w szczególności energii swobodnej F i entalpii swobodnej G :

$$\begin{aligned} F &= -k_B T \ln Q(N, V, T), \\ G &= -k_B T \ln Q(N, P, T) \end{aligned} \quad (3.1.18)$$

3.2 Równanie Schrödingera

Podstawowym równaniem ruchu w mechanice kwantowej jest zależne od czasu równanie Schrödingera:

$$H\Psi(\mathbf{r}, t) = -i\frac{h}{2\pi} \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\mathbf{r}, t), \quad (3.2.1)$$

gdzie $\Psi(\mathbf{r}, t)$ oznacza zależną od położenia cząstek $\mathbf{r}$ i czasu t funkcję falową układu. Niemniej, gdy operator Hamiltona nie zależy jawnie od czasu, równanie (3.2.1) przyjmuje postać:

$$H\Psi_i(\mathbf{r}) = E_i\Psi_i(\mathbf{r}), \quad (3.2.2)$$

a jego rozwiązanie sprowadza się do wyznaczenia wartości własnych (tożsamy z energiami E_i poszczególnych stanów stacjonarnych) i odpowiadających im funkcji własnych Ψ_i . Niestety – poza najprostszyimi przypadkami, takimi jak atomy wodoropodobne – ścisłe rozwiązanie tego równania nie jest możliwe i konieczne jest zastosowanie rozwiązań przybliżonych.

Ze względu na to, że masa jąder atomowych jest znacznie większa od masy elektronów, można przyjąć, że elektrony są zwykle w stanie nieskończenie szybko dopasować się do zmian położenia jąder atomowych. W takim wypadku elektronowa funkcja falowa zależy tylko od położenia jąder, a nie

od ich pędów. Takie podejście, znane jako przybliżenie adiabatyczne, pozwala zapisać funkcję falową $\Psi(\mathbf{r})$ jako iloczyn funkcji falowych jąder i elektronów, $\Psi(\mathbf{r}) \approx \psi_{nucl}(\mathbf{r}_{nucl}) \cdot \psi_{el}(\mathbf{r}_{el}; \mathbf{r}_{nucl})$, gdzie drugi człon zależy jedynie parametrycznie od położenia jąder. Przyjmując określoną konfigurację jąder, funkcja $\psi_{el}(\mathbf{r}_{el}; \mathbf{r}_{nucl})$ stanowi rozwiązanie elektronowego równania Schrödingera:

$$H_{el}\psi_{el,i}(\mathbf{r}_{el}; \mathbf{r}_{nucl}) = E_{el,i}(\mathbf{r}_{nucl})\psi_{el,i}(\mathbf{r}_{el}; \mathbf{r}_{nucl}), \quad (3.2.3)$$

gdzie na zmodyfikowany operator Hamiltona H_{el} składa się operator energii kinetycznej elektronów oraz operatory wszystkich możliwych oddziaływań elektrostatycznych: pomiędzy elektronami, między elektronami i jądrami oraz pomiędzy jądrami (dla konkretnego $\mathbf{r}_{nucl}$ jest to stała wartość odpychania między jądrami). Z kolei występująca w powyższym równaniu wielkość $E_{el}(\mathbf{r}_{nucl})$ to energia potencjalna elektronów, zależna od położenia jąder atomowych. Pominięcie tzw. poprawki diagonalnej umożliwia dalej zapisanie równania Schrödingera dla ruchu jąder atomowych:

$$[T_{nucl} + E_{el,i}(\mathbf{r}_{nucl})]\psi_{nucl,i}(\mathbf{r}_{nucl}) = E_i(\mathbf{r}_{nucl})\psi_{nucl,i}(\mathbf{r}_{nucl}), \quad (3.2.4)$$

gdzie T_{nucl} to operator energii kinetycznej jąder. Zgodnie z twierdzeniem Hellmanna-Feynmana, siłę działającą na jądra można zatem wyznaczyć jako wartość oczekiwaną ujemnego gradientu energii elektronowej:

$$\mathbf{F}_k = -\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_{nucl,k}} E_{el,i}(\mathbf{r}_{nucl,1}, \mathbf{r}_{nucl,2}, \dots, \mathbf{r}_{nucl,N}), \quad k = 1, 2, \dots, N \quad (3.2.5)$$

Korzystając z tego faktu i traktując jądra jako punktowe masy można zatem wygenerować ich trajektorię używając klasycznych równań ruchu.

3.3 Dynamika molekularna i pole siłowe

W wariantcie obliczeniowym wykorzystywanym w tej pracy, tj. pełnoatomowej Dynamice Molekularnej (ang. *Molecular Dynamics*, MD), pojedyncze atomy traktuje się jako oddziałujące centra potencjału obdarzone ładunkami oraz masami i spełniające równania Newtona. Rezygnuje się zatem z rozwiązywania równania Schrödingera, a ewolucję czasową układu otrzymuje się poprzez numeryczne całkowanie równań ruchu:

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i}, \quad (3.3.1)$$

gdzie siła działająca na i -ty atom dana jest zależnością:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} V(\mathbf{r}) \quad (3.3.2)$$

Określenie początkowych położeń i prędkości atomów, a także dyskretyzacja operatorów różniczkowych umożliwia wyznaczenie trajektorii układu (przy założeniu, że w dostatecznie krótkim kroku czasowym siły w układzie nie ulegają zmianie).

W Dynamice Molekularnej potencjał $V(\mathbf{r})$ (zwany także "polem siłowym") zastępuje wcześniej wspomnianą energię elektronową $E_{el}(\mathbf{r}_{nucl})$ i jest zbudowany z wkładów o prostej matematycznie postaci, które mają w sposób akceptowalny odwzorowywać kształt $E_{el}(\mathbf{r}_{nucl})$. Wśród nich wyróżnia się wkłady wiążące (V_{bonded}), opisujące lokalną geometrię cząsteczki oraz wkłady niewiążące ($V_{non-bonded}$), które opisują oddziaływania z dalszym otoczeniem atomu. Wkłady wiążące opisują odchylenia od referencyjnych wartości położeń atomów (długości wiązań, kątów płaskich i kątów dwuściennych cząsteczki), w których znajdują się minima energetyczne:

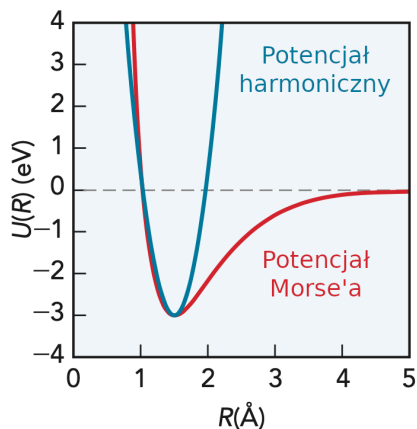
$$V_{bonded}(\mathbf{r}) = \sum_{bonds} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{angles} \frac{k_i}{2} (\phi_i - \phi_{i,0})^2 + \sum_{torsions} \left(\sum_n \frac{v_n}{2} [1 + \cos(n\psi - \gamma)] \right) \quad (3.3.3)$$

Składowe potencjału opisujące odchylenia od optymalnych długości wiązań i kątów płaskich (l_0, ϕ_0) mają najczęściej – zgodnie z prawem Hooke’a – postać funkcji kwadratowej, której krzywna dostosowywana jest przez wartość stałej siłowej k_i . Taki opis sprawdza się dość dobrze dla niewielkich odchyżeń od punktu równowagi, jednak ze względu na swoją formułę matematyczną nie przewiduje zrywania wiązań czy też nie różnicuje siły związanej z ich rozciąganiem i skracaniem. Niedogodności te można ominąć używając do opisu wiązań tzw. potencjału Morse’a (Rysunek 3.3.1):

$$\vartheta = D_e \left[1 - \exp \left(-\omega \sqrt{\frac{\mu}{2D_e}} (l_i - l_{i,0}) \right) \right]^2, \quad (3.3.4)$$

gdzie D_e określa głębokość minimum energii potencjalnej, μ jest masą zredukowaną, a ω – częstotliwością drgania wiązania. Niemniej, ze względu na to, że wymaga on wyznaczenia trzech parametrów dla każdego wiązania, potencjał ten jest rzadko używany w praktyce. Co więcej, znaczne wahania długości wiązań w cząsteczkach są bardzo rzadkie, dlatego w trakcie symulacji zwykle usztywnia się ich długość, co pozwala na zwiększenie wydajności obliczeniowej.

Trzecim wkładem wiążącym jest wkład związany z wartościami kątów dwuściennych w cząsteczce (ψ). Najczęściej energetyka obrotu wokół wiązania jest przedstawiana w postaci szeregu Fouriera, z ustalonymi wartościami barier energetycznych (v) i czynników fazowych (γ). Niekiedy w celu



Rysunek 3.3.1: Porównanie przebiegu potencjału harmonicznego i potencjału Morse'a. Zaadaptowano z [117].

utrzymania kilku atomów w jednej płaszczyźnie wprowadza się do członów wiążących dodatkowy element harmoniczny, odpowiedzialny za tzw. niewłaściwe kąty dwuścienne (ζ). W takim wypadku planarność (np. pierścieni aromatycznych) utrzymywana jest dodatkowo dzięki narzuceniu wartości kąta między dwiema płaszczyznami (ζ_0) równemu zero:

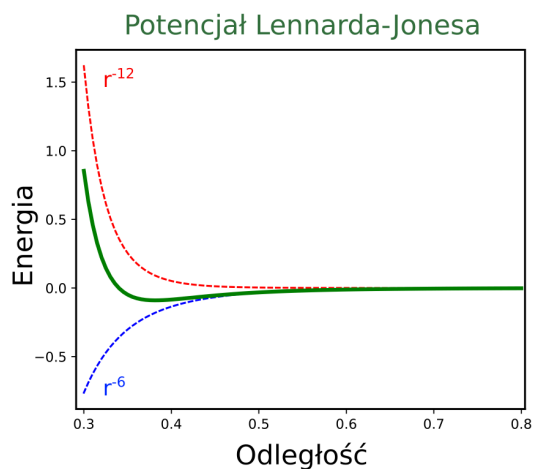
$$\sum_{improper} \frac{k_i}{2} (\zeta_i - \zeta_{i,0})^2 \quad (3.3.5)$$

Człony niewiążące pola siłowego odwzorowują z kolei oddziaływania dyspersyjne związane z wzajemną polaryzacją chmur elektronowych atomów oraz elektrostatyczne przyciąganie się lub odpychanie atomów:

$$V_{non-bonded}(\mathbf{r}) = \sum_i^N \sum_j^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (3.3.6)$$

Pierwszy człon, nazywany potencjałem Lennarda-Jonesa (Rysunek 3.3.2), uwzględnia zarówno przyciąganie się atomów zanjadujących w się w relatywnie niewielkiej odległości od siebie (związane z wzajemną polaryzacją chmur elektronowych), jak też ich wzajemne odpychanie dla bardzo bliskich odległości (wynikające z zakazu Pauliego). Energię takiego oddziaływania opisują parametry odpowiedzialne za głębokość (ϵ) oraz pozycję (σ) minimum energetycznego.

Drugi człon wynika natomiast z prawa Coulomba opisującego oddziaływanie dwóch punktowych ładunków elektrycznych, gdzie q_i i q_j to wartości poszczególnych ładunków, r_{ij} to dzieląca je odległość, a ϵ_0 to przenikalność dielektryczna próżni. Warto zaznaczyć, że to właśnie wyznaczanie oddziaływań niewiążących jest najbardziej kosztownym elementem symulacji MD i zajmuje więk-



Rysunek 3.3.2: Przebieg potencjału Lennarda-Jonesa. Z czysto praktycznego punktu widzenia człon związany z odpychaniem jest modelowany zależnością r^{-12} i jest uzyskiwany poprzez podniesienie do kwadratu obliczonego członu przyciągającego r^{-6} .

szość czasu obliczeniowego.

Ładunki cząstkowe i inne parametry występujące w powyższych wzorach różnią w obrębie pierwiastków chemicznych i odpowiadają *typom* atomów (np. węgiel sp^3 , węgiel aromatyczny, węgiel α w białku, etc.) – wartości tych parametrów są ustalane na podstawie obliczeń kwantowych lub danych eksperymentalnych w taki sposób, aby zapewnić przybliżone odtworzenie wybranych właściwości cząsteczek.

Dysponując matematyczną formułą opisującą energię układu, poprzez numeryczne całkowanie równań ruchu Newtona przy odpowiednio małym kroku czasowym generuje się trajektorię obrazującą ewolucję układu. Ze względu na to, że przy dostatecznie długim czasie symulacji układ powinien przejść przez wszystkie dostępne mikrostan (hipoteza ergodyczna), chcąc wyznaczyć wartość danej wielkości makroskopowej, można utożsamić jej średnią po zespole $\langle A \rangle$ ze średnią po czasie dążącym do nieskończoności, $\bar{A}$:

$$\langle A \rangle = \bar{A} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_0^t A(\mathbf{r}(t), \mathbf{p}(t)) dt \approx \frac{1}{n - n_0} \sum_{s=n_0}^n A(\mathbf{r}(s\Delta t), \mathbf{p}(s\Delta t)) \quad (3.3.7)$$

W dyskretnym przybliżeniu s w powyższym wzorze to numer kroku symulacji, natomiast n_0 i n wyznaczają początek i koniec symulacji prowadzonej z krokiem czasowym równym Δt .

Należy zaznaczyć, że ze względu na poczynione przybliżenia, MD nie jest właściwym narzędziem do modelowania efektów polaryzacyjnych czy badania reakcji, w których dochodzi do zrywania

i powstawania wiązań chemicznych, jednak z powodzeniem sprawdza się jako narzędzie do opisu takich procesów jak asocjacja białek i peptydów [118, 119], zmiany konformacyjnych białek oraz ich poszczególnych domen [120] czy zmian strukturalnych zachodzących w obrębie nici DNA [121, 122].

3.4 Temperatura i ciśnienie w symulacjach Dynamiki Molekularnej

Chęć określenia spontaniczności badanych procesów na podstawie zmian w wartościach energii lub entalpii swobodnej wymaga, aby w trakcie symulacji wielkości, odpowiednio, NVT lub NPT pozostawały niezmiennie. Temperatura T jest bezpośrednio związana z energią kinetyczną układu:

$$E_{kin} = \sum_i^N \frac{m_i |\mathbf{v}_i|^2}{2} = N_f \frac{k_B T}{2} \quad (3.4.1)$$

$$T = \frac{1}{N_f k_B} \sum_i^N m_i |\mathbf{v}_i|^2, \quad (3.4.2)$$

gdzie N_f oznacza liczbę stopni swobody układu. Początkowe prędkości są losowane z rozkładu Maxwella-Boltzmann dla danej temperatury w taki sposób, aby ich suma wektorowa zapewniała zerowanie się pędu układu:

$$f(|\mathbf{v}_i|) = 4\pi \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{3/2} |\mathbf{v}_i|^2 \exp \left(-\frac{m |\mathbf{v}_i|^2}{2k_B T} \right) \quad (3.4.3)$$

Stała temperatura w trakcie symulacji może być zatem kontrolowana poprzez skalowanie prędkości cząsteczek układu w każdym kroku czasowym. Termostat Berendsena [123] działa dokładnie w taki sposób – skalowane prędkości mają zapewniać zbieganie chwilowej temperatury w symulacji, $T(t)$, do wartości zadanej T_0 , zgodnie z zależnością:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{T_0 - T(t)}{\mathcal{T}}, \quad (3.4.4)$$

gdzie $\mathcal{T}$ określa szybkość relaksacji. Algorytm ten w wydajny sposób umożliwia relaksację układu i sprowadzenie go do zadanej temperatury, jednak nie odtwarza w poprawny sposób fluktuacji energii kinetycznej. Niedogodność tę rozwiązuje termostat Bussi-Donadio-Parrinello [124], który zawiera stochastyczny człon zapewniający prawidłowy rozkład energii kinetycznej. Alternatywnym podejściem jest termostat Nosé-Hoovera [125, 126], który polega na rozszerzeniu stopni swobody układu, tak aby uwzględniały obecność łaźni termicznej.

W podobny sposób można manipulować ciśnieniem zadany w symulacji. Zakładając, że cząstka o masie m porusza się pod wpływem siły $\mathbf{F}$, można zdefiniować skalarną wielkość Λ jako iloczyn

$m(\mathbf{v} \cdot \mathbf{r})$, a jej pochodną względem czasu zapisać jako:

$$\frac{d\Lambda}{dt} = m \frac{d\mathbf{v}}{dt} \cdot \mathbf{r} + m\mathbf{v} \cdot \frac{d\mathbf{r}}{dt} = m(\mathbf{a} \cdot \mathbf{r}) + m\mathbf{v}^2 = \mathbf{F} \cdot \mathbf{r} + 2E_{kin} \quad (3.4.5)$$

Uśrednienie pochodnej (3.4.5) po czasie będzie równe:

$$\left\langle \frac{d\Lambda}{dt} \right\rangle = \langle \mathbf{F} \cdot \mathbf{r} \rangle + 2\langle E_{kin} \rangle \quad (3.4.6)$$

Jeśli w dowolnie długim czasie cząstka porusza się w ograniczonym obszarze, to $\mathbf{r}$ i $\mathbf{v}$ są skończone, a całe wyrażenie (3.4.6) można przyrównać do zera. Pozwala to na zapisanie:

$$\langle E_{kin} \rangle = -\frac{1}{2} \langle \mathbf{F} \cdot \mathbf{r} \rangle, \quad (3.4.7)$$

gdzie prawa strona równania to tzw. wiriał układu złożonego z jednej cząstki. Dla układu cząstek, których energia oddziaływania zależy od ich odległości ($\propto r^{-n}$) równość przyjmie formę:

$$\langle E_{kin} \rangle = -\frac{1}{2} \left\langle \sum_i \mathbf{F}_i \cdot \mathbf{r}_i + \sum_{i,j>i} \mathbf{F}_{ij} \cdot \mathbf{r}_{ij} \right\rangle \quad (3.4.8)$$

Cząstki znajdują się wewnątrz ograniczonej powierzchni S , co pozwala związać część otrzymanej równości z ciśnieniem p :

$$\sum_i \mathbf{F}_i \cdot \mathbf{r}_i = - \oint_S p \hat{\mathbf{n}} \mathbf{r} dS = -p \oint_S \hat{\mathbf{n}} \mathbf{r} dS, \quad (3.4.9)$$

gdzie $\hat{\mathbf{n}}$ oznacza wektor jednostkowy. Twierdzenie Ostrogradskiego-Gaussa umożliwia zamianę całki powierzchniowej na objętościową:

$$-p \oint_S \hat{\mathbf{n}} \mathbf{r} dS = -p \int_V \nabla \mathbf{r} dV = -p \int_V \left(\frac{\partial x}{\partial x} + \frac{\partial y}{\partial y} + \frac{\partial z}{\partial z} \right) dV = -3pV \quad (3.4.10)$$

Podstawiając równości (3.4.9) oraz (3.4.10) do równania (3.4.8) można zapisać:

$$\langle E_{kin} \rangle = \frac{3}{2} pV - \frac{1}{2} \left\langle \sum_{i,j>i} \mathbf{F}_{ij} \cdot \mathbf{r}_{ij} \right\rangle \quad (3.4.11)$$

$$p = \frac{N_f k_B T}{V} + \frac{1}{3V} \left\langle \sum_{i,j>i} \mathbf{F}_{ij} \cdot \mathbf{r}_{ij} \right\rangle, \quad (3.4.12)$$

gdzie wyrażenie po prawej stronie to wiriał sił międzycząsteczkowych. Związek (3.4.12) umożliwia sterowanie ciśnieniem podczas symulacji poprzez zmianę objętości układu i skalowanie położeń cząstek, co stanowi to podstawę działania barostatu Berendsena. [123] Niemniej, analogicznie jak w przypadku termostatu Nosé-Hoovera, stałe ciśnienie można utrzymywać poprzez dodatkowe stopnie swobody odpowiadające łaźni ciśnieniowej (barostat Parinello-Rahmana [127]).

3.5 Całkowanie równań ruchu. Algorytm Verleta

Całkowanie równań ruchu jest kluczowym elementem generowania trajektorii metodą Dynamiki Molekularnej. Algorytm zaproponowany przez Verleta [128] opiera się na rozwinięciu w szereg Taylora dwóch analogicznych funkcji położenia atomu od czasu i zaniedbaniu wyrazów wyższych rzędów:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} \frac{d^n \mathbf{r}_i(t)}{dt^n} (\Delta t)^n \quad \mathbf{r}_i(t - \Delta t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} \frac{d^n \mathbf{r}_i(t)}{dt^n} (-\Delta t)^n \quad (3.5.1)$$

W wyniku zsumowania powyższych równań można zapisać:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) + \mathbf{r}_i(t - \Delta t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{2}{(2n)!} \frac{d^{2n} \mathbf{r}_i(t)}{dt^{2n}} (\Delta t)^{2n} = 2\mathbf{r}_i(t) + \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} (\Delta t)^2 + \dots \quad (3.5.2)$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} (\Delta t)^2 + \mathcal{O}(\Delta t^4) \quad (3.5.3)$$

Z kolei różnica równań (3.5.1) pozwala na wyznaczenie chwilowych prędkości:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) = 2\mathbf{v}_i(t)(\Delta t) + \mathcal{O}(\Delta t^3) \quad (3.5.4)$$

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} + \mathcal{O}(\Delta t^2), \quad (3.5.5)$$

ze względu na fizyczną interpretację pierwszej i drugiej pochodnej położenia po czasie oraz konieczność przyjęcia skończonej precyzji. Dzięki temu dysponuje się dogodnym sposobem na wyznaczanie zarówno położeń, jak i prędkości atomów. Warto jednak zauważyć, że wyznaczanie prędkości będzie się odbywało z opóźnieniem względem wyznaczania położeń, co stanowi istotną wadę algorytmu.

W *prędkościowym* wariacie algorytmu Verleta (ang. *velocity Verlet* [129]) wyznaczanie zmian położeń atomów odbywa się przy pomocy równania:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t)(\Delta t) + \frac{\Delta t^2}{2m_i}\mathbf{F}_i(t) + \mathcal{O}(\Delta t^3), \quad (3.5.6)$$

natomiast zmian w ich prędkości przy użyciu zależności:

$$\mathbf{v}_i(t + \Delta t) = \mathbf{v}_i(t) + \frac{\Delta t}{2m_i}[\mathbf{F}_i(t) + \mathbf{F}_i(t + \Delta t)] + \mathcal{O}(\Delta t^2) \quad (3.5.7)$$

Alternatywne podejście zakłada rozwinięcie w szereg następujących funkcji:

$$\mathbf{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} \frac{d^n \mathbf{v}_i(t)}{dt^n} \left(\frac{\Delta t}{2}\right)^n \quad \mathbf{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} \frac{d^n \mathbf{v}_i(t)}{dt^n} \left(-\frac{\Delta t}{2}\right)^n \quad (3.5.8)$$

Po odjęciu równań (3.5.8) od siebie można zapisać:

$$\mathbf{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \mathbf{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i}\Delta t + \mathcal{O}(\Delta t^3) \quad (3.5.9)$$

Chcąc otrzymać równanie dla chwilowych położeń można skorzystać z poniższego rozwinięcia:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} \frac{d^n \mathbf{r}_i(t)}{dt^n} (\Delta t)^n = \mathbf{r}_i(t) + \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt}(\Delta t) + \frac{1}{2} \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} (\Delta t)^2 + \mathcal{O}(\Delta t^3) \quad (3.5.10)$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \cdot \mathbf{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + \mathcal{O}(\Delta t^3)$$

Wspólnie, równania (3.5.9) oraz (3.5.10) tworzą schemat *leap-frog*, niezwykle prosty i stabilny sposób numerycznego całkowania równań ruchu. [130] Chcąc wyeliminować opóźnienie względem wyznaczania położeń i prędkości równe $\Delta t/2$ można posłużyć się średnią arytmetyczną:

$$\mathbf{v}_i(t + \Delta t) = \frac{1}{2}[\mathbf{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \mathbf{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)] \quad (3.5.11)$$

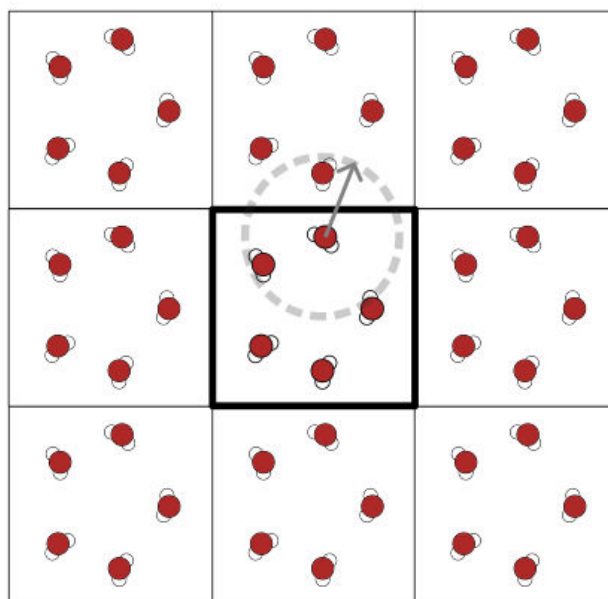
Algorytmy Verleta mimo swej prostoty posiadają szereg zalet: są odwracalne w czasie i symplektyczne, tj. ich zastosowanie umożliwia zachowanie stałej całkowitej energii układu (w zespole *NVE*), która oscyluje wokół wartości zadanej.

Wielkość kroku czasowego Δt używanego w symulacjach MD uzależniona jest od częstotliwości oscylacji wiązań z udziałem atomu wodoru, które są najszybszymi ruchami w układach molekularnych. Powszechnie stosowany krok czasowy równy 2 fs, który stanowi kompromis między

dokładnością i stabilnością obliczeń, a możliwością rozsądnego próbkowania przestrzeni fazowej, wymaga nałożenia dodatkowych więzów unieruchamiających długości wiązań X-H. Jednym ze sposobów dalszego zwiększenia tego kroku jest implementacja *hydrogen mass repartitioning* [131], która polega na redystrybucji masy w obrębie fragmentów cząsteczki zawierających atomy wodoru. Przykładowo, masy poszczególnych atomów grupy metylowej mogą zostać zmienione z 12 Da dla atomu węgla i 1.008 Da dla atomów wodoru na, odpowiednio, 5.952 i 3.024 Da. Nadanie atomom wodoru większej masy powoduje spadek częstości oscylacji długości wiązań i możliwość zastosowania kroku czasowego równego 4 fs.

3.6 Periodyczne warunki brzegowe

Symulowanie układu o skończonym rozmiarze powoduje, że na styku atomów brzegowych z próżnią może dochodzić do niefizycznych zachowań. Jedną z metod wyeliminowania efektów brzegowych w skończonym układzie jest zastosowanie periodycznych warunków brzegowych (ang. *periodic boundary conditions*, PBC), które zapewniają ciągłość symulowanego układu. Pudło symulacyjne traktowane jest jako komórka elementarna, która we wszystkich wymiarach otoczona jest kopiami symulowanego układu. Przy takim podejściu cząsteczka oddziałuje nie tylko z innymi cząstkami w danej komórce, ale także ze wszystkimi cząstkami z innych komórek sieci. Pociąga to za sobą konieczność doboru odpowiedniej wielkości pudła symulacyjnego, tak aby zminimalizować niefizyczne oddziaływania poszczególnych cząsteczek z własnymi obrazami.



Rysunek 3.6.1: Periodyczne warunki brzegowe. Wybrana cząsteczka wody bezpośrednio oddziałuje z innymi cząsteczkami znajdującymi się w zaznaczonym okręgu.

3.7 Sumowanie Ewalda

Ze względu na bardzo szybki zanik członu oddziaływań dipol indukowany–dipol indukowany wraz z odległością ($\propto r^{-6}$), możliwe jest zastosowanie promienia odcięcia (ang. *cut-off*): odległości, powyżej której ignoruje się wkłady oddziaływań między znacznie oddalonymi od siebie centrami. W celu pozbycia się nieciągłości siły działającej na cząstkę, wprowadza się dodatkową funkcję wyłączającą (ang. *switching function*), gładko sprowadzającą wartość energii oddziaływań dyspersyjnych do zera dla promienia odcięcia. Taki zabieg w połączeniu z konwencją najbliższego obrazu (przy obliczaniu oddziaływań z wybraną cząsteczką brany jest pod uwagę jedynie najbliższy obraz każdego atomu) i monitorowaniem bezpośrednich sąsiadów poszczególnych atomów (np. przy użyciu list sąsiadów Verleta [128]) prowadzi do zmniejszenia kosztu obliczeniowego symulacji i jednocześnie pozwala na uniknięcie dużych wahań energii układu.

Nie jest to jednak właściwa metoda do radzenia sobie z oddziaływaniami elektrostatycznymi, które zanikają znacznie wolniej ($\propto r^{-1}$). Jedną z metod pozwalających na szybsze obliczanie oddziaływań dalekozasięgowych jest sumowanie Ewalda. [132] Rezygnując z konwencji najbliższego obrazu, można obliczyć oddziaływania cząsteczek w pudle symulacyjnym z ich obrazami periodycznymi jako:

$$\vartheta = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|}, \quad (3.7.1)$$

gdzie $\mathbf{n}$ oznacza kolejne obrazy komórki dla sześcienniej komórki o krawędzi L , $\mathbf{n} = (n_x L, n_y L, n_z L)$, a n_x, n_y i n_z należą do liczb całkowitych.

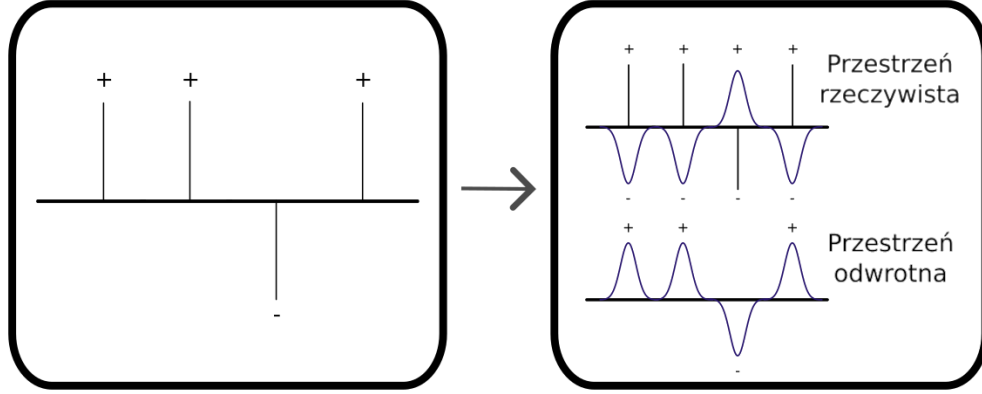
Zasadniczym problemem jest jednak fakt, że szereg (3.7.1) jest zbieżny warunkowo (tzn. jego zbieżność zależy od kolejności sumowania członów). W celu rozwiązania tego problemu, powyższą sumę rozбивa się na dwa szeregi zbiegające bezwzględnie i znacznie szybciej. Do sumowania w przestrzeni rzeczywistej wprowadza się chmury ładunków neutralizujących o rozkładzie gaussowskim, natomiast przy sumowaniu w przestrzeni odwrotnej uwzględnia się chmury ładunków o znakach przeciwnych niż w pierwszym przypadku (Rysunek 3.7.1).

Gaussowska dystrybucja ładunku ma zazwyczaj postać:

$$\rho_i(\mathbf{r}) = \frac{q_i \alpha^3}{\pi^{3/2}} \exp(-\alpha^2 r^2) \quad (3.7.2)$$

Sumowanie w przestrzeni rzeczywistej przyjmuje zatem formę:

Sumowanie Ewalda



Rysunek 3.7.1: Modyfikacja dystrybucji ładunków stosowana w metodzie sumowania Ewalda- dodane ładunki o rozkładzie gaussowskim wzajemnie się kompensują.

$$\vartheta = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{\text{erfc}(\alpha|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|)}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|}, \quad (3.7.3)$$

gdzie komplementarna funkcja błędu, $\text{erfc}(x)$, jest definiowana jako:

$$\text{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} \exp(-t^2) dt \quad (3.7.4)$$

Sumowanie w przestrzeni odwrotnej ma z kolei postać:

$$\vartheta = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{k} \neq 0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{\pi L^3} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\pi^2}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2}{4\alpha^2}\right) \cos(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_{ij}), \quad (3.7.5)$$

gdzie $\mathbf{k}$ oznacza wektor sieci odwrotnej, $\mathbf{k} = 2\pi\mathbf{n}/L^2$. Co istotne, sumowanie rozkładów gaussowskich w przestrzeni rzeczywistej obejmuje również samoodziaływanie rozmytych ładunków, które należy odjąć od końcowego wyniku:

$$\vartheta = -\frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_{k=1}^N \frac{q_k^2}{4\pi\epsilon_0} \quad (3.7.6)$$

Ostatecznie, odpowiednio dobrane wielkości parametru α pozwalają na zmniejszenie złożoności obliczeniowej wyznaczania energii elektrostatycznej z $\mathcal{O}(N^2)$ do $\mathcal{O}(N^{3/2})$. Co więcej, modyfikacje algorytmu wykorzystujące szybką transformację Fouriera do sumowania w przestrzeni odwrotnej, takie jak PME (*Particle Mesh Ewald* [133]) pozwalają dalej zredukować złożoność obliczeniową do $\mathcal{O}(N \log N)$.

3.8 Metody wzmocnionego próbkowania

W trakcie prowadzenia symulacji równowagowych (ang. *non-biased simulations*) można spodziewać się, że przez większość czasu układ będzie znajdował się w lokalnych minimach energii swobodnej. Chcąc uzyskać pełną termodynamiczną i kinetyczną charakterystykę badanego procesu należy jednak zbadać także prawdopodobieństwo odwiedzania wyżej energetycznych rejonów przestrzeni konfiguracyjnej. W tym celu najczęściej prowadzi się symulacje w obecności dodatkowego potencjału, przykładanego wzdłuż zdefiniowanej wcześniej współrzędnej reakcji. Dzięki temu możliwe jest pokonywanie przez układ barier energetycznych i pełne wypróbkowanie przestrzeni konfiguracyjnej.

Wartość oczekiwana obserwabli A jest równa:

$$\langle A \rangle = \frac{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} A(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]} \quad (3.8.1)$$

Wprowadzając wagę $w(\mathbf{r})$, można przekształcić równanie na wartość oczekiwaną A do postaci:

$$\begin{aligned} \langle A \rangle &= \frac{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} A w(\mathbf{r}) w(\mathbf{r})^{-1} \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} w(\mathbf{r}) w(\mathbf{r})^{-1} \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]} \cdot \frac{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} w(\mathbf{r}) \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} w(\mathbf{r}) \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]} = \\ &= \frac{\langle A/w(\mathbf{r}) \rangle^*}{\langle 1/w(\mathbf{r}) \rangle^*}, \end{aligned} \quad (3.8.2)$$

gdzie notacja $\langle \dots \rangle^*$ oznacza uśrednianie po rozkładzie obciążonym wagą $w(\mathbf{r})$. Po rozwinięciu mianownika:

$$(\langle 1/w(\mathbf{r}) \rangle^*)^{-1} = \frac{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} w(\mathbf{r}) \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} w(\mathbf{r}) w(\mathbf{r})^{-1} \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]} = \langle w(\mathbf{r}) \rangle, \quad (3.8.3)$$

równanie (3.8.2) można dalej zapisać w postaci:

$$\langle A \rangle = \langle A/w(\mathbf{r}) \rangle^* \langle w(\mathbf{r}) \rangle = \frac{\langle A \exp(w(\mathbf{r})\beta) \rangle^*}{\langle \exp(w(\mathbf{r})\beta) \rangle^*} \quad (3.8.4)$$

Powyższe równanie pozwala na odtworzenie wartości oczekiwanej obserwabli po nieobciążonym rozkładzie kanoniczym. W celu wyznaczenia nieobciążonego prawdopodobieństwa $P(\mathbf{r})$ z rozkładu obciążonego wagą $w(\mathbf{r})$ można przekształcić równanie (3.1.13) do postaci:

$$P(\mathbf{r}) = \frac{w(\mathbf{r}) w(\mathbf{r})^{-1} \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} w(\mathbf{r}) w(\mathbf{r})^{-1} \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]} \cdot \frac{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} w(\mathbf{r}) \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]}{\int d\mathbf{p} \int d\mathbf{r} w(\mathbf{r}) \exp[-\beta H(\mathbf{r}, \mathbf{p})]} \quad (3.8.5)$$

$$P(\mathbf{r}) = \frac{P^*(\mathbf{r})/w(\mathbf{r})}{\langle 1/w(\mathbf{r}) \rangle^*}$$

Otrzymana zależność pozwala zatem na uzyskanie niezaburzonego rozkładu prawdopodobieństwa z symulacji prowadzonych w obecności dodatkowego potencjału obciążającego. Znając rozkład prawdopodobieństwa, można z kolei wyznaczyć różnicę w energii swobodnej F , między dwoma stanami A i B jako:

$$\frac{P(A)}{P(B)} = \exp\left(-\frac{F(A) - F(B)}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right) \quad (3.8.6)$$

Analogiczne równanie jest również stosowalne w warunkach izobaryczno-izotermicznych dla entalpii swobodnej, G .

3.8.1 Umbrella sampling

Jedną z metod wzmocnionego próbkowania wykorzystujących zależność (3.8.5) jest metoda *umbrella sampling*; *US* (pol. "próbkowanie parasolowe"). [134] Polega ona na dodaniu do rzeczywistego potencjału $V(\mathbf{r})$ zewnętrznego potencjału $W(\mathbf{r})$, dzięki któremu układ utrzymywany jest w pobliżu wybranych wartości $\mathbf{r}$ w taki sposób, aby zapewnić reprezentatywne wypróbkowanie trudno dostępnych obszarów przestrzeni konformacyjnej. W tym celu przeprowadza się szereg symulacji, w których potencjał $W(\mathbf{r}) = k_W(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2$ centrowany jest w punktach znajdujących się w przedziale zmienności badanej współrzędnej reakcji. Obciążone gęstości prawdopodobieństwa uzyskane na podstawie tych symulacji przelicza się następnie na rzeczywistą gęstość prawdopodobieństwa, korzystając z relacji:

$$P(\mathbf{r}) = P^*(\mathbf{r}) \cdot \exp\left(\frac{W(\mathbf{r}) - f}{k_B T}\right), \quad (3.8.7)$$

która po zlogarytmowaniu może posłużyć do wyznaczenia energii swobodnej wzdłuż wybranej współrzędnej reakcji. Występujący w równaniu (3.8.7) parametr f równy jest:

$$f = -k_B T \ln \left\langle \exp\left(\frac{-W(\mathbf{r})}{k_B T}\right) \right\rangle \quad (3.8.8)$$

i może być interpretowany jako zmiana energii swobodnej układu wynikająca z wprowadzenia dodatkowego potencjału. Należy zaznaczyć, że wielkość ta nie jest określana bezpośrednio, a optymaliz-

zowana, np. metodą ważonych histogramów (ang. *weighted histogram analysis method*, WHAM) [135]. Przeprowadzając N_w symulacji w obecności dodatkowego potencjału przy minimalizacji błędu statystycznego, optymalne wartości niezaburzonego rozkładu prawdopodobieństwa dla przedziału j , $P(\mathbf{r}_j)$ określone są zależnościami:

$$P(\mathbf{r}_j) = \sum_i^{N_w} N_i P_i^*(\mathbf{r}_j) \cdot \left(\sum_i^{N_w} \frac{N_i \exp[-\beta k_i(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_0)^2]}{f_i} \right)^{-1} \quad (3.8.9)$$

$$f_i = \sum_j \exp[-\beta k_i(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_0)^2] P(\mathbf{r}_j), \quad (3.8.10)$$

gdzie N_i oznacza liczbę klatek w i -tym oknie symulacji, a $P_i^*(\mathbf{r}_j)$ – obciążone prawdopodobieństwo w i -tym oknie. Metoda WHAM polega na iteracyjnym rozwiązywaniu współzależnych równań (3.8.9) i (3.8.10) do osiągnięcia samouzgodnienia z zadaniem precyzji.

3.8.2 Metadynamika

W odróżnieniu od metody *umbrella sampling*, w przypadku metadynamiki potencjał przykładany wzdłuż współrzędnej reakcji zmienia się w czasie (Rysunek 3.8.1). Jest on sumą funkcji Gaussa o szerokości σ i wysokości H , dodawanych z częstotliwością ω wzdłuż współrzędnej $\mathbf{r}$:

$$W(\mathbf{r}, t) = \sum_{t'=0}^t H \exp \left(- \sum_{i=1}^d \frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}(t'))^2}{2\sigma_i^2} \right), \quad (3.8.11)$$

gdzie d jest liczbą współrzędnych opisujących przestrzeń konformacyjną. [136]

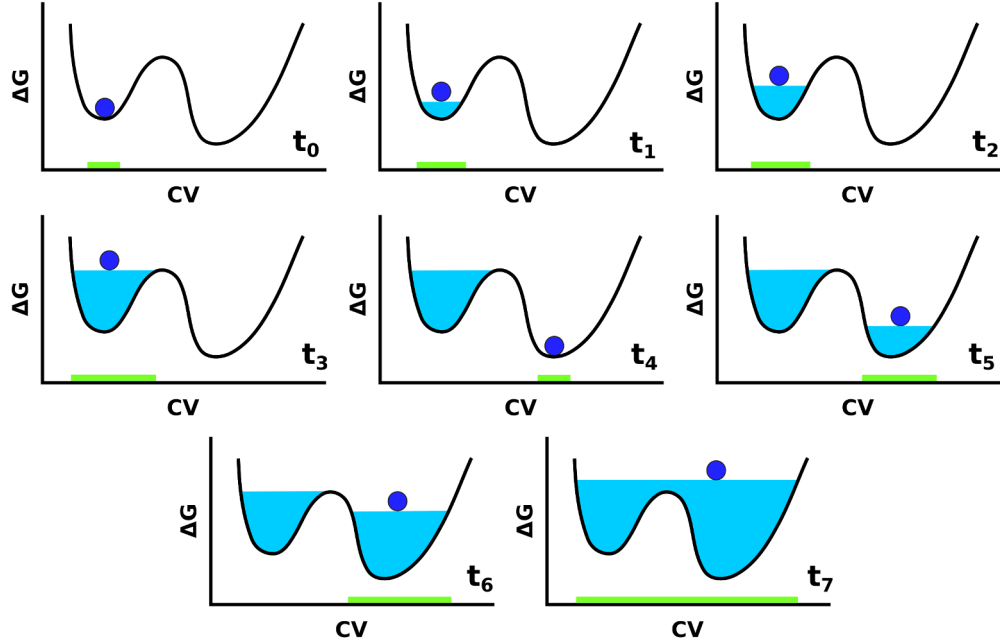
Dla odpowiednio długich trajektorii dążących do nieskończoności, przykładany potencjał zbiega do energii swobodnej wziętej z przeciwnym znakiem (z dokładnością do stałej addytywnej, C):

$$W(\mathbf{r}, t \rightarrow \infty) = -F(\mathbf{r}) + C \quad (3.8.12)$$

Aby uniknąć oscylacji wokół rzeczywistej wartości energii swobodnej, dodawany w czasie potencjał jest skalowany w czasie (tzw. wariant *well-tempered* metadynamiki). Odbywa się to poprzez zmniejszanie wysokości krzywych Gaussa (H) w trakcie symulacji:

$$H = H_0 \exp \left(- \frac{W(\mathbf{r}, t)}{k_B \Delta T} \right), \quad (3.8.13)$$

gdzie ΔT jest parametrem o wymiarze temperatury opisującym szybkość spadku wysokości potencjału. Ostatecznie pozwala to zapisać następujące wyrażenie na uzbieżniony potencjał:



Rysunek 3.8.1: Graficzne przedstawienie metadynamiki. Stopniowe dodawanie potencjału w czasie symulacji (kolor błękitny) umożliwia układowi na pokonywanie barier energetycznych i próbkowanie większego zakresu badanej współrzędnej reakcji (kolor zielony).

$$W(\mathbf{r}, t \rightarrow \infty) = -\frac{\Delta T}{\Delta T + T} F(\mathbf{r}) + C = -(1 - \frac{1}{\gamma}) F(\mathbf{r}) + C, \quad (3.8.14)$$

gdzie parametr γ jest bezwymiarową wielkością pozwalającą na oszacowanie ilukrotnie zmniejszone zostaną bariery energetyczne poprzez dodanie zewnętrznego potencjału (ang. *bias factor*).

Zmodyfikowany, szybkozbieżny wariant OPES metadynamiki (ang. *on-the-fly probability-enhanced sampling* [137]) został z kolei zaprojektowany w taki sposób, aby dodawany w czasie potencjał rekonstruował zadaną gęstość prawdopodobieństwa, $p^{tg}(\mathbf{r})$, a jego postać jest aktualizowana w czasie:

$$W(\mathbf{r}, t) = k_B T \log \frac{P(\mathbf{r})}{p^{tg}(\mathbf{r})}, \quad (3.8.15)$$

gdzie $P(\mathbf{r}) = \exp(-F(\mathbf{r})/k_B T)$. Podobnie jak w wariancie *well-tempered*, zadaną gęstość prawdopodobieństwa, $p^{tg}(\mathbf{r})$, jest proporcjonalna do czynnika $[P(\mathbf{r})]^{1/\gamma}$. Oszacowanie gęstości prawdopodobieństwa jest otrzymywane w trakcie symulacji poprzez dodawanie w czasie kolejnych krzywych Gaussa z odpowiednią wagą, a ich suma w czasie t wynosi $\tilde{P}(\mathbf{r}, t)$. Ostatecznie pozwala to na zapisanie potencjału przykładanego w czasie jako:

$$W(\mathbf{r}, t) = \left(1 - \frac{1}{\gamma}\right) k_B T \log\left(\frac{\tilde{P}(\mathbf{r}, t)}{Z(t)} + \epsilon\right), \quad (3.8.16)$$

gdzie $Z(t)$ to czynnik normalizujący prawdopodobieństwo, a ϵ jest parametrem, który z jednej strony zapewnia, że argument logarytmu jest zawsze większy od zera, a z drugiej umożliwia lepszą kontrolę nad eksplorowaniem przestrzeni fazowej.

3.9 Transformacje alchemiczne

Opisane do tej pory metody wzmocnionego próbkowania umożliwiają otrzymanie profilu energii swobodnej dla badanego procesu. Niemniej, dla części problemów badawczych istotniejsza jest nie tyle znajomość pełnego przebiegu profilu, co względna różnica energii swobodnej między wybranymi stanami. Przykładem może być oszacowanie zmian powinowactwa ligandów do celu molekularnego lub zmiany stabilności białka na skutek mutacji punktowej. Metody obliczeniowe pozwalają na przeprowadzanie niefizycznych symulacji (tzw. transformacji *alchemicznych*), w których zamiast śledzenia całej ścieżki reakcji, przekształca się jedną cząsteczkę (lub jej fragment) w drugą.

W trakcie tych symulacji Hamiltonian opisujący stan A układu jest stopniowo transformowany w Hamiltonian opisujący stan B układu. [138] Taka interpolacja odbywa się zwykle przy użyciu dodatkowej zmiennej, λ , liniowo skalującej Hamiltonian pomiędzy H_A a H_B :

$$H(\mathbf{r}, \mathbf{p}, \lambda) = (1 - \lambda)H_A + \lambda H_B \quad (3.9.1)$$

Dla wartości λ różnych od 0 i 1, układ znajduje się w niefizycznych stanach pośrednich.

Ze względu na to, że transformacje mogą być związane z pojawianiem się lub znikaniem atomów wzdłuż takiego przejścia, liniowa interpolacja oddziaływań elektrostatycznych i dyspersyjnych może prowadzić do problemów numerycznych dla wartości λ bliskich 0 lub 1. By tego uniknąć, obliczanie energii oddziaływań niewiążących w trakcie takich symulacji odbywa się w następujący sposób [139]:

$$\begin{aligned} V_{soft-core}(\mathbf{r}) &= (1 - \lambda)V^A(\mathbf{r}_A) + \lambda V^B(\mathbf{r}_B) \\ \mathbf{r}_A &= (\alpha\sigma_A^6\lambda^p + \mathbf{r}^6)^{\frac{1}{6}} \\ \mathbf{r}_B &= (\alpha\sigma_B^6(1 - \lambda)^p + \mathbf{r}^6)^{\frac{1}{6}}, \end{aligned} \quad (3.9.2)$$

gdzie V^A i V^B odpowiadają potencjałom niewiążącym dla stanu A lub B (odpowiednio, $\lambda=0$ i $\lambda=1$), natomiast wartości parametrów α , σ oraz p mogą być indywidualnie dopasowane.

Metoda całkowania termodynamicznego (ang. *thermodynamic integration*, TI) [140] polega na wyznaczeniu różnicy w entalpii swobodnej między stanami A i B poprzez scałkowanie średniej siły działającej wzdłuż zmiennej λ w trakcie alchemicznego przejścia:

$$\Delta G_{AB} = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \quad (3.9.3)$$

Jednym ze sposobów realizacji TI jest podział zakresu zmienności parametru λ na dyskretne podprzedziały. Następnie z każdego punktu λ_i startowana jest równowagowa symulacja, służąca do oszacowania średniej wartości $\left\langle \frac{\partial H}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda_i}$. Poprzez całkowanie numeryczne tak zebranych wartości otrzymuje się wówczas wartość ΔG .

Alternatywne podejście możliwe jest przy skorzystaniu z tzw. tożsamości Jarzynskiego [141, 142]:

$$e^{-\beta \Delta G} = \langle e^{-\beta W} \rangle \quad (3.9.4)$$

Pozwala ona na wyznaczenie zmian w entalpii swobodnej poprzez pomiar pracy wykonanej w trakcie symulacji nierównowagowych. Równość Jarzynskiego wymaga jednak, aby owe symulacje rozpoczynały się z konformacji uzyskanych z symulacji równowagowych. Wykonana praca jest otrzymywana poprzez całkowanie chwilowych wartości $\partial H / \partial \lambda$:

$$W = \int_0^1 \frac{\partial H}{\partial \lambda} d\lambda \quad (3.9.5)$$

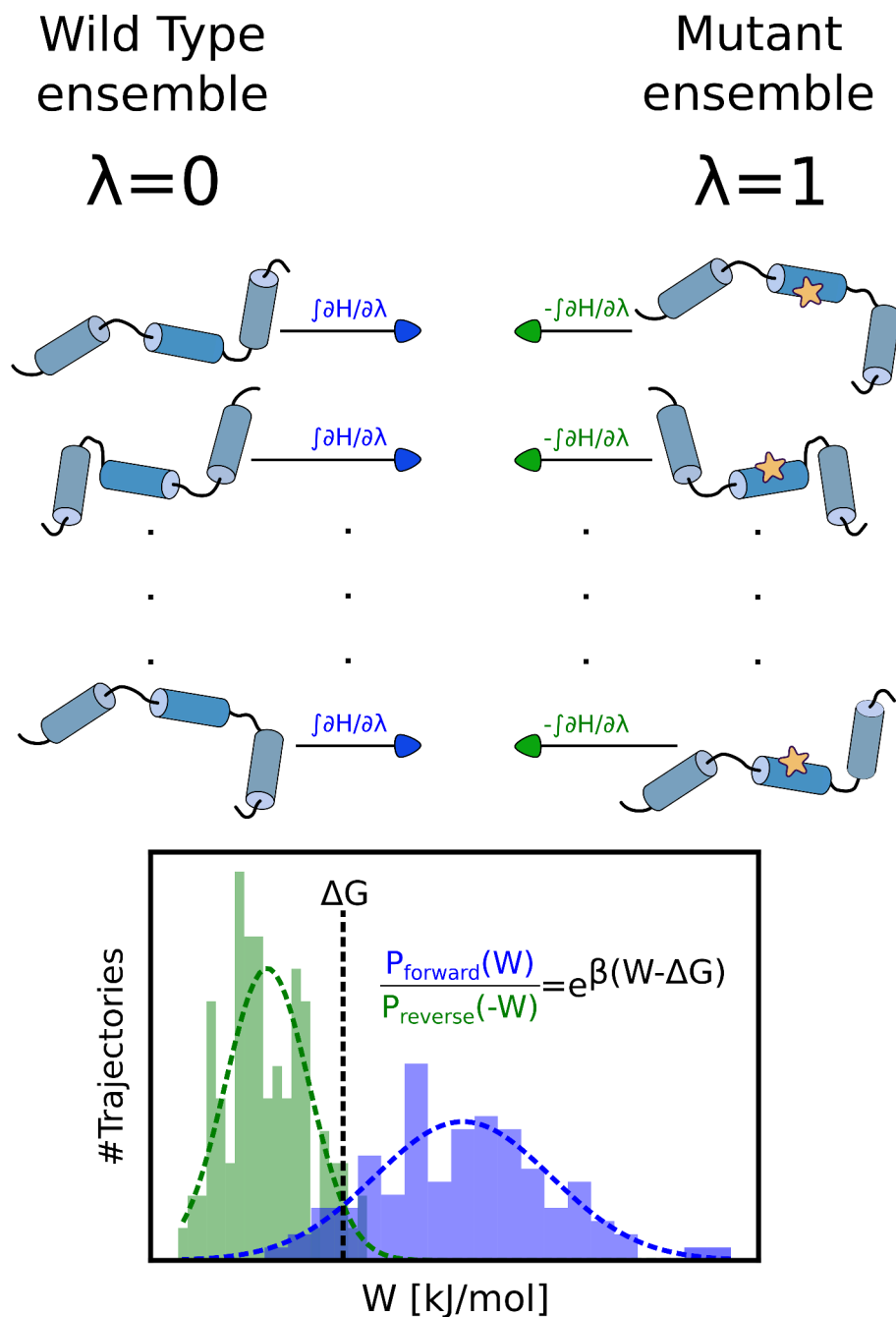
Bardziej ogólny związek między pracą a entalpią swobodną został wyprowadzony przez Crooksa (ang. *Crooks Fluctuation Theorem*, CFT) [143, 144, 145]:

$$\frac{P_f(W)}{P_r(-W)} = e^{\beta(W - \Delta G)}, \quad (3.9.6)$$

gdzie P_f i P_r są rozkładami pracy dla – odpowiednio – alchemicznego przejścia "w przód" ($\lambda=0 \rightarrow \lambda=1$) i "w tył" ($\lambda=1 \rightarrow \lambda=0$). Co warto zaznaczyć, sama równość Jarzynskiego może zostać wyprowadzona z powyższego równania. [143] W przypadkach gdy nakładanie się rozkładów prac P_f i P_r jest znaczne, różnica entalpii swobodnej może zostać wyznaczona bezpośrednio z równania (3.9.6):

$$\ln \frac{P_f(W)}{P_r(-W)} = \beta W - \beta \Delta \hat{G} \quad (3.9.7)$$

Gdy warunek ten nie jest spełniony, rozkłady pracy mogą zostać przybliżone przez analityczne rozkłady, a ich punkt przecięcia równy będzie poszukiwanej wartości ΔG (Rysunek 3.9.1).



Rysunek 3.9.1: Schemat nierównowagowego oszacowania entalpii swobodnej. Z równowagowych symulacji dwóch stanów ($\lambda=0$ lub $\lambda=1$) otrzymuje się zbiór konformacji startowych, które następnie służą jako punkt wyjścia do przeprowadzenia serii krótkich, nierównowagowych symulacji przejścia jednego stanu w drugi. Mierzone w trakcie tych przejść wartości pracy mogą następnie – na mocy twierdzenia Crooksa – posłużyć do oszacowania wartości ΔG . Opracowano na podstawie [138].

Używając krzywych Gaussa do przybliżenia rozkładów (ang. *Crooks Gaussian Intersection, CGI*) [146], otrzymuje się poszukiwaną różnicę entalpii swobodnej jako:

$$\Delta\hat{G} = \left[\frac{\langle W_f \rangle_{n_f}}{\hat{\sigma}_f^2} - \frac{-\langle W_r \rangle_{n_r}}{\hat{\sigma}_r^2} \pm \sqrt{\frac{1}{\hat{\sigma}_f^2 \hat{\sigma}_r^2} \left(\langle W_f \rangle_{n_f} + \langle W_r \rangle_{n_r} \right)^2 + 2 \left(\frac{1}{\hat{\sigma}_f^2} - \frac{1}{\hat{\sigma}_r^2} \right) \ln \frac{\hat{\sigma}_r}{\hat{\sigma}_f}} \right] \times \left(\frac{1}{\hat{\sigma}_f^2} - \frac{1}{\hat{\sigma}_r^2} \right)^{-1}, \quad (3.9.8)$$

gdzie $\langle W_f \rangle_{n_f}$ i $\langle W_r \rangle_{n_r}$ są średnimi wartościami pracy, a $\hat{\sigma}_f^2$ i $\hat{\sigma}_r^2$ wariancjami rozkładów pracy, odpowiednio dla przejścia "w przód" i "w tył". Podany estymator przewiduje dwa miejsca przecięcia rozkładów, jednak tylko jeden z nich, punkt przecięcia między $\langle W_f \rangle_{n_f}$ i $-\langle W_r \rangle_{n_r}$, jest brany pod uwagę.

Do nierównowagowych symulacji może zostać użyty również estymator BAR (ang. *Bennett Acceptance Ratio*), który nie wymaga przyjęcia założenia o gaussowskim rozkładzie analizowanych rozkładów. Przyjmuje on wtedy postać [147]:

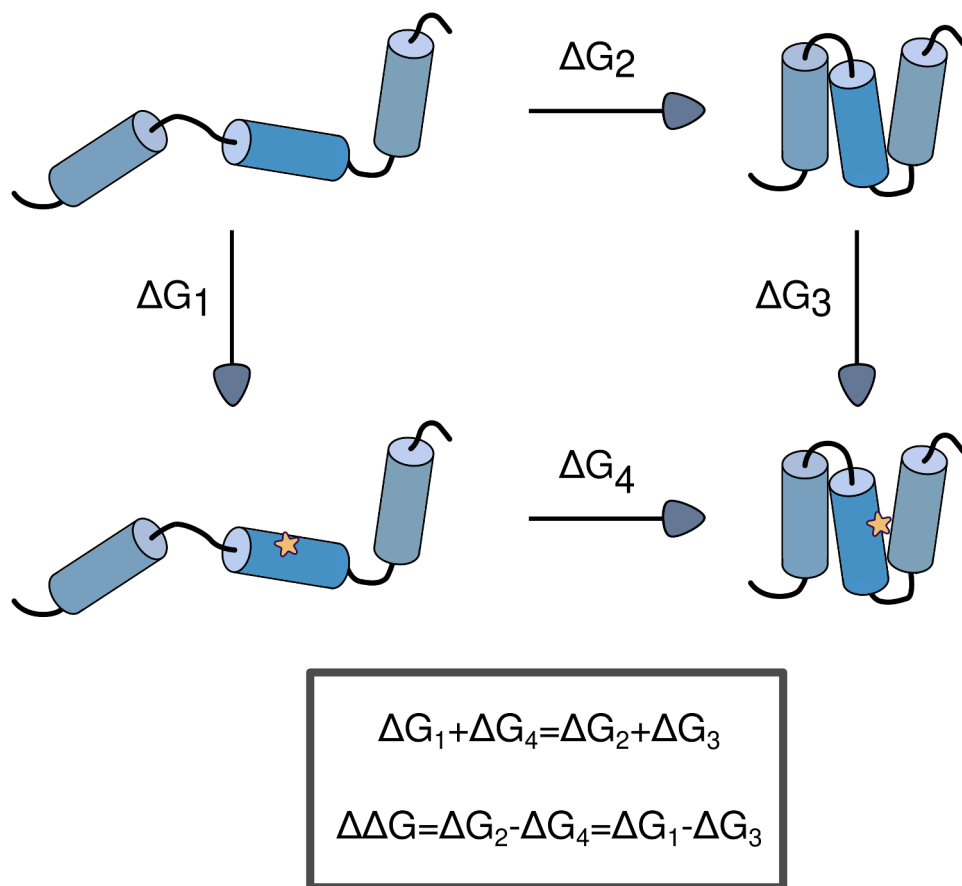
$$\sum_{i=1}^{n_f} \left[1 + \exp\left(\ln \frac{n_f}{n_r} + \beta(W_i - \Delta\hat{G})\right) \right]^{-1} = \sum_{j=1}^{n_r} \left[1 + \exp\left(\ln \frac{n_r}{n_f} + \beta(W_j - \Delta\hat{G})\right) \right]^{-1}, \quad (3.9.9)$$

gdzie n_f i n_r to odpowiednio ilość przejść "w przód" i "w tył".

3.9.1 Cykl termodynamiczny

Ze względu na to, że entalpia swobodna jest funkcją stanu i nie zależy od ścieżki reakcji, metody alchemiczne mogą stanowić wygodne narzędzie do badania względnych zmian ΔG . Rozpatrując cykl termodynamiczny ilustrujący zwijanie się białka z mutacją punktową (Rysunek 3.9.2) można zauważyć, że różnica między wartościami ΔG_2 i ΔG_4 (różnica energii swobodnej zwijania dzikiego szczepu białka i jego zmutowanego wariantu) równa jest różnicy między wartościami ΔG_1 i ΔG_3 (różnica energii swobodnej (alchemicznego) wprowadzania mutacji punktowej, odpowiednio, w rozwiniętym i zwiniętym białku). Względny wpływ mutacji punktowej na zwijanie białka, $\Delta\Delta G$, można zatem uzyskać z dwóch prostszych, pozornie niezwiązanych ze sobą "wertykalnych" symulacji (zamiast dwukrotnego symulowania skomplikowanego procesu zwijania białka). Badanie mniejszych zmian układu w trakcie symulacji umożliwia także na ogół szybsze uzyskanie uzbieżnionych wyników.

W niektórych przypadkach, takich jak określanie względnego powinowactwa ligandów do białka, dwie gałęzie cyklu termodynamicznego można nawet przeprowadzić w pojedynczym pudle sy-



Rysunek 3.9.2: Cykl termodynamiczny związany z badaniem wpływu mutacji punktowej na stabilność związania białka. Procesy "horyzontalne" są związane ze związaniem białka, a "wertykalne" – z wprowadzeniem mutacji w obrębie sekwencji białka.

mulacyjnym (tzw. wariant *double system/single box*) – jeden ligand jest wówczas związany z białkiem, a drugi zostaje umieszczony swobodnie w rozpuszczalniku (przy czym obecność dodatkowego potencjału zapobiega jego zbliżaniu się do białka).

3.10 Analiza głównych składowych

Analiza głównych składowych (ang. *Principal Components Analysis*, PCA) jest powszechnie używaną metodą redukcji wymiarowości. Dzięki niej można przedstawić wejściowe n -wymiarowe dane w przestrzeni nowych wektorów $\mathbf{p}$, które są liniową kombinacją oryginalnych zmiennych $\mathbf{x}$:

$$\mathbf{p}_i = \sum_{j=1}^v c_{i,j} \mathbf{x}_j \quad (3.10.1)$$

Ograniczając się do jednej, dwóch lub kilku nowych współrzędnych (głównych składowych), oryginalne dane można przedstawić w przestrzeni nowych wektorów $\mathbf{p}$.

nalne dane można przedstawić w formie, która umożliwia łatwiejszą i wizualną interpretację wyników.

PCA sprowadza się do takiego obrotu układu współrzędnych, który maksymalizuje wartość wariancji wzdłuż kolejnych głównych składowych. Kolejne, ortogonalne względem siebie główne składowe $\mathbf{p}_i$ otrzymuje się poprzez diagonalizację macierzy kowariancji. Elementy macierzy kowariancji dla pary dyskretnych zmiennych losowych (X, Y) , które przyjmują wartości (x_i, y_i) dla $i = 1, \dots, n$ z równym prawdopodobieństwem ($\frac{1}{n}$) określone są wzorem:

$$\text{cov}(X, Y) = \frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{1}{2} (x_i - x_j)(y_i - y_j) = \frac{1}{n^2} \sum_i \sum_{j>i} (x_i - x_j)(y_i - y_j) \quad (3.10.2)$$

Łatwo zauważyć, że elementy diagonali tej macierzy są równe wariancji zmiennej losowej, $\text{cov}(X, X) = \sigma^2$. Część zmienności opisywanej przez i pierwszych wektorów własnych można z kolei wyznaczyć z zależności:

$$\frac{q_1^2 + \dots + q_i^2}{q_1^2 + \dots + q_n^2} \quad (3.10.3)$$

która opiera się na addytywności wariancji (q) nieskorelowanych ze sobą liniowo zmiennych losowych.

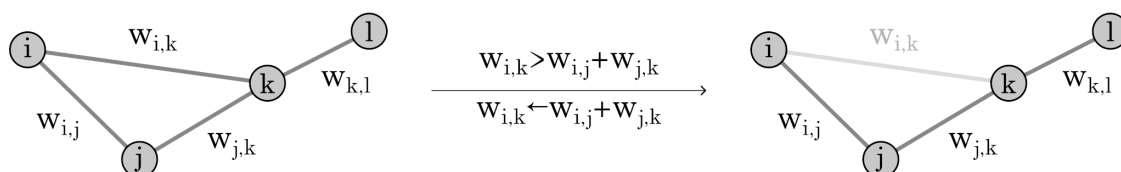
3.11 Dynamiczna analiza sieci

Dane zebrane w trakcie symulacji MD mogą posłużyć do analizy komunikacji wewnątrz biomolekuł i zidentyfikowania ścieżek wzdłuż których propagowany jest sygnał allosteryczny. Badany układ da się w tym celu przedstawić w formie grafu, w którym poszczególne reszty i oddziaływania między nimi są obrazowane jako sieć połączeń między węzłami. Siłę połączenia między wierzchołkami można określić wartością liczbową (wagą w). Ciąg połączeń między kolejno połączonymi węzłami tworzy ścieżkę, której długość L (dla sieci opartej na grafie ważonym) definiowana jest jako:

$$L = \sum_{j=1}^n \left(\prod_{i=1}^j w_i \right) \quad (3.11.1)$$

Algorytm Floyda-Warshalla [148] służy do znajdowania najkrótszych ścieżek między węzłami w grafie ważonym. Algorytm tworzy macierz $\mathcal{D}$, którego element $\mathcal{D}[i, j]$ odzwierciedla najmniejszy koszt przejścia z węzła i do węzła j . Początkowo, koszty te są równe odpowiednio: 0 (gdy $i = j$), $w_{i,j}$ (dla istniejących w grafie krawędzi o zadanej wadze) lub $+\infty$ (dla pozostałych elementów macierzy).

Następnie, jeśli koszt przejścia między i -tym a k -tym węzłem jest większy od sumy kosztów przejścia $\mathcal{D}[i, j] + \mathcal{D}[j, k]$, to za lepszą ścieżkę należy przyjąć tę prowadzącą przez wierzchołek j , która charakteryzuje się mniejszym kosztem (Rysunek 3.11.1). Algorytm wykonuje tę procedurę w sposób dynamiczny: w następujących po sobie krokach będzie szukał ścieżek o najmniejszym koszcie przechodzących przez kolejne wierzchołki, a jego złożoność obliczeniowa wynosi $\mathcal{O}(N^3)$, gdzie N oznacza liczbę węzłów w grafie.



Rysunek 3.11.1: Schematyczny sposób działania algorytmu Floyd-Warshalla (opracowano na podstawie [149]).

4 Procedura symulacyjna

Wszystkie symulacje zostały przeprowadzone przy użyciu programu GROMACS [150] (wersja 5.0.4 lub wyższa) z rozszerzeniem PLUMED 2.1. [151] Do opisu białek, jonów oraz kompleksu Mg-ATP wykorzystano pole siłowe CHARMM36m [152], natomiast cząsteczki wody symulowano przy pomocy modelu TIP3P [153]. W każdym układzie liczba jonów sodowych i chlorkowych była dobrana w taki sposób, aby uzyskać elektrycznie obojętny roztwór o fizjologicznej sile jonowej równej 0.15 M. Stałą temperaturę równą 310 K utrzymywano algorytmem v-rescale [124] ze stałą sprężenia równą 0.1 ps. Stałe ciśnienie o wartości 1 bara utrzymywano natomiast algorytmem Parrinello-Rahmana [127] ze stałą sprężenia równą 5 ps. Ponadto, każdy układ był symulowany z zastosowaniem periodycznych warunków brzegowych oraz metody Particle Mesh Ewald (PME) [154] przy obliczaniu dalekoasięgowych oddziaływań elektrostatycznych (ustalając promień odcięcia równy 1.2 nm i krok siatki fourierowskiej na 0.12 nm). Oddziaływania van der Waalsa były obliczane przy użyciu potencjału Lennarda-Jonesa z promieniem odcięcia równym 1.2 nm. Wszystkie wiązania z atomami wodoru były usztywniane przy pomocy algorytmu LINCS [155]. Do całkowania równań ruchu wykorzystano algorytm *leap-frog* Verlet [156] z krokiem czasowym równym 2 fs. Jeśli nie zaznaczono inaczej, przed właściwymi symulacjami energia przygotowanych układów była minimalizowana w dwóch etapach przy użyciu algorytmu najszybszego spadku. W pierwszym etapie utrzymywano stałe pozycje wszystkich ciężkich atomów białka, a w drugim etapie – jedynie pozycje głównego łańcucha białka, aby umożliwić relaksację łańcuchów bocznych. Profile energii swobodnej zostały wyznaczone metodą umbrella sampling (US) [134] w wariancie z wymianą replik z zastosowaniem metody ważonych histogramów (WHAM) [135], a niepewności pomiaru energii zostały obliczone przy pomocy metody *bootstrap*. Graficzne przedstawienie otrzymanych w trakcie symulacji struktur przygotowano za pomocą programu VMD [157].

4.1 Zmiany konformacyjne DnaK indukowane hydrolizą ATP

4.1.1 Równowagowe symulacje Dynamiki Molekularnej

Układy izolowanych domen wiążących nukleotyd (reszty 4–398) zostały przygotowane na podstawie struktur 4JNE i 2KHO z bazy PDB. [48, 158] W obydwu przypadkach NBD zostały wysolwotwane ok. 37000 cząsteczkami wody i były symulowane w sześciennym pudle o krawędzi ~ 10.5 nm. Symulowane układy zostały przygotowane przy użyciu serwera CHARMM-GUI [159], a minimalizacja i równowagowanie układów odbywała się według domyślnego protokołu narzędzia CHARMM-GUI Solution Builder. [160] Układy były symulowane przez 1 μ s, a ostatnie 500 ns symulacji zostało użyte do otrzymania referencyjnych struktur NBD zawierających ATP lub ADP w kieszeni katalitycznej. Procedura klastrowania została wykonana narzędziem gmx cluster [150] używając promienia odcięcia równego 0.25 nm. W każdym przypadku otrzymano pojedynczy klaster.

4.1.2 Analiza trajektorii

Analiza głównych składowych została przeprowadzona dla ciężkich atomów domeny NBD za pomocą narzędzi `gmx covar` i `gmx anaeig`. [150] Do wyznaczenia wektorów własnych opisujących zmiany konformacyjne NBD użyłem połączonych trajektorii NBD z ATP i ADP. Kąt torsyjny między płatami NBD został zdefiniowany jako kąt między środkami mas ciężkich atomów subdomeny IB (reszty 40–115), IA (reszty 1–39, 116–188, 361–384), IIA (reszty 189–228, 307–360) i IIB (reszty 229–306). [161] Fluktuacje położenia łańcuchów bocznych obliczono za pomocą narzędzia `gmx rmsf`. [150] Wartości RMSF zostały obliczone jako pierwiastek z wariancji fluktuacji wokół średnich położenia łańcuchów bocznych. Analiza kontaktów w układach NBD w trakcie ostatnich 500 ns symulacji została przeprowadzona narzędziem `Contact Map Explorer` [162] przy użyciu promienia odcięcia równego 0.35 nm. Kontakt był traktowany jako różnicujący, jeśli był obecny przez co najmniej 70% analizowanego czasu symulacji.

4.1.3 Wyznaczanie profili energii swobodnej

Profile energii swobodnej związane ze zmianą konformacyjną NBD zostały obliczone wzdłuż współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako różnica RMSD między otrzymaną reprezentatywną strukturą NBD z ADP i ATP. Dla układu z domeną NBD zawierającą ATP struktury startowe zostały uzyskane podczas symulacji dynamiki sterowanej o długości 100 ns, w trakcie której różnicę RMSD zmniejszano od początkowej wartości ~ 0.5 nm do -0.3 nm za pomocą jednostronnego potencjału harmonicznego o stałej siłowej równej $10000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$. Analogiczna procedura została zastosowana dla układu zawierającego ADP – w tym wypadku wartość różnicy RMSD była zmieniana od -0.5 nm do 0.3 nm. W obu przypadkach symulowano trzynaście równoodległych okien, które pokrywały zakres współrzędnej reakcji od -0.3 nm do 0.3 nm. Stała siłowa potencjału harmonicznego przykładanego w każdym oknie była równa $7500 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, a każde okno było symulowane przez $1 \mu\text{s}$, przy czym pierwsze 250 ns symulacji zostało odrzucone na rzecz równowagowania układów.

Układ DnaK do badania dysocjacji SBD β z powierzchni NBD został przygotowany na podstawie struktury 4JNE [158] umieszczonej w sześciennym pudle o krawędzi ~ 13.5 nm i solwatowanej ok. 55000 cząsteczkami wody. Następnie przygotowano kopię tego układu, usuwając terminalny fosforan ATP. Ze względu na to, że C-terminalny region domeny SBD α nie uczestniczy w transmisji sygnału allosterycznego [163, 164], w celu zmniejszenia rozmiaru układów, reszty 505–609 DnaK zostały usunięte. Profile energii swobodnej dla dysocjacji SBD β z powierzchni NBD były obliczane wzdłuż współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako odległość między centrum masy atomów C α SBD β (reszty 398–504) i centrum masy atomów C α reszt znajdujących się na interfejsie wiązania NBD (reszty 75–115 i 140–230). Struktury startowe do symulacji US otrzymano podczas symulacji dynamiki

sterowanej o długości 300 ns, podczas której odległość między NBD a SBD β była stopniowo zwiększana do 5 nm przy użyciu potencjału harmonicznego o stałej siłowej równej 750 kJ·mol⁻¹·nm⁻². Następnie symulowano jedenaście równoodległych okien US, które pokrywały zakres 2.5–5 nm współrzędnej reakcji. Stała siłowa potencjału harmonicznego przykładanego w każdym oknie była równa 500 kJ·mol⁻¹·nm⁻², a każde okno było symulowane przez 1 μ s. Po wprowadzeniu mutacji punktowej Phe216Ala wyznaczone struktury startowe dla układu z ADP posłużyły także do wyznaczenia profilu energii swobodnej dla zmodyfikowanej wersji białka (w tym wypadku stałe siłowe potencjału harmonicznego w każdym oknie nie uległy zmianie). Również w tym przypadku każde okno było symulowane przez 1 μ s, z czego pierwsze 100 ns odrzucono na rzecz równowagowania układów.

4.1.4 Transformacje alchemiczne

Zgrubnego oszacowania wpływu mutacji alaninowych na interfejsie NBD/SBD β dokonano za pomocą narzędzia mCSM-PPI2. [165] Reszty aminokwasowe zostały wybrane do analizy jeśli brały udział w kontakcie między NBD a SBD β przez co najmniej połowę czasu trwania symulacji. Analizie poddano okna symulacji *umbrella sampling* odpowiadające wartości współrzędnej reakcji poniżej 3.25 nm. Promieniem odcięcia przyjętym dla obecności kontaktu było 0.35 nm. Dla każdego stanu obsadzenia kieszeni wiążącej NBD wybrano po 10 struktur, użytych następnie do oszacowania zmiany w powinowactwie SBD β (reszty 398–504) do NBD (reszty 2–385) pod wpływem mutacji alaninowych (Tabela 3 w Załączniku zestawia średnią i odchylenie standardowe z dziesięciu pomiarów).

Po odrzuceniu z uprzednio wyznaczonej grupy naładowanych aminokwasów (jak również reszt glicyny i alaniny) otrzymano ostatecznie 16 reszt. Ze wspomnianych symulacji US ponownie wybrano struktury DnaK ze związanym ATP lub ADP, w której domena SBD β była związana z NBD (wartość współrzędnej reakcji równa 3 nm), jak również struktury DnaK z rozseparowanymi domenami (wartość współrzędnej reakcji równa 4.5 nm). Struktury te zostały użyte do wygenerowania hybrydowych topologii białka, które uzyskano przy pomocy serwera pmx. [166, 167] W przypadku każdego aminokwasu przeprowadzono dwie symulacje równowagowe o długości 50 ns, z których jedna odpowiadała stanowi natywnemu ($\lambda=0$), a druga – wybranej mutacji alaninowej ($\lambda=1$). Symulacje te posłużyły do wygenerowania 50 struktur startowych dla symulacji nierównowagowych. W trakcie nierównowagowych symulacji zastosowano krok czasowy równy 1 fs, a przejście z jednego stanu do drugiego odbywało się poprzez zwiększanie (lub zmniejszanie) w każdym kroku symulacji wartości λ o $2 \cdot 10^{-6}$. Przy obliczaniu oddziaływań niewiążących przyjęto domyślne wartości parametrów: $\alpha=0.3$, $\sigma=0.25$ oraz $p=1$. Mierzone w trakcie każdego przejścia wartości $\partial H/\partial \lambda$ zostały użyte do uzyskania histogramów pracy towarzyszącej przejściu "w przód" i "w tył" – miejsce przecięcia histogramów uzyskano metodą BAR oraz CGI, korzystając ze skryptu opublikowanego na serwerze BioBB. [168] Wyniki te zestawiono w Tabelach 4 i 5 w Załączniku.

4.2 Zmiany konformacyjne DnaK indukowane związaniem domeny J

4.2.1 Równowagowe symulacje Dynamiki Molekularnej

Układ zawierający samo białko DnaK został przygotowany na podstawie struktury 4B9Q z bazy PDB. [47] Białko zostało wysolwatowane przez dodanie ok. 55000 cząsteczek wody i było symulowane w sześciennym pudle o krawędzi ~ 13.5 nm. Dla każdej z dwóch kopii symulowanego układu uzyskano $2.5 \mu\text{s}$ trajektorii. Układ zawierający kompleks białka DnaK z domeną J białka DnaJ został przygotowany na podstawie struktury 5NRO z bazy PDB. [83] Białka zostały wysolwatowane ok. 52000 cząsteczkami wody i były symulowane w sześciennym pudle o krawędzi ~ 13 nm. Dla każdej z pięciu kopii symulowanego układu uzyskano $1.8 \mu\text{s}$ trajektorii. Podobnie jak wcześniej, region domeny SBD α (reszty 534—609) został w tych układach usunięty w celu zmniejszenia kosztów obliczeniowych symulacji. Struktury otrzymane podczas symulacji równowagowych posłużyły następnie jako punkty startowe w dalszych obliczeniach energii swobodnej.

Układy izolowanej domeny J (reszty 3–65) w formie natywnej i z substytucją Pro34Ala zostały przygotowane na podstawie struktury 5NRO z bazy PDB. [83] Fragmenty białka zostały wysolwatowane ok. 7000 cząsteczkami wody i były symulowane w sześciennym pudle o krawędzi ~ 6 nm przez $1 \mu\text{s}$. Do otrzymania pełnych struktur białek J użyto serwera Alphafold2 [169] posługując się sekwencjami przykładowych ludzkich białek J typu A (UniProt ID O60884) i typu B (UniProt ID Q9UDY4). [170] Białka J (odpowiednio: typu A, typu B z EEVD i typu B bez EEVD) były solwowane ok. 70000 cząsteczkami wody i symulowane w sześciennych pudłach o krawędziach ~ 13 nm. Symulowane układy zostały przygotowane przy użyciu serwera CHARMM-GUI [159], a minimalizacja i równowagowanie układów odbywała się według domyślnego protokołu narzędzia CHARMM-GUI Solution Builder. [160] W trakcie równowagowych symulacji o długości 500 ns w pierwszych dwóch przypadkach zaobserwowano spontaniczne odejście domeny J od CTD. Wygenerowane w ten sposób struktury posłużyły jako punkty startowe w obliczeniach energii swobodnej. Dodatkowo z tak otrzymanych klatek dla białka J typu B usunięto peptyd EEVD i posłużyły one jako punkty startowe do porównawczej serii symulacji *umbrella sampling*.

4.2.2 Analiza trajektorii

Analiza głównych składowych została przeprowadzona dla ciężkich atomów domeny NBD (reszty 2–384) za pomocą narzędzi gmx covar i gmx anaeig. [150] Do wyznaczenia wektorów własnych opisujących zmiany konformacyjne NBD indukowane związaniem domeny J użyłem połączonych trajektorii izolowanego DnaK oraz układu DnaK+JD.

Analiza kontaktów mgr. Marcina Pitka (Uniwersytet Gdański) została wykonana przy użyciu

narzędzia GetContacts [171], z uwzględnieniem kontaktów, które wykazywały różnicę w występowaniu między izolowanym białkiem DnaK a jego kompleksem DnaK+JD na poziomie co najmniej 50 punktów procentowych. Tak uzyskane częstości kontaktów zostały zwizualizowane narzędziem Flareplot. [172]

Dynamiczna analiza sieci została przeprowadzona przy pomocy programu dynetan 1.0.1. Węzły w sieci odpowiadały położeniom atomów C α aminokwasów DnaK (reszty 2–394) lub domeny J DnaJ (reszty 3–65). Dodatkowe węzły zostały przypisane atomowi magnezu w centrum katalitycznym oraz cząsteczce ATP (dwa węzły odpowiadające położeniu atomu N1 pierścienia purynowego i terminalnego atomu fosforu). Ciężkie atomy pierścienia purynowego zostały przypisane do węzła odpowiadającego atomowi N1, a ciężkie atomy rybozy i fosforanów – do węzła odpowiadającego terminalnemu atomowi fosforu. Krawędzie między węzłami były tworzone jeśli ciężkie atomy przypisane do węzłów pozostawały między sobą w odległości mniejszej niż 0.45 nm przez co najmniej 75% czasu symulacji.

Dla każdej z pięciu symulowanych replik wyznaczono ścieżki allosteryczne między resztą Asp35 (Asn35) domeny J a resztą Thr199 DnaK przy pomocy algorytmu Floyda-Warshalla [148], minimalizując sumę ujemnych logarytmów z wartości współczynników korelacji między poszczególnymi węzłami. Dodatkowo wyznaczono dziesięć suboptymalnych ścieżek allosterycznych, które posłużyły do obliczenia częstości występowania poszczególnych aminokwasów w ścieżce. W przypadku kompleksu R167A DnaK+D35N JD ścieżki allosteryczne zostały wyznaczone na podstawie okna symulacji *umbrella sampling*, odpowiadającemu stanowi Thr-close.

Obserwowany kąt torsyjny między resztami His33 i Asp35 domeny J obliczono przy pomocy narzędzia gmx angle [150], a zdefiniowano go jako kąt między atomami His33 N ϵ , His33 C β , Asp35 C α i Asp35 C γ . Odległości między resztami (grupami reszt) obliczono przy pomocy narzędzia gmx distance.

4.2.3 Wyznaczanie profili energii swobodnej

Profile energii swobodnej związane ze zmianą konformacyjną reszty Thr199 w kieszeni katalitycznej NBD zostały obliczone wzdłuż współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako odległość między atomem tlenu grupy hydroksylowej reszty Thr199 oraz terminalnego atomu fosforu ATP. Klatki startowe do symulacji US otrzymano podczas symulacji dynamiki sterowanej o długości 80 ns, podczas której zwiększano odległość między Thr199 a ATP, stosując jednostronny potencjał harmoniczny o stałej siłowej równej 2000 kJ·mol⁻¹·nm⁻². Finalnie symulowano dziesięć równoodległych okien US, które pokrywały zakres 0.3–1.2 nm współrzędnej reakcji. Stała siłowa potencjału harmonicznego przykła-

danego w każdym oknie była równa $1500 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, a każde okno było symulowane przez $1 \mu\text{s}$. Analogicznie przygotowano symulacje US dla kompleksu R167A DnaK+D35N JD oraz wariantów z mutacją Y145A. Okna symulacyjne dla tych mutantów były symulowane odpowiednio, przez 900 ns i $1 \mu\text{s}$.

W wypadku badania wpływu rozpadu β -kartki na zmianę konformacyjną Thr-far do Thr-close wykonano dwie serie symulacji US, korzystając z opcji ANTIBETARMSD oferowanej przez rozszerzenie PLUMED. Pozwala ona na użycie parametru s , opisującego zawartość antyrównoległej β -kartki w strukturze i definiowanego jako:

$$s = \sum_i \frac{1 - \left(\frac{r_i - d_0}{r_0}\right)^n}{1 - \left(\frac{r_i - d_0}{r_0}\right)^m} \quad (4.2.1)$$

W powyższym równaniu suma przebiega po wszystkich możliwych segmentach β -kartki i zawiera odchylenia od referencyjnych struktur (domyślne wartości parametrów wynoszą odpowiednio: $d_0 - 0 \text{ nm}$, $r_0 - 0.08 \text{ nm}$, $m - 12$, $n - 8$). [173] W symulacjach dla izolowanego DnaK wartość parametru s dla reszt 198–206 i 219–227 była utrzymywana na wartości 2.7, a w wypadku kompleksu DnaK+JD – na wartości 1.8. W tym celu w obu przypadkach zastosowano jednostronny potencjał (odpowiednio lewo- i prawostronny), którego stała siłowa wynosiła $4000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$

Profile energii swobodnej dla związania domeny J do DnaK zostały obliczone wzdłuż współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako odległość między centrum masy ciężkich atomów domeny J (reszty 25–31 i 48–54) a centrum masy węgli $C\alpha$ miejsca wiązania DnaK (reszty 208–216 i 415–422). Klatki startowe do symulacji US otrzymano podczas symulacji dynamiki sterowanej o długości 100 ns, podczas której zwiększano odległość między DnaK a domeną J stosując jednostronny potencjał harmoniczny o stałej siłowej równej $1500 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$. Symulowano sześć równoodległych okien US, które pokrywały zakres 0.8–1.3 nm współrzędnej reakcji. Stała siłowa potencjału harmonicznego przykładanego w każdym oknie była równa $3500 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, a każde okno było symulowane przez 800 ns.

W przypadku białka J typu A, profil energii swobodnej dla dysocjacji domeny J od CTD został obliczony wzdłuż współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako odległość między centrum masy domeny J (atomy $C\alpha$ reszt 1–102) i CTD I (atomy $C\alpha$ reszt 111–144 i 211–255). Symulowano 9 równoodległych okien US, które pokrywały zakres 2.75–4.75 nm współrzędnej reakcji. Stała siłowa potencjału harmonicznego przykładanego w każdym oknie była równa $250 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, a każde okno było symulowane przez $1 \mu\text{s}$. Konformacja palców cynkowych była usztywniona poprzez dodanie potencjału harmonicznego o stałej siłowej równej $1000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, który utrzymywał stałe wartości czterech odległości cynk–siarka (0.265 nm).

W przypadku białka J typu B, profile energii swobodnej został obliczone wzdłuż analogicznej współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako odległość między centrum masy domeny J (atomy $C\alpha$ reszt 1–115) i CTD I (atomy $C\alpha$ reszt 153–238). Symulowano 10 równoodległych okien US, które pokrywały zakres 2.75–5 nm współrzędnej reakcji. Stała siłowa potencjału harmonicznego przykładanego w każdym oknie była równa $250 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$, a każde okno było symulowane przez $1 \mu\text{s}$. Ze względu na przejściowy charakter oddziaływania [98], pozycja peptydu EEVD (oktapeptydu o sekwencji GPTIEEVD odpowiadającej C-terminalnym resztom 634–641 ludzkiego białka Hsp70, HSPA1A [174]) w miejscu wiązania była utrzymywana poprzez potencjał harmoniczny o stałej siłowej równej $750 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$, który utrzymywał odległość 0.6 nm między parami atomów $C\alpha$ reszt 179–181 białka J (Thr, Ile, Lys) oraz reszt 3–5 peptydu EEVD (Thr, Ile, Glu).

Dla białka J typu B przeprowadzono ponadto symulację dynamiki sterowanej o długości 150 nm, podczas której zwiększano odległość między helisami II i III (centrum masy atomów $C\alpha$ reszt 17–57) a helisą V (centrum masy atomów $C\alpha$ reszt 93–115) od początkowej wartości $\sim 1.25 \text{ nm}$ do wartości 3.125 nm przy pomocy potencjału harmonicznego o stałej siłowej równej $500 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$. W trakcie tej symulacji utrzymywano stałą konformację helisy II i III za pomocą potencjału harmonicznego o stałej siłowej równej $1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$. Tak uzyskane struktury zostały użyte do symulacji *umbrella sampling* – symulowano 16 równoodległych okien US, które pokrywały zakres 1.25–3.125 nm współrzędnej reakcji. Stała siłowa potencjału harmonicznego przykładanego w każdym oknie była równa $500 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$, a każde okno było symulowane przez 750 ns. Zarówno w trakcie symulacji dynamiki sterowanej, jak i w trakcie symulacji US stan, w którym domena J jest oddysocjowana od CTD I (odległość helisy V od CTD I większa niż 3.5 nm) utrzymywano poprzez jednostronny potencjał o stałej siłowej równej $250 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$.

Ze względu na symulowanie monomerów białek, we wszystkich symulacjach domena dimeryzacyjna białek J została usztywniona poprzez przyłożenie harmonicznego potencjału o stałej siłowej równej $5000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$, który uniemożliwiał zmianę położenia ciężkich atomów reszt 345–355 (dla białka J typu A) lub reszt 324–334 (dla białka J typu B).

4.3 Zmiany konformacyjne DnaK indukowane obecnością substratu w SBD

4.3.1 Równowagowe symulacje Dynamiki Molekularnej

Układ DnaK w stanie S (reszty 2–533) został przygotowany na podstawie struktury 7KRU z bazy PDB. [175] Białko zostało solwatowane ok. 70000 cząsteczkami wody i było symulowane w sześciennym pudle o krawędzi $\sim 14.5 \text{ nm}$. Struktury DnaK z peptydem oraz kompleksu DnaK i domeny

J z peptydem zostały przygotowane przez mgr. M. Pitka poprzez nałożenie struktury 1DKZ [39], zawierającej SBD β ze związanym peptydem, na strukturę DnaK (kod w bazie PDB: 4B9Q [158]) lub strukturę kompleksu DnaK i domeny J (kod w bazie PDB: 5NRO [83]). Były one symulowane w sześciennych pudłach o krawędziach, odpowiednio, ~ 14 nm (solwatowane ok. 60000 cząsteczkami wody) i ~ 14.5 nm (solwatowane ok. 70000 cząsteczkami wody). Dla każdego z układów uzyskano po 5 μ s równowagowych trajektorii (5 kopii po 1 μ s).

4.3.2 Analiza trajektorii

Kąt torsyjny między subdomenami NBD został zdefiniowany analogicznie jak w poprzednich punktach. Odległości pomiędzy poszczególnymi resztami wyznaczono za pomocą narzędzi gmx distance i gmx mindist. [150] Przy analizach RMSD wzięto pod uwagę atomy węgla C α fragmentu NBD (reszty 2–385), SBD (reszty 395–533) oraz całego DnaK (reszty 2–533). Strukturę drugorzędową regionu 198–206 i 219–227 obliczono korzystając z opcji ANTIBETARMSD [173] oferowanej przez rozszerzenie PLUMED. Odległość między SBD β a NBD były zdefiniowana, podobnie jak poprzednio, jako odległość między centrum masy atomów C α SBD β (reszty 398–504) i centrum masy atomów C α reszt znajdujących się na interfejsie wiązania NBD (reszty 75–115 i 140–230).

4.3.3 Wyznaczanie profili energii swobodnej

Przy badaniu przejścia między stanem R a S, współrzędna reakcji została zdefiniowana jako różnica RMSD względem położenia atomów C α stanu R (PDB: 4B9Q, [158]) i stanu S (PDB: 7KRU, [163]). Układ izolowanego DnaK otrzymano poprzez usunięcie peptydu NRLLLTG ze struktury stanu S. W obu przypadkach, za pomocą symulacji dynamiki sterowanej o długości 350 ns przeprowadzono DnaK ze stanu S do stanu R. Przykładany potencjał harmoniczny o stałej siłowej równej 15000 kJ $\cdot$ mol $^{-1}\cdot$ nm $^{-2}$ sprowadzał wartość RMSD względem położenia atomów C α stanu R od początkowej wartości ~ 1.5 nm do 0 nm. Pod uwagę wzięto reszty 2–533 DnaK, a zakres badanej współrzędnej obejmował obszar od -1.5 nm do 1.5 nm. Profile dla przejścia DnaK (z peptydem lub bez) między stanem R i S otrzymałem przy pomocy metadynamiki (wariant *well-tempered*) [176, 177], symulując jednocześnie pięć okien różniących się początkową wartością współrzędnej reakcji (łączna długość symulacji wyniosła 5 μ s). W trakcie symulacji potencjał gaussowski o szerokości 0.04 nm i początkowej wysokości 0.15 kJ/mol był dodawany co 1 ps.

Reprezentacyjne struktury z symulacji otrzymano poprzez klastrowanie narzędziem gmx cluster. [150] Klastrowano fragmenty metadynamik próbujących region 0.4–1.1 nm (DnaK) lub -0.2 –1.2 nm (kompleks DnaK+peptyd). Użyto promienia odcięcia równego 0.25 nm i w obu przypadkach wybrano największy otrzymany klaster. Do oszacowania niepewności pomiaru otrzymanych profili energii swobodnej posłużono się metodą średnich bloków (ang. *block average method*), której wyniki zapre-

zentowano na Rysunku 6.2 w Załączniku.

4.3.4 Symulacje metadynamiki w wariancie OPES

Porównawczy układ pełnego DnaK (reszty 2–604) został przygotowany na podstawie struktury 4B9Q z bazy PDB. [158] Białko zostało wysolwatowane przez dodanie ok. 60000 cząsteczek wody i było symulowane w sześciennym pudle o krawędzi ~ 14 nm. Mapy energii swobodnej dla obrotu wokół kątów Ψ wybranej części SBD α uzyskano metodą szybkozbieżnego wariantu metadynamiki (OPES). [137] Kąty Ψ definiowane były jako kąty dwuścienne pomiędzy atomami: $N(-H)_n-C\alpha_n-C(=O)_n-N(-H)_{n+1}$. Przykładany wzdłuż wybranej pary kątów potencjał był aktualizowany co 1 ps. Wartość bariery energii swobodnej do pokonania przez układ została ustawiona na 50 kJ, a początkowa szerokość dodawanych w czasie potencjałów Gaussa została dobrana automatycznie. Każda z symulacji trwała 500 ns. Zbieżność wyników oszacowano na podstawie mierzonych w czasie wartości parametrów $Z(t)$ oraz $C(t)$, równemu oszacowaniu $\beta^{-1}\log\langle e^{\beta V} \rangle$ (Rysunki 6.3–6.5 w Załączniku).

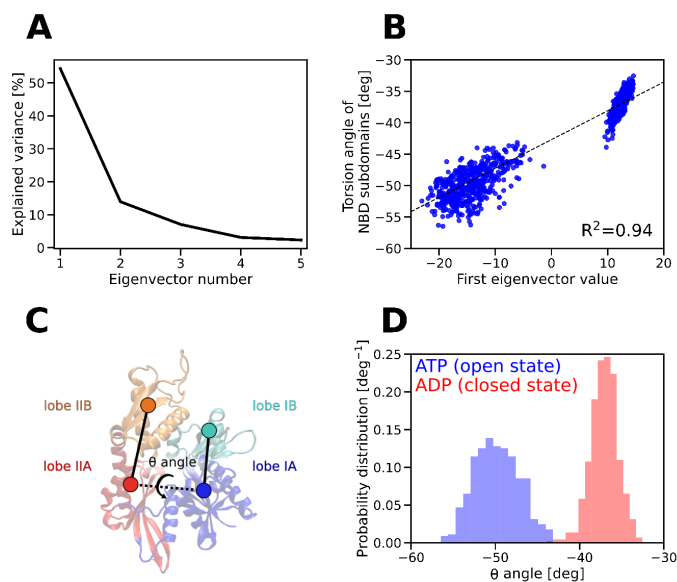
5 Wyniki i dyskusja

5.1 Zmiany konformacyjne DnaK indukowane hydrolizą ATP

5.1.1 Zmiany konformacyjne NBD

Hydroliza ATP przez DnaK prowadzi do zmian w ułożeniu interfejsu SBD β -NBD, co skutkuje odłączeniem się jednej domeny od drugiej w przypadku obecności ADP. [73] W celu uzyskania wyczerpującego opisu przejścia DnaK od stanu ze związanym ATP do stanu ze związanym ADP, przyjrzałem się zmianom konformacyjnym zarówno w obrębie NBD, jak i SBD β . Ze względu na sprzężenie obsadzenia NBD z konformacją SBD, w dalszej części pracy konformacje NBD charakterystyczne dla obsadzenia przez ATP i ADP będę nazywał przez analogię do SBD jako, kolejno, konformację otwartą i zamkniętą. Z powodu braku struktury krystalicznej domeny wiążącej nukleotyd DnaK zawierającej ADP, najpierw przygotowałem taki układ do symulacji, bazując na dostępnej strukturze NBD bez nukleotydu. [48] Następnie przeprowadziłem symulacje równowagowe dla izolowanych domen NBD z ADP i ATP (po 1 μ s dla każdego z układów).

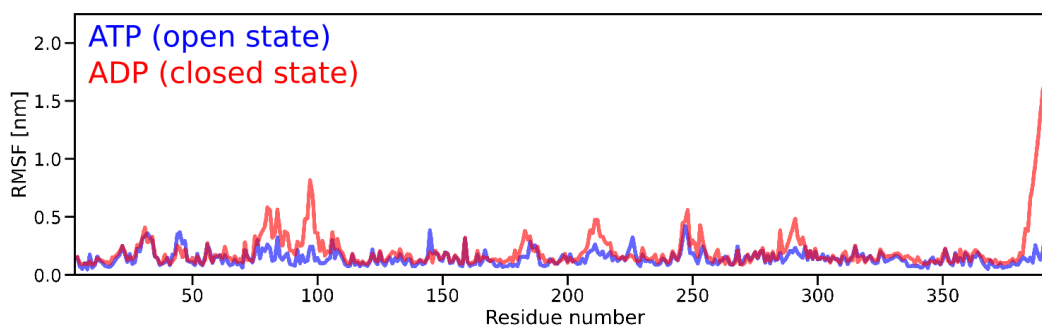
Analiza głównych składowych (PCA) otrzymanych trajektorii pozwoliła mi na wyznaczenie wektora własnego opisującego ok. 55 % zmienności konformacyjnej NBD (Rysunek 5.1.1 A).



Rysunek 5.1.1: Wyniki analizy głównych składowych dla połączonych trajektorii DnaK z ATP i ADP. (A) Część całkowitej zmienności konformacyjnej opisywana przez pięć pierwszych wektorów własnych. (B) Korelacja między wartościami pierwszej głównej składowej a kątem torsyjnym między płacami NBD. (C) Struktura NBD. Subdomena IA została zaznaczona kolorem niebieskim, IB – błękitnym, IIA – czerwonym, a IIB – pomarańczowym. (D) Rozkład prawdopodobieństwa dla kąta torsyjnego między płacami NBD w trakcie symulacji NBD z ATP (niebieski) oraz NBD z ADP (czerwony).

Wartości pierwszej głównej składowej były silnie skorelowane z kątem torsyjnym między płatami NBD (θ ; Rysunek 5.1.1 B). Przed hydrolizą ATP płaty I i II NBD są rozchylone (wartość kąta θ bliska -50°), natomiast po hydrolizie zbliżają się one do siebie, co uwidacznia zmiana wartości kąta θ o ok. 13° (Rysunek 5.1.1 D). Obserwacje te są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami o tym, że wiązanie i hydroliza ATP powoduje wzajemną rotację płatów względem siebie [45, 46], a otrzymana różnica kąta jest podobna do wartości otrzymanej przez M. Schneidera w symulacjach różnie obsadzonych izolowanych NBD. [109]

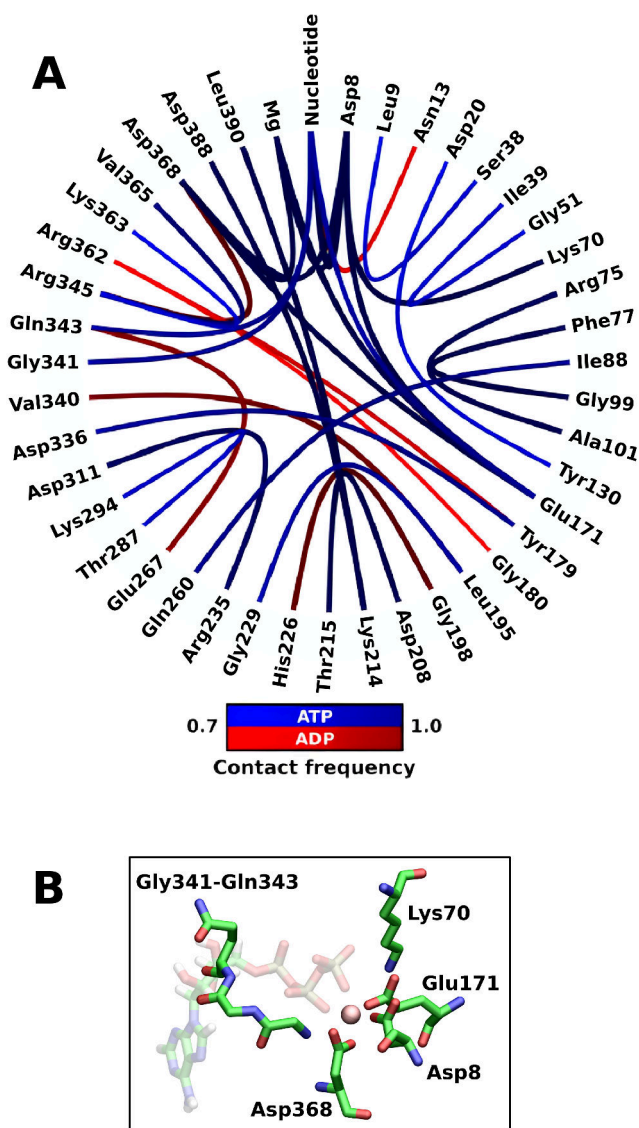
Dla obu przypadków wyznaczyłem także wartości fluktuacji położenia (RMSF) łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych NBD, które przedstawione są na Rysunku 5.1.2. Sugerują one, że zwarta struktura NBD w konformacji zamkniętej charakteryzuje się jednocześnie większą mobilnością łańcuchów bocznych w porównaniu do struktury z ATP. W szczególności wysokie wartości RMSF charakterystyczne są dla nieuporządkowanego łącznika po hydrolizie (reszty 386–393). [68] Użyłem zatem równowagowych symulacji do zidentyfikowania trwałych kontaktów (tj. obecnych przez co najmniej 70% czasu symulacji) między resztami NBD i nukleotydem, którymi oba stany różnią się między sobą.



Rysunek 5.1.2: Wartości RMSF łańcuchów bocznych domeny wiążącej nukleotydyd w trakcie symulacji NBD z ATP (niebieski) i NBD z ADP (czerwony).

Otrzymane wyniki (Rysunek 5.1.3) wskazują na to, że obecność ATP sprzyja wytworzeniu się specyficznej sieci dwudziestu siedmiu trwałych kontaktów między resztami NBD, kationem magnezu i nukleotydem w kieszeni wiążącej. Dla porównania, jedynie siedem trwałych kontaktów występowało w stanie zamkniętym, co zgadza się z większą dynamiką NBD po hydrolizie. W szczególności brak terminalnego fosforanu ATP wpływa na preferowane oddziaływania reszt Tyr179, Leu195, Gln343, Arg345 i Asp368. Reszta Asp368 przed hydrolizą pozostawała w kontakcie z jonem magnezu, Asp8 i Glu171 (sprzęgającą hydrolizę ATP z obecnością substratu w SBD β [114]). Po hydrolizie reszta ta oddziałuje z kolei z Arg345, która przed hydrolizą tworzyła stabilne połączenia z Lys363 i Val365. Z uprzednio sugerowanych czterech reszt wykazujących szczególną wrażliwość na obsadzenie NBD

[109] na Rysunku 5.1.3 widoczne są dwie z nich, Gly229 i Glu267 (brak natomiast oddziaływań tworzonych z Asp233 lub Lys270).



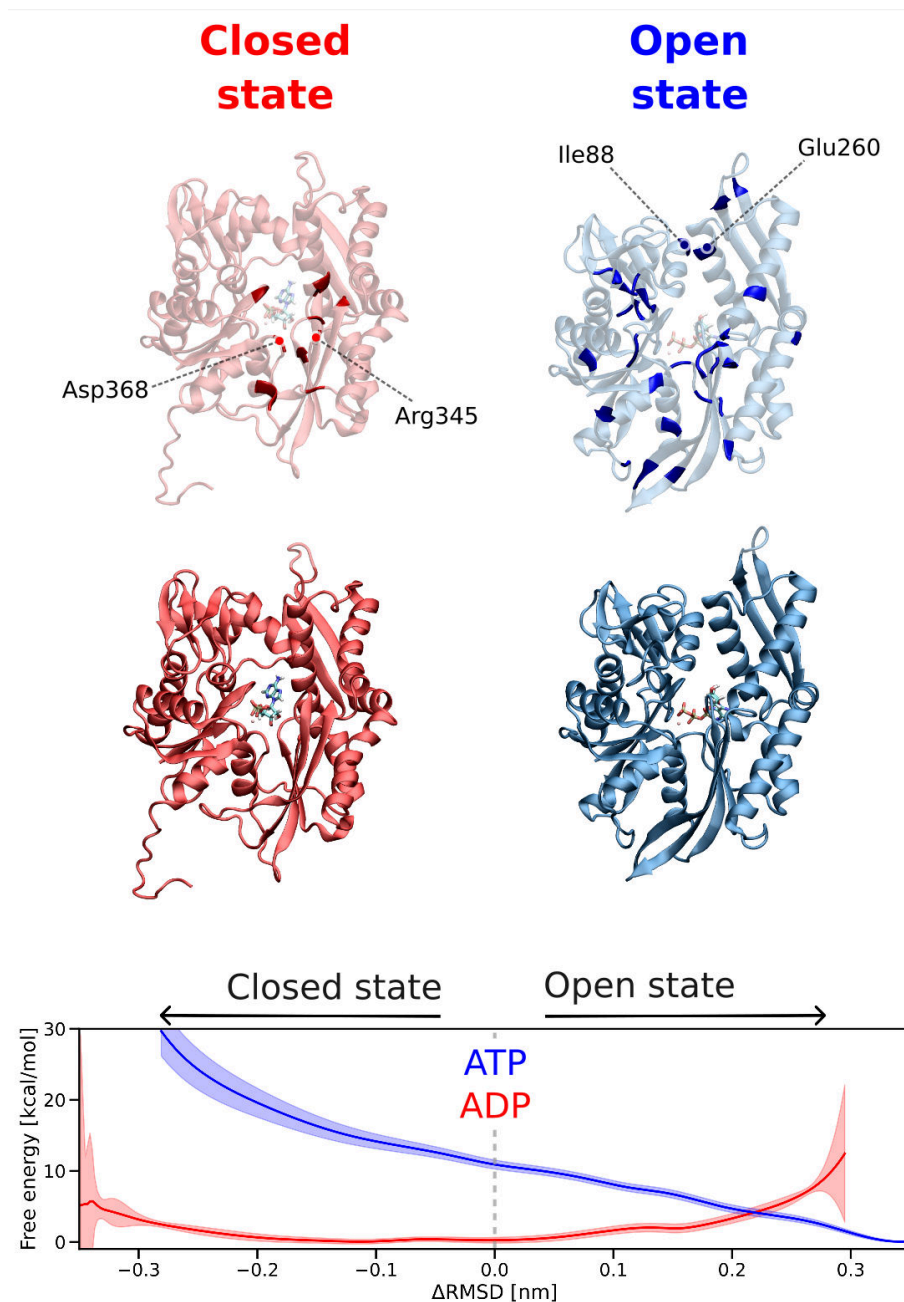
Rysunek 5.1.3: (A) Wykres strunowy obrazujący charakterystyczne kontakty reszt aminokwasowych NBD w konformacji otwartej (kolor niebieski) i zamkniętej (kolor czerwony). Nasycenie koloru odpowiada trwałości kontaktu w trakcie symulacji. (B) Sieć trwałych kontaktów między resztami NBD, kationem magnezu i ATP w kieszeni wiążącej.

Charakterystyczny dla stanu zamkniętego kontakt Arg345–Asp368 jest kontaktem między resztami znajdującymi się na dwóch płatach NBD, którego pojawienie się wymaga zwartej konformacji NBD. Przeciwnie, rozchylona struktura otwartej NBD umożliwia oddziaływanie Ile88 (z płata I) z resztą Gln260 (z płata II). Co warto odnotować, wśród charakterystycznych kontaktów dla struktury NBD z ATP brakuje połączeń dla uporządkowanego łącznika międzydomenowego. [178, 179]

Wcześniejsze badania techniką NMR pozwoliły na wytypowanie reszt zaangażowanych w zmianę konformacyjną NBD spowodowaną hydrolizą ATP. [179] Wśród reszt, którym odpowiada największa różnica przesunięć chemicznych, $\Delta\delta$, znajdują się reszty wyłonię przez mnie w toku analizy charakterystycznych dla nukleotydu kontaktów: Asp8, Leu9, Glu171, Leu195, Lys214, Thr215, Val340 i Asp388. Podobnie, przeprowadzone przez Adriana i współpracowników symulacje DnaK dla różnego stanu obsadzenia NBD pozwoliły na zaproponowanie reszt zaangażowanych w zmianę konformacyjną spowodowaną związaniem ATP i propagowanie sygnału z NBD do SBD. [180] Należą do nich Asn13, Phe77, Gly99, Ala101, Leu195, Lys214, Thr215, Val340, Gly341 i Asp388, widoczne na Rysunku 5.1.3 A. Porównując różne stany obsadzenia NBD, badacze wytypowali sześć aminokwasów odpowiadających za specyficzne kontakty z ATP w kieszeni wiążącej: Thr11, Gly197, Gly198, Thr199, Ile271 oraz Gly341. Wśród zaproponowanych reszt jedynie Gly341 pokrywa się z otrzymanymi przeze mnie wynikami – może to być jednak spowodowane przyjęciem bardziej rygorystycznego kryterium obecności kontaktu między dwoma resztami (warunkiem zaistnienia kontaktu w przytaczanej pracy była wzajemna odległość reszt mniejsza lub równa 0.4 nm przez co najmniej 50% czasu symulacji; w moim przypadku wartości te wynosiły odpowiednio 0.35 nm i 70%). Podobnie, nie zaobserwowałem sieci oddziaływań między resztami Asn144–Arg156, które w pięciokrotnie krótszych symulacjach DnaK były charakterystyczne dla zamkniętej konformacji NBD. [181]

Warto również wspomnieć o wynikach symulacji porównujących konformację NBD z ATP i kompleksem ADP+Pi, ilustrującym bezpośredni stan po hydrolizie. [182] Autorzy pracy wytypowali szereg reszt o większej swobodzie konformacyjnej kątów dwuściennych Φ i Ψ , które mogłyby sterować ruchami między płatami NBD (znajdują się wśród nich Asn13, Asp20, Gly51, Leu195, Gly198 i Gly229) oraz reszt, których ruch był skorelowany z obsadzeniem NBD (wśród których są Asp8, Ser38, Ile39, Gly51, Leu195, Gly229). W publikacji odnotowano również 25 innych reszt, których ruch wykazuje korelację z obsadzeniem NBD, a które nie są obecne w wyznaczonej przeze mnie sieci kontaktów. Wśród nich znajdowała się Gly228, która wraz z Gly229, może pełnić ważną rolę przy koordynowaniu ruchu NBD i sprzęganiu komunikacji między NBD a SBD. Trzeba jednak podkreślić, że wnioski te zostały wyciągnięte na podstawie dużo krótszych symulacji, bowiem długość symulacji opisywanych w owej pracy wynosiła zaledwie 5 ns.

W następnym kroku chciałem zbadać zmiany energii swobodnej towarzyszące przejściu konformacyjnemu NBD od stanu otwartego do stanu zamkniętego. W tym celu przeprowadziłem symulacje dynamiki sterowanej podczas których zmieniałem konformację NBD zawierającej ATP w kieszeni wiążącej na konformację zamkniętą (analogiczne przejście do stanu otwartego przeprowadziłem dla NBD zawierającej ADP). Strukturami startowymi w obu przypadkach były struktury otrzymane



Rysunek 5.1.4: (Góra) Struktury NBD otrzymane w wyniku klastrowania trajektorii, które posłużyły jako punkty odniesienia do symulacji wzmocnionego próbkowania. Na półprzezroczystych strukturach zaznaczone zostały reszty pojawiające się na Rysunku 5.1.3 A, z wyszczególnieniem reszt tworzących trwałe kontakty między płacami. (Dół) Profile energii swobodnej dla przejścia konformacyjnego NBD między stanem otwartym i zamkniętym w obecności ATP (kolor niebieski) lub ADP (kolor czerwony) w kieszeni wiążącej nukleotyd.

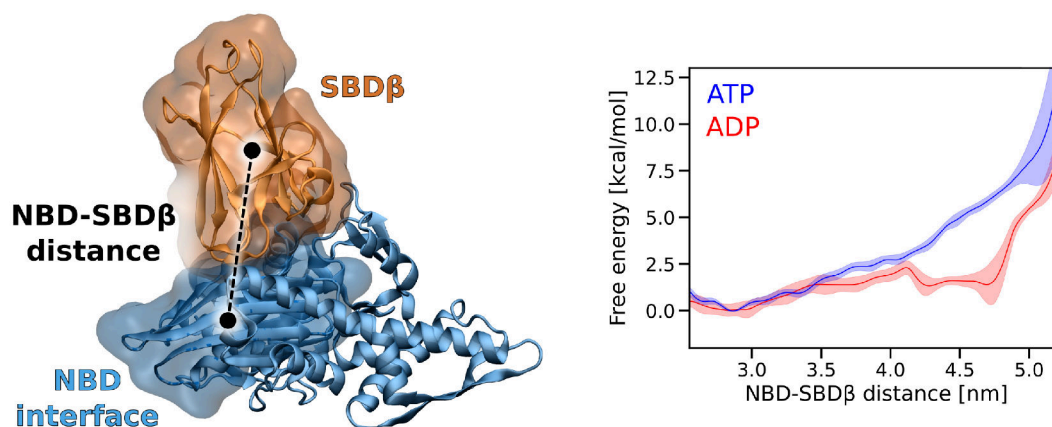
poprzez klastrowanie wcześniej wygenerowanych trajektorii równowagowych. Profil energii swobodnej dla badanych zmian konformacyjnych wyznaczyłem korzystając z metody *umbrella sampling*, używając współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako różnica wartości RMSD względem struktur NBD

z ADP i ATP (Rysunek 5.1.4).

Otrzymany profil energii swobodnej dla NBD z ATP charakteryzuje się dużą barierą (powyżej 20 kcal/mol), która może być związana z rozrywaniem korzystnych, polarnych kontaktów w kieszeni wiążącej. Przeciwnie, profil energii uzyskany dla NBD zawierającego ADP jest względnie płaski i nie wykazuje wyraźnego minimum. Ponownie przemawia to za większą mobilnością NBD po hydrolizie i może tłumaczyć, dlaczego liczba charakterystycznych kontaktów właściwych dla ADP jest niewielka. Wyniki te zgodne są z poprzednimi badaniami, które wskazywały na to, że fluktuacje konformacyjne NBD rosną zgodnie z kolejnością: ATP, ADP+Pi, ADP. [183]

5.1.2 Dysocjacja SBD β z powierzchni NBD

W dalszej kolejności postanowiłem przyjrzeć się procesowi dysocjacji SBD β od powierzchni NBD, który jest efektem hydrolizy ATP. W tym celu przeprowadziłem symulacje wzmocnionego próbkowania wzdłuż odległości NBD-SBD β , ponownie dla dwóch możliwych sposobów obsadzenia kieszeni wiążącej nukleotyd (Rysunek 5.1.5).

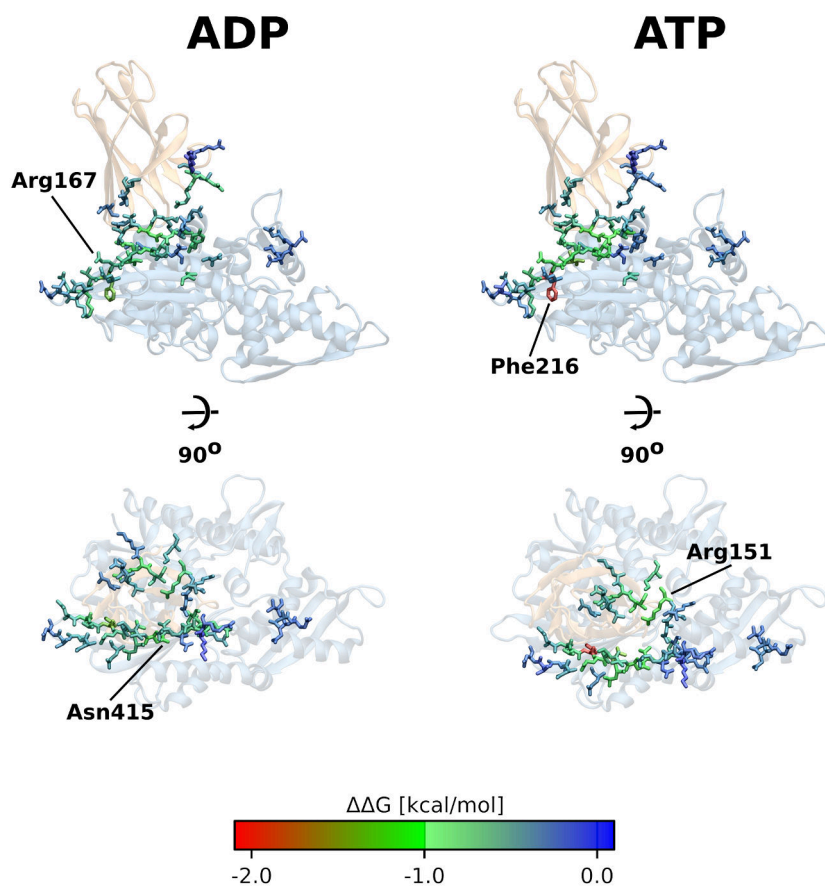


Rysunek 5.1.5: Dysocjacja SBD β od NBD w zależności od obsadzenia kieszeni wiążącej nukleotyd. (Lewa strona) Schematyczne przedstawienie współrzędnej reakcji– NBD zostało przedstawione kolorem niebieskim, a SBD β – pomarańczowym. (Prawa strona) Profile energii swobodnej dla dysocjacji SBD β z powierzchni NBD. Profil dla obsadzenia kieszeni wiążącej nukleotyd przez ATP został przedstawiony kolorem niebieskim, a dla obsadzenia kieszeni przez ADP– kolorem czerwonym.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że gdy ATP znajduje się w kieszeni wiążącej, minimum energetyczne odpowiada wzajemnej odległości domen równej ~ 2.9 nm. Zwiększanie tej odległości powoduje wzrost energii swobodnej, co pozwala na wywnioskowanie, że przy obsadzeniu NBD przez ATP dysocjacja SBD β nie jest faworyzowana i dwie domeny pozostają ze sobą w ścisłym kontakcie. Obsadzenie NBD przez ADP zmienia z kolei przebieg profilu dysocjacji dwóch domen: dla odległości

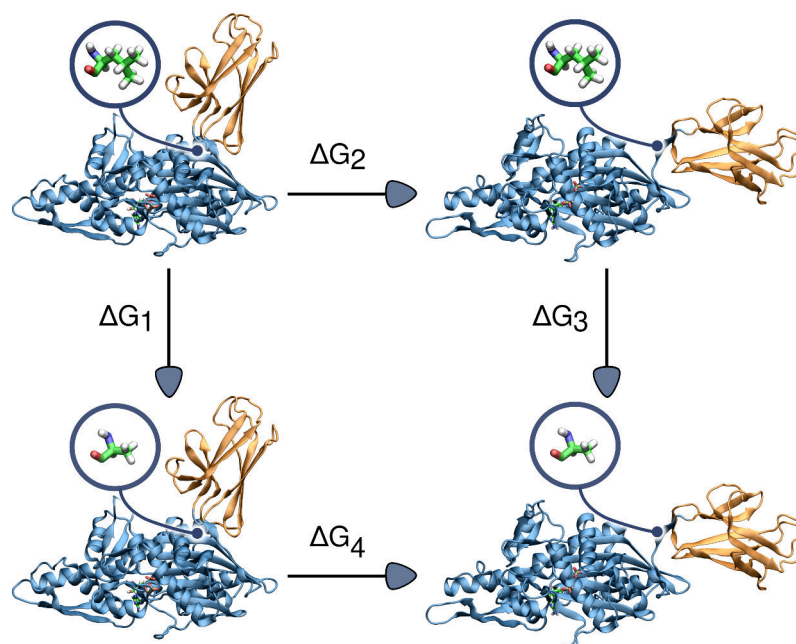
ok. 4.5 nm pojawia się drugie minimum energetyczne, odpowiadające rozdysocjowanym domenom. Z kolei widoczny wzrost energii swobodnej dla dalszych odległości może być spowodowany ograniczoną długością międzydomenowego łącznika. Otrzymane wyniki potwierdzają zatem, że dysocjacja domen DnaK nie zachodzi spontanicznie przed hydrolizą i dopiero obecność ADP umożliwia tę zmianę konformacyjną.

Chcąc sprawdzić, które reszty aminokwasowe mogą odpowiadać za zmienne powinowactwo SBD β i NBD, wytypowałem reszty, które w stanie zasocjowanym tworzą sieć trwałych połączeń między NBD a SBD β . Następnie, przy użyciu narzędzia mCSM-PPI2 opartego o uczenie maszynowe [165], zgrubnie oszacowałem wpływ mutacji alaninowych 41 reszt znajdujących się na międzydomenowym interfejsie na powinowactwo SBD β do NBD (Rysunek 5.1.6 oraz Tabela 3 w Załączniku).



Rysunek 5.1.6: Wpływ mutacji alaninowych reszt znajdujących się na interfejsie NBD/SBD β na powinowactwo SBD β do NBD, w zależności od obsadzenia kieszeni wiążącej nukleotydy. Ujemne wartości $\Delta\Delta G$ oznaczają łatwiejszą dysocjację w przypadku zmutowanego wariantu białka.

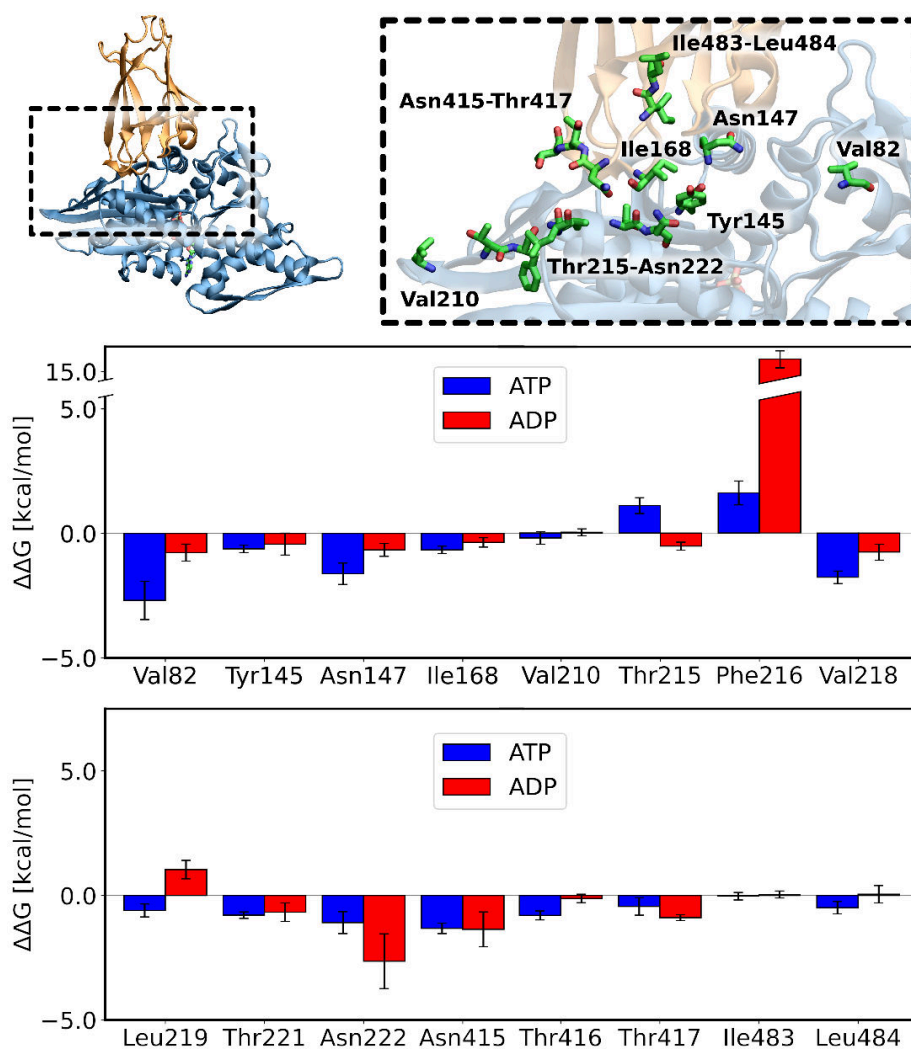
Niezależnie od obsadzenia NBD, punktowe mutacje nie wpłynęły znacząco na preferencję do dysocjacji SBD β (do 1 kcal/mol różnicy), a w granicach błędu eksperymentalnego każda mutacja ułatwiała ten proces. Dla NBD ze związanym ATP resztami wykazującymi największy wpływ na łatwość dysocjacji były: Phe216 (−2.05 kcal/mol), Val218 (−1.36 kcal/mol), Asn415 (−1.03 kcal/mol), Arg151 (−1.00 kcal/mol) oraz Thr221 (−0.90 kcal/mol). Z kolei przy związanym ADP największa różnica była zauważalna dla Phe216 (−1.30 kcal/mol), Asn415 (−0.93 kcal/mol), Arg167 (−0.90 kcal/mol), Val218 (−0.79 kcal/mol) i Lys214 (−0.78 kcal/mol). W tej grupie znalazły się zatem reszty Arg151, Arg167, Thr221 i Asn415, które są zaangażowane w międzydomenowe kontakty stabilizujące konformację NBD niezdolną do hydrolizy ATP. [110] Warto ponadto zauważyć, że siedem spośród tych dziesięciu reszt nie posiada łańcuchów bocznych obdarzonych ładunkiem, co podkreśla wkład oddziaływań niepolarnych w stabilizację interfejsu NBD/SBD β . Poza tym reszty o zauważalnym wkładzie w stabilność interfejsu tworzą dwa skupiska obejmujące reszty 214–221 oraz 415–417. W oczywisty sposób spośród wytypowanych reszt wyróżnia się Phe216: mutacje Phe216Ala mają największy wpływ na łatwość dysocjacji SBD β , zarówno dla ATP, jak i dla ADP w kieszeni wiążącej NBD; ponadto, wykazują one także największą różnicę zmian $\Delta\Delta G$ pod wpływem zmiany nukleotydu. Warto podkreślić, że Phe216 może bezpośrednio oddziaływać z międzydomenowym łącznikiem [178], co rzeczywiście umożliwiałoby jej udział w sprzęganiu obsadzenia NBD i dysocjacji SBD β .



Rysunek 5.1.7: Cykl termodynamiczny związany z badaniem wpływu mutacji punktowej na łatwość dysocjacji SBD β z powierzchni NBD. Wartości ΔG_1 i ΔG_3 są związane z mutacjami pojedynczego aminokwasu w alaninę, a wartości ΔG_2 i ΔG_4 – z separacją domen.

Ze względu na to, że wstępne wyniki podkreśliły rolę elektrycznie obojętnych reszt w stabilizowaniu interfejsu NBD/SBD β , postanowiłem dokładniej przyjrzeć się ich wkładowi w powinowactwo SBD β do NBD. W tym celu dla 16 spośród wcześniej wybranych reszt powtórzyłem obliczenia wyznaczenia wartości $\Delta\Delta G$ korzystając tym razem z metod alchemicznych. Cykl termodynamiczny skonstruowany na potrzeby zbadania względnego wkładu aminokwasu w powinowactwo NBD i SBD β przedstawiony został na Rysunku 5.1.7.

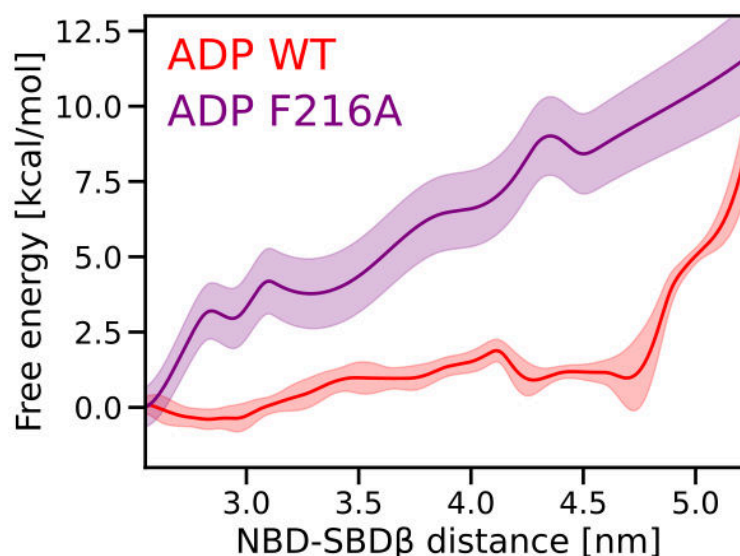
Ponownie jak w przypadku uprzednio uzyskanych wyników, symulacje alchemiczne także sugerują, że większość mutacji alaninowych w różnym stopniu destabilizuje interfejs NBD/SBD β (Rysunek 5.1.8). Warto zauważyć, że aż w 75% przypadków wyznaczone wartości $\Delta\Delta G$ metodą BAR pokrywają się w granicach ± 0.5 kcal/mol (Tabela 4 w Załączniku).



Rysunek 5.1.8: Wpływ mutacji alaninowych poszczególnych reszt na powinowactwo SBD β do NBD. Ujemne wartości $\Delta\Delta G$ oznaczają łatwiejszą dysocjację domen dla zmutowanego wariantu białka.

Co ciekawe, wartości $\Delta\Delta G$ dla tego samego aminokwasu, a dla różnego obsadzenia NBD, potrafiły różnić się nie tylko wielkością (Val82, Asn222), ale też i znakiem (Thr215, Leu219). Największym zaskoczeniem była natomiast wartość $\Delta\Delta G$ otrzymana dla Phe216 z ADP w kieszeni wiążącej (16.14 ± 0.34 kcal/mol). Dodatni znak $\Delta\Delta G$ wskazuje na to, że nieobecność fenyloalaniny skutecznie uniemożliwia dysocjację obu domen. Narzędzie mCSM-PPI2 również przewidziało centralną rolę Phe216 w interfejsie NBD/SBD β , jednak sugerowało ono odmienny efekt, tzn. łatwiejszą dysocjację domen w przypadku mutacji Phe216Ala.

Chcąc rozstrzygnąć te rozbieżności, wyznaczyłem dla tej mutacji pełen profil energii swobodnej, używając dokładniejszej metody US, podobnie jak zrobiłem to dla natywnych wariantów DnaK (Rysunek 5.1.9). Jednoznacznie pokazuje on, że usunięcie fenyloalaniny utrudnia dysocjację domen, choć efekt ten jest o połowę mniejszy niż przewidywały to symulacje alchemiczne (ok. 8 kcal/mol). Niestety, pomimo tego, że Phe216 jest jedną z reszt, które bezpośrednio oddziałują z międzydomenowym łącznikiem, brakuje wcześniejszych prac, które opisują jej wkład w komunikację w obrębie DnaK, co uniemożliwia porównanie otrzymanych wyników z danymi biochemicznymi i zweryfikowanie kluczowej roli Phe216.



Rysunek 5.1.9: Wpływ mutacji punktowej Phe216Ala na powinowactwo SBD β do NBD. Profil dla dzikiego wariantu DnaK z ADP został przedstawiony kolorem czerwonym, a profil dla wariantu Phe216Ala– kolorem fioletowym.

Biorąc pod uwagę, że sąsiadujące reszty (Thr215, Phe216, Val218, Leu219, Asn222) wykazują zauważalne różnice w wartościach $\Delta\Delta G$, co świadczy o ich zaangażowaniu w różne sieci oddziaływań zależnych od nukleotydu w NBD, można przypuszczać, że to właśnie region Thr215-Asn222 jest

fragmentem NBD koordynującym powinowactwo obu domen względem siebie. Co ciekawe, Chiapori i współpracownicy donieśli o tym, że obecność ATP faworyzuje konformację sąsiadującej pętli Glu209–Lys214, w której orientuje się ona ku międzydomenowemu łącznikowi. [178] Brak oddziaływań tych reszt z łącznikiem w obecności ADP przemawiał za ich kluczową rolę w dokowaniu SBD. Ponadto wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazywały na udział regionu Glu206–Thr221 w oddziaływaniu z DnaJ oraz w stymulowaniu hydrolizy ATP. [184, 185, 186] Moje wyniki sugerują, że jego część mogłaby ponadto pełnić rolę w koordynowaniu asocjacji (i dysocjacji) domen DnaK.

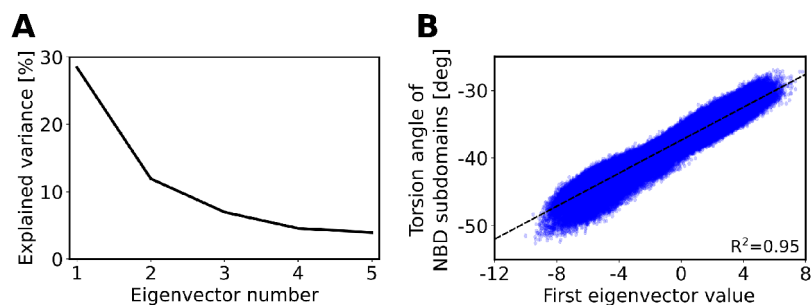
Porównując otrzymane wyniki z rezultatami grupy badawczej Mayera, zaskakująca może być znikoma wartość $\Delta\Delta G$ dla reszty Ile168: wiązanie wodorowe między Asp481 i Ile168, które tworzone jest w hydrofobowym otoczeniu niepolarnych łańcuchów miało mieć znaczący wkład w stabilizację międzydomenowego interfejsu. [110] Niemniej, w tworzeniu tego wiązania uczestniczy łańcuch główny, a nie boczny izoleucyny, co tłumaczy niskie $\Delta\Delta G$ przy zmianie tej reszty na alaninę. Z kolei wkład Asn415, dokującej SBD β na powierzchni NBD poprzez kontakt z Asp326 [187] ponownie mieści się w przedziale 1–1.5 kcal/mol. Należy jednak zaznaczyć, że znikomy wkład danej reszty aminokwasowej w powinowactwo SBD β do NBD nie wyklucza jej zaangażowania w procesy komunikacji między domenami. Mutacje alaninowe Tyr145, Asn147 czy Thr417 skutecznie osłabiały transmisję sygnału allosterycznego między kieszeniami wiążącymi substrat i nukleotyd. [180, 184, 187, 188, 189, 190] Natomiast w przypadku mutacji alaninowej Leu484, stymulacja hydrolizy ATP przez substrat została skutecznie zahamowana, nawet przy jednoczesnej obecności DnaJ. [110]

Podsumowując, moje wyniki wskazują na to, że hydroliza ATP powoduje zmianę ułożenia płatów NBD oraz umożliwia większą mobilność łańcuchów bocznych, w szczególności reszt międzydomenowego łącznika. Dla NBD w konformacji otwartej i zamkniętej określiłem charakterystyczne kontakty wewnątrz domeny i pokazałem, że przy obsadzeniu kieszeni wiążącej przez ATP przejście pomiędzy konformacją otwartą i zamkniętą nie zachodzi spontanicznie. Ponadto, udowodniłem, że dysocjacja SBD β z powierzchni NBD jest faworyzowana jedynie po hydrolizie ATP. Badając wpływ mutacji punktowych w obrębie interfejsu NBD–SBD β , wskazałem na rolę reszty Phe216 i regionu 215–222 w sprzęganiu obsadzenia NBD z powinowactwem między domenami.

5.2 Zmiany konformacyjne DnaK indukowane związaniem domeny J¹

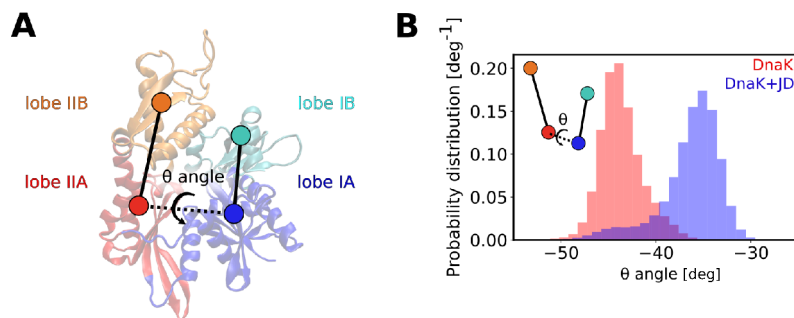
5.2.1 Zmiany konformacyjne NBD

W celu scharakteryzowania zmian konformacyjnych DnaK następujących po związaniu domeny J, przeprowadziłem symulacje równowagowe o długości kilku mikrosekund dla izolowanego białka DnaK oraz dla kompleksu DnaK z domeną J (DnaK+JD). W celu zidentyfikowania kluczowych zmian w obrębie NBD ponownie użyłem analizy głównych składowych. Jak poprzednio, pierwszy wektor własny – opisujący 28 % całkowitej zmienności konformacyjnej – był wystarczający do rozróżnienia stanów NBD w izolowanym DnaK oraz w kompleksie DnaK+JD (Rysunek 5.2.1 A).



Rysunek 5.2.1: Wyniki analizy głównych składowych dla połączonych trajektorii DnaK oraz DnaK+JD. (A) Część całkowitej zmienności konformacyjnej opisywana przez pięć pierwszych wektorów własnych. (B) Korelacja między wartościami pierwszej głównej składowej a kątem torsijskim między subdomenami NBD. [191]

Wartości pierwszej głównej składowej były ściśle skorelowane z kątem torsijskim między płaszczyznami NBD ($R^2=0.95$, Rysunek 5.2.1 B), a jego wartości wskazywały na to, że po związaniu domeny J kąt między płaszczyznami NBD zmniejsza się o $\sim 7^\circ$ w porównaniu z izolowanym DnaK (Rysunek 5.2.2).

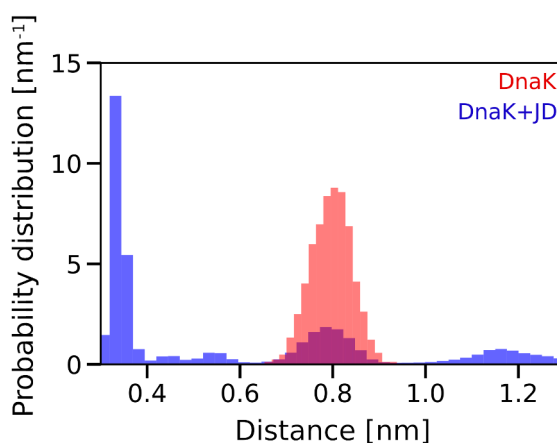


Rysunek 5.2.2: (A) Struktura NBD. Subdomena IA została zaznaczona kolorem niebieskim, IB – błękitnym, IIA – czerwonym, a IIB – pomarańczowym. (B) Rozkład prawdopodobieństwa dla kąta torsijskiego między płaszczyznami NBD w trakcie symulacji DnaK (czerwony) oraz kompleksu DnaK+JD (niebieski). [191]

¹Wyniki zaprezentowane w tym podrozdziale zostały opublikowane w pracy [191].

Porównując uzyskane rozkłady z otrzymanymi dla izolowanych domen NBD (Rysunek 5.1.1) można zauważyć dwie tendencje. Przy obsadzeniu kieszeni wiążącej przez ATP nieobecność SBD sprzyja większemu rozchyleniu płatów NBD (o ok. 5°). Z kolei obecność domeny J sprzyja ciaśniejszemu upakowaniu płatów, podobnie jak ma to miejsce w konformacji NBD po hydrolizie.

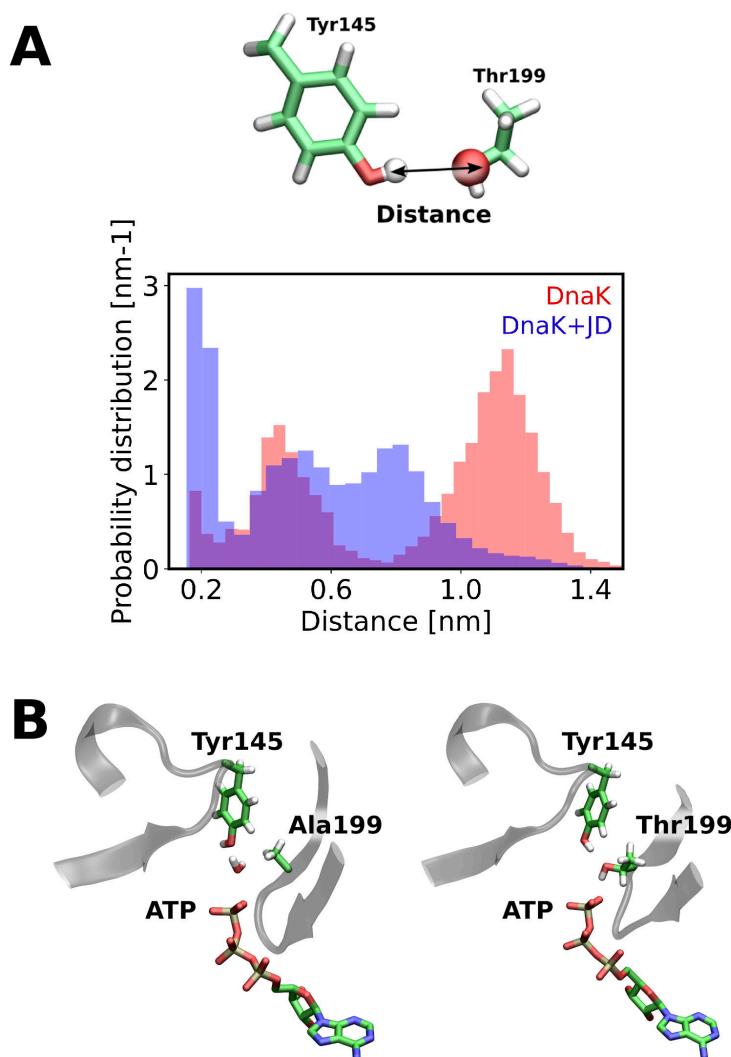
Przyglądając się symulacjom, w których zastąpiłem wprowadzoną na potrzeby krystalizacji mutację Ala199 treoniną zaobserwowałem, że oddziaływanie reszty Thr199 z ATP jest obecne w kompleksie DnaK+JD, a brak go w trajektoriach dla izolowanego DnaK (Rysunek 5.2.3). Thr199 oddziaływała z nukleotydem przez grupę hydroksylową łańcucha bocznego, a nie – jak poprzednio sugerowano – grupę amidową łańcucha głównego. [192] Thr199 jest istotną resztą dla aktywności ATP-azowej DnaK [108], a jej stabilny kontakt z terminalnym fosforanem ATP w przypadku kompleksu DnaK+JD może wskazywać na jej bezpośredni udział w reakcji hydrolizy, np. poprzez stabilizację przejściowego metafosforanu. [83]



Rysunek 5.2.3: Rozkład prawdopodobieństwa odległości pomiędzy tlenem grupy hydroksylowej Thr199 a terminalnym fosforanem ATP otrzymany z trajektorii dla izolowanego DnaK (czerwony) oraz kompleksu DnaK+JD (niebieski). [191]

W otrzymanych przeze mnie trajektoriach widoczne jest także przemieszczenie reszty Tyr145, charakterystyczne dla stanu aktywnego DnaK, będącego rezultatem związania substratu (Rysunek 5.2.4 A). [163] W strukturze krystalicznej stanu aktywnego DnaK grupa hydroksylowa Tyr145 pośrednio stabilizuje terminalny fosforan ATP poprzez cząsteczkę wody, która zlokalizowana jest w miejscu mutacji punktowej T199A. Ze względu na to, że w moich symulacjach reszta Thr199 została przywrócona, grupa hydroksylowa z bocznego łańcucha treoniny zajmuje miejsce wody ze struktury krystalicznej, bezpośrednio oddziałując z ATP (Rysunek 5.2.4 B). Możliwe więc, że Tyr145 przyczynia się do stabilizacji oddziaływania Thr199–ATP, a przemieszczenie tej reszty jest elementem wspólnym

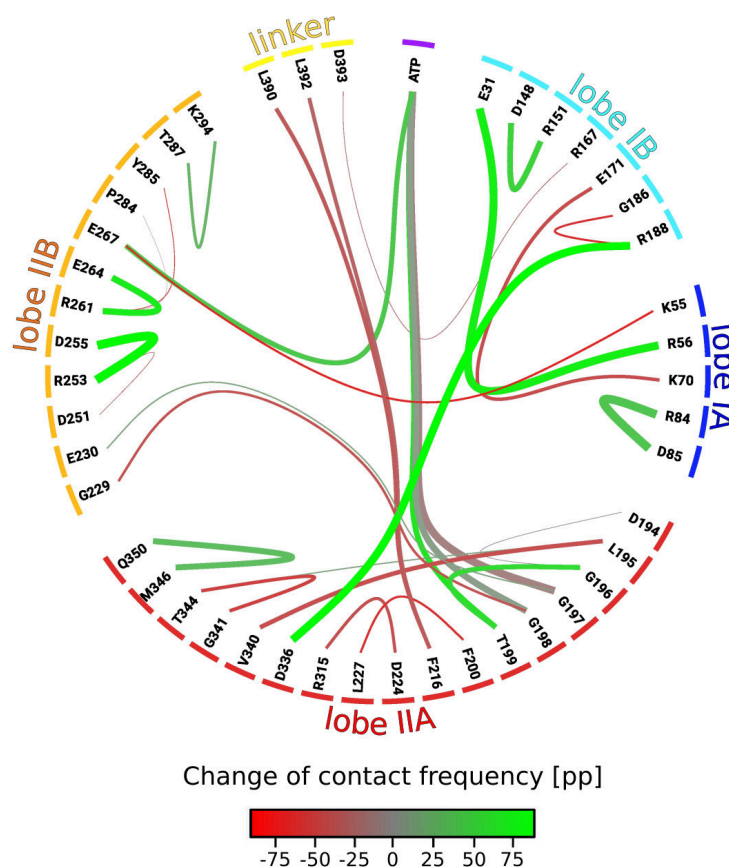
w stymulacji DnaK indukowanej przez substrat i związanie białka J.



Rysunek 5.2.4: Koordynacja ATP przez Tyr145. (A) Rozkład prawdopodobieństwa odległości pomiędzy tlenem grupy hydroksylowej Thr199 a wodorem grupy hydroksylowej Tyr145 otrzymany z trajektorii dla izolowanego DnaK (czerwony) oraz kompleksu DnaK+JD (niebieski). (B) Koordynacja terminalnego fosforanu ATP w strukturze aktywnego katalitycznie DnaK ze związanym substratem (kod PDB: 7KRU [163]; lewa strona) oraz w reprezentacyjnej strukturze z symulacji układu DnaK+JD (prawa strona). [191]

Szczegółowego scharakteryzowania zmian w obrębie NBD podjął się mój współpracownik, mgr Marcin Pitek z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. Porównał on różnice w oddziaływaniach pomiędzy resztami NBD i międzydomenowego łącznika, wynikające ze związania domeny J (Rysunek 5.2.5). Największe różnice w częstości kontaktów były właściwe dla: (i)

miejsca związania domeny J, (ii) kieszeni wiązającej ATP oraz (iii) subdomeny IIB NBD. Zmiany kontaktów wynikające ze związania domeny J obejmowały także reszty aminokwasowe biorące udział w komunikacji allosterycznej między NBD i SBD (Lys70, Asp148, Arg151, Glu171, Leu390, Leu392). [67, 68, 107, 108, 109]

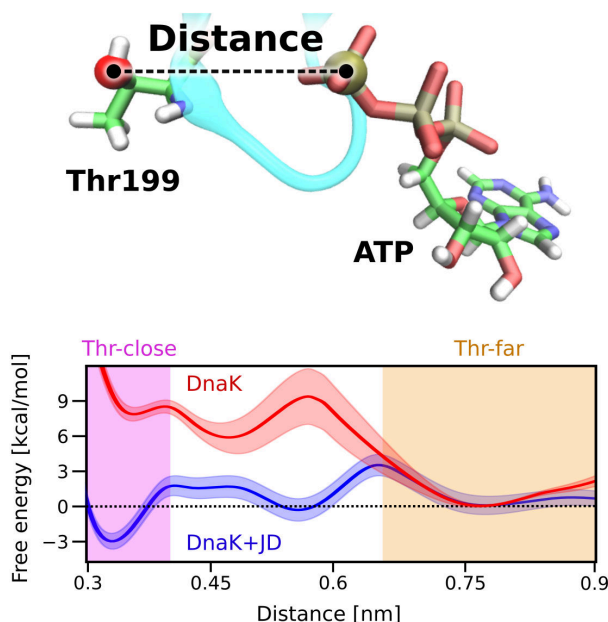


Rysunek 5.2.5: Wykres strunowy obrazujący częstość kontaktów reszt aminokwasowych NBD. Grubość linii jest proporcjonalna do częstości kontaktu między resztami w symulacji izolowanego DnaK. Kolor linii obrazuje natomiast zmianę w częstości kontaktu po związaniu domeny J. [191]

5.2.2 Obecność domeny J umożliwia kontakt Thr199 z ATP

W celu rozwiązania struktur krystalicznych DnaK ze związonym ATP, reszta Thr199 jest zastępowana przez alaninę, co powoduje zahamowanie aktywności ATP-azowej białka. [83, 158] Z tego powodu dane krystalograficzne nie dostarczają szczegółowych informacji dotyczących roli Thr199 w procesie katalitycznym. Ze względu na to, że w symulacjach układu DnaK+JD zaobserwowałem przesunięcie Thr199 w kierunku ATP, postanowiłem zbadać bliżej tę zmianę konformacyjną. Korzystając z metod wzmocnionego próbkowania, wyznaczyłem profile energii swobodnej wzdłuż współ-

rzędnej reakcji zdefiniowanej jako odległość między hydroksylowym tlenem Thr199 a terminalnym fosforanem ATP (Rysunek 5.2.6).

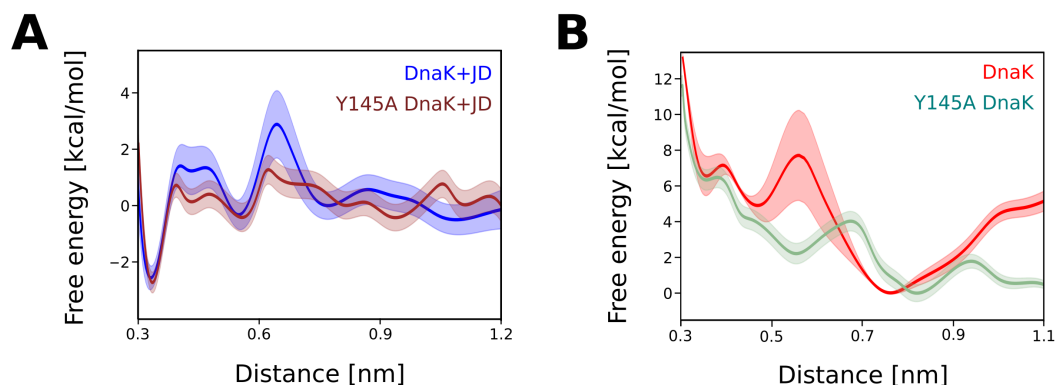


Rysunek 5.2.6: (Góra) Schematyczna reprezentacja współrzędnej reakcji użytej w symulacjach wzmocnionego próbkowania. (Dół) Profile energii swobodnej wzdłuż odległości Thr199 od terminalnego fosforanu ATP dla izolowanego DnaK (czerwony) i dla kompleksu DnaK+JD (niebieski). Fioletowy obszar wskazuje na stan Thr-close (odległość <0.4 nm), natomiast pomarańczowy – stan Thr-far (odległość >0.65 nm). [191]

Profil energii swobodnej dla izolowanego DnaK charakteryzuje się wyraźnym minimum energetycznym, odpowiadającym sytuacji, gdzie grupa hydroksylowa Thr199 znajduje się w odległości ~ 0.8 nm od ATP i nie tworzy z nukleotydem bezpośredniego kontaktu (stan "Thr-far"). W szczególności ten stan jest korzystniejszy o 6 kcal/mol od stanu, w którym Thr199 bezpośrednio oddziałuje z fosforanem ATP (odległość <0.4 nm; stan "Thr-close"). Można więc przyjąć, że pod nieobecność domeny J Thr199 jest odsunięta od fosforanu i nie promuje hydrolizy poprzez oddziaływanie z ATP. Pod wpływem związania domeny J przebieg profilu radykalnie się zmienia: dla kompleksu DnaK+JD minimum energetyczne odpowiada odległości ~ 0.35 nm (stanowi "Thr-close"). Ponadto stan ten charakteryzuje się niższą o 3 kcal/mol energią względem stanu Thr-far. Tym samym obecność domeny J faworyzuje bliskie oddziaływanie treoniny z nukleotydem.

W celu zweryfikowania postawionej przez mnie hipotezy o stabilizacji stanu Thr-close przez resztę Tyr145, powtórzyłem symulacje wzmocnionego próbkowania dla układów DnaK oraz DnaK+JD, tym razem zmieniając tę resztę na alaninę (Rysunek 5.2.7). Ku mojemu zaskoczeniu profil energii swobodnej dla tego mutantu (Y145 DnaK+JD) nie różnił się położeniem minimum ani jego głębo-

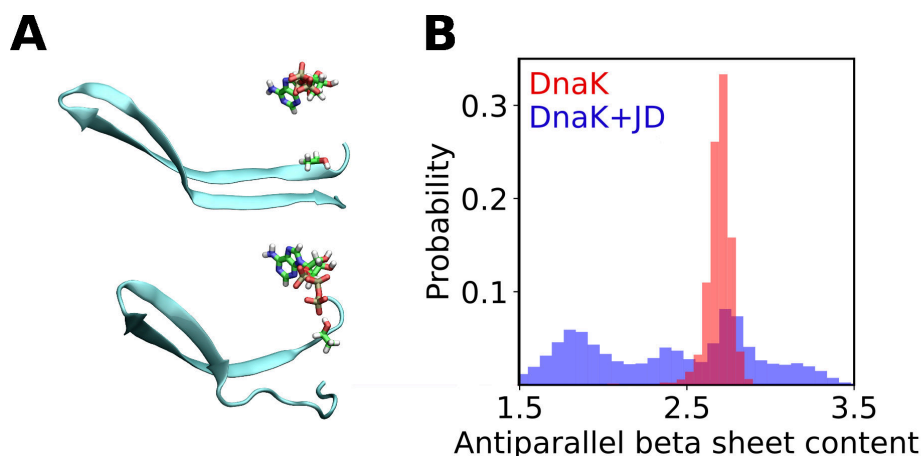
kością względem profilu dla natywnego kompleksu DnaK+JD. Zatem, przeciwnie do moich przewidywań, oddziaływanie między Tyr145 i Thr199 nie stabilizuje bliskiego kontaktu między Thr199 i ATP. Interesującą różnicą w przebiegu otrzymanego profilu jest natomiast brak bariery energetycznej odpowiadającej odległości ~ 0.65 nm. Jej brak może wpływać na łatwość osiągania stanu Thr-close i tłumaczyć dlaczego wariant Y145A DnaK charakteryzuje się wyższą stałą szybkości hydrolizy ATP po dodaniu DnaJ niż natywny wariant DnaK. [110]



Rysunek 5.2.7: (A) Profile energii swobodnej wzdłuż odległości Thr199 od terminalnego fosforanu ATP dla natywnego kompleksu DnaK+JD (niebieski) oraz kompleksu Y145A DnaK+JD (brązowy). (B) Profile wzdłuż tej samej współrzędnej reakcji dla izolowanego DnaK (czerwony) oraz wariantu Y145A DnaK (zielony). [191]

W przypadku izolowanego Y145A DnaK wyznaczony profil charakteryzuje się obecnością dodatkowego minimum energetycznego w odległości ~ 0.55 nm. Ponadto, w porównaniu do profilu dla natywnego DnaK, bariera energetyczna związana z przejściem do stanu Thr-close jest niższa o ok. 2–3 kcal/mol. Brak tej bariery ponownie tłumaczyłby dane kinetyczne, które wskazują na wyższą bazową aktywność ATP-azową wariantu Y145A DnaK względem dzikiego szczepu DnaK. [110] Rola reszty Tyr145 nie jest tym samym stabilizowanie oddziaływań Thr199-ATP, natomiast nieobecność tyrozyny o dużym objętościowo łańcuchu bocznym obniża barierę energetyczną związaną z przejściem do stanu Thr-close, warunkującego hydrolizę nukleotydu.

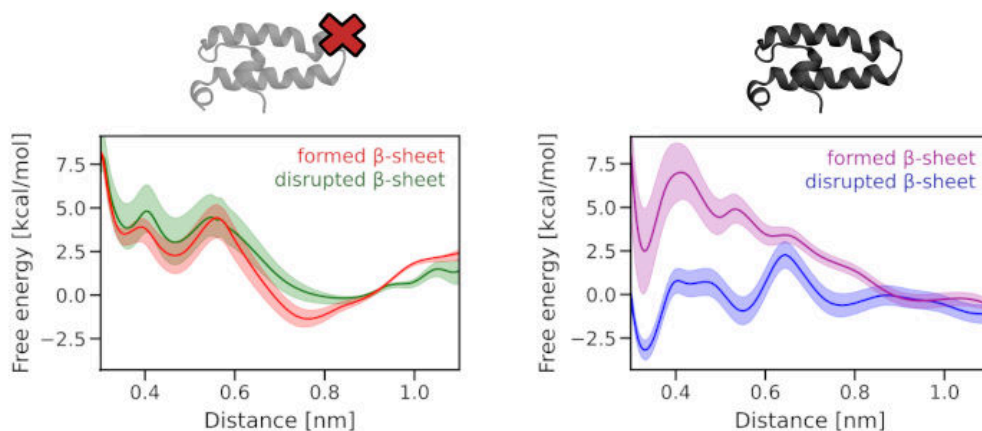
W kolejnym kroku, postanowiłem zbadać zmiany konformacyjne, które wprost powodują ruch Thr199 po związaniu domeny J. Bliższa analiza trajektorii pozwoliła mi na zaobserwowanie, że związaniu domeny J (i co za tym idzie, przemieszczeniu Thr199) towarzyszy zaburzenie struktury drugorzędowej dwóch β -nici złożonych z reszt 198–206 oraz 219–227 (Rysunek 5.2.8). W celu zbadania jak ta zmiana konformacyjna wpływa na oddziaływanie między Thr199 a ATP, ponownie przeprowadziłem symulacje wzmocnionego próbkowania wzdłuż odległości Thr199–ATP, rozważając dwie różne konformacje regionu Gly198–Glu206/Leu219–Leu227.



Rysunek 5.2.8: Zaburzenie struktury β -nici spowodowane związaniem domeny J. (A) Reprezentacja przemieszczenia Thr199 w stronę ATP umożliwionego poprzez zaburzenie struktury drugorzędowej. ATP i Thr199 są przedstawione w reprezentacji "Licorice", natomiast β -nici w reprezentacji "NewCartoon". (B) Rozkład prawdopodobieństwa zawartości antyrównoległych β -kartek w obszarze obejmującym reszty 198–206 i 219–227 DnaK. Rozkład dla izolowanego DnaK został przedstawiony kolorem czerwonym, natomiast rozkład dla kompleksu DnaK+JD – kolorem niebieskim. [191]

Po pierwsze, w symulacjach dla izolowanego DnaK za pomocą dodatkowego potencjału wymusiłem zaburzoną konformację β -nici, aby odwzorować obecność domeny J. Otrzymany profil (Rysunek 5.2.9) nie różni się zbytnio od uprzedniego wyniku dla izolowanego DnaK, co sugeruje, że samo naruszenie struktury drugorzędowej β -nici nie prowadzi bezpośrednio do faworyzowania stanu Thr-close. Po drugie, w analogiczny sposób utrzymałem nienaruszoną strukturę β -nici w symulacjach układu DnaK+JD. Profil ten wskazuje z kolei na silną preferencję przyjmowania przez DnaK stanu Thr-far (Rysunek 5.2.9).

Powyższe wyniki wskazują zatem, że związanie domeny J indukuje zmiany konformacyjne w obrębie kieszeni wiążącej ATP, które umożliwiają oddziaływanie Thr199 z ATP i stymulację aktywności ATP-azowej DnaK. Wśród tych zmian zaburzenie struktury drugorzędowej regionu Gly198–Glu206; Leu219–Leu227 jest konieczne, ale niewystarczające do przyjęcia przez DnaK stanu Thr-close. Jako że samo naruszenie β -nici nie odwzorowuje w pełni obecności domeny J, można wnioskować, że równie istotną rolę w procesie aktywacji DnaK pełni również rotacja płatów NBD, sprzyjająca ciaśniejszemu upakowaniu domeny.

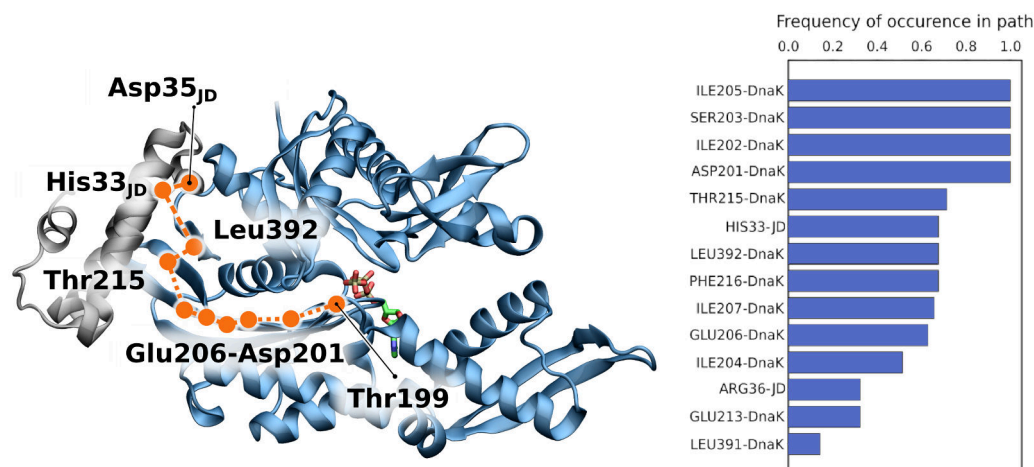


Rysunek 5.2.9: (Lewa strona) Profil energii swobodnej dla przejścia między stanami Thr-far i Thr-close pod nieobecność domeny J. Oryginalny profil został przedstawiony kolorem czerwonym, natomiast profil dla zaburzonej β -nici – kolorem zielonym. (Prawa strona) Profil energii swobodnej dla przejścia między stanami Thr-far i Thr-close dla kompleksu DnaK+JD. Oryginalny profil został przedstawiony kolorem niebieskim, natomiast profil dla sztucznie utrzymywanej konformacji β -nici – kolorem żółtym. [191]

5.2.3 Sygnalizacja allosteryczna pomiędzy domeną J a kieszenią katalityczną DnaK

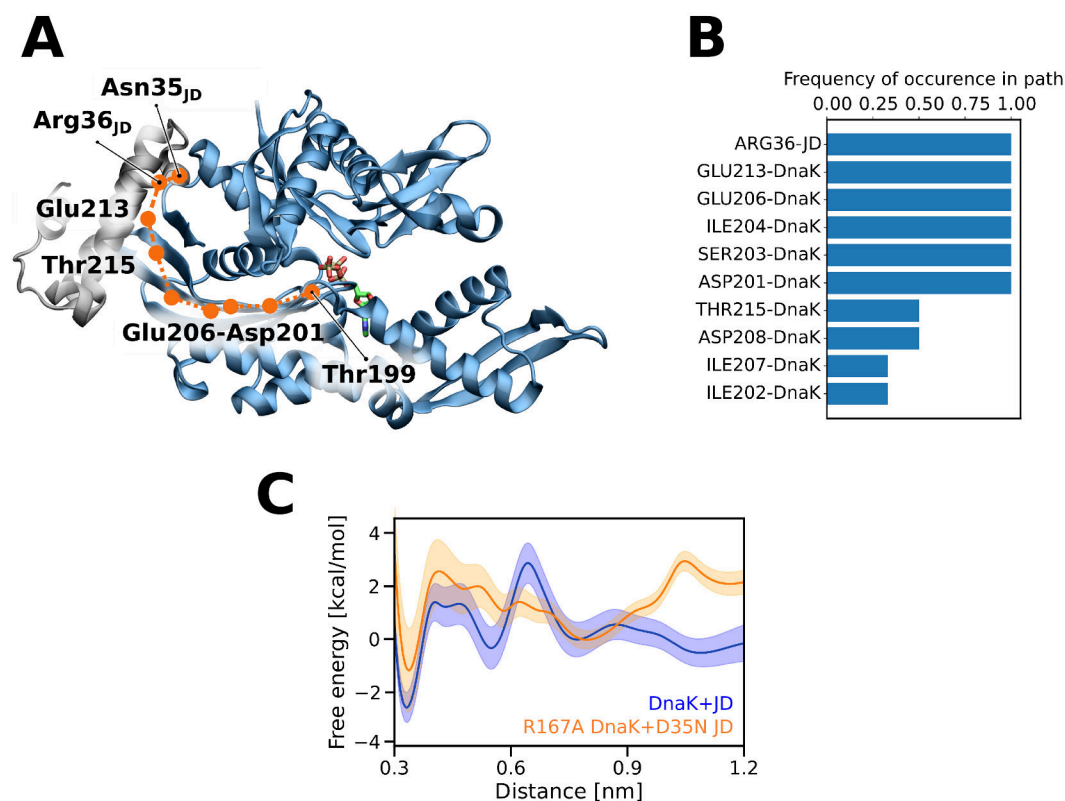
Upřednio sugerowano, że sygnał allosteryczny w kompleksie DnaK+JD bierze początek od reszty Asp35 domeny J i jest przekazywany przez Arg167 na powierzchni DnaK w głąb kieszeni wiążącej nukleotyd. [83, 84] W celu zweryfikowania proponowanej ścieżki allosterycznej mgr M. Pitek użył wcześniej wygenerowanych trajektorii, aby sprawdzić jak sygnał allosteryczny może być transmitowany od reszty Asp35 motywu HPD do reszty Thr199 w kieszeni wiążącej ATP. W tym celu skorzystał z dynamicznej analizy sieci [193] – modelu, który umożliwia reprezentację białka w postaci sieci atomów $C\alpha$ (węzłów) połączonych krawędziami, których długość jest determinowana przez siłę ogólnej korelacji między odpowiadającymi resztami podczas symulacji MD (patrz: podrozdział 3.11 w sekcji Metodyka badań).

Wszystkie z wyznaczonych przez niego ścieżek allosterycznych cechowały się tym samym przebiegiem: sygnał inicjowany przez Asp35 domeny J przechodził przez międzydomenowy łącznik na β -nić NBD (reszty Phe200–Thr215), ostatecznie kończąc na reszcie Thr199 (Rysunek 5.2.10). Co istotne, 7 z 14 reszt tworzących ścieżki allosteryczne zostało wcześniej zidentyfikowanych jako pośredniczące w komunikacji allosterycznej wewnątrz DnaK. [68, 107, 194, 195, 196] Wśród nich znajdują się reszty Asp201, Ile202 oraz Ser203, których mutacje punktowe powodowały brak stymulacji DnaK przez domenę J. [107, 196] Również zauważona przez mnie przy okazji badania procesu dysocjacji SBD β od powierzchni NBD reszta Phe216 występuje w ponad połowie ścieżek, co kolejny raz podkreśla jej zaangażowanie w sygnalizację w obrębie DnaK.



Rysunek 5.2.10: Sygnalizacja allosteryczna między domeną J a DnaK. (Lewa strona) Najkrótsza ścieżka w przestrzeni ogólnej korelacji reszt pomiędzy motywem HPD domeny J a kieszenią katalityczną DnaK wyznaczona przy użyciu algorytmu Floyda-Warshalla, rzutowana na strukturę kompleksu DnaK+JD. (Prawa strona) Częstość z jaką poszczególne reszty aminokwasowe pojawiają się na ścieżkach allosterycznych. Do obliczeń wzięto pod uwagę zarówno optymalne, jak i suboptymalne ścieżki. [191]

Niespodziewanie, Arg167, która poprzednio była uważana za centralną resztę w sieci allosterycznej DnaK [83], nie pośredniczyła w żadnej ze ścieżek. Taka różnica względem wcześniej proponowanej ścieżki allosterycznej może wynikać z kryterium użytego w pracy, którym była bliskość statycznych reszt w strukturze krystalicznej, a nie skorelowany ruch reszt w dynamicznej strukturze kompleksu DnaK+JD. Co ciekawe, jednoczesne zastąpienie reszt Arg167 DnaK oraz Asp35 domeny J przez, odpowiednio, alaninę i asparaginę nie powoduje zaniku aktywności ATP-azowej DnaK. [197, 198] Powtórzyłem zatem samodzielnie analogiczną analizę dla kompensatorowego wariantu kompleksu R167A DnaK z D35N JD. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na to, że sygnalizacja allosteryczna między domeną J a kieszenią katalityczną pozostaje niezmienną względem natywnego kompleksu DnaK+JD (Rysunek 5.2.11 A i B). Ponownie zaangażowany jest w nią region Phe200–Thr215, natomiast dodatkowo w każdej z wyznaczonych ścieżek pojawia się Arg36 domeny J. Niezaburzona transmisja sygnału do kieszeni wiążącej powinna przejawiać się w preferowanym bliskim kontakcie Thr199 z ATP. Aby to zweryfikować, jak uprzednio wykonałem serię symulacji wzmocnionego próbkowania wzdłuż odległości Thr199–ATP, które potwierdziły zdolność przyjmowania stanu Thr-close przez wariant R167A DnaK+D35N JD (Rysunek 5.2.11 C) .



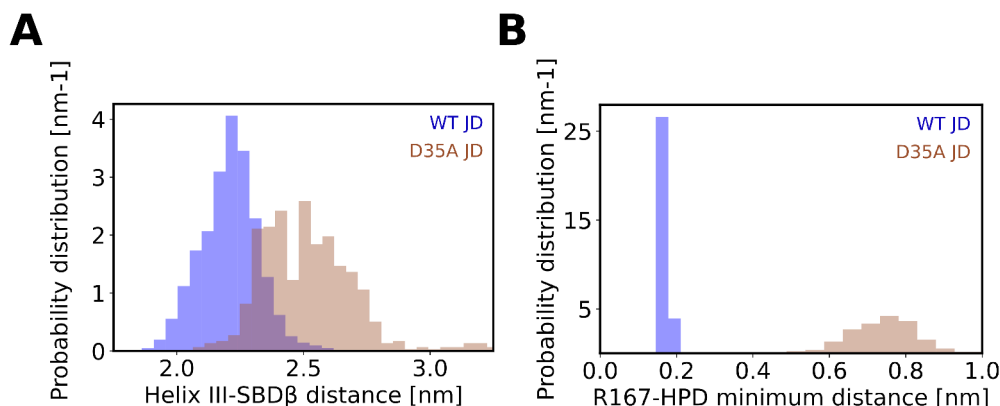
Rysunek 5.2.11: Kompensatorowy wariant kompleksu R167A DnaK+D35N JD (A) Najkrótsza ścieżka pomiędzy motywem HPD domeny J a kieszenią katalityczną DnaK wyznaczona przy użyciu algorytmu Floyda-Warshalla, rzutowana na strukturę kompleksu R167A DnaK+D35N JD. (B) Częstość z jaką poszczególne reszty aminokwasowe pojawiają się na ścieżkach allosterycznych w kompleksie R167A DnaK+D35N JD. (C) Profil energii swobodnej dla przejścia między stanami Thr-close i Thr-far dla kompleksu R167A DnaK+D35N JD (żółty) oraz dla kompleksu DnaK+JD (niebieski). [191]

5.2.4 Rola motywu HPD w stymulacji aktywności DnaK

W kolejnym kroku chciałem wyjaśnić indywidualną rolę reszt wchodzących w skład motywu HPD w stymulację aktywności DnaK. W tym celu przeprowadziłem szereg symulacji, w którym każdą z reszt motywu HPD poddałem substytucji alaninowej (APD, HAD, HPA).

Zgodnie ze wcześniejszymi doniesieniami [199], w symulacjach kompleksu DnaK+D35A JD domena J oddalała się od miejsca wiązania, w taki sposób, że jedynie helisa II domeny J pozostawała w bezpośrednim kontakcie z NBD (Rysunek 5.2.12). W celu scharakteryzowania roli Asp35 w pozycjonowaniu domeny J na powierzchni NBD przeprowadziłem symulacje *umbrella sampling* wzdłuż odległości DnaK–domena J. Otrzymane profile energii swobodnej (Rysunek 5.2.13 A) wskazują na to, że zastąpienie asparagianu alaniną powoduje, że związanie domeny J jest o ~ 2 kcal/mol mniej

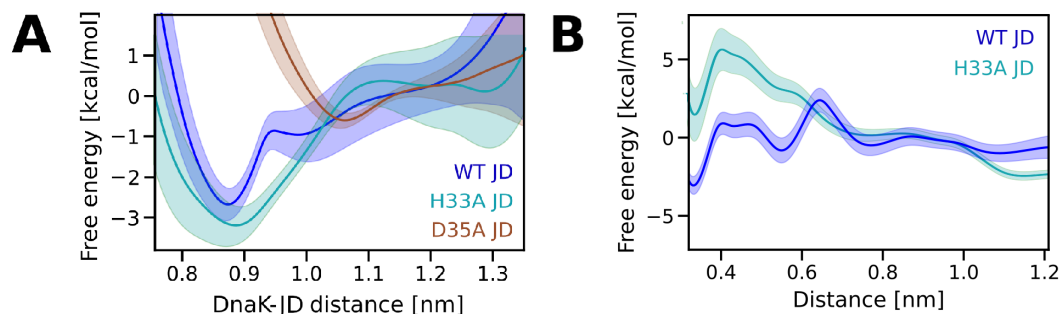
korzystne w porównaniu z natywnym wariantem domeny J. Co więcej, mutacja D35A powoduje rozluźnienie struktury kompleksu, przez co domena J lokalizuje się ~ 0.2 nm dalej od DnaK. Wyniki te podkreślają zatem kluczową rolę mostka solnego między Asp35 domeny J a Arg167 DnaK [84] w wiązaniu domeny J i stabilizowaniu powstałego kompleksu z DnaK.



Rysunek 5.2.12: Dysocjacja domeny J ze specyficznego miejsca wiązania spowodowana mutacją D35A. (A) Rozkład prawdopodobieństwa odległości między SBD β i helisą III domeny J. Kolorem niebieskim przedstawiono wyniki dla natywnej domeny J, a kolorem brązowym – substytucji D35A. (B) Rozkład prawdopodobieństwa minimalnej odległości między resztą Arg167 DnaK a motywem HPD. [191]

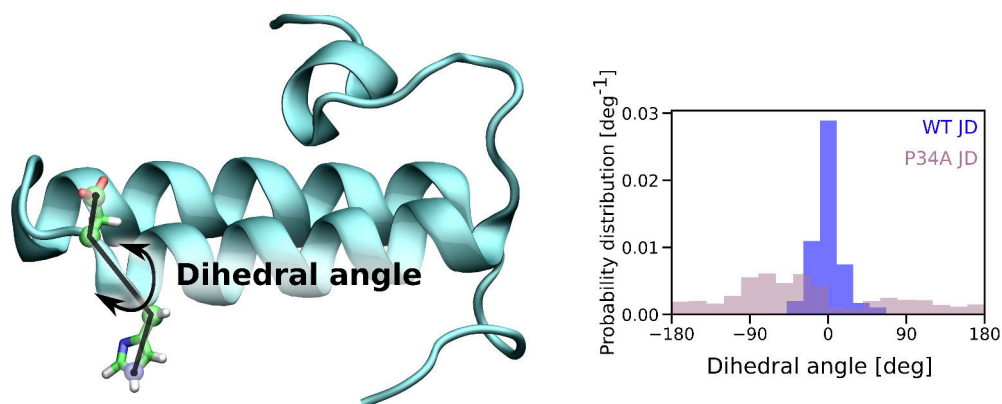
Podczas symulacji kompleksu DnaK+H33A JD nie zaobserwowałem częściowej dysocjacji domeny J. Tę obserwację potwierdza także wyznaczony przeze mnie profil energii swobodnej dla wiązania domeny J z substytucją H33A, który jest niemal identyczny z profilem wyznaczonym dla natywnego wariantu domeny J (Rysunek 5.2.13 A). Postanowiłem więc sprawdzić czy wariant ten również powoduje zmianę konformacyjną Thr199 w centrum katalitycznym DnaK, tak jak czyni to natywna domena J. Podobnie jak wcześniej, przy użyciu metody *umbrella sampling* wyznaczyłem zmiany energii swobodnej wzdłuż odległości Thr199-ATP (Rysunek 5.2.13 B). W przypadku substytucji H33A stan Thr-far jest o ~ 4 kcal/mol bardziej preferowany niż katalitycznie aktywny stan Thr-close. Pomimo tego, że substytucja H33A nie wpływa na powinowactwo domeny J względem DnaK, to faworyzuje ona stan Thr-far i uniemożliwia stymulację aktywności ATP-azowej DnaK. Potwierdza to tym samym rolę His33 oddziałującej z Leu391 międzydomenowego łącznika w transmisji sygnału między domeną J a centrum katalitycznym DnaK [83], zgodnie z wynikami dynamicznej analizy sieci (Rysunek 5.2.10). Podsumowując, substytucje D35A i H33A wywierają różny efekt na powinowactwo domeny J względem DnaK, jednak obie finalnie uniemożliwiają stymulację DnaK.

Ze względu na to, że reszty His33 i Asp35 oddziałują z wybranymi resztami NBD (odpowiednio: Leu391 i Arg167), wysunąłem hipotezę jakoby lokalne zaburzenie struktury α -helisy przez prolinę umożliwiałoby przyjęcie przez His33 i Asp35 orientacji faworyzującej oddziaływanie z DnaK. W ce-



Rysunek 5.2.13: (A) Profile energii swobodnej dla wiązania domeny J do DnaK. Profil dla wariantu H33A został przedstawiony kolorem błękitnym, profil dla wariantu D35A– kolorem brązowym, natomiast profil dla natywnej domeny J– kolorem niebieskim. (B) Profile energii swobodnej dla przejścia między stanami Thr-far i Thr-close w kompleksie DnaK z natywną domeną J (kolor niebieski) i z wariantem H33A (kolor błękitny). [191]

W celu zweryfikowania tej hipotezy przygotowałem symulacje dwóch izolowanych wariantów domeny J: natywnej oraz obciążonej mutacją P34A. Brak proliny w sekwencji domeny J skutkowało przyjęciem przez region w pobliżu motywu HPD helikalnej struktury. W konsekwencji, His33 oraz Asp35 były zorientowane w różnych kierunkach (Rysunek 5.2.14), co uniemożliwiało ich jednocześnie oddziaływanie z interfejsem DnaK. Tym samym, otrzymane wyniki potwierdzają, że obecność każdego z trzech aminokwasów motywu HPD jest niezbędna dla poprawnego związania domeny J do DnaK i dalszego stymulowania aktywności ATP-azowej.



Rysunek 5.2.14: Rozkład prawdopodobieństwa dla kąta dwuściennego pomiędzy His33 a Asp35 w natywnej domenie J (niebieski) i w wariacie Pro34Ala (fioletowy). Kąt dwuścienny został zdefiniowany jako kąt między atomami: His33 N ϵ , His33 C β , Asp35 C α and Asp35 C γ . [191]

5.2.5 Dysocjacja domeny J pod wpływem Hsp70

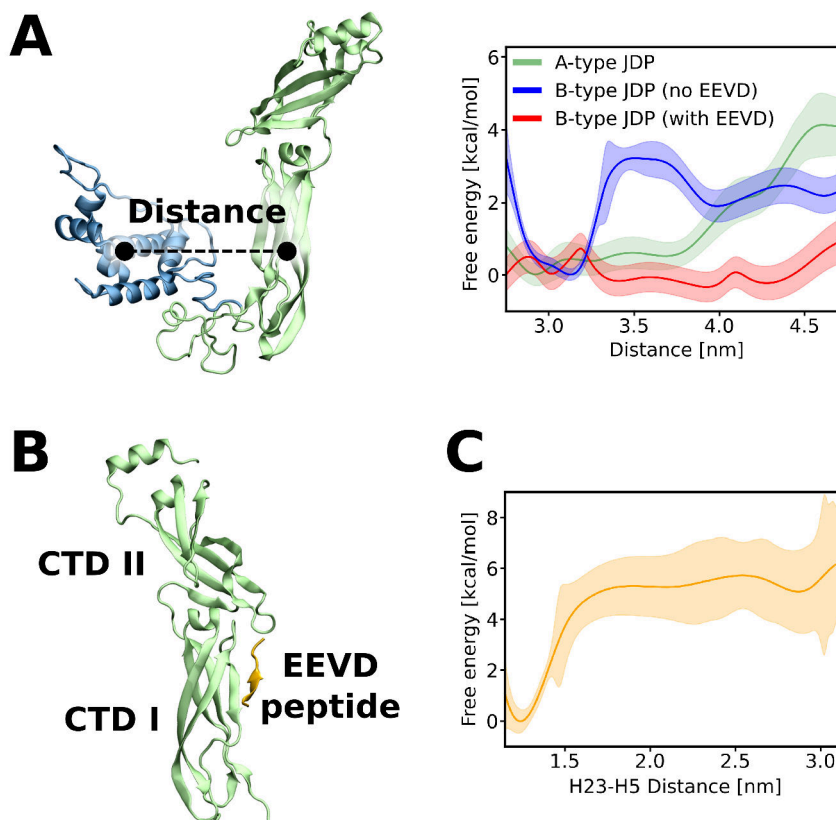
Fragmentem białek J oddziałującym z Hsp70 i stymulującym hydrolizę ATP w obrębie domeny wiążącej nukleotyd jest helisa II i III domeny J, stąd dotychczas podjęte przeze mnie modelowanie obecności białka J ograniczało się do tego fragmentu. W przypadku białek J klasy A, domena J nie jest trwale zadokowana do powierzchni C-terminalnej domeny (CTD). Odwrotnie, u białek J klasy B dopiero związanie C-terminalnego fragmentu Hsp70 zawierającego motyw EEVD umożliwia dysocjację domeny J i, w konsekwencji, stymulowanie hydrolizy przez białka J typu B, co stanowi ciekawy przykład współzależności białek Hsp40 i Hsp70. Choć ten przypadek nie dotyczy bezpośrednio badanego przeze mnie układu DnaK–DnaJ, postanowiłem zbadać trwałość związania domeny J do CTD u obu klas białek J, uwzględniając ich pełne struktury.

W celu scharakteryzowania procesu dysocjacji domeny J od powierzchni CTD białka J w pierwszym kroku przeprowadziłem symulacje równowagowe dla ludzkiego białka J typu A oraz białka typu B ze związanym oktapeptydem zawierającym motyw EEVD. W obu przypadkach 500 ns symulacji było wystarczające do zaobserwowania spontanicznego odejścia domeny J od CTD. Struktury te posłużyły mi do przeprowadzenia symulacji wzmocnionego próbkowania wzdłuż odległości domena J–CTD. Dla porównania przygotowałem również układ białka J typu B bez peptydu EEVD.

Otrzymane wyniki zostały przedstawione na Rysunku 5.2.15 A. Domena J białka typu A nie jest trwale związana do powierzchni CTD i może swobodnie się poruszać, o czym świadczy płytkie minimum i płaski region profilu energii swobodnej odpowiadający odległości ~ 2.9 – 3.9 nm. Z kolei dalsza dysocjacja nie jest preferowana ze względu na stosunkowo krótki łącznik między CTD a domeną J. W przypadku białek klasy B, pod nieobecność motywu EEVD w rowku wiążącym domena J jest zadokowana do powierzchni CTD o czym świadczy wyraźne minimum energetyczne o głębokości ~ 3 kcal/mol (odległość ~ 3 nm). Przeciwnie, obecność peptydu EEVD znosi tę barierę energetyczną i umożliwia dysocjację domeny J z powierzchni CTD: płaski obszar profilu sięga do odległości ~ 4.5 nm. Wyniki te są zgodne z eksperymentami NMR, które sugerowały, że po związaniu EEVD domena J oddala się od CTD na odległość większą niż 3 nm. [98]

W kolejnym kroku postanowiłem przyjrzeć się mechanizmowi autoinhibicji białek J klasy B i zbadać energetykę dysocjacji helisy V z powierzchni helis II i III domeny J, która umożliwiłaby bezpośrednio oddziaływanie tego fragmentu domeny J z Hsp70. W tym celu przeprowadziłem dodatkowe symulacje US wzdłuż odległości helisa II i III–helisa V domeny J. Otrzymany profil energii swobodnej (Rysunek 5.2.15 C) charakteryzuje się obecnością relatywnie głębokiego (~ 5 kcal/mol) minimum, co jest zgodne ze wcześniejszymi doniesieniami o tym, że oddysocjowanie helisy II i III wiąże się z zerwaniem mostka solnego tworzonego między helisą III a V. [200] Niemniej, korzystne oddziały-

wania elektrostatyczne podobnego rzędu wielkości (kilka kcal/mol, Rysunek 5.2.13), towarzyszące związaniu domeny J przez Hsp70 [84] mogą ułatwiać formowanie się kompleksu Hsp70–helisa II i III białka J.



Rysunek 5.2.15: (A) Profil energii swobodnej związane z odejściem domeny J (helisy I–V) od CTD I białka J typu B. Kolorem niebieskim oznaczono profil w przypadku braku peptydu EEVD w obrębie CTD I, a kolorem czerwonym– profil w przypadku obecności peptydu EEVD. Dla porównania kolorem zielonym przedstawiono profil energii swobodnej dla odejścia domeny J od CTD I dla białka J typu A. (B) Miejsce związania peptydu EEVD. (C) Profil dla odwiązania się helisy II i III od helisy V po wstępnej dysocjacji domeny J.

5.2.6 Steryczny nacisk umożliwia aktywację DnaK przez domenę J

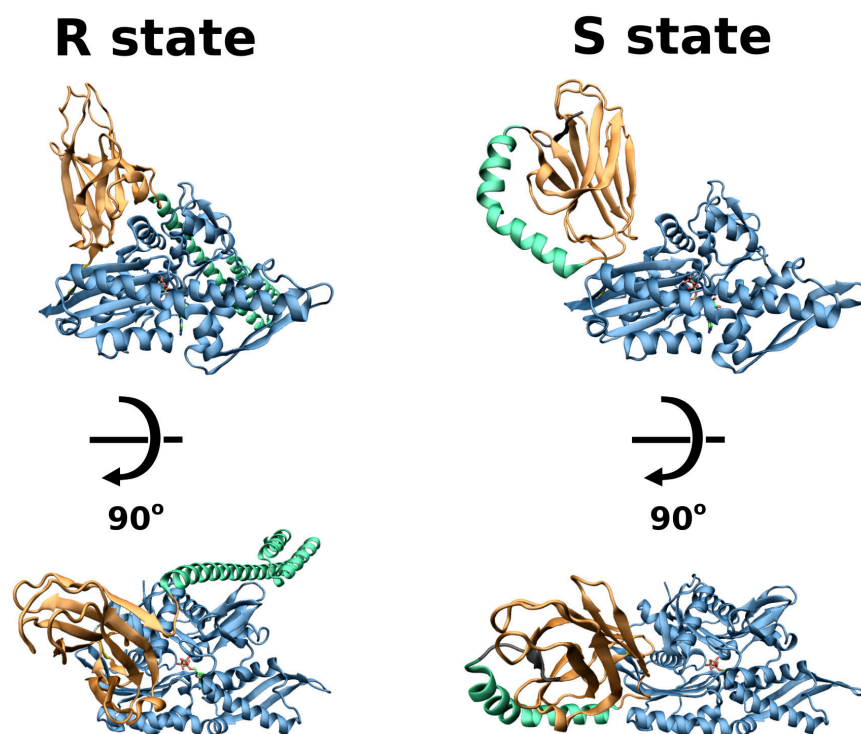
Badania nad mechanizmem aktywacji DnaK przez domenę J pozwoliły mi na scharakteryzowanie zmian konformacyjnych umożliwiających oddziaływanie pomiędzy istotną katalitycznie resztą Thr199 i ATP. Z kolei dzięki analizie mutacji punktowych fragmentu HPD domeny J wskazałem na rolę poszczególnych aminokwasów motywu, w szczególności na wkład His33 w transmisję sygnału allosterycznego i Asp35 w ścisłe związanie JD do interfejsu DnaK.

Zaprezentowane rezultaty moich badań zostały uzupełnione przez wyniki uzyskane przez moich współpracowników. [191] Jak wcześniej pokazano, związanie domeny J powoduje wstępne rozluźnienie interfejsu NBD-SBD β . [84] Co ciekawe, dla kompleksu DnaK ze skróconym wariantem domeny J (pozbawionym helisy III i IV) nie tylko nie zaobserwowaliśmy wzajemnego oddalania się domen, ale sam stan Thr-close nie był faworyzowany energetycznie. Ze względu na to, że stan Thr-far był preferowany nawet wtedy, gdy pod nieobecność JD wymuszałem zdeformowaną konformację regionu 198–206; 219–227 DnaK (sekcja 5.2.2), wysunęliśmy hipotezę, że to steryczny nacisk wywierany przez ciasne związanie domeny J powoduje częściowe oddokowanie SBD β , co umożliwia rotację płatów NBD. Jednocześnie, związanie JD inicjuje propagację sygnału allosterycznego przez region 200–215 DnaK, czego rezultatem jest deformacja β -nici w obrębie subdomeny IIA i, w konsekwencji, aktywacja białka, uwidaczniana przez bliski kontakt między Thr199 i ATP.

5.3 Zmiany konformacyjne DnaK indukowane związaniem substratu przez SBD

5.3.1 Obecność substratu faworyzuje katalitycznie aktywny stan DnaK

Badania nad wiązaniem substratu przez DnaK sugerowały istnienie częściowo zadokowanego stanu pośredniego, który również faworyzowałby hydrolizę ATP. W tym wypadku obsadzenie SBD miałooby sprzyjać takiemu ułożeniu domen, w którym kontakty NBD–SBD β są z grubsza nieobecne, natomiast tworzone są kontakty na interfejsie SBD α –SBD β . Jednocześnie w tej konformacji międzydomenowy łącznik nadal związany jest z NBD. [201, 202, 203] Struktura krystaliczna przewidywanego, stymulowanego stanu została finalnie wyznaczona kilka lat temu przez grupę W. Hendricksona (Rysunek 5.3.1). [163] Ten aktywny stan nazwano stanem S (ang. *Stimulated state*) w odróżnieniu od dotychczas wyznaczonych struktur DnaK, w których hydroliza ATP jest zahamowana (stan R, ang. *Restrained state*). Charakterystyczne dla stanu R jest ponadto niskie powinowactwo względem białkowych substratów. [163, 175, 204]

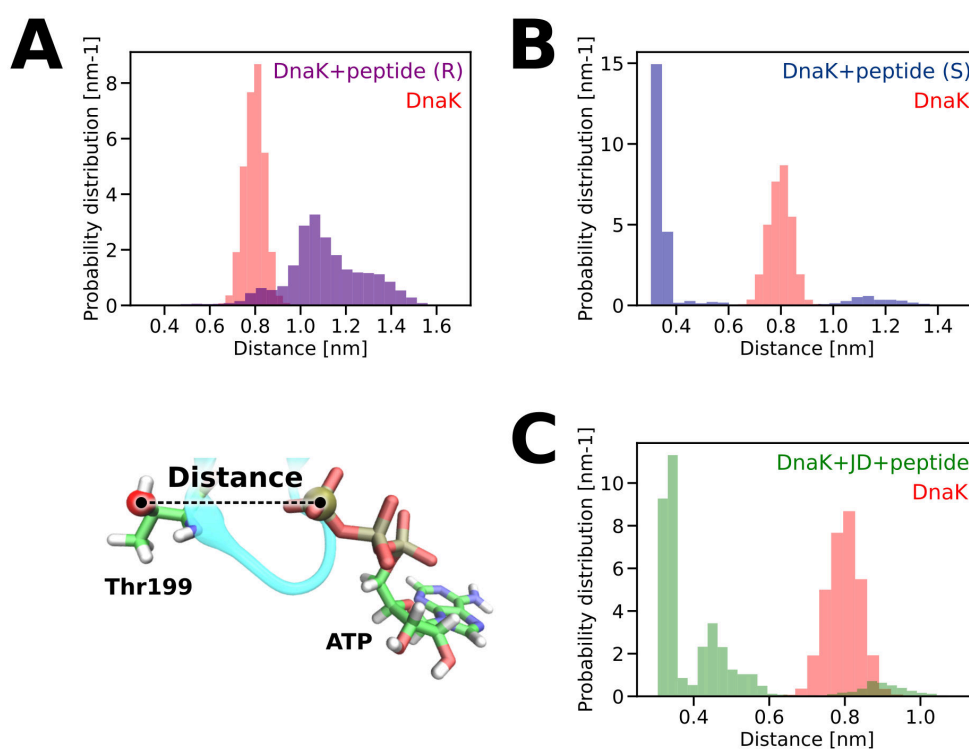


Rysunek 5.3.1: Porównanie struktur nieaktywnego stanu R (kod PDB: 4B9Q, [158]) i stymulowanego stanu S (kod PDB: 7KRU, [163]) DnaK.

Moje dotychczasowe analizy wskazały na to, że bliski kontakt Thr199 z ATP jest kluczową oznaką aktywacji DnaK. Jako że w strukturze krystalicznej stanu S ponownie obecna była mutacja T199A, w pierwszym kroku przywróciłem treoninę w miejscu reszty 199 i przeprowadziłem serię równowagowych symulacji dla tego wariantu DnaK. Ponadto, dla porównania czy sama obecność peptydu

może stymulować ruch Thr199 w przypadku otwartej konformacji SBD, przygotowałem także symulacje układu DnaK w stanie R ze związanym peptydem.

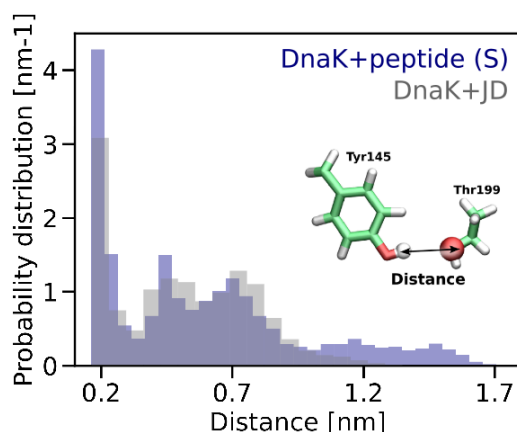
Wyznaczone gęstości prawdopodobieństwa dla odległości Thr199-ATP uwidaczniają, że podobnie jak w przypadku kompleksu DnaK+JD, w stanie S treonina znajduje się blisko nukleotydu (odległość <0.4 nm, Rysunek 5.3.2). Jednocześnie, gdy DnaK znajduje się w stanie R, sama obecność substratu nie stymuluje przemieszczenia Thr199 względem ATP. W tym wypadku maksimum gęstości prawdopodobieństwa dla odległości Thr199-ATP przypada na ~ 1 nm, co wskazuje na przyjmowanie przez białko stanu Thr-far. Dopiero dodatkowa obecność domeny J (kompleks potrójny: układ DnaK, peptyd i domena J) sprzyja tworzeniu bliskiego kontaktu między treoniną a ATP.



Rysunek 5.3.2: Rozkład prawdopodobieństwa dla odległości między tlenem grupy hydroksylowej Thr199 a terminalnym fosforanem ATP otrzymany z trajektorii dla: (A) DnaK w stanie R z peptydem, (B) DnaK w stanie S z peptydem, (C) kompleksu potrójnego (układu złożonego z DnaK, peptydu i domeny J). Dla porównania czerwonym kolorem pokazany został rozkład dla izolowanego DnaK.

Analogicznie jak w przypadku aktywacji DnaK przez domenę J, cofnięcie mutacji alaninowej Thr199 powoduje ponadto, że treonina jest bezpośrednio koordynowana przez Tyr145 (Rysunek 5.3.3). Pomimo tego, że moja wcześniejsza hipoteza dotycząca stabilizacji stanu Thr-close przez Tyr145 okazała się nietrafiona, reszta ta jest zaangażowana w sygnalizację allosteryczną poprzez sprzężenie

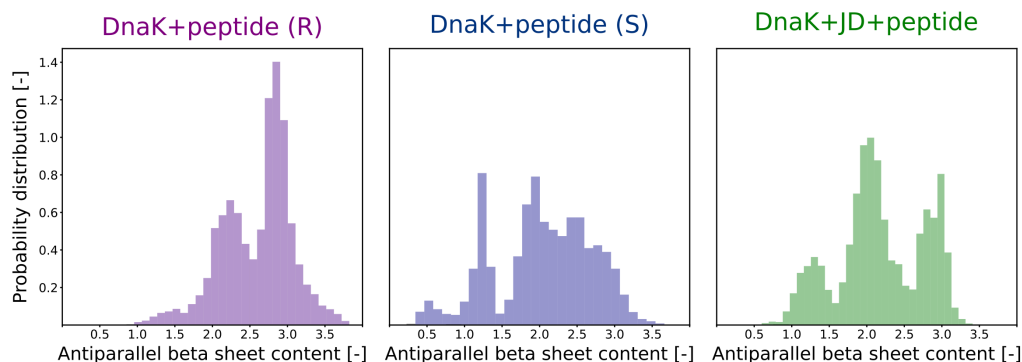
sygnału od substratu dla synergistycznej stymulacji aktywności ATP-azowej w obecności domeny J. [110] Co ciekawe, przeprowadzone przez Schneidera symulacje i badania z użyciem analizy sieci wskazywały, że obie reszty, Thr199 i Tyr145, wchodziły w skład ścieżki allosterycznej łączącej peptyd związany przez SBD z nukleotydem w NBD (pozostałymi resztami w najkrótszej ścieżce były Lys452, Leu441 i Ile401). [109]



Rysunek 5.3.3: Rozkład prawdopodobieństwa dla odległości między tlenem grupy hydroksylowej Thr199 a wodorem grupy hydroksylowej Tyr145 otrzymany z trajektorii dla stanu S DnaK z peptydem (granatowy) oraz kompleksu DnaK+JD (szary)

W stanie R Tyr145 oddziałuje z Asn222 i Gly223, a zmiana orientacji jej grupy fenylovej została zaliczona przez Hendricksona i współpracowników do wyróżników stanu stymulowanego DnaK. [163] Porównując struktury krystaliczne stanów S i R badacze zauważyli, że ujawniają one różnice w koordynowaniu terminalnego fosforanu ATP, wynikające z konformacji regionu Ala220–Asp231, nazwanego przez nich "przełącznikiem R–S" (ang. *R-to-S switch segment*). Poza oddziaływaniami między Y145 i N222–G223, hydroliza w stanie R miałaby być zablokowana poprzez: (i) oddziaływania Thr225 z obszarem Gly196–Thr199, które utrudniają orientację Thr199 ku ATP oraz (ii) parę mostków solnych Asp231–Arg71, His226–Asp85, które pociągają za sobą niesprzyjające ułożenie Lys70, również zaangażowanej w proces hydrolizy ATP. [111]

Poprzednio opisałem jak ruch Thr199 po związaniu domeny J wymaga zaburzenia struktury β -nici tworzonych przez reszty 198–206 i 219–227, a więc obszaru obejmującego także część "przełącznika R–S". W celu sprawdzenia czy podobne zachowanie będzie widoczne także w symulacjach stanu S, w kolejnym kroku porównałem zmiany w strukturze drugorzędowej wspomnianych β -nici. Otrzymane wyniki wskazują, że dla stanu S naruszenie β -nici jest wyraźniejsze niż dla kompleksu DnaK+JD (Rysunek 5.3.4). Średnie wartości parametru s (opisującego zawartość antyrównoległej β -kartki w strukturze) maleją zgodnie z kolejnością: DnaK z peptydem (stan R), kompleks potrójny, DnaK z peptydem w stanie S (odpowiednio: 2.60, 2.17, 2.04).

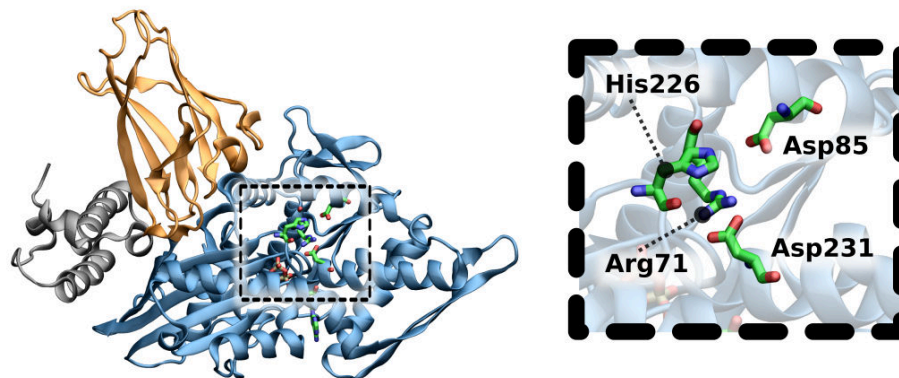


Rysunek 5.3.4: Rozkład prawdopodobieństwa zawartości antyrównoległych β -kardków w obszarze obejmującym reszty 198–206 i 219–227 dla kolejno: DnaK z peptydem (stan R), DnaK z peptydem (stan S) i kompleksu potrójnego.

Samo wymuszone naruszenie struktury β -nici pod nieobecność domeny J nie skutkowało przyjęciem stanu Thr-close (por. sekcja 5.2.2), co wskazywało, że rotacja płatów NBD jest elementem niezbędnym do przyjęcia przez DnaK stanu katalitycznie aktywnego. Różnica w orientacji subdomen została zauważona w strukturze krystalicznej stanu S [163], a wyznaczony przeze mnie rozkład kąta torsyjnego NBD dla stanu stymulowanego odpowiada rozkładowi dla kompleksu DnaK+JD (Rysunek 6.1 w Załączniku). Wyniki uzyskane metodami fluorescencyjnymi dla znakowanego wariantu DnaK wskazywały, że po związaniu substratu przyjęcie orientacji płatów NBD optymalnej do hydrolizy ATP jest umożliwione przez dysocjację SBD β z powierzchni NBD. [192] Odległość pomiędzy domenami miała być w tym przypadku mniejsza niż w przypadku w pełni rozdysocjowanych domen. [203] Istotnie, w trakcie symulacji stanu S, NBD i SBD β są oddalone względem siebie o 3.6 ± 0.3 nm (dla porównania wartość ta wynosiła ~ 3 nm dla zadokowanych i ~ 4.5 nm dla odseparowanych domen), co jest spójne z przesłankami eksperymentalnymi.

Ostatnią opisaną przez Wangę cechą charakterystyczną stanu S w obrębie NBD miało być zerwanie mostków solnych tworzonych między resztami znajdującymi się na płatach I i II NBD (R71–D231, D85–H226). [163] Wspomniane mostki solne są obecne zarówno w strukturach krystalicznych stanu R jak i kompleksu DnaK+JD. (Rysunek 5.3.5) Niemniej, w toku przeprowadzonych przeze mnie symulacji w żadnym z analizowanych przypadków kontakty te nie były trwałe, a reszty oddalały się od siebie także w stanie R i w kompleksie DnaK+JD (Tabela 1). Brak tych oddziaływań nie jest zatem wyróżnikiem stanu S.

Podsumowując, stan S DnaK indukowany obecnością substratu w SBD wykazuje te same cechy charakterystyczne aktywacji, które zauważyłem przy badaniu kompleksu DnaK z domeną J. W obu przypadkach obecność czynnika allosterycznego faworyzuje zmiany konformacyjne w obrębie NBD,



Rysunek 5.3.5: Struktura kompleksu DnaK+JD (PDB: 5NRO [83]). Na zbliżeniu po prawej stronie zostały zaznaczone reszty, tworzące mostki solne (71–D231, D85–H226) zaliczone przez grupę badawczą Hendriksona do cech charakterystycznych dla stanu R.

które skutkują bliskim kontaktem między Thr199 i ATP, a opisane zmiany są zgodne z wynikami wcześniejszych badań krystalograficznych. Przesłanki te mogą zatem tłumaczyć kooperatywne działanie substratu i domeny J w stymulowaniu hydrolizy ATP w centrum aktywnym NBD.

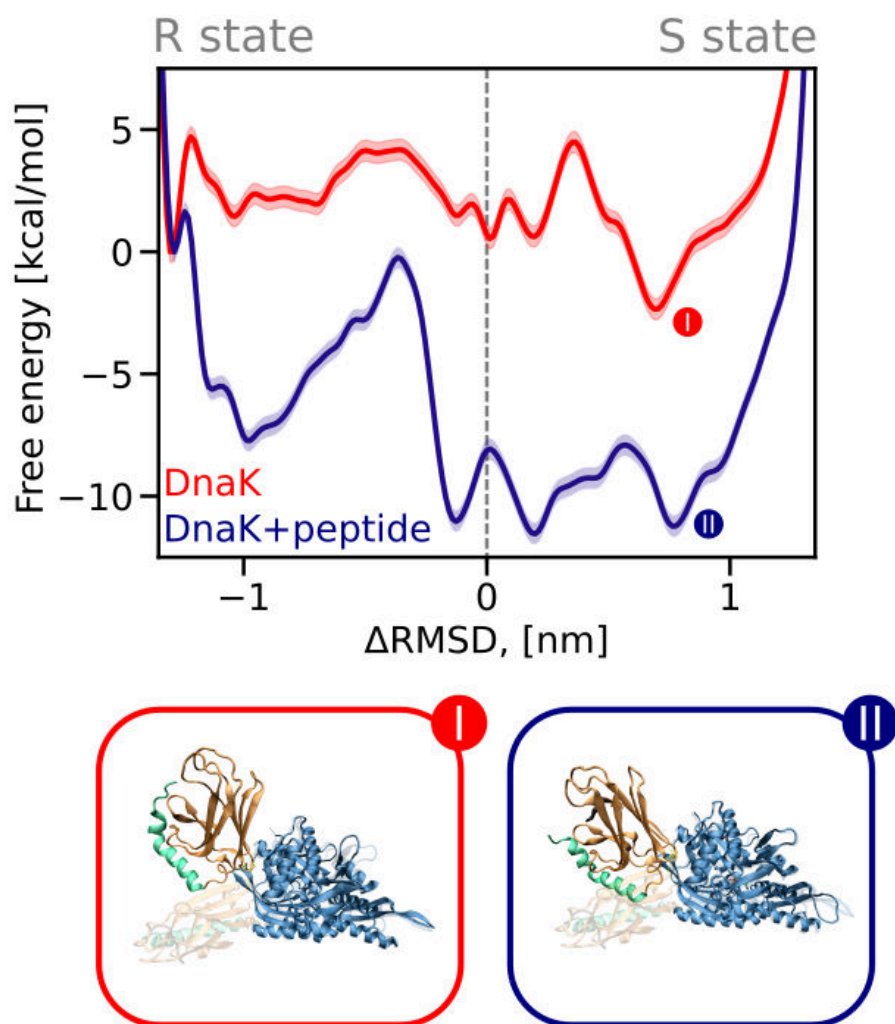
Kontakt	Minimalna odległość między resztami [nm]			
	DnaK	DnaK+JD	DnaK+peptyd (S)	DnaK+peptyd (R)
Arg71-Asp231	0.84±0.18	0.69±0.14	0.88±0.15	0.91±0.17
Asp85-His226	0.83±0.20	1.18±0.26	1.16±0.22	1.14±0.26
	DnaK (R) PDB: 4B9Q	DnaK+JD PDB: 5NRO	DnaK+peptyd (S) PDB: 7KRU	
Arg71-Asp231	0.27*	0.27*	0.59*	
Asp85-His226	0.37*	0.37*	0.93*	
*-wartości obliczone pomiędzy ciężkimi atomami w kryształach				

Tabela 1: Minimalne odległości pomiędzy resztami R71–D231 oraz D85–H226 w trakcie symulacji równowagowych. Jako punkt odniesienia podano odległości między ciężkimi atomami tych reszt w dostępnych strukturach krystalicznych.

5.3.2 Zamknięta konformacja SBD jest faworyzowana w obecności substratu

Wyniki eksperymentalne wskazywały, że substrat wiązany jest przez stan S, a równowaga DnaK między stanami R i S jest przesunięta na korzyść stanu R. Dopiero obecność substratu przesuwają rów-

nowagę na korzyść stanu S. [175, 204] W celu scharakteryzowania zmian energii swobodnej towarzyszących przejściu DnaK między stanem R a S, posłużyłem się symulacjami wzmocnionego próbkowania. Tym razem przeprowadziłem serię metadynamik dla izolowanego DnaK oraz kompleksu DnaK+peptyd, używając współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako różnica wartości RMSD względem struktur stanów R i S DnaK. Otrzymane profile widoczne są na Rysunku 5.3.6.



Rysunek 5.3.6: (Góra) Profil energii swobodnej dla przejścia między konformacją R i S DnaK. Kolorem czerwonym przedstawiono profil dla izolowanego DnaK, a niebieskim – dla kompleksu DnaK+peptyd. (Dół) Reprezentatywne struktury odpowiadające wybranym minimom z symulacji metadynamiki układu DnaK (I) i DnaK z peptydem (II). Półprzezroczyste struktury odpowiadają położeniu SBD ze struktury krystalicznej stanu S.

O ile minima energetyczne dla stanu R są dobrze odtwarzane (ΔRMSD ok. -1.3 nm), to skrajne minima po prawej stronie profili przypadają na wartości współrzędnej reakcji równe 0.7 – 0.8 nm i nie

RMSD [nm]		Stan R	Stan S	Δ RMSD
DnaK	Całkowite	1.680	0.995	0.685
	NBD	0.215	0.165	
	SBD	1.643	0.165	
DnaK +peptyd	Całkowite	1.582	0.772	0.810
	NBD	0.226	0.174	
	SBD	1.596	0.163	

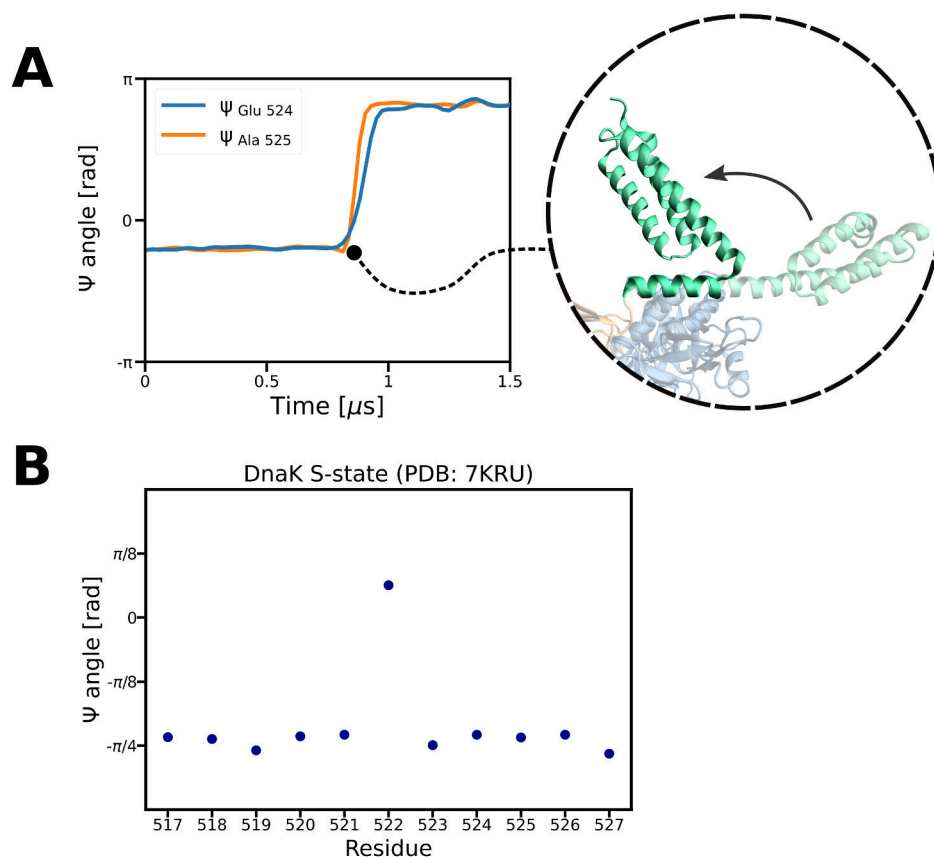
Tabela 2: Porównane wartości RMSD poszczególnych domen i całego białka w przypadku struktur odpowiadającym minimum I i II.

odpowiadają ściśle stanowi S. Wybrana współrzędna dobrze opisuje głównie zmiany w obrębie SBD, ale nie uwzględnia subtelnych różnic w obrębie kieszeni wiążącej nukleotyd, różniących stany R i S. Pomimo zadokowanego do NBD łącznika i niewielkiego RMSD węgli α dla poszczególnych domen (Tabela 2), wzajemne położenie domen różni się od położenia właściwego strukturze krystalicznej stanu S (minimum I, II). Niemniej, otrzymany profil energii swobodnej pozwala na przybliżony opis przyjmowania przez SBD konformacji zamkniętej i wstępnego oddokowania domeny. W nieobecności substratu przyjęcie przez SBD konformacji zamkniętej jest możliwe i energetycznie korzystne (o ~ 2.5 kcal/mol), choć wymaga pokonania przez układ dwóch barier energetycznych o wysokości ok. 5 kcal/mol. W przypadku związanego substratu, zamknięta konformacja SBD jest jeszcze bardziej korzystna energetycznie w porównaniu z konformacją otwartą (o ~ 12.5 kcal/mol). Ponadto, dla kompleksu DnaK+peptyd otwieranie SBD jest silniej zahamowane: bariera związana z tym procesem wynosi ok. 10 kcal/mol.

Otrzymane wyniki pozwalają zauważyć, że faworyzowanie zamkniętej konformacji przy obsadzeniu SBD jest zgodne z mechanizmem selekcji konformacyjnej. Niestety, dokładny opis równowagi między stanami R i S z punktu widzenia termodynamicznego pozostaje kwestią otwartą i wymaga bardziej szczegółowych badań.

5.3.3 Podatność na "łamanie" SBD α w obecności czynników allosterycznych

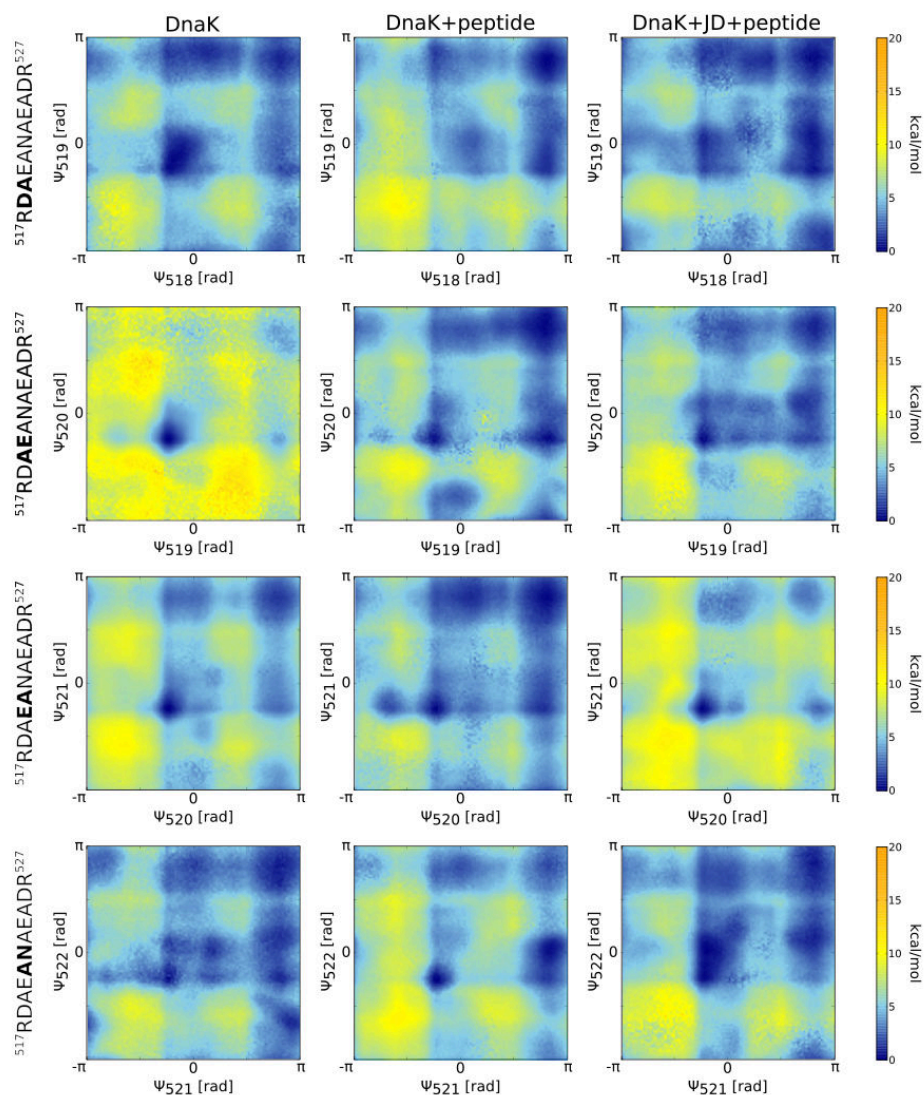
W trakcie symulacji równowagowych potrójnego kompleksu zaobserwowałem spontaniczną deformację helikalnej subdomeny SBD α polegającą na jej "złamaniu" w pozycji reszt 524 i 525. Złamanie to może być uznane za pierwszy etap przyjmowania przez SBD konformacji zamkniętej, a towarzyszyła mu zmiana kątów Ψ dwóch reszt aminokwasowych, Glu524 i Ala525 (Rysunek 5.3.7 A). Co ciekawe, struktury krystaliczne: izolowana zamknięta struktura SBD oraz struktura stanu S charakteryzują się złamaniem SBD α w miejscu reszty Asn522 (Rysunek 5.3.7 B). [39, 163]



Rysunek 5.3.7: (A) Spontaniczne "złamanie" SBD α , które zaobserwowałem w trakcie symulacji kompleksu potrójnego, skorelowane ze zmianą wartości kątów Ψ reszt Glu524 i Ala 525. (B) Wartości kątów Ψ wybranych reszt SBD α w strukturze stanu S. [163]

Postanowiłem więc sprawdzić czy obecność czynników allosterycznych wpływa na preferencje dotyczące miejsca łamania SBD α . W tym celu przy pomocy metod wzmocnionego próbkowania wyznaczyłem dwuwymiarowe profile energii swobodnej dla obrotu wokół kątów Ψ sąsiadujących reszt w trzech przypadkach: (i) dla izolowanego DnaK, (ii) dla DnaK w stanie R z substratem w SBD oraz (iii) kompleksu potrójnego; skupiłem się przy tym na regionie Arg517–Arg527. Zestaw otrzymanych

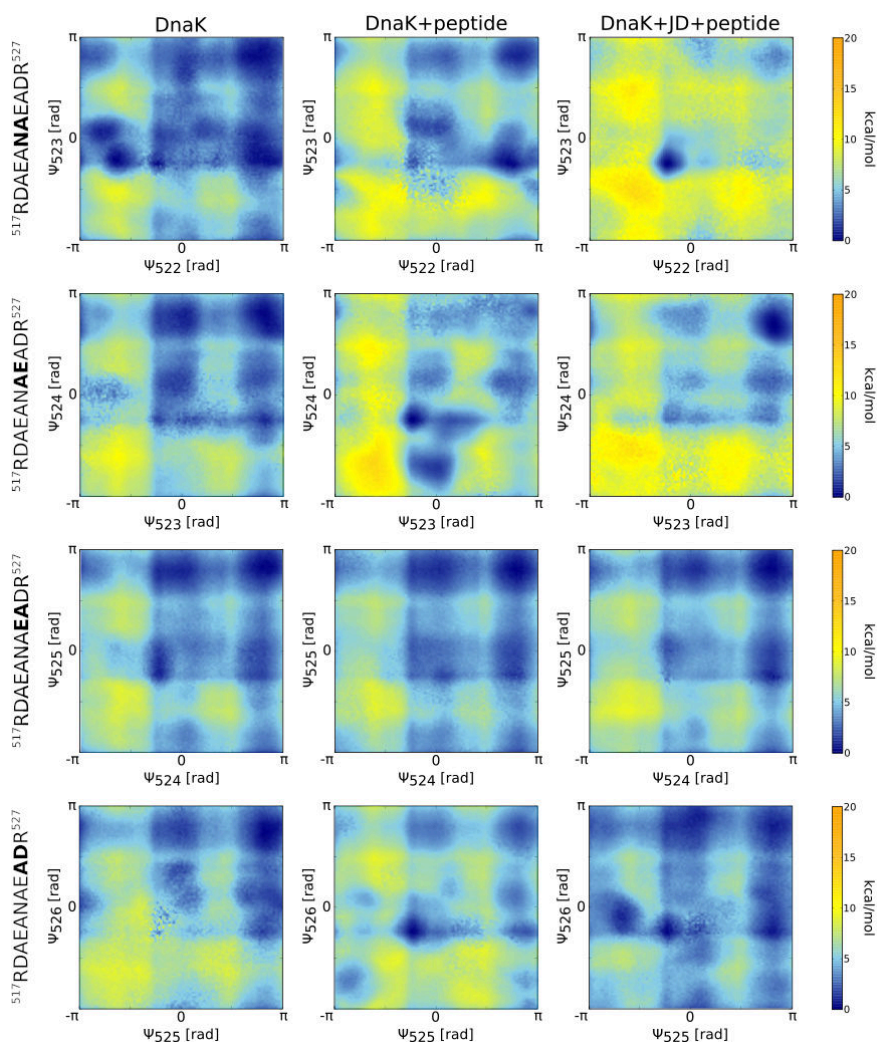
profilu dla izolowanego DnaK wskazuje, że dla większości par reszt swoboda konformacyjna kątów Ψ jest umożliwiona poprzez stosunkowo niewielkie bariery energii swobodnej (<5 kcal/mol) pomiędzy minimami lokalnymi (Rysunki 5.3.8–5.3.9).



Rysunek 5.3.8: Mapy energii swobodnej dla obrotu wokół kątów torsyjnych Ψ kolejnych par reszt SBD α (518–522), kolejno dla izolowanego DnaK, DnaK w stanie R ze związanym peptydem oraz dla kompleksu potrójnego.

Poza parą 525–526, w każdym przypadku minima energetyczne odpowiadające α -helisie ($\Psi \approx -0.25\pi$) są wyraźnie zdefiniowane, a miejscowa deformacja helisy ($\Psi \approx 0.75\pi$) jest utrudniona jedynie w przypadku pary 519–520. Obecność efektorów allosterycznych zmienia krajobraz energetyczny, ułatwiając tę deformację: dla obrotu wokół kątów $\Psi_{519-520}$ przy wartościach $\Psi \approx 0.75\pi$ pojawiają się lokalne minima. Nie jest to jednak powszechna tendencja: dla par 520–521 i 522–

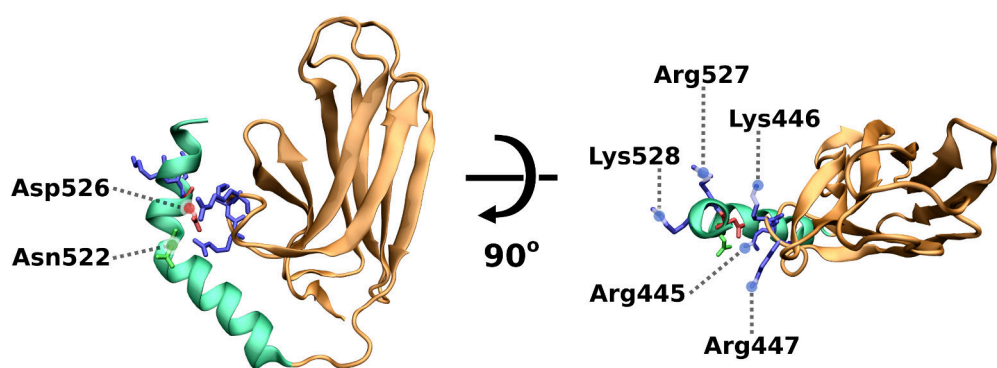
523 układ DnaK z peptydem oraz kompleks potrójny charakteryzują się preferencją do zachowania α -helisy i mniejszą swobodą obrotu niż izolowany DnaK. Odwrotnie, dla pary 523–524 obecność domeny J i peptydu faworyzuje zaburzenie helikalnej struktury. Jednocześnie mapy energii dla połowy badanych par (518–519, 521–522, 524–525 i 525–526) nie wykazują znaczących różnic w przebiegu zależnych od obecności czynników allosterycznych: w każdym z tych przypadków możliwe jest zaburzenie struktury helisy SBD.



Rysunek 5.3.9: Mapy energii swobodnej dla obrotu wokół kątów torsyjnych Ψ kolejnych par reszt SBD α (522–526), kolejno dla izolowanego DnaK, DnaK w stanie R ze związanym peptydem oraz dla kompleksu potrójnego.

Dlaczego zatem złamania SBD α w różnych miejscach nie są widoczne w strukturach krystalicznych? Bliższa analiza zamkniętej konformacji SBD pozwala dostrzec, że złamanie helisy dokładnie na wysokości reszty Asn522 umożliwia oddziaływanie Asp526 z grupą dodatnio naładowanych łańcuchów bocznych reszt SBD β (Arg445, Lys446 i Arg447; Rysunek 5.3.10). W trakcie symulacji równowagowych stanu S minimalne odległości między parami D526–R445, D526–K446 i D526–R447 wy-

nosiły odpowiednio: 0.18 ± 0.01 nm, 0.23 ± 0.03 nm oraz 0.41 ± 0.05 nm. Te oddziaływania mogą pełnić podobną rolę jak „zatrask” (ang. *latch*), tj. mostki solne między resztami SBD α (Asp540, His544, Lys548) i SBD β (Asp431, Arg467) stabilizujące zamkniętą konformację SBD. [39] Ponadto złamanie w tym miejscu powoduje, że łańcuchy boczne Arg527 i Lys528 nie są skierowane w kierunku regionu R445–R447. Podsumowując, dzięki niskim barierom energetycznym przed pełnym zamknięciem SBD możliwe jest wstępne złamanie helisy w różnych miejscach, jednak złamanie na wysokości Asn522 sprzyja korzystnemu ułożeniu łańcuchów bocznych naładowanych aminokwasów. Brakuje natomiast wyraźnych trendów wiążących obecność peptydu i domeny J ze swobodą konformacyjną obrotu wzdłuż kątów Ψ .



Rysunek 5.3.10: SBD z symulacji równowagowej stanu S z wyróżnionymi naładowanymi resztami w pobliżu Asn522 (NBD i związany peptyd pominięto dla większej czytelności).

Większość dotychczasowych badań uwzględniających zachowanie SBD α raportowała, że SBD może okresowo otwierać się i zamykać niezależnie od obsadzenia NBD. [74, 75, 203] W trakcie symulacji dimerów SBD Mahto i współpracownicy zauważyli jednak, że SBD α może też rotować czy wykonywać ruchy „wachlarzowe”, gdzie helisa wychyla się względem NBD. [205] Sama helisa mogła również zginać się w okolicy reszty 522, a dystrybucje prawdopodobieństwa dla kąta zdefiniowanego między resztami Asp510, Asn522 i Asp550 wykazywały różne maksima. Otrzymane przeze mnie wyniki dotyczące preferencji łamania SBD α w obecności efektorów allosterycznych wpisują się tym samym w najnowsze doniesienia o większej swobodzie konformacyjnej SBD α niż wynikałoby to ze struktur krystalicznych.

6 Podsumowanie

W niniejszej pracy, korzystając z metod obliczeniowych, scharakteryzowałem mechanizm aktywacji Hsp70, która prowadzi do przyjęcia przez białko konformacji sprzyjającej hydrolizie ATP. W swoich badaniach skoncentrowałem się na bakteryjnym wariantcie Hsp70, DnaK, który jak dotąd jest najlepiej poznanym przedstawicielem tej rodziny białek. Dotychczas wyniki badań biochemicznych wielokrotnie podkreślały kluczową rolę reszty Thr199 w procesie hydrolizy. Niestety, poprzez rutynowe stosowanie mutacji T199A w badaniach krystalograficznych, dokładny wgląd strukturalny w mechanizm jej działania nie był znany. Moje badania wypełniły tę lukę i pozwoliły na szczegółowy opis aktywacji DnaK uwypuklający centralną rolę treoniny.

Wychodząc od charakterystyki stanów NBD przy różnym obsadzeniu kieszeni wiążącej, pokazałem, że główną zmianą w obrębie NBD po hydrolizie jest przyjęcie struktury o bardziej kompaktowym ułożeniu płatów domeny. Struktura ta cechuje się równocześnie większą mobilnością łańcuchów bocznych w porównaniu do NBD ze związanym ATP, co przekłada się na mniejszą liczbę trwałych, specyficznych kontaktów tworzonych między resztami po hydrolizie. Dzięki wyznaczeniu profili energii swobodnej dla dysocjacji SBD β od NBD potwierdziłem, że przy nieobsadzonym SBD nie zachodzi ona spontanicznie przed hydrolizą ATP. Z kolei analiza interfejsu NBD–SBD β pozwoliła mi na wytypowanie grupy reszt aminokwasowych 215–222 jako tych, które sprzęgają powinowactwo między domenami z obsadzeniem NBD. W procesie dysocjacji obu domen zwróciłem także uwagę na kluczową rolę reszty Phe216, która dotąd nie była obiektem badań biochemicznych.

W kolejnej części badań scharakteryzowałem zmiany konformacyjne DnaK, które prowadzą do aktywacji białka przez związanie domeny J. Pokazałem, że obecność JD powoduje wzajemną rotację płatów NBD i faworyzuje przemieszczenie reszty Thr199 w kierunku terminalnego fosforanu ATP. Opisałem także towarzyszący tej zmianie ruch Tyr145, reszty zaangażowanej w aktywację DnaK powodowaną obecnością substratu w SBD. Wskazałem ponadto, że naruszenie struktury drugorzędowej regionu 198–206; 219–227 jest konieczne, ale niewystarczające, aby umożliwić DnaK przyjęcie stanu kompetentnego dla hydrolizy. Co więcej, udało mi się określić dokładną rolę aminokwasów tworzących silnie zakonserwowany motyw HPD obecny w sekwencji białek J. Wykazałem, że His33 bierze udział w transmisji sygnału allosterycznego do kieszeni wiążącej NBD, Asp35 jest zaangażowany w tworzenie mostka solnego, odpowiadającego za stabilizację kompleksu DnaK-JD, a Pro34, poprzez lokalne zaburzenie struktury drugorzędowej, umożliwia właściwą orientację His33 i Asp35. Jednocześnie pokazałem, że sygnalizacja allosteryczna w obrębie wariantu kompensatorowego (R167A DnaK+D35N JD) pozostaje niezmienną względem natywnego kompleksu, co wyjaśnia zachowanie przez niego aktywności ATP-azowej. Ponadto, opisałem trwałość zadokowania JD do C-terminalnej domeny białek J i pokazałem, jak związanie motywu EEVD modyfikuje to powinowactwo dla białek

J grupy B.

Wsparcie uzyskanych wyników przez analizy przeprowadzone w naszej grupie badawczej pozwoliło nam na zaproponowanie mechanistycznego wyjaśnienia podłoża aktywacji DnaK przez domenę J. Zgodnie z naszą hipotezą, przebiega ona według mechanizmu indukowanego dopasowania: ciasnemu wiązaniu domeny J do DnaK towarzyszy steryczny nacisk, który odpowiada za rozluźnienie interfejsu NBD–SBD β , co umożliwia rotację płatów NBD. Jednocześnie propagacja sygnału allosterycznego przez region 200–215 DnaK powoduje deformację β -nici w obrębie subdomeny IIA, która pozwala na utworzenie kontaktu Thr199–ATP.

W trzeciej części badań skupiłem się na charakterystyce stanu stymulowanego DnaK (stanu S), przyjmowanego w obecności substratu w SBD. Dokonana przez mnie analiza porównawcza względem kompleksu DnaK–JD przemawia za spójnym obrazem aktywacji DnaK pod wpływem czynników allosterycznych. Wśród cech wspólnych stanu S wyróżniłem: rotację płatów NBD, trwałe kontakty między Thr199 a terminalnym fosforanem ATP, koordynowanie Thr199 przez grupę hydroksylową Tyr145 oraz naruszenie struktury drugorzędowej regionu 198–206; 219–227. Wyszczególnione cechy są spójne z przesłankami eksperymentalnymi i mogą wyjaśniać synergistyczne działanie domeny J i białkowego substratu w stymulacji hydrolizy ATP. Dodatkowo opisałem również jak lokalne naruszenie helikalnej struktury w obrębie regionu 517–527 SBD α , towarzyszące przyjmowaniu przez białko stanu zamkniętego, jest zależne od obecności czynników allosterycznych.

Tym samym zastosowanie metod Dynamiki Molekularnej pozwoliło mi na uzupełnienie i wyjaśnienie dotychczasowych wyników badań eksperymentalnych nad DnaK. Rezultaty moich analiz mogą być szczególnie interesujące dla badaczy traktujących Hsp70 jako cel terapeutyczny w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych czy nowotworów. Z kolei w dalszej perspektywie zaproponowany model stymulacji może stanowić punkt wyjścia do przeprowadzenia dalszych badań metodami kwantowymi, zdolnymi opisać bezpośrednio sam proces hydrolizy ATP w obrębie NBD.

Załącznik

mCSM-PPI2 $\Delta\Delta G$ [kcal/mol]					
	ATP	ADP		ATP	ADP
Asp79	-0,26±0,10	-0,25±0,05	Thr215	-0,72±0,14	-0,59±0,18
Glu80	-0,18±0,10	-0,14±0,02	Phe216	-2,05±0,17	-1,30±0,46
Glu81	-0,29±0,15	-0,17±0,07	Glu217	-0,88±0,20	-0,58±0,21
Val82	-0,16±0,04	-0,17±0,06	Val218	-1,36±0,13	-0,79±0,41
Tyr145	-0,23±0,13	-0,70±0,56	Leu219	-0,87±0,17	-0,62±0,2
Asn147	-0,40±0,17	-0,27±0,10	Thr221	-0,90±0,20	-0,51±0,28
Asp148	-0,39±0,16	-0,37±0,16	Asn222	-0,09±0,10	-0,18±0,20
Arg151	-1,00±0,23	-0,74±0,35	Asp224	-0,23±0,12	-0,40±0,29
Lys155	-0,67±0,27	-0,44±0,23	Lys414	-0,46±0,16	-0,47±0,12
Lys166	-0,46±0,15	-0,26±0,19	Asn415	-1,03±0,15	-0,93±0,17
Arg167	-0,76±0,11	-0,90±0,17	Thr416	-0,58±0,16	-0,45±0,11
Ile168	-0,89±0,20	-0,60±0,24	Thr417	-0,64±0,14	-0,45±0,10
Asp201	-0,56±0,11	-0,69±0,35	Glu444	-0,36±0,12	-0,53±0,19
Glu206	-0,29±0,09	-0,44±0,13	Arg445	-0,24±0,04	-0,70±0,41
Asp208	-0,40±0,12	-0,40±0,12	Lys446	0,04±0,05	0,06±0,09
Glu209	-0,26±0,08	-0,44±0,11	Arg447	-0,12±0,03	-0,11±0,04
Val210	-0,05±0,03	-0,31±0,16	Lys452	-0,25±0,07	-0,39±0,24
Asp211	-0,18±0,05	-0,18±0,05	Asp479	-0,36±0,17	-0,26±0,13
Glu213	-0,43±0,05	-0,50±0,08	Asp481	-0,52±0,24	-0,34±0,25
Lys214	-0,63±0,16	-0,78±0,26	Ile483	-0,43±0,36	-0,31±0,25
			Leu484	-0,44±0,11	-0,43±0,10

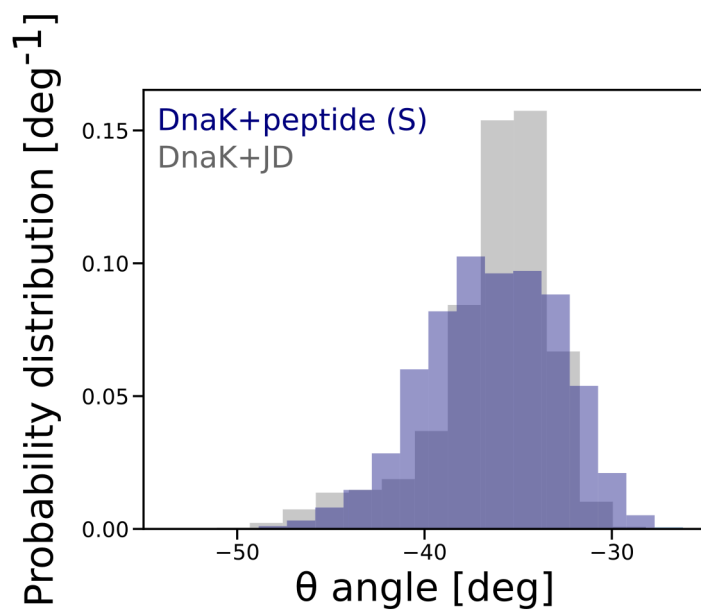
Tabela 3: Wartości $\Delta\Delta G$ otrzymane za pomocą narzędzia mCSM-PPI2. Ujemne wartości wskazują na łatwiejszą dysocjację domen pod wpływem mutacji alaninowej wybranej reszty.

	BAR [kcal/mol]					
	ATP			ADP		
	ΔG_1	ΔG_3	$\Delta\Delta G$	ΔG_1	ΔG_3	$\Delta\Delta G$
Val82	5,68 $\pm$ 0,66	2,98 $\pm$ 0,40	-2,69 $\pm$ 0,77	3,58 $\pm$ 0,26	2,81 $\pm$ 0,22	-0,77 $\pm$ 0,34
Tyr145	0,76 $\pm$ 0,10	0,13 $\pm$ 0,11	-0,62 $\pm$ 0,15	2,50 $\pm$ 0,20	2,07 $\pm$ 0,39	-0,43 $\pm$ 0,44
Asn147	2,48 $\pm$ 0,42	0,86 $\pm$ 0,11	-1,62 $\pm$ 0,43	1,38 $\pm$ 0,23	0,72 $\pm$ 0,12	-0,66 $\pm$ 0,26
Ile168	1,58 $\pm$ 0,12	0,93 $\pm$ 0,09	-0,66 $\pm$ 0,15	1,75 $\pm$ 0,11	1,39 $\pm$ 0,15	-0,29 $\pm$ 0,19
Val210	0,83 $\pm$ 0,24	0,63 $\pm$ 0,07	-0,20 $\pm$ 0,25	0,33 $\pm$ 0,07	0,36 $\pm$ 0,12	0,03 $\pm$ 0,14
Thr215	1,13 $\pm$ 0,14	2,23 $\pm$ 0,29	1,10 $\pm$ 0,32	1,41 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,13	-0,53 $\pm$ 0,16
Phe216	1,97 $\pm$ 0,37	3,58 $\pm$ 0,31	1,61 $\pm$ 0,48	-12,40 $\pm$ 0,32	3,75 $\pm$ 0,14	16,14 $\pm$ 0,34
Val218	3,37 $\pm$ 0,15	1,59 $\pm$ 0,20	-1,78 $\pm$ 0,25	2,51 $\pm$ 0,17	1,74 $\pm$ 0,26	-0,77 $\pm$ 0,32
Leu219	3,14 $\pm$ 0,19	2,54 $\pm$ 0,18	-0,60 $\pm$ 0,26	2,05 $\pm$ 0,30	3,08 $\pm$ 0,22	1,04 $\pm$ 0,37
Thr221	1,79 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,10	-0,79 $\pm$ 0,13	2,18 $\pm$ 0,28	1,51 $\pm$ 0,24	-0,67 $\pm$ 0,37
Asn222	4,24 $\pm$ 0,38	3,16 $\pm$ 0,23	-1,09 $\pm$ 0,44	5,43 $\pm$ 1,09	2,79 $\pm$ 0,14	-2,64 $\pm$ 1,10
Asn415	3,28 $\pm$ 0,16	1,96 $\pm$ 0,13	-1,32 $\pm$ 0,21	3,49 $\pm$ 0,69	2,13 $\pm$ 0,16	-1,36 $\pm$ 0,70
Thr416	1,14 $\pm$ 0,12	0,35 $\pm$ 0,14	-0,80 $\pm$ 0,18	0,76 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,15	-0,12 $\pm$ 0,17
Thr417	1,21 $\pm$ 0,15	0,77 $\pm$ 0,32	-0,44 $\pm$ 0,35	1,15 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,09	-0,89 $\pm$ 0,12
Ile483	1,29 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,11	-0,03 $\pm$ 0,15	0,44 $\pm$ 0,11	0,49 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,14
Leu484	1,76 $\pm$ 0,20	1,27 $\pm$ 0,15	-0,49 $\pm$ 0,25	2,20 $\pm$ 0,28	2,25 $\pm$ 0,21	0,05 $\pm$ 0,35

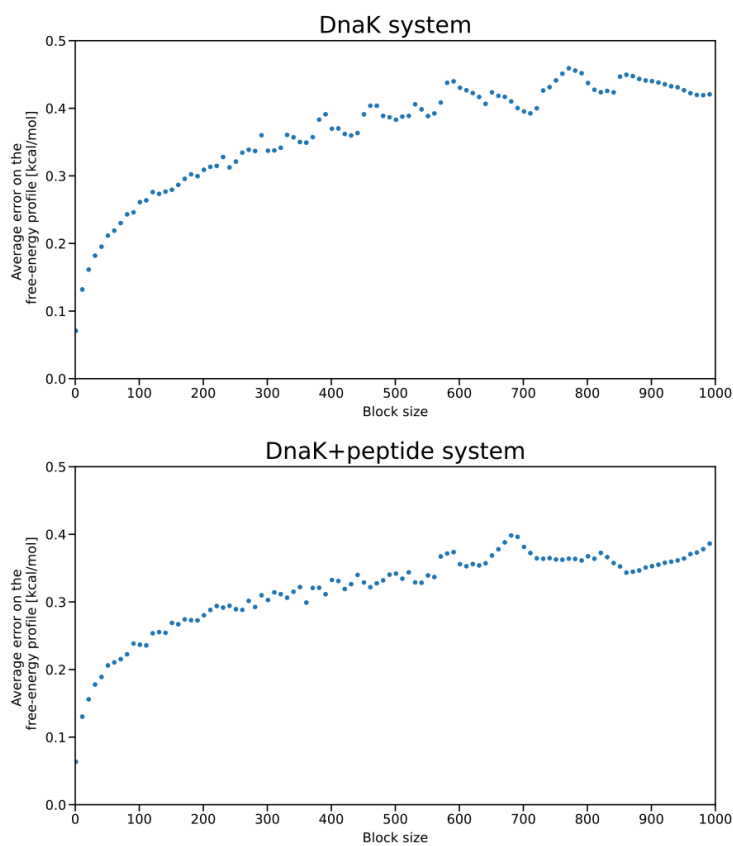
Tabela 4: Wartości $\Delta\Delta G$ otrzymane za pomocą metod alchemicznych (metoda BAR). Ujemne wartości wskazują na łatwiejszą dysocjację domen pod wpływem mutacji alaninowej wybranej reszty.

	CGI [kcal/mol]					
	ATP			ADP		
	ΔG_1	ΔG_3	$\Delta \Delta G$	ΔG_1	ΔG_3	$\Delta \Delta G$
Val82	5,69±0,42	4,47±0,85	-2,47±0,54	5,05±0,51	4,47±0,85	-0,58±0,99
Tyr145	-2,82±0,76	-3,04±0,58	-0,22±0,96	1,78±0,30	2,73±0,38	0,95±0,49
Asn147	20,88±6,14	14,68±8,97	-6,20±10,87	0,59±7,72	6,78±5,32	6,19±9,38
Ile168	1,31 ±0,15	0,88±0,07	-0,43±0,16	1,68±0,11	1,39±0,15	-0,36 ±0,19
Val210	2,15 ±0,98	1,42±0,48	-0,73±1,09	1,58±0,53	0,77±0,53	-0,81±0,75
Thr215	7,19 ±1,57	2,27±1,08	-4,91±1,91	4,57±1,19	4,06±1,13	-0,51±1,64
Phe216	-6,45±0,83	-0,31±1,36	6,14±1,59	0,92±1,93	-3,47±0,91	-4,38±2,13
Val218	9,00±0,33	3,43±0,61	-5,57±0,70	4,76±0,53	4,66±0,71	-0,10±0,89
Leu219	6,63±0,57	6,41±0,59	-0,22±0,82	3,90±0,74	5,35±0,62	1,45±0,96
Thr221	4,63±1,15	2,94±1,04	-1,69±1,55	5,77±1,20	5,93±1,17	0,16±1,67
Asn222	35,03±5,24	31,97±4,33	-3,06±6,80	28,95±6,89	42,02±3,96	13,08±7,95
Asn415	12,81±4,11	37,46±4,69	24,65±6,23	27,26±5,98	43,11±3,97	15,85±7,17
Thr416	6,94±1,25	3,68±1,18	-3,26±1,72	6,11±0,98	2,17±1,20	-3,93±1,55
Thr417	1,63±1,30	2,83±1,41	1,20±1,92	7,65±0,73	1,06±1,10	-6,59±1,32
Ile483	1,26±0,15	1,29±0,12	0,02±0,19	0,49±0,10	0,71±0,13	0,22±0,16
Leu484	1,90±0,72	2,27±0,94	0,36±1,18	5,81±0,78	5,40±0,81	-0,41±1,13

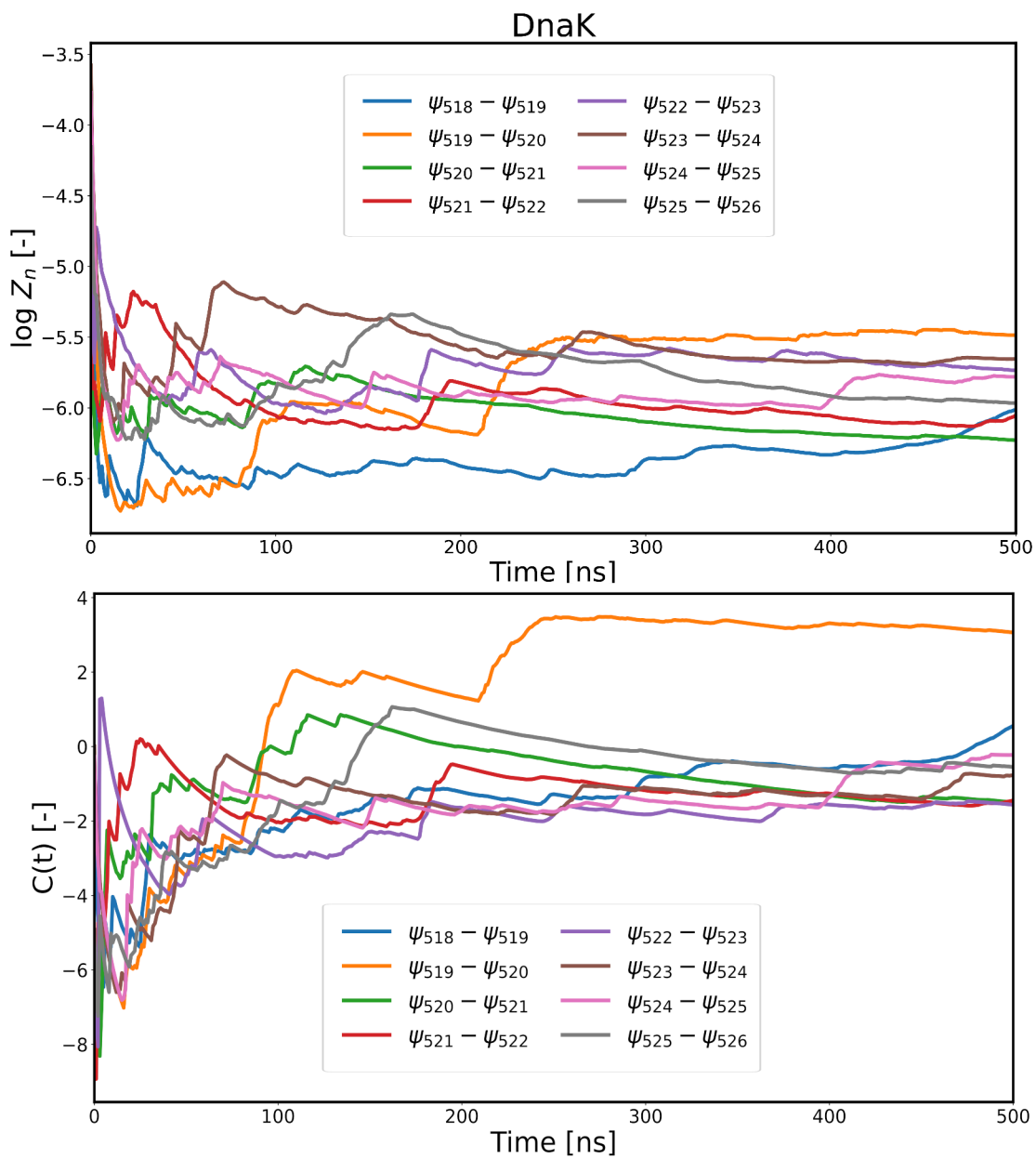
Tabela 5: Wartości $\Delta \Delta G$ otrzymane za pomocą metod alchemicznych (metoda CGI). Ujemne wartości wskazują na łatwiejszą dysocjację domen pod wpływem mutacji alaninowej wybranej reszty.



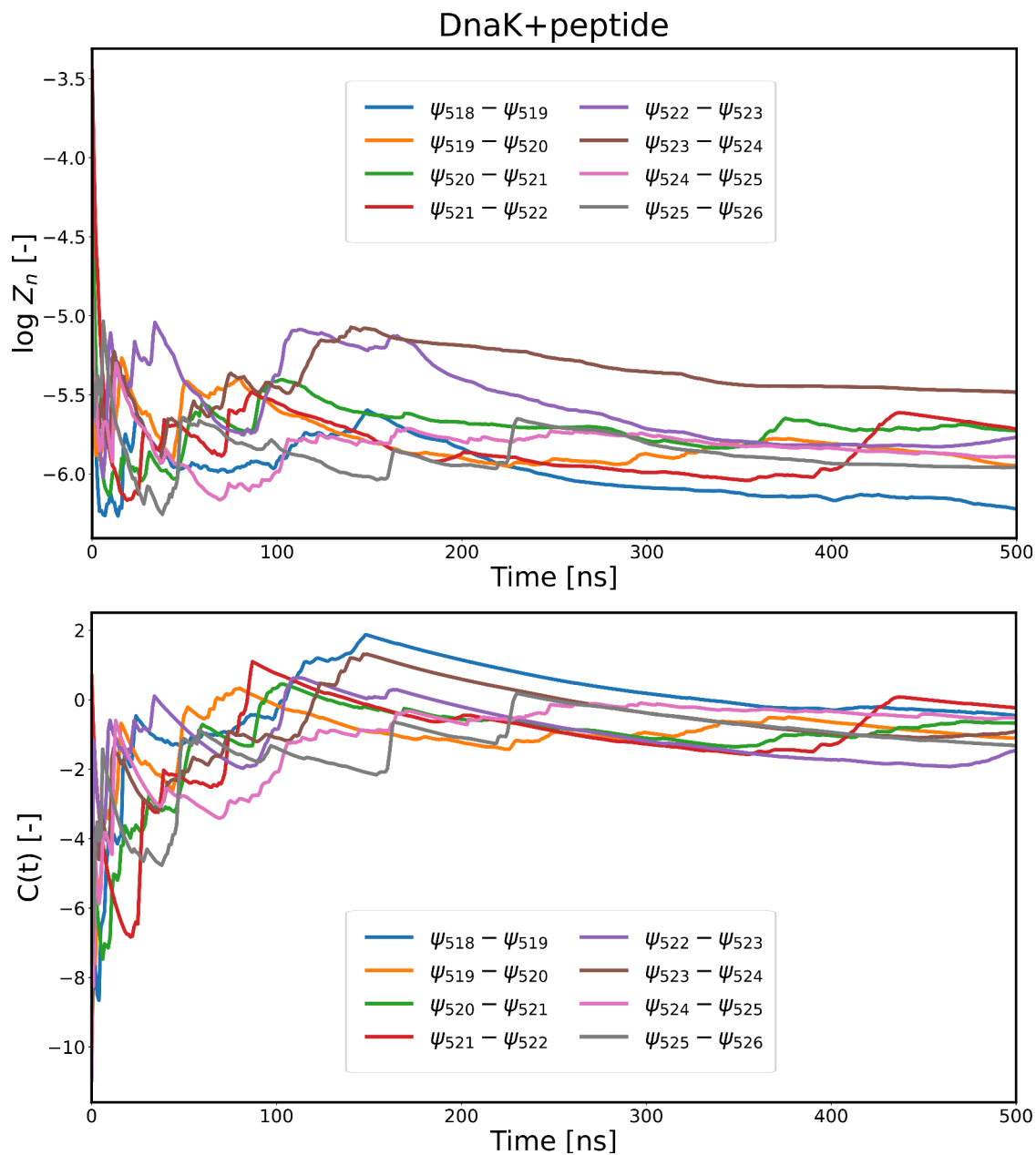
Rysunek 6.1: Rozkład prawdopodobieństwa dla kąta torsyjnego między płatami NBD w trakcie symulacji DnaK w stanie S (granatowy) oraz kompleksu DnaK+JD (szary).



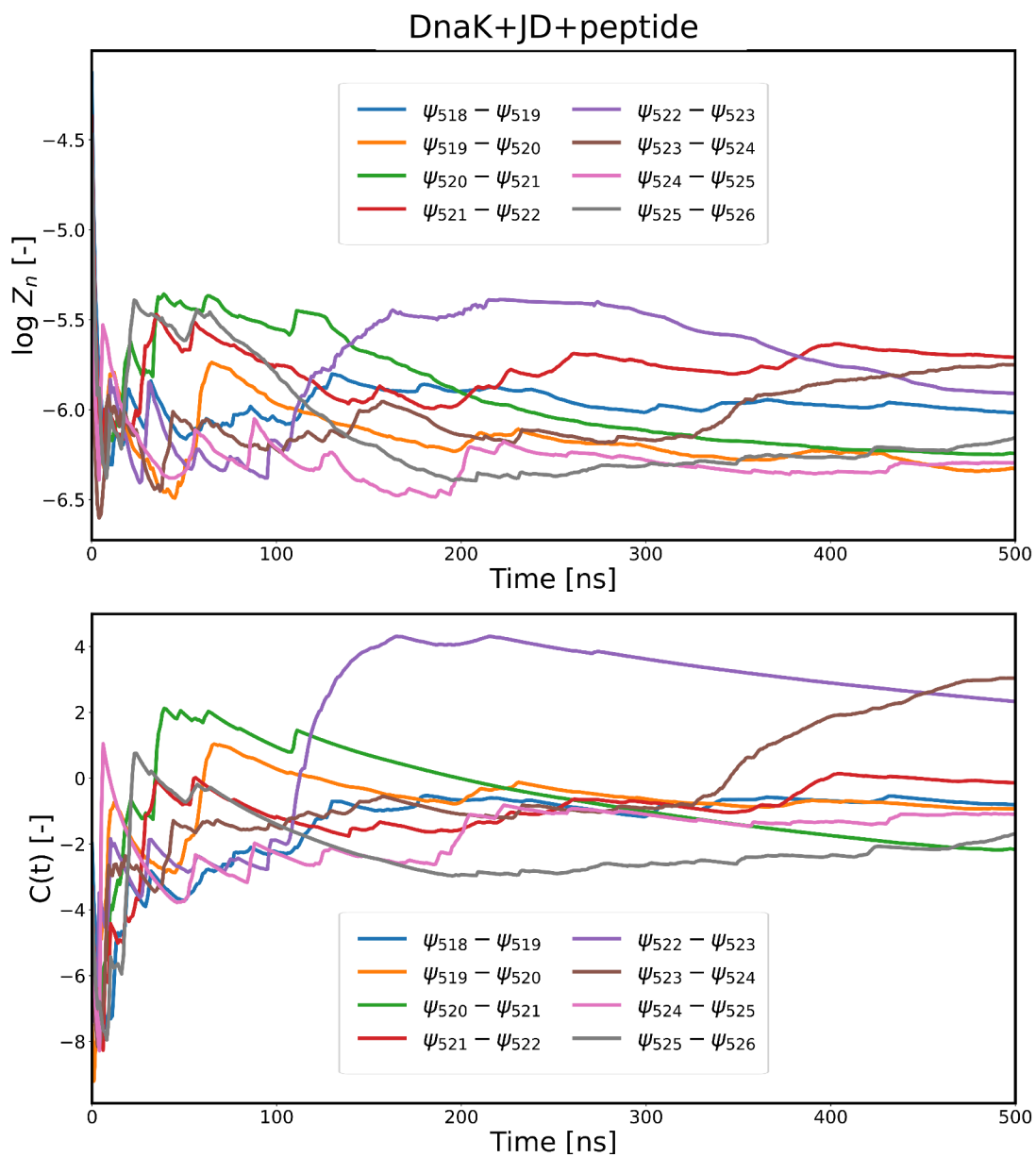
Rysunek 6.2: Analiza blokowa symulacji metadynamiki dla układu izolowanego DnaK (góra) i kompleksu DnaK z peptydem (dół) służąca do oszacowania niepewności pomiaru dla otrzymanych profili.



Rysunek 6.3: Zmiana parametrów Z_n i C w trakcie symulacji wzmocnionego próbkowania obrazująca zbieżność wyników uzyskanych metodą OPES (układ DnaK).



Rysunek 6.4: Zmiana parametrów Z_n i C w trakcie symulacji wzmocnionego próbkowania obrazująca zbieżność wyników uzyskanych metodą OPES (układ DnaK z peptydem).



Rysunek 6.5: Zmiana parametrów Z_n i C w trakcie symulacji wzmocnionego próbkowania obrazująca zbieżność wyników uzyskanych metodą OPES (kompleks potrójny).

Literatura

- [1] J. Monod, J.P. Changeux, F. Jacob. Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of Molecular Biology*, 6(4):306–329, 1963.
- [2] H. N. Motlagh, J. O. Wrabl, J. Li, V. J. Hilser. The ensemble nature of allostery. *Nature*, 508(7496):331–339, 2014.
- [3] B. Grzelakowska-Sztabert, J. Rytka. Allosteryczna kontrola aktywności biologicznej niektórych białek. *Postępy Biochemii*, 14:251–266, 1968.
- [4] J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12(1):88–118, 1965.
- [5] D. E. Koshland, Jr., G. Némethy, D. Filmer. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5(1):365–385, 1966.
- [6] Q. Cui, M. Karplus. Allostery and cooperativity revisited. *Protein Science*, 17(8):1295–1307, 2008.
- [7] D. E. Koshland, Jr. Enzyme flexibility and enzyme action. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 54(S1):245–258, 1959.
- [8] M. J. Whitley, A. L. Lee. Frameworks for understanding long-range intra-protein communication. *Current Protein Peptide Science*, 10(2):116–127, 2009.
- [9] J. P. Changeux. Allostery and the Monod-Wyman-Changeux Model After 50 Years. *Annual Review of Biophysics*, 41:103–133, 2012.
- [10] J. F. Swain, L. M. Gierasch. The changing landscape of protein allostery. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(1):102–108, 2006.
- [11] J. Liu, R. Nussinov. Allostery: An overview of its history, concepts, methods, and applications. *PLOS Computational Biology*, 12(6):1–5, 2016.
- [12] M. G. Süel, S. W. Lockless, M. A. Wall, R. Ranganathan. Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nature Structural Biology*, 10(1):59–69, 2003.
- [13] S. W. Lockless, R. Ranganathan. Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science*, 286(5438):295–299, 1999.
- [14] A. Cooper, D. T. F. Dryden. Allostery without conformational change. *European Biophysics Journal*, 11(2):103–109, 1984.

- [15] C. J. Tsai, S. Kumar, B. Ma, R. Nussinov. Folding funnels, binding funnels and protein function. *Protein Science*, 8(6):1181–1190, 1999.
- [16] B. Ma, S. Kumar, C. J. Tsai, R. Nussinov. Folding funnels and binding mechanisms. *Protein Engineering*, 12(9):713–720, 1999.
- [17] S. Kumar, B. Ma, C. J. Tsai, H. Wolfson, R. Nussinov. Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31(2):141–164, 1999.
- [18] V. J. Hilser, J. O. Wrabl, H. N. Motlagh. Structural and energetic basis of allostery. *Annual Review of Biophysics*, 41:585–609, 2012.
- [19] J. Guo, H. X. Zhou. Protein allostery and conformational dynamics. *Chemical Reviews*, 116(11):6503–6515, 2016.
- [20] K. Gunasekaran, B. Ma, R. Nussinov. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57(3):433–443, 2004.
- [21] S. Torino, M. Dhurandhar, A. Stroobants, R. Claessens, R. G. Efremov. Time-resolved cryo-EM using a combination of droplet microfluidics with on-demand jetting. *Nature Methods*, 20(9):1400–1408, 2023.
- [22] M. Carroni, H. R. Saibil. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods*, 95:78–85, 2016. Integrated Structural Biology.
- [23] A. Chandramohan, S. Krishnamurthy, A. Larsson, P. Nordlund, A. Jansson, G. S. Anand. Predicting Allosteric Effects from Orthosteric Binding in Hsp90-Ligand Interactions: Implications for Fragment-Based Drug Design. *PLOS Computational Biology*, 12(6):1–17, 2016.
- [24] S. Hertig, N. R. Latorraca, R. O. Dror. Revealing atomic-level mechanisms of protein allostery with molecular dynamics simulations. *PLOS Computational Biology*, 12(6):1–16, 2016.
- [25] S. Grutsch, S. Bruschweiler, M. Tollinger. NMR Methods to Study Dynamic Allostery. *PLOS Computational Biology*, 12(3):1–20, 2016.
- [26] B. J. Dong. Cinacalcet: An oral calcimimetic agent for the management of hyperparathyroidism. *Clinical Therapeutics*, 27(11):1725–1751, 2005.
- [27] K. Kucharczyk, E. Laskowska, A. Taylor. Response of Escherichia coli cell membranes to induction of λ c1857 prophage by heat shock. *Molecular Microbiology*, 5(12):2935–2945, 1991.
- [28] A.I. Gragerov, E.S. Martin, M.A. Krupenko, M.V. Kashlev, V.G. Nikiforov. Protein aggregation and inclusion body formation in Escherichia coli rpoH mutant defective in heat shock protein induction. *FEBS Letters*, 291(2):222–224, 1991.

- [29] H. Schröder, T. Langer, F.U. Hartl, B. Bukau. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *The EMBO Journal*, 12(11):4137–4144, 1993.
- [30] S. Kędzierska. Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie. *Postępy Biochemii*, 51(2):146–152, 2005.
- [31] K. Richter, M. Haslbeck, J. Buchner. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, 40(2):253–266, 2010.
- [32] V. Prahlad, T. Cornelius, R. Morimoto. Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons. *Science*, 320(5877):811–814, 2008.
- [33] M. Åkerfelt, R. Morimoto, L. Sistonen. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(8):545–555, 2010.
- [34] A. D. Grossman, J. W. Erickson, C. A. Gross. The htpR gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell*, 38(2):383–390, 1984.
- [35] R. Gomez-Pastor, E. T. Burchfiel, D. J. Thiele. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1):4–19, 2018.
- [36] F. U. Hartl. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583):571–580, 1996.
- [37] B. Bukau, A. L. Horwich. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell*, 92(3):351–366, 1998.
- [38] R. Rosenzweig, N. B. Nillegoda, M. P. Mayer, B. Bukau. The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11):665–680, 2019.
- [39] X. Zhu, X. Zhao, W. F. Burkholder, A. Gragerov, C. M. Ogata, M. E. Gottesman, W. A. Hendrickson. Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK. *Science*, 272(5268):1606–1614, 1996.
- [40] D. Schmid, A. Baici, H. Gehring, P. Christen. Kinetics of Molecular Chaperone Action. *Science*, 263(5149):971–973, 1994.
- [41] B. Bukau, E. Deuerling, C. Pfund, E. A. Craig. Getting Newly Synthesized Proteins into Shape. *Cell*, 101(2):119–122, 2000.
- [42] F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl. Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science*, 295(5561):1852–1858, 2002.
- [43] G. Cagney, S. Amiri, T. Premawaradena, M. Lindo, A. Emili. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. *Proteome Science*, 1(1):5, 2003.

- [44] M. P. Mayer, B. Bukau. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6):670, 2005.
- [45] K. M. Flaherty, C. DeLuca-Flaherty, D. B. McKay. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346(6285):623–628, 1990.
- [46] A. Buchberger, H. Theyssen, H. Schröder, J. S. McCarty, G. Virgallita, P. Milkereit, J. Reinstein, B. Bukau. Nucleotide-induced Conformational Changes in the ATPase and Substrate Binding Domains of the DnaK Chaperone Provide Evidence for Interdomain Communication. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28):16903–16910, 1995.
- [47] R. Kityk, J. Kopp, I. Sinning, M. P. Mayer. Structure and Dynamics of the ATP-Bound Open Conformation of Hsp70 Chaperones. *Molecular Cell*, 48(6):863–874, 2012.
- [48] E. B. Bertelsen, L. Chang, J. E. Gestwicki, E. R. P. Zuiderweg. Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21):8471–8476, 2009.
- [49] G. C. Flynn, J. Pohl, M. T. Flocco, J. E. Rothman. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, 353(6346):726–730, 1991.
- [50] S. Rüdiger, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, B. Bukau. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *The EMBO Journal*, 16(7):1501–1507, 1997.
- [51] S. Rüdiger, A. Buchberger, B. Bukau. Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nature Structural Biology*, 4(5):342–349, 1997.
- [52] A. Gragerov, M. E. Gottesman. Different Peptide Binding Specificities of hsp70 Family Members. *Journal of Molecular Biology*, 241(2):133–135, 1994.
- [53] R. Dutkiewicz, B. Schilke, S. Cheng, H. Knieszner, E. A. Craig, J. Marszalek. Sequence-specific Interaction between Mitochondrial Fe-S Scaffold Protein Isu and Hsp70 Ssq1 Is Essential for Their in Vivo Function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28):29167–29174, 2004.
- [54] K. G. Hoff, D. T. Ta, T. L. Tapley, J. J. Silberg, L. E. Vickery. Hsc66 Substrate Specificity Is Directed toward a Discrete Region of the Iron-Sulfur Cluster Template Protein IscU. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30):27353–27359, 2002.
- [55] B. Misselwitz, O. Staeck, T. A. Rapoport. J Proteins Catalytically Activate Hsp70 Molecules to Trap a Wide Range of Peptide Sequences. *Molecular Cell*, 2(5):593–603, 1998.

- [56] M. Zahn, N. Berthold, B. Kieslich, D. Knappe, R. Hoffmann, N. Sträter. Structural Studies on the Forward and Reverse Binding Modes of Peptides to the Chaperone DnaK. *Journal of Molecular Biology*, 425(14):2463–2479, 2013.
- [57] E. M. Clerico, A. K. Pozhidaeva, R. M. Jansen, C. Özden, J. M. Tilitsky, L. M. Gierasch . Selective promiscuity in the binding of E. coli Hsp70 to an unfolded protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(41):e2016962118, 2021.
- [58] S. Rüdiger, J. Schneider-Mergener, B. Bukau. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J*, 20(5):1042–1050, 2001.
- [59] S. V. Slepenkov, S. N. Witt. Peptide-induced conformational changes in the molecular chaperone DnaK. *Biochemistry*, 37(47):16749–16756, 1998.
- [60] S. M. Gisler, E. V. Pierpaoli, P. Christen. Catapult mechanism renders the chaperone action of Hsp70 unidirectional. *Journal of molecular biology*, 279(4):833–840, 1998.
- [61] B. E. Horne, T. Li, P. Genevaux, C. Georgopoulos, S. J. Landry. The Hsp40 J-domain Stimulates Hsp70 When Tethered by the Client to the ATPase Domain . *Journal of Biological Chemistry*, 285(28):21679–21688, 2010.
- [62] M. Pellicchia, D. L. Montgomery, S. Y. Stevens, C. W. Vander Kooi, H. P. Feng, L. M. Gierasch, E. R. P. Zuiderweg. Structural insights into substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Nature Structural Biology*, 7(4):298–303, 2000.
- [63] I. R. Taylor, A. Ahmad, T. Wu, B. A. Nordhues, A. Bhullar, J. E. Gestwicki, E. R.P. Zuiderweg. The disorderly conduct of Hsc70 and its interaction with the Alzheimer’s-related Tau protein. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27):10796–10809, 2018.
- [64] A. Szabo, T. Langer, H. Schröder, J. Flanagan, B. Bukau, F. U. Hartl. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22):10345–10349, 1994.
- [65] A. Buchberger, H. Schröder, T. Hesterkamp, H. J. Schönfeld, B. Bukau. Substrate Shuttling Between the DnaK and GroEL Systems Indicates a Chaperone Network Promoting Protein Folding. *Journal of Molecular Biology*, 261(3):328–333, 1996.
- [66] J. F. Swain, G. Dinler, R. Sivendran, D. L. Montgomery, M. Stotz, L. M. Gierasch. Hsp70 Chaperone Ligands Control Domain Association via an Allosteric Mechanism Mediated by the Interdomain Linker. *Molecular Cell*, 26(1):27–39, 2007.
- [67] M. Vogel, M. P. Mayer, B. Bukau. Allosteric Regulation of Hsp70 Chaperones Involves a Conserved Interdomain Linker. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50):38705–38711, 2006.

- [68] C. A. English, W. Sherman, W. Meng, L. M. Gierasch. The Hsp70 interdomain linker is a dynamic switch that enables allosteric communication between two structured domains. *Journal of Biological Chemistry*, 292(36):14765–14774, 2017.
- [69] H. H. Kampinga, E. A. Craig. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(8):579–592, 2010.
- [70] T. Laufen, M. P. Mayer, C. Beisel, D. Klostermeier, A. Mogk, J. Reinstein, B. Bukau. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10):5452–5457, 1999.
- [71] A. W. Karzai, R. McMacken. A Bipartite Signaling Mechanism Involved in DnaJ-mediated Activation of the Escherichia coli DnaK Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(19):11236–11246, 1996.
- [72] D. Brehmer, S. Rüdiger, C. S. Gässler, D. Klostermeier, L. Packschies, J. Reinstein, M. P. Mayer, B. Bukau. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nature Structural Biology*, 8(5):427–432, 2001.
- [73] M. P. Mayer, H. Schröder, S. Rüdiger, K. Paal, T. Laufen, B. Bukau. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nature Structural Biology*, 7(7):586–593, 2000.
- [74] R. Schlecht, A. H. Erbse, B. Bukau, M. P. Mayer. Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction with client proteins. *Nature structural & molecular biology*, 18(3):345–351, 2011.
- [75] M. Marcinowski, M. Höller, M. J. Feige, D. Baerend, D. C. Lamb, J. Buchner. Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions. *Nature structural & molecular biology*, 18(2):150–158, 2011.
- [76] S. Tiwari, B. Fauvet, S. Assenza, P. De Los Rios, P. Goloubinoff. A fluorescent multi-domain protein reveals the unfolding mechanism of Hsp70. *Nature Chemical Biology*, 19(2):198–205, 2023.
- [77] R. Imamoglu, D. Balchin, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl. Bacterial Hsp70 resolves misfolded states and accelerates productive folding of a multi-domain protein. *Nature Communications*, 11(1):365, 2020.
- [78] J. Lu, X. Zhang, Y. Wu, Y. Sheng, W. Li, W. Wang. Energy landscape remodeling mechanism of Hsp70-chaperone-accelerated protein folding. *Biophysical Journal*, 120(10):1971–1983, 2021.
- [79] S. Tiwari, V. Kumar, G. G. Jayaraj, S. Maiti, K. Mapa. Unique Structural Modulation of a Non-Native Substrate by Cochaperone DnaJ. *Biochemistry*, 52(6):1011–1018, 2013.

- [80] W. L. Kelley. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6):222–227, 1998.
- [81] J. Tsai, M. G. Douglas. A Conserved HPD Sequence of the J-domain Is Necessary for YDJ1 Stimulation of Hsp70 ATPase Activity at a Site Distinct from Substrate Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16):9347–9354, 1996.
- [82] D. Malinverni, A. Jost Lopez, P. De Los Rios, G. Hummer, A. Barducci. Modeling Hsp70/Hsp40 interaction by multi-scale molecular simulations and coevolutionary sequence analysis. *eLife*, 6:e23471, 2017.
- [83] R. Kityk, J. Kopp, M. P. Mayer. Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones. *Molecular Cell*, 69(2):227–237.e4, 2018.
- [84] B. Tomiczek, W. Delewski, L. Nierzwicki, M. Stolarska, I. Grochowina, B. Schilke, R. Dutkiewicz, M. Uzarska, S. J. Ciesielski, J. Czub, E. A. Craig, J. Marszalek. Two-step mechanism of J-domain action in driving Hsp70 function. *PLOS Computational Biology*, 16(6):1–29, 2020.
- [85] W. Delewski, B. Paterkiewicz, M. Manicki, B. Schilke, B. Tomiczek, S. J. Ciesielski, L. Nierzwicki, J. Czub, R. Dutkiewicz, E. A. Craig, J. Marszalek. Iron–Sulfur Cluster Biogenesis Chaperones: Evidence for Emergence of Mutational Robustness of a Highly Specific Protein–Protein Interaction. *Molecular Biology and Evolution*, 33(3):643–656, 2015.
- [86] E. A. Craig, J. Marszalek. How Do J-Proteins Get Hsp70 to Do So Many Different Things? *Trends in Biochemical Sciences*, 42(5):355–368, 2017.
- [87] H. H. Kampinga, C. Andreasson, A. Barducci, M. E. Cheetham, D. Cyr, C. Emanuelsson, P. Genevaux, J. E. Gestwicki, P. Goloubinoff, J. Huerta-Cepas, J. Kirstein, K. Liberek, M. P. Mayer, K. Nagata, N. B. Nillegoda, P. Pulido, C. Ramos, P. De los Rios, S. Rospert, R. Rosenzweig, C. Sahi, M. Taipale, B. Tomiczek, R. Ushioda, J. C. Young, R. Zimmermann, A. Zylicz, M. Zylicz, E. A. Craig, J. Marszalek. Function, evolution, and structure of J-domain proteins. *Cell Stress and Chaperones*, 24(1):7–15, 2019.
- [88] D. Malinverni, S. Zamuner, M. E. Rebeaud, A. Barducci, N. B. Nillegoda, P. De Los Rios. Data-driven large-scale genomic analysis reveals an intricate phylogenetic and functional landscape in J-domain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(32):e2218217120, 2023.
- [89] P. Domanski, M. Stolarska, K. Kalinowska, D. Purzycki, B. A. Schilke, H. Wyszowski, M. Pittek, A. Szymanska, K. Bury, J. Czub, A. A. Klosowska, E. A. Craig, J. Marszalek, B. Tomiczek. Origin of class B J-domain proteins involved in amyloid transactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 123(2):e2522403123, 2026.

- [90] M. Lynch, J. S. Conery. The Origins of Genome Complexity. *Science*, 302(5649):1401–1404, 2003.
- [91] L. E. Vickery, J. R. Cupp-Vickery. Molecular Chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and Their Roles in Iron-Sulfur Protein Maturation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(2):95–111, 2007.
- [92] A. Fotin, Y. Cheng, N. Grigorieff, T. Walz, S. C. Harrison, T. Kirchhausen. Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature*, 432(7017):649–653, 2004.
- [93] C. Sahi, T. Lee, M. Inada, J. A. Pleiss, E. A. Craig. Cwc23, an Essential J Protein Critical for Pre-mRNA Splicing with a Dispensable J Domain. *Molecular and Cellular Biology*, 30(1):33–42, 2010.
- [94] R. Ushioda, A. Miyamoto, M. Inoue, S. Watanabe, M. Okumura, K. Maegawa, K. Uegaki, S. Fujii, Y. Fukuda, M. Umitsu, J. Takagi, K. Inaba, K. Mikoshiba, K. Nagata. Redox-assisted regulation of Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41):E6055–E6063, 2016.
- [95] Y. Minami, J. Höhfeld, K. Ohtsuka, F. U. Hartl. Regulation of the Heat-shock Protein 70 Reaction Cycle by the Mammalian DnaJ Homolog, Hsp40. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32):19617–19624, 1996.
- [96] W. Yan, E. A. Craig. The Glycine-Phenylalanine-Rich Region Determines the Specificity of the Yeast Hsp40 Sis1. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11):7751–7758, 1999.
- [97] D. Wall, M. Zylicz, C. Georgopoulos. The Conserved G/F Motif of the DnaJ Chaperone Is Necessary for the Activation of the Substrate Binding Properties of the DnaK Chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5):2139–2144, 1995.
- [98] O. Faust, M. Abayev-Avraham, A. S. Wentink, M. Maurer, N. B. Nillegoda, N. London, B. Bukau, R. Rosenzweig. HSP40 proteins use class-specific regulation to drive HSP70 functional diversity. *Nature*, 587(7834):489–494, 2020.
- [99] H. Suzuki, S. Noguchi, H. Arakawa, T. Tokida, M. Hashimoto, Y. Satow. Peptide-Binding Sites As Revealed by the Crystal Structures of the Human Hsp40 Hdj1 C-Terminal Domain in Complex with the Octapeptide from Human Hsp70. *Biochemistry*, 49(39):8577–8584, 2010.
- [100] Y. Jiang, P. Rossi, C. G. Kalodimos. Structural basis for client recognition and activity of Hsp40 chaperones. *Science*, 365(6459):1313–1319, 2019.
- [101] M. L. Duennwald, A. Echeverria, J. Shorter. Small Heat Shock Proteins Potentiate Amyloid Dissolution by Protein Disaggregases from Yeast and Humans. *PLOS Biology*, 10(6):1–1, 2012.

- [102] X. Gao, M. Carroni, C. Nussbaum-Krammer, A. Mogk, N. B. Nillegoda, A. Szlachcic, D. Lys Guilbride, H. R. Saibil, M. P. Mayer, B. Bukau. Human Hsp70 Disaggregase Reverses Parkinson's-Linked alpha-Synuclein Amyloid Fibrils. *Molecular Cell*, 59(5):781–793, 2015.
- [103] H. Wyszowski, A. Janta, W. Sztangierska, I. Obuchowski, T. Chamera, A. Kłosowska, K. Liberek. Class-specific interactions between Sis1 J-domain protein and Hsp70 chaperone potentiate disaggregation of misfolded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(49):e2108163118, 2021.
- [104] P. De Los Rios, A. Ben-Zvi, O. Slutsky, A. Azem, P. Goloubinoff. Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16):6166–6171, 2006.
- [105] P. Goloubinoff, P. De Los Rios. The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(8):372–380, 2007.
- [106] S. Assenza, A. S. Sassi, R. Kellner, B. Schuler, P. De Los Rios, A. Barducci. Efficient conversion of chemical energy into mechanical work by Hsp70 chaperones. *eLife*, 8:e48491, 2019.
- [107] L. Chang, A. D. Thompson, P. Ung, H. A. Carlson, J. E. Gestwicki. Mutagenesis Reveals the Complex Relationships between ATPase Rate and the Chaperone Activities of Escherichia coli Heat Shock Protein 70 (Hsp70/DnaK). *Journal of Biological Chemistry*, 285(28):21282–21291, 2010.
- [108] T. K. Barthel, J. Zhang, G. C. Walker. ATPase-Defective Derivatives of Escherichia coli DnaK That Behave Differently with Respect to ATP-Induced Conformational Change and Peptide Release. *Journal of Bacteriology*, 183(19):5482–5490, 2001.
- [109] M. Schneider, I. Antes. Comparison of allosteric signaling in DnaK and BiP using mutual information between simulated residue conformations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 91(2):237–255, 2023.
- [110] R. Kityk, M. Vogel, R. Schlecht, B. Bukau, M. P. Mayer. Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones. *Nature Communications*, 6(8308), 2015.
- [111] T. K. Barthel, J. Zhang, G. C. Walker. ATPase-Defective Derivatives of Escherichia coli DnaK That Behave Differently with Respect to ATP-Induced Conformational Change and Peptide Release. *Journal of Bacteriology*, 183(19):5482–5490, 2001.
- [112] F. A. Kiani, S. Fischer. Stabilization of the ADP/Metaphosphate Intermediate during ATP Hydrolysis in Pre-power Stroke Myosin: QUANTITATIVE ANATOMY OF AN ENZYME. *Journal of Biological Chemistry*, 288(49):35569–35580, 2013.

- [113] F. A. Kiani, S. Fischer. Comparing the catalytic strategy of ATP hydrolysis in biomolecular motors. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18:20219–20233, 2016.
- [114] A. Buchberger, A. Valencia, R. McMacken, C. Sander, B. Bukau. The chaperone function of DnaK requires the coupling of ATPase activity with substrate binding through residue E171. *The EMBO Journal*, 13(7):1687–1695, 1994.
- [115] P. Liu, Z. Sang, K. Liu, M. Zhang, Y. Niu. Mycobacterium tuberculosis Hsp70 as a cancer vaccine adjuvant: Immunomodulatory mechanisms and tumor microenvironment remodeling. *Vaccine*, 62:127493, 2025.
- [116] C. G. Evans, L. Chang, J. E. Gestwicki. Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an Emerging Drug Target. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(12):4585–4602, 2010.
- [117] <https://shorturl.at/jxhmn>, data dostępu: 20 listopada 2025.
- [118] L. Nierzwicki, M. Olewniczak, P. Chodnicki, J. Czub. Role of cholesterol in substrate recognition by gamma-secretase. *Sci. Rep.*, 11:15213, 2021.
- [119] M. Szadkowska, M. Olewniczak, A. Kloska, E. Jankowska, M. Kapusta, B. Rybak, D. Wyrzykowski, W. Zmudzinska, A. Gieldon, A. Kocot, A. K. Kaczorowska, L. Nierzwicki, J. Makowska, T. Kaczorowski, M. Plotka. A Novel Cryptic Clostridial Peptide That Kills Bacteria by a Cell Membrane Permeabilization Mechanism. *Microbiology Spectrum*, 10(5):e01657–22, 2022.
- [120] A. Piróg, F. Cantini, L. Nierzwicki, I. Obuchowski, B. Tomiczek, J. Czub, K. Liberek. Two bacterial small heat shock proteins, IbpA and IbpB, form a functional heterodimer. *J. Mol. Biol.*, 433(15):167054, 2021.
- [121] M. Jurkowski, M. Kogut, S. Sappati, J. Czub. Why Are Left-Handed G-Quadruplexes Scarce? *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 15(11):3142–3148, 2024.
- [122] K. A. Hossain, M. Jurkowski, J. Czub, M. Kogut. Mechanism of recognition of parallel G-quadruplexes by DEAH/RHAU helicase DHX36 explored by molecular dynamics simulations. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19:2526–2536, 2021.
- [123] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8):3684–3690, 1984.
- [124] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello. Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics*, 126(1), 2007.
- [125] S. Nosé. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics*, 81(1):511–519, 1984.

- [126] W. G. Hoover. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A*, 31:1695–1697, 1985.
- [127] M. Parrinello, A. Rahman. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.*, 52(12):7182–7190, 1981.
- [128] L. Verlet. Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.*, 159(1):98–103, 1967.
- [129] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, K. R. Wilson. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *The Journal of Chemical Physics*, 76(1):637–649, 1982.
- [130] R. W. Hockney, S. P. Goel, J. W. Eastwood. Quiet high-resolution computer models of a plasma. *Journal of Computational Physics*, 14(2):148–158, 1974.
- [131] C. W. Hopkins, S. Le Grand, R. C. Walker, A. E. Roitberg. Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(4):1864–1874, 2015.
- [132] P. P. Ewald. Die berechnung optischer und elektrostatischer gitterpotentiale. *Annalen der Physik*, 369(3):253–287, 1921.
- [133] T. Darden, D. York, L. Pedersen. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98(12):10089–10092, 1993.
- [134] G. M. Torrie, J. P. Valleau. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *J. Comp. Phys.*, 23(2):187–199, 1977.
- [135] S. Kumar, J. M. Rosenberg, D. Bouzida, R. H. Swendsen, P. A. Kollman. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.*, 13(8):1011–1021, 1992.
- [136] A. Barducci, M. Bonomi, M. Parrinello. Metadynamics. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, 1(5):826–843, 2011.
- [137] M. Invernizzi, M. Parrinello. Rethinking Metadynamics: From Bias Potentials to Probability Distributions. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 11(7):2731–2736, 2020.
- [138] V. Gapsys, S. Michielssens, J. H. Peters, B. L. de Groot, H. Leonov. *Calculation of Binding Free Energies*. s. 173-209. Springer New York, New York, 2015.
- [139] T. C. Beutler, A. E. Mark, R. C. van Schaik, P. R. Gerber, W. F. van Gunsteren. Avoiding singularities and numerical instabilities in free energy calculations based on molecular simulations. *Chemical Physics Letters*, 222(6):529–539, 1994.

- [140] J. G. Kirkwood. Statistical Mechanics of Fluid Mixtures. *The Journal of Chemical Physics*, 3(5):300–313, 1935.
- [141] C. Jarzynski. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys. Rev. Lett.*, 78:2690–2693, 1997.
- [142] M. A. Cuendet. The Jarzynski identity derived from general Hamiltonian or non-Hamiltonian dynamics reproducing NVT or NPT ensembles. *The Journal of Chemical Physics*, 125(14):144109, 2006.
- [143] G. E. Crooks. Nonequilibrium Measurements of Free Energy Differences for Microscopically Reversible Markovian Systems. *Journal of Statistical Physics*, 90(5):1481–1487, 1998.
- [144] G. E. Crooks. Entropy production fluctuation theorem and the nonequilibrium work relation for free energy differences. *Phys. Rev. E*, 60:2721–2726, 1999.
- [145] R. Chelli, S. Marsili, A. Barducci, P. Procacci. Recovering the Crooks equation for dynamical systems in the isothermal-isobaric ensemble: A strategy based on the equations of motion. *The Journal of Chemical Physics*, 126(4):044502, 2007.
- [146] M. Goette, H. Grubmüller. Accuracy and convergence of free energy differences calculated from nonequilibrium switching processes. *Journal of Computational Chemistry*, 30(3):447–456, 2009.
- [147] M. R. Shirts, E. Bair, G. Hooker, V. S. Pande. Equilibrium Free Energies from Nonequilibrium Measurements Using Maximum-Likelihood Methods. *Phys. Rev. Lett.*, 91:140601, 2003.
- [148] R. W. Floyd. Algorithm 97: Shortest Path. *Commun. ACM*, 5(6):345, 1962.
- [149] J. Wałaszek. Algorytmy. struktury danych, <https://eduinf.waw.pl/inf/>, data dostępu: 20 listopada 2025.
- [150] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1701–1718, 2005.
- [151] G. A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi, C. Camilloni, G. Bussi. PLUMED 2: New feathers for an old bird. *Computer Physics Communications*, 185(2):604–613, 2014.
- [152] J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. De Groot, H. Grubmüller, A. D. MacKerell. CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods*, 14(1):71–73, 2016.
- [153] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2):926–935, 1983.

- [154] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(19):8577–8593, 1995.
- [155] B. Hess, H. Bekker, H. J.C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije. LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12):1463–1472, 1997.
- [156] W. F. van Gunsteren and H.J.C Berendsen. A leap frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation*, 1(May 1983):173–185, 1988.
- [157] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1):33–38, 1996.
- [158] R. Qi, E. B. Sarbeng, Q. Liu, K. Q. Le, X. Xu, H. Xu, J. Yang, J. L. Wong, C. Vorvis, W. A. Hendrickson, L. Zhou, Q. Liu. Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(7):900–907, 2013.
- [159] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, W. Im. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11):1859–1865, 2008.
- [160] J. Lee, X. Cheng, J. M. Swails, M. S. Yeom, P. K. Eastman, J. A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J. C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V. S. Pande, D. A. Case, C. L. III Brooks, A. D. Jr. MacKerell, J. B. Klauda, W. Im. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1):405–413, 2016.
- [161] A. Arakawa, N. Handa, M. Shirouzu, S. Yokoyama. Biochemical and structural studies on the high affinity of Hsp70 for ADP. *Protein Science*, 20:1367–1379, 2011.
- [162] D. W. H. Swenson, S. Roet, N. Faruk. Contact Map Explorer, https://github.com/dwhswenson/contact_map, data dostępu: 20 listopada 2025.
- [163] W. Wang, Q. Liu, Q. Liu, W. A. Hendrickson. Conformational equilibria in allosteric control of Hsp70 chaperones. *Molecular Cell*, 81(19):3919–3933, 2021.
- [164] N. A. D. Bascos, M. P. Mayer, B. Bukau, S. J. Landry. The Hsp40 J-domain modulates Hsp70 conformation and ATPase activity with a semi-elliptical spring. *Protein Science*, 26(9):1838–1851, 2017.
- [165] C. H. M. Rodrigues, Y. Myung, D. E. V. Pires, D. B. Ascher. mCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein–protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 47(W1):W338–W344, 2019.
- [166] V. Gapsys, B. L. de Groot. pmx Webserver: A User Friendly Interface for Alchemistry. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(2):109–114, 2017.

- [167] V. Gapsys, S. Michielssens, D. Seeliger, B. L. de Groot. pmx: Automated protein structure and topology generation for alchemical perturbations. *Journal of Computational Chemistry*, 36(5):348–354, 2015.
- [168] D. Lowe, G. Bayarri. Mutation Free Energy Calculations using BioExcel Building Blocks (biobb) (jupyter notebook). WorkflowHub. <https://doi.org/10.48546/WORKFLOWHUB.WORKFLOW.55.1>. 2021.
- [169] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873):583–589, 2021.
- [170] The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D158–D169, 2016.
- [171] R. Fonseca. GetContacts, interaction analysis for molecular structures and ensembles, <https://getcontacts.github.io/>, data dostępu: 20 listopada 2025.
- [172] R. Fonseca. Flareplot, an open source library for visualizing and interactively exploring dynamically changing networks, <https://github.com/GPCRviz/flareplot>, data dostępu: 20 listopada 2025.
- [173] F. Pietrucci, A. Laio. A Collective Variable for the Efficient Exploration of Protein Beta-Sheet Structures: Application to SH3 and GB1. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(9):2197–2201, 2009.
- [174] C. Hunt, R. I. Morimoto. Conserved Features of Eukaryotic hsp70 Genes Revealed by Comparison with the Nucleotide Sequence of Human hsp70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(19):6455–6459, 1985.
- [175] W. Wang, W. A. Hendrickson. Intermediates in allosteric equilibria of DnaK-ATP interactions with substrate peptides. *Acta Crystallographica Section D*, 77(5):606–617, 2021.
- [176] P. Raiteri, A. Laio, F. L. Gervasio, C. Micheletti, M. Parrinello. Efficient Reconstruction of Complex Free Energy Landscapes by Multiple Walkers Metadynamics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(8):3533–3539, 2006.
- [177] A. Barducci, G. Bussi, M. Parrinello. Well-Tempered Metadynamics: A Smoothly Converging and Tunable Free-Energy Method. *Phys. Rev. Lett.*, 100:020603, 2008.

- [178] F. Chiappori, I. Merelli, L. Milanesi, G. Colombo, G. Morr. An atomistic view of Hsp70 allosteric crosstalk: from the nucleotide to the substrate binding domain and back. *Scientific Reports*, 6(1):23474, 2016.
- [179] A. Zhuravleva, L. M. Gierasch. Allosteric signal transmission in the nucleotide-binding domain of 70-kDa heat shock protein (Hsp70) molecular chaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17):6987–6992, 2011.
- [180] A. Nicolai, P. Delarue, P. Senet. Decipher the Mechanisms of Protein Conformational Changes Induced by Nucleotide Binding through Free-Energy Landscape Analysis: ATP Binding to Hsp70. *PLOS Computational Biology*, 9(12):1–20, 2013.
- [181] F. Chiappori, I. Merelli, G. Colombo, L. Milanesi, G. Morra. Molecular Mechanism of Allosteric Communication in Hsp70 Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *PLOS Computational Biology*, 8(12):1–15, 2012.
- [182] P. M. U. Ung, A. D. Thompson, L. Chang, J. E. Gestwicki, H. A. Carlson. Identification of Key Hinge Residues Important for Nucleotide-Dependent Allostery in *E. coli* Hsp70/DnaK. *PLOS Computational Biology*, 9(11):1–11, 2013.
- [183] C. S. Gässler, T. Wiederkehr, D. Brehmer, B. Bukau, M. P. Mayer. Bag-1M Accelerates Nucleotide Release for Human Hsc70 and Hsp70 and Can Act Concentration-dependent as Positive and Negative Cofactor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35):32538–32544, 2001.
- [184] I. J. General, Y. Liu, M. E. Blackburn, W. Mao, L. M. Gierasch, I. Bahar. ATPase Subdomain IA Is a Mediator of Interdomain Allostery in Hsp70 Molecular Chaperones. *PLOS Computational Biology*, 10(5):1–17, 2014.
- [185] A. Ahmad, A. Bhattacharya, R. A. McDonald, M. Cordes, B. Ellington, E. B. Bertelsen, E. R. P. Zuiderweg. Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(47):18966–18971, 2011.
- [186] R. Sousa, J. Jiang, E. M. Lafer, A. P. Hinck, L. Wang, A. B. Taylor, E. Guy Maes. Evaluation of competing J domain:Hsp70 complex models in light of existing mutational and NMR data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13):E734–E734, 2012.
- [187] G. Stetz, G. M. Verkhivker. Computational Analysis of Residue Interaction Networks and Co-evolutionary Relationships in the Hsp70 Chaperones: A Community-Hopping Model of Allosteric Regulation and Communication. *PLOS Computational Biology*, 13(1):1–34, 2017.

- [188] C. S. Gässler, A. Buchberger, T. Laufen, M. P. Mayer, H. Schröder, A. Valencia, B. Bukau. Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26):15229–15234, 1998.
- [189] R. G. Smock, O. Rivoire, W. P. Russ, J. F. Swain, S. Leibler, R. Ranganathan, L. M. Gierasch. An interdomain sector mediating allostery in Hsp70 molecular chaperones. *Molecular Systems Biology*, 6(1):414, 2010.
- [190] A. Zhuravleva, L. M. Gierasch. Substrate-binding domain conformational dynamics mediate Hsp70 allostery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22):E2865–E2873, 2015.
- [191] M. Olewniczak, M. Pitek, J. Czub, J. Marszalek, Ł. Nierzwicki, B. Tomiczek. Mechanism of Hsp70 activation: How J-domain proteins push for ATP hydrolysis. *PLOS Computational Biology*, 22(3):1–21, 2026.
- [192] L. Rohland, R. Kityk, L. Smalinskaite-Wolf, V. Lashkul, M. P. Mayer. A dynamic structural framework for the allosteric regulation of Hsp70 chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 301(9):110516, 2025.
- [193] M. C. R. Melo, R. C. Bernardi, C. de la Fuente-Nunez, Z. Luthey-Schulten. Generalized correlation-based dynamical network analysis: a new high-performance approach for identifying allosteric communications in molecular dynamics trajectories. *The Journal of Chemical Physics*, 153(13):134104, 2020.
- [194] T. Szyperski, M. Pellecchia, D. Wall, C. Georgopoulos, K. Wüthrich. NMR structure determination of the Escherichia coli DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24):11343–11347, 1994.
- [195] P. Genevaux, F. Schwager, C. Georgopoulos, W. L. Kelley. Scanning Mutagenesis Identifies Amino Acid Residues Essential for the in Vivo Activity of the Escherichia coli DnaJ (Hsp40) J-Domain. *Genetics*, 162(3):1045–1053, 2002.
- [196] A. S. Kamath-Loeb, C. Z. Lu, W. C. Suh, M. A. Lonetto, C. A. Gross. Analysis of Three DnaK Mutant Proteins Suggests That Progression through the ATPase Cycle Requires Conformational Changes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50):30051–30059, 1995.
- [197] S. J. Landry. Structure and Energetics of an Allele-Specific Genetic Interaction between dnaJ and dnaK: Correlation of Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift Perturbations in the J-Domain of Hsp40/DnaJ with Binding Affinity for the ATPase Domain of Hsp70/DnaK. *Biochemistry*, 42(17):4926–4936, 2003.

- [198] W. C. Suh, W. F. Burkholder, C. Z. Lu, X. Zhao, M. E. Gottesman, C. A. Gross. Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26):15223–15228, 1998.
- [199] Ł. Nierzwicki. Symulacje biomolekularne jako narzędzie do badania mechanizmów rozpoznania i wiązania pomiędzy białkami (Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska), 2019.
- [200] H. Y. Yu, T. Ziegelhoffer, J. Osipiuk, S. J. Ciesielski, M. Baranowski, M. Zhou, A. Joachimiak, E. A. Craig. Roles of Intramolecular and Intermolecular Interactions in Functional Regulation of the Hsp70 J-protein Co-Chaperone Sis1. *Journal of Molecular Biology*, 427(7):1632–1643, 2015.
- [201] W. Meng, E. M. Clerico, N. McArthur, L. M. Gierasch . Allosteric landscapes of eukaryotic cytoplasmic Hsp70s are shaped by evolutionary tuning of key interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(47):11970–11975, 2018.
- [202] A. Zhuravleva, E. M. Clerico, L. M. Gierasch. An Interdomain Energetic Tug-of-War Creates the Allosterically Active State in Hsp70 Molecular Chaperones. *Cell*, 151(6):1296–1307, 2012.
- [203] A. L. Lai, E. M. Clerico, M. E. Blackburn, N. A. Patel, C. V. Robinson, P. P. Borbat, J. H. Freed, L. M. Gierasch. Key features of an Hsp70 chaperone allosteric landscape revealed by ion-mobility native mass spectrometry and double electron-electron resonance. *Journal of Biological Chemistry*, 292(21):8773–8785, 2017.
- [204] W. A. Hendrickson. Theory of Allosteric Regulation in Hsp70 Molecular Chaperones. *QRB Discovery*, 1:e7, 2020.
- [205] F. K. Mahto, A. Bhattacharya, S. Bhattacharya. Molecular dynamics simulations shows real-time lid opening in Hsp70 chaperone. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 129:108726, 2024.

Dorobek naukowy

Publikacje naukowe

K. Hemine, A. Skwierawska, C. Kleist, **M. Olewniczak**, K. Szwarc-Karabyka, D. Wyrzykowski, A. Mieszkowska, J. Chojnacki, J. Czub, L. Nierzwicki; Effect of chemical structure on complexation efficiency of aromatic drugs with cyclodextrins: The example of dibenzazepine derivatives, *Carbohydr. Polym.* **2020**, 250, 116957

L. Nierzwicki, **M. Olewniczak**, P. Chodnicki, J. Czub; Role of cholesterol in substrate recognition by γ -secretase, *Sci. Rep.* **2021**, 11, 15213

M. Szadkowska*, **M. Olewniczak***, A. Kloska, E. Jankowska, M. Kapusta, B. Rybak, D. Wyrzykowski, W. Zmudzinska, A. Gieldon, A. Kocot, A. Kaczorowska, L. Nierzwicki, J. Makowska, T. Kaczorowski, M. Plotka; A Novel Cryptic Clostridial Peptide That Kills Bacteria by a Cell Membrane Permeabilization Mechanism, *Microbiol. Spectr.* **2022**, 10, e01657-22 (*-równy wkład)

O. Grabowska, K. Żamojć, **M. Olewniczak**, L. Chmurzyński, D. Wyrzykowski; Can sodium 1-alkyl-sulfonates participate in the sodium dodecyl sulfate micelle formation?, *J. Mol. Liq.* **2023**, 377, 121568

M. Głowacki, P. Niedziałkowski, J. Ryl, M. Prześniak-Welenc, M. Sawczak, K. Prusik, M. Ficek, M. Janik, K. Pyrchla, **M. Olewniczak**, K. Bojarski, J. Czub, R. Bogdanowicz; Enhancing colloidal stability of nanodiamond via surface modification with dendritic molecules for optical sensing in physiological environments, *J. Colloid Interface Sci.* **2024**, 674, 236–250

M. Jurkowski, M. Kogut, **M. Olewniczak**, J. Glinko, J. Czub; Large-scale conformational analysis explains G-quadruplex topological landscape *J. Phys. Chem. B* **2025**, 129(38), 9622–9632

M. Olewniczak*, M. Pitek*, J. Czub, J. Marszałek, L. Nierzwicki, B. Tomiczek; Mechanism of Hsp70 activation: How J-domain proteins push for ATP hydrolysis. *PLoS Comput. Biol.* **2026**, 22(3), e1014094 (*-równy wkład)

Doniesienia konferencyjne

M. Olewniczak, L. Nierzwicki, J. Czub; Influence of Presenilin H1-H2 Linker Mutations on the APP Processing by Gamma-Secretase, 64th Biophysical Society Meeting, San Diego, Stany Zjednoczone, 15-19.02.2020

L. Nierzwicki, **M. Olewniczak**, P. Chodnicki, J. Czub; Cholesterol-dependent substrate binding by Gamma-Secretase is governed by hydrophobic mismatch, 13th European Biophysics Conference, Wiedeń, Austria, 24-28.07.2021

M. Olewniczak, L. Nierzwicki, M. Plotka; Mechanism of action of antimicrobial peptide hidden in the structure of the LysC lytic enzyme, BioExcel Summer School on Biomolecular Simulations 2022, Pula, Włochy, 12-17.06.2022

M. Olewniczak, M. Pitek, L. Nierzwicki, J. Czub; Conformational changes of Hsp70 induced by substrate binding and ATP hydrolysis, 15th European Biophysics Conference, Rzym, Włochy, 30.06-04.07.2025

Podziękowania

Jeżeli jest ono [opowiadanie] pięknie i zgrabnie ułożone, to tego właśnie ja sam chciałem; jeżeli zaś małą ma wartość i jest przeciętne, to zrobiłem, co było w mej mocy. (2 Mch 15, 38)

Niniejsza dysertacja stanowi symboliczne podsumowanie mojej dziesięcioletniej pracy na Politechnice Gdańskiej. Patrząc na tę dekadę z ogromnym rozrzewnieniem i wdzięcznością. Ten czas był pełen niespodzianek, ciekawych odkryć (również o sobie!), trudnych wyzwań, drobnych sukcesów, otwierających oczy porażek, ciężkiej pracy, śmiechu i wylewanych łez: w tym wszystkim jednak nigdy nie byłem sam.

Przede wszystkim dziękuję Łukaszowi, który dostrzegł we mnie potencjał, kiedy ja sam go w sobie nie widziałem: za cierpliwie poświęcany mi czas i nauczanie mnie rzeczy znacznie wykraczających poza warsztat badacza. Dziękuję również profesorowi Jackowi Czubowi i całemu zespołowi Komputerowej Biofizyki Molekularnej za stworzenie środowiska, w którym mogłem rozwijać swoje pasje i za wsparcie w stawianiu pierwszych kroków w pracy naukowej.

Dziękuję moim Rodzicom, Rodzeństwu oraz Przyjaciołom za wspieranie mnie w moich codziennych zmaganiach i podejmowanych wyborach. Dziękuję Karolowi za nasze niekończące się rozmowy, jeszcze dłuższe spacerunki i każdy wspólny posiłek w przerwie między obowiązkami. Dziękuję Łukaszowi, który skutecznie zmotywował mnie do tego, aby pisanie doktoratu nie odwlekać na sam koniec: wziąłem sobie tę radę do serca! Dziękuję Taylor Swift, której muzyczna twórczość utrzymywała mnie przy zdrowych zmysłach w trakcie toczenia nierównej walki z uczelnianą rzeczywistością.

Na ręce ks. Roberta Zielińskiego i ks. Bartosza Adamskiego dziękuję przełożonym gdańskiego i toruńskiego seminarium za wspieranie mnie dobrym słowem, dodawanie otuchy i wiarę we mnie, szczególnie wtedy, gdy mi jej brakowało. Dziękuję moim Braciom za wyrozumiałe znoszenie mojej nieobecności, za każdą przysługę i za każdy obiad, który czekał na mnie w kuchni aż wrócę z uczelni.

Dziękuję wszystkim, których na tej drodze spotkałem: to dzięki Wam znalazłem się w miejscu, w którym jestem teraz i wyczekuję z niecierpliwością tego, co czeka mnie dalej.